

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y AGRONÓMICA DE LA
ANDROESTERILIDAD CITOPLÁSMICA RES1 EN GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) IDENTIFICADA EN LA ESPECIE
SILVESTRE *H. resinosus* Small.**

M. Mercedes ECHEVERRÍA

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

Unidad Integrada Balcarce

Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria - Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata

Balcarce, Argentina
Noviembre 2005

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y AGRONÓMICA DE LA
ANDROESTERILIDAD CITOPLÁSMICA RES1 EN GIRASOL (*Helianthus
annuus* L.) IDENTIFICADA EN LA ESPECIE SILVESTRE *H. resinosus*
Small.**

DIRECTOR: Ing. Agr. Raúl Horacio RODRÍGUEZ

CODIRECTOR: Ing. Agr. Elsa Lucila CAMADRO

EVALUADORES:

Ing. Agr. Alberto ACEVEDO

Ing. Agr. Alberto LEON

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e Instituciones que facilitaron la realización de esta tesis:

A Raúl H. Rodríguez por haberme motivado a iniciar este proyecto, por su guía constante, por alentarme en todo momento con su confianza y por permitirme que creciera con independencia.

A Elsa Camadro por su colaboración y sus sugerencias atinadas y valiosas.

A los evaluadores externos, Alberto Acevedo y Alberto León, por la lectura crítica y las sugerencias aportadas al manuscrito.

A Teresa Salaberry por brindarme su inestimable apoyo, desinteresados consejos e invaluables críticas constructivas. También por todas aquellas muestras de confianza y amistad.

A Fernando Castaño por su colaboración en algunos aspectos de este trabajo de tesis.

A Ana Estela Luchini, Serenella Sukno, Mónica Torres, Silvia Capezio, Raúl Faciglione, Germán Peluso y Eliseo Chaves por la ayuda incondicional brindada.

A todos los que frecuentan los laboratorios de Girasol, Genética y Nematología por su apoyo y las palabras de aliento para seguir en la lucha.

A todos los integrantes del Instituto de Genética *Edwald A. Favret* de INTA Castelar, particularmente a Pascual Franzone, Raúl Ríos y Fernando Ardila, por su desinteresada y amplia colaboración, al permitir la realización de parte de las tareas realizadas en ese Instituto, como así también por el cálido recibimiento.

A la empresa *Advanta Semillas* por permitirme utilizar el RMN.

A la Universidad Nacional de Mar del Plata por haber financiado la investigación a través de subsidios otorgados a proyectos de investigación, dentro del Grupo de Genética y Mejoramiento Genético del que participo.

A la Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por permitir que utilice sus instalaciones.

A la comunidad de la Facultad de Ciencias Agrarias –UNMdP- por haberme brindado la posibilidad de formarme, por el apoyo y la buena predisposición que encontré siempre que tuve que resolver algún inconveniente.

A mi familia por su paciencia y constante apoyo.

A todos los que con su hacer y saber hicieron posible la concreción de esta meta.

RESUMEN

Se propusieron los siguientes objetivos para conocer las características de la androesterilidad citoplásmica (CMS) RES1: 1) conocer la estabilidad de esta fuente y su expresión fenotípica, 2) conocer en qué estadio de la microgametogénesis se producen los sucesos que llevan a la androesterilidad, 3) identificar genotipos con capacidad de restaurar la androfertilidad, 4) conocer el modo de herencia de los genes *Rf*, responsables de la restauración de la androfertilidad 5) caracterizar el citoplasma RES1 por sus efectos sobre algunos caracteres agronómicos y sobre la aptitud combinatoria con respecto a estos caracteres, 6) determinar si existen cambios moleculares en la región comprendida entre *atp6-coxIII* del ADNmt.

La androesterilidad citoplásmica RES1 es estable y completa. Las plantas CMSRES1 presentan anteras más cortas que las de las plantas fértiles y escasa producción de granos de polen, que resultan inviables. El proceso meiótico se desarrolla normalmente, por lo que los sucesos que conducen a la androesterilidad son post-meióticos. Los genes *Rf* se encuentran en las especies hexaploides, *H. resinosus*, *H. pauciflorus*, *H. tuberosus* y *H.x laetiflorus* y estaría/n localizado/s en cromosomas de *H. resinosus*, homeólogos con los de *H. annuus*, por lo cual sería factible la transferencia de este/os gen/es al girasol cultivado. Las plantas CMSRES1 tienen un menor tamaño del capítulo que las plantas CMSPET1, pero la producción de semillas, y por lo tanto, la fertilidad femenina no se afecta. El citoplasma RES1 presenta diferencias estructurales en las áreas circundantes a los genes *atp9* y *coxIII* del ADNmt y se diferencia de los citoplasmas PET1 y MAX1 por la ausencia del *orfH522*.

El citoplasma RES1 es apropiado para ser utilizado en programas de producción de híbridos de girasol, si se logra transferir el gen *Rf*. De todas maneras, puede ser usado con éxito en programas de mejoramiento genético de girasoles ornamentales.

Palabras clave:

CMS, *Helianthus*, *H. resinosus*, *H. annuus*, restauración de la fertilidad del polen, *Rf*, aptitud combinatoria, ADNmt, *orfH522*

**GENETIC AND AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF THE CYTOPLASMIC
MALE-STERILITY RES1 IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) IDENTIFIED IN
THE WILD SPECIES *H. resinosus* Small.**

ABSTRACT

To better understand the agronomic characteristics of cytoplasmic male-sterility (CMS) RES1, the following objectives were proposed: 1) to determine the stability of this source and its phenotypic characteristics, 2) to identify the stage of microsporogenesis in which the events leading to the male-sterility take place, 3) to identify male-fertility restorer genotypes, 4) to find out the mode of inheritance of male-fertility restoration genes (*Rf*), 5) to characterize the RES1 cytoplasm for its effects on some agronomic characters and on the combining ability with regard to those characters, and 6) to determine if there are any changes in the region between the *atp6* and *coxIII* genes of the mtDNA.

The RES1 cytoplasmic male-sterility is complete and stable. In the CMSRES1 plants, a few and nonviable pollen grains are observed within the anthers, which generally remain inside the corolla. Meiosis proceeds normally so male-sterility is caused by alterations which take place in the post-meiotic stages. The *Rf* gen/es are found in the hexaploid species, *H. resinosus*, *H. x laetiflorus*, *H. tuberosus* and *H. pauciflorus* and would be located in chromosomes of *H. resinosus*, homeologous with those of *H. annuus*, by which it would be feasible to transfer this/ these gen/es in cultivated sunflower. CMSRES1 plants have smaller heads than CMSPET1 plants; however, seed set, and therefore, female fertility, are not affected. RES1 cytoplasm contains structural differences in the region near the *atp9* and *coxIII* genes of the mtDNA. Specifically, RES1 does not have *orfH522*, which is present in the mtDNAs of PET1 and MAX1 cytoplasms.

RES1 cytoplasm could be used in hybrid breeding programs when the *Rf* gen/es can be transferred. This cytoplasm can be successfully used in ornamental sunflower breeding programs.

Key words:

CMS, *Helianthus*, *H. resinosus*, *H. annuus*, pollen fertility restoration, *Rf*, combining ability, mtDNA, *orfH522*

INDICE

	Pág.
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de Figuras	x
Índice de Tablas	xii
Introducción	1
Revisión bibliográfica	7
Capítulo 1. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO CMSRES1	
Introducción	15
Materiales y métodos	17
Resultados	19
Discusión	24
Conclusiones	25
Capítulo 2. BÚSQUEDA DE GENOTIPOS CON CAPACIDAD DE RESTAURAR LA FERTILIDAD MASCULINA DE LAS PLANTAS CMSRES1	
Introducción	26
Materiales y métodos	28
Resultados	34
Discusión	37
Conclusiones	42

Capítulo 3. **CARACTERIZACIÓN DEL CITOPLASMA RES1 POR SUS EFECTOS SOBRE ALGUNOS CARACTERES AGRONÓMICOS Y LA APTITUD COMBINATORIA DE UNA LÍNEA ENDOCRIADA**

Introducción	43
Materiales y métodos	
1. CMSRES1 y caracteres de relevancia agronómica	46
2. Diferentes CMS (incluido RES1) y caracteres de relevancia agronómica	49
3. Diferentes CMS (incluido RES1) y aptitud combinatoria de la línea HA89	52
Resultados	
1. CMSRES1 y caracteres de relevancia agronómica	55
2. Diferentes CMS (incluido RES1) y caracteres de relevancia agronómica	59
3. Diferentes CMS (incluido RES1) y aptitud combinatoria de la línea HA89	62
Discusión	68
Conclusiones	73

Capítulo 4. **CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE LAS PLANTAS CMSRES1**

Introducción	74
Materiales y métodos	76
1. Amplificación mediante cebadores universales	77
2. Amplificación mediante cebadores específicos de girasol	80
3. Hibridaciones de tipo <i>Southern</i>	81

Resultados	
1. Amplificación mediante cebadores universales	82
2. Amplificación mediante cebadores específicos de girasol	86
3. Hibridaciones de tipo <i>Southern</i>	89
Discusión	98
Conclusiones	100
CONCLUSIONES FINALES	101
Bibliografía	104

Índice de Figuras

	Pág.
<p>Figura 1.1. Capítulos de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1 (A), HA89 B (B) y HA89 CMSPET1 (C)</p>	<p>2 0</p>
<p>Figura 1.2. Flores pistiladas de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1 (izquierda), HA89 B (centro) y HA89 CMSPET1 (derecha) (10x)</p>	<p>2 1</p>
<p>Figura 1.3. Anteras de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1 (A) (25x), HA89 B (B) (20x) y HA89 CMSPET1 (C) (25x)</p>	<p>2 2</p>
<p>Figura 4.1. Polimorfismos de los fragmentos amplificados con <i>rpS14-cob</i>, <i>coxIII</i> y <i>nad4</i>, exones 2-4, digeridos con las enzimas de restricción <i>HpaII</i> y <i>HaeIII</i> en las líneas isoplásmicas de girasol HA89 fértil (B) y HA89 androestéril (CMS PET1 y RES1)</p>	<p>8 5</p>
<p>Figura 4.2. Productos de la amplificación obtenidos con el cebador específico de girasol <i>orfH522</i> en las líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y HA89 androestéril (CMS PET1, RES1 y MAX1) y en la línea androestéril RHA271 CMSRES1).</p>	<p>8 7</p>
<p>Figura 4.3. Productos de la amplificación obtenidos con el sistema triple de cebadores específicos de girasol en las líneas isoplásmicas de girasol, RHA271 fértil (B) y androestéril (CMSRES1), RHA801 fértil (B) y androestéril (CMSRES1) y HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1, MAX1 y PET2)</p>	<p>8 8</p>
<p>Figura 4.4. <i>Southern blots</i> obtenidos con la sonda <i>atpA</i> en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1 y PET1). (A) ADN digerido con la enzima de restricción <i>Sall</i>. (B) ADN digerido con la enzima de restricción <i>BglII</i></p>	<p>9 3</p>

Figura 4.5. <i>Southern blot</i> obtenido con la sonda <i>atpA</i> en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMSRES1); ADN digerido con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	9
	4
Figura 4.6. <i>Southern blots</i> obtenidos con la sonda <i>atp9</i> en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1 y PET1). (A) ADN digerido con la enzima de restricción <i>HinDIII</i> . (B) ADN digerido con la enzima de restricción <i>Eco RI</i>	9
	5
Figura 4.7. <i>Southern blot</i> obtenido con la sonda <i>coxIII</i> en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1 y PET1); ADN digerido con la enzima de restricción <i>BglII</i>	9
	6
Figura 4.8. <i>Southern blot</i> obtenido con la sonda <i>orfH522</i> en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1, PET1 y MAX1); ADN digerido con la enzima de restricción <i>BglII</i>	9
	7

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Análisis de diferentes estadios meióticos en las líneas endocriadas androfértiles y androestériles	2 3
Tabla 2.1. Líneas endocriadas de girasol evaluadas como fuentes de restauración de la fertilidad masculina de plantas CMSRES1	3 0
Tabla 2.2. Poblaciones diploides derivadas de cruzamientos entre el girasol cultivado y especies silvestres, evaluadas como fuentes de restauración de la fertilidad masculina de plantas CMSRES1	3 1
Tabla 2.3. Especies silvestres de girasol evaluadas como fuentes de restauración de la fertilidad masculina de plantas CMSRES1	3 2
Tabla 2.4. Porcentaje de granos de polen no abortados de plantas F ₁ (HA89 x especies hexaploides)	3 5
Tabla 3.1. Citoplasmas que producen androesterilidad evaluados por el efecto sobre algunos caracteres de relevancia agronómica	5 0
Tabla 3.2. Valores promedios de los caracteres evaluados en las cuatro líneas endocriadas, androfértiles y androestériles, en los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00	5 6
Tabla 3.3. Valores promedios de los caracteres evaluados en las dos condiciones de fertilidad, androesterilidad y androfertilidad, y de las cuatro líneas endocriadas, en los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00	5 8
Tabla 3.4. Valores promedios de los caracteres evaluados en las siete líneas isoplásmicas HA89, en los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00	6 1

Tabla 3.5. Análisis de variancia de los caracteres evaluados en siete líneas endocriadas isoplásmicas HA89 androestériles, siete líneas endocriadas utilizadas como progenitores masculinos y las F ₁ , en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00	6 4
Tabla 3.6. Valores promedios de los caracteres evaluados en siete líneas endocriadas isoplásmicas HA89 androestériles, de siete líneas endocriadas utilizadas como progenitores masculinos y las F ₁ , en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00	6 4
Tabla 3.7. Valores promedios de los caracteres evaluados en las siete líneas endocriadas isoplásmicas HA89 androestériles y de su aptitud combinatoria general, en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00	6 6
Tabla 4.1. Líneas endocriadas utilizadas en el estudio molecular del citoplasma RES1	7 7
Tabla 4.2. Cebadores y condiciones de ciclado utilizados en las reacciones de amplificación por PCR	7 8
Tabla 4.3. Bandas obtenidas por la amplificación de diferentes cebadores (expresada en pb) en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestériles (CMS PET1 y RES1)	8 3
Tabla 4.4. Tamaño de las bandas (expresado en Kb) obtenidas por hibridación del tipo <i>Southern</i> , con diferentes combinaciones de sondas y enzimas de restricción en las líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS PET1, RES1, MAX1 y PET2), RHA271 fértil (B) y androestéril (CMSRES1), RHA801 fértil (B) y androestéril (CMSRES1)	9 1

INTRODUCCIÓN

Según evidencias arqueológicas, el girasol (*Helianthus annuus* L.) comenzó a ser utilizado por los aborígenes nativos que habitaban lo que actualmente es EEUU aproximadamente 3.000 años AC, como alimento, medicina y fuente de aceite y pigmentos para las ceremonias (Tang y Knapp 2003). Su domesticación a partir de poblaciones silvestres, probablemente se haya originado en las grandes planicies americanas de Arizona y Nuevo México (Cronn *et al.* 1977). Luego del arribo de los españoles a América, esta especie fue introducida en Europa durante el siglo XVI como ornamental. En el siglo XVII, llega al este de Europa, Hungría, y en el siglo XVIII a Rusia, donde es considerada como una especie oleaginosa. Luego se expandió rápidamente y se comenzaron las tareas propias del mejoramiento genético. En la década de 1880, algunos cultivares de origen europeo fueron introducidos en EEUU, donde se utilizaron con doble propósito, para forraje y para la obtención de aceite. Una vez que se conoció el fenómeno de la heterosis en maíz, se comenzaron a diseñar esquemas de producción de híbridos de girasol. En la década de 1960 se dieron dos sucesos que tuvieron un marcado efecto en este cultivo y su industrialización. Tales sucesos fueron, por un lado, la introducción en EEUU de cultivares rusos con un grado de madurez similar al de los que se cultivaban pero con mayor contenido de aceite y, por el otro, el hallazgo de una fuente de androesterilidad citoplásmica (CMS) por Leclercq (1969) y, posteriormente, la identificación de genes de restauración de la fertilidad masculina (Kinman 1970; Enns *et al.* 1970; Leclercq 1971; Vrânceanu y Stoenescu 1971). La detección de un sistema de androesterilidad genético-citoplásmica llevó a que el mecanismo de producción de semilla híbrida fuese rápidamente adoptado ya que los rendimientos logrados con los cultivares híbridos fueron superados debido al fenómeno de la heterosis (Putt 1997).

De acuerdo a los datos aportados por la Asociación Argentina de Girasol, ASAGIR, en nuestro país la evolución del cultivo de girasol puede dividirse en cinco etapas (www.asagir.org.ar/historia.asp):

La primera etapa es conocida como de **cultivo pre-industrial**, donde las referencias se remontan al siglo XIX cuando los colonos de origen hebreo realizaron las primeras introducciones de semillas para su propio consumo. A partir de 1900, los agricultores de la Jewish Colonization Association se encargaron de su difusión como cultivo, sin fines comerciales, sólo para atender las necesidades del consumo de sus semillas tostadas.

En el período de 1930 a 1949 se dio la etapa de **gran expansión como cultivo oleaginoso**. La primera información estadística del área sembrada data del período agrícola 1928/29 con 400 ha y veinte años después tuvo lugar el primer récord de superficie sembrada, 1.800.000 ha, superficie que fue superada recién en 1978/79 con 2.200.000 ha. Paralelamente a la expansión del cultivo de girasol y a causa de las guerras mundiales con la consecuente falta de aceite, se produjo la industrialización del grano y el consumo del aceite de esta especie en sustitución de otros.

Posteriormente sobrevino una etapa de **crisis**, entre 1950 y 1960, causada por factores económicos y sanitarios. Las enfermedades fueron las principales causales de esta etapa crítica en la evolución del cultivo.

En una cuarta etapa, entre 1960 y 1975, y gracias al aporte del mejoramiento genético que produjo variedades de polinización abierta de buen desempeño, se logró un aumento en los rendimientos con lo que se dio una **recuperación del cultivo**. En 1972 se liberó el primer girasol híbrido, Dekalb G-104, producido con el sistema de androesterilidad genética y al año siguiente se introdujeron en el mercado los híbridos logrados por androesterilidad genética-citoplásmica.

La última etapa, definida a partir de 1975 y hasta nuestros días, se caracteriza por la **difusión de los híbridos**. Los excelentes resultados logrados con los mismos, especialmente en cuanto a rendimiento, han determinado que este tipo de cultivar sea el único que se siembra en la Argentina. Prueba de ello son los datos estadísticos que revelan que el rendimiento se duplicó en diez años: en el ciclo agrícola 1974/75 fue de 728 k/ha mientras que en el 1984/85 fue de 1.441 k/ha (www.sagpya.mecon.gov.ar/agricu/agricultura.htm).

El girasol constituye una de las cuatro fuentes más importantes de aceite vegetal a nivel mundial, junto con la soja, la colza y la palma. Alrededor del 80% del precio del grano de girasol queda determinado en el mercado mundial de grasas y aceites. En los últimos años, la producción mundial de granos de girasol ha oscilado entre 23 y 25.000.000 tn. Finalizando la década de 1990, la Argentina se constituyó en el primer productor mundial de granos y también se ubicó como primer exportador mundial con 1.700.000 tn de aceite (sobre un total de 3.000.000 tn comercializadas en el mundo). En este contexto, la Argentina jugó un rol relevante ya que tenía 60% de participación en el mercado internacional de la producción mundial de aceite de girasol, mientras que en el de soja participaba sólo con 39%. Posteriormente, al aumentar la demanda de proteína vegetal con el consiguiente incremento de la producción de soja, merced a la introducción de los cultivares genéticamente modificados, la oferta de aceites resultó muy importante. Como resultado de ello, se produjo una sensible caída de los precios del girasol y su cultivo se vio desplazado a ambientes agronómicamente menos favorables, lo que lo hizo menos productivo. En el período comprendido entre 1999 y 2004, la superficie destinada al cultivo se estabilizó entre 1.800.000 y 2.000.000 ha, la producción osciló entre 3.400.000 y 3.800.000 tn y entre el 65 y 75% de los granos se exportaron como aceite crudo, a granel y "pellet" y en menor proporción como grano o como aceite refinado envasado, generando importantes ingresos anuales. Si a estos

datos se agrega que el 70% del aceite consumido por la población argentina es procesado a partir de esta oleaginosa, queda reflejada la importancia de este cultivo en el país (www.asagir.org.ar; www.sagpya.mecon.gov.ar/agricu/agricultura.htm).

Como se dijo anteriormente, el desarrollo de los híbridos de girasol para explotar el efecto de heterosis fue posible al identificarse la primera fuente CMS encontrada en la especie silvestre *H. petiolaris*, denominada CMSPET1 y posteriormente, los genes de restauración de la fertilidad del polen. El sistema CMSPET1 se convirtió en una herramienta muy eficiente para la producción comercial de semilla híbrida a gran escala. En la actualidad, más del 90% de la producción mundial proviene de híbridos que poseen este sistema de androesterilidad. Sin embargo, la utilización de una única fuente de androesterilidad implica un riesgo potencial por la vulnerabilidad de tan estrecha base genética (Whelan 1980; Havekes *et al.* 1991). Por ejemplo, ante el desarrollo de una nueva raza de un patógeno específica para un citoplasma, se pueden tener resultados adversos. Esto quedó claramente demostrado cuando se utilizaba el citoplasma T (Texas) como fuente de androesterilidad, en el 85% de la producción mundial de semillas híbridas de maíz. En 1970, se desató en EEUU una devastadora epidemia del tizón sureño de la hoja de maíz, causado por el hongo *Helminthosporium maydis*, raza T (Scheifele *et al.* 1970) que se inició en el estado de Florida y luego se expandió a otros estados de este país, llegando hasta el sur de Canadá. En el mismo año, en Sudáfrica también hubo un daño severo causado por el ataque de la misma raza del hongo, mientras que en Brasil los daños fueron moderados. Así quedó demostrado que el citoplasma T de maíz era altamente susceptible a esta raza del hongo. Las pérdidas de rendimiento en los híbridos de maíz portadores del citoplasma Texas fueron muy importantes y se tradujeron en grandes pérdidas en la producción de granos a nivel mundial (Wise *et al.* 1999). Debido a esto, se dejó de utilizar el sistema de androesterilidad para la producción de

híbridos (Ullstrup 1972).

Considerando que en las especies silvestres del género *Helianthus* existen diversos caracteres heredables de interés agronómico, como por ejemplo, resistencia a enfermedades y factores de calidad de la semilla (Seiler 1988; Henn *et al.* 1997), se pueden desarrollar genotipos del girasol cultivado portadores de dichos caracteres a partir de cruzamientos interespecíficos (Skoric 1993; Rönicke *et al.* 2004). Con estos cruzamientos no sólo se busca incrementar la variabilidad genética y responder así a la demanda de adaptación a distintos ambientes y condiciones extremas, sino que además es posible ampliar la estrecha base genética generada por el uso casi exclusivo de CMSPET1 en la producción de los cultivares híbridos que se comercializan en el mundo. Esta vulnerabilidad genética que presentan los cultivares de girasol por el uso de una sola fuente CMS, determinó que varios grupos de investigación se hayan dedicado a la búsqueda y el desarrollo de nuevos sistemas de androesterilidad. Hasta el presente, se han identificado 70 fuentes CMS, derivadas de 16 especies de *Helianthus*, pero sólo se han encontrado los genes de restauración de la fertilidad para 38 de estas fuentes y no siempre dicha restauración es total (Serieys 2002). En este marco, en la Unidad Integrada Balcarce (UIB), INTA-FCA, UNMdP, se desarrolló un programa de hibridación interespecífica entre el girasol cultivado y la especie silvestre *H. resinosus*, seguido de una serie de retrocruzas, utilizando al girasol cultivado como padre recurrente. Luego de cuatro retrocruzas se produjeron plantas androestériles, lo cual sugirió que se había encontrado una fuente de androesterilidad proveniente de *H. resinosus* (Rodríguez y Pereyra 1993). Siguiendo las normas FAO, esta fuente de androesterilidad citoplásmica fue designada CMSRES1 (Rodríguez *et al.* 1996; Serieys 2002) ya que constituye la primera fuente CMS hallada en dicha especie.

Dado el hallazgo del citoplasma CMSRES1 que confiere androesterilidad y

debido a la importancia que reviste conocer más detalladamente sus características para decidir si sería eficiente su utilización en la producción de híbridos de girasol, es que en la presente tesis se estudiaron distintos aspectos relacionados con este citoplasma.

La **hipótesis** de trabajo planteada fue que la fuente de androesterilidad citoplásmica de girasol RES1 presenta características agronómicas y genéticas favorables para ser utilizada en la producción de híbridos.

Los **objetivos** propuestos para realizar una caracterización de la androesterilidad citoplásmica RES1 fueron:

- Conocer la estabilidad de dicha fuente y su expresión fenotípica.
- Conocer en qué estadio de la microgametogénesis se producen los sucesos que llevan a la condición de androesterilidad.
- Identificar genotipos con capacidad de restaurar la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1.
- Conocer el modo de herencia de la restauración de la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1, en caso de que se detecten genes de restauración en los genotipos evaluados.
- Caracterizar el citoplasma RES1 por sus efectos sobre algunos caracteres agronómicos y sobre la aptitud combinatoria, con respecto a estos caracteres, de una línea endocriada.
- Determinar si existen cambios moleculares, con respecto a CMSPET1 y CMSMAX1, situados en la región comprendida entre los genes *atp6* y *coxIII* del genoma mitocondrial de las plantas CMSRES1.

REVISION BIBLIOGRAFICA

El género *Helianthus* pertenece a la familia *Asteraceae* de las Compuestas e incluye especies diploides, tetraploides y hexaploides, las que tienen un número básico de 17 cromosomas. Este género comprende 49 especies (13 anuales y 36 perennes), cuyo centro de origen es América del Norte (Schilling y Heiser 1981). La clasificación taxonómica de las especies es compleja dado que ocurre hibridación natural e introgresión entre muchas de ellas y además presentan una gran variación fenotípica que puede ser atribuida tanto a componentes genéticos como ambientales. La última clasificación morfológica e infragenérica, propuesta por Schilling y Heiser (1981), constituye el estudio taxonómico de mayor referencia y divide al género en cuatro secciones (*Helianthus*, *Agrestes*, *Ciliares* y *Atrorubens*) y seis series. Así, el girasol cultivado, *H. annuus* ($2n=2x=34$, anual), pertenece a la sección *Helianthus* mientras que *H. resinosus* Small. ($2n=6x=102$, perenne) queda incluido en la sección *Atrorubens*, serie *Corona-solis*.

La androesterilidad, que se define como la incapacidad de producir granos de polen funcionales, se ha observado en más de 150 especies vegetales (Schnable y Wise 1998). Ha sido clasificada como genética, citoplásmica o genética-citoplásmica, de acuerdo a su modo de herencia, ya que puede estar codificada por genes nucleares, citoplásmicos o ambos interactuando. En varias especies, la androesterilidad genética-citoplásmica constituye un excelente modelo para estudiar la interacción de factores nucleares y citoplásmicos, ya que los efectos de esterilidad inducidos por el citoplasma son contrarrestados por los de los genes nucleares restauradores de la fertilidad.

En el girasol, se ha determinado la existencia de todos los tipos de androesterilidad propuestos, genética (NMS), citoplásmica (CMS) y genética-

citoplásmica. Generalmente, el responsable de la NMS es un único gen recesivo. Por consiguiente, al cruzar una línea NMS con otra línea endocriada androfértil, la progenie F_1 resulta 100% androfértil. Vrânceanu (1970) al estudiar 10 líneas NMS, determinó la existencia de cinco genes diferentes, *ms1* a *ms5*. Con posterioridad, Jan y Rutger (1988) aplicaron estreptomycin y mitomicina C, como agente mutagénico, para inducir androesterilidad en la línea endocriada HA89. Aislaron siete líneas NMS en las que posteriormente se determinó la existencia de otros cuatro genes diferentes, *ms6* a *ms9* (Jan 1992). Se ha determinado que el gen *ms8* controla estadios de desarrollo que afectan a los órganos tanto femeninos como masculinos, mientras que los restantes genes afectan solamente los masculinos (Jan 1997).

En el caso de la androesterilidad citoplásmica, su origen ha sido establecido por mutaciones citoplásmicas espontáneas en *H. annuus* - como por ejemplo el CMSANT1 o Fundulea (Vrânceanu *et al.* 1986) - o por mutaciones en otras especies del género *Helianthus*. En este último caso, y con el fin de obtener plantas de *H. annuus* androestériles, se reemplaza el citoplasma de *H. annuus* por el citoplasma proveniente de la especie portadora de la mutación. La primera fuente CMS de este tipo se detectó en la progenie producida a partir del cruzamiento entre el girasol cultivado y *H. petiolaris* (Leclercq 1969) y se la denominó CMSPET1. Luego, se detectaron numerosas fuentes de androesterilidad citoplásmicas en ésta y otras especies silvestres del género (Serieys y Vincourt 1987). De las 70 fuentes CMS disponibles en la actualidad, 38 fueron encontradas en poblaciones silvestres de *H. annuus*, de las cuales 26 fuentes han aparecido espontáneamente, mientras que las otras 12 restantes surgieron de tratamientos mutagénicos. Las restantes 32 fuentes tuvieron su origen en otras especies silvestres, tanto anuales como perennes y fueron detectadas a partir de cruzamientos interéspecíficos con el girasol cultivado (Serieys 2002).

En la búsqueda de nuevas fuentes CMS y ante las demandas del mercado

argentino que requería mejorar el girasol cultivado específicamente en cuanto a su comportamiento frente a la podredumbre del capítulo ocasionada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, se inició en la UIB un programa de hibridación entre el girasol cultivado y algunas especies silvestres. El resultado de cruzamientos realizados entre plantas de la especie perenne *H. resinosus* ($2n=6x=102$), introducción MPHE 243 (código INRA) = PI 435864 (código USDA) y plantas de una línea endocriada de *H. annuus* fue una F_1 tetraploide parcialmente androfértil. Posteriormente, se realizaron cuatro retrocruzadas (RC), utilizando como padre recurrente a *H. annuus*, con el fin de obtener plantas diploides con el citoplasma de *H. resinosus*. Todas las plantas obtenidas en la generación RC_4 fueron diploides y androestériles. Esta condición quedó demostrada por la incapacidad para producir polen, lo cual sugirió que se había encontrado la primera fuente de androesterilidad detectada en *H. resinosus*, CMSRES1 (Rodríguez y Pereyra 1993). El esquema de trabajo seguido para la obtención de las plantas androestériles fue el siguiente (R. H. Rodríguez, com. pers.):

H. resinosus (MPHE243) (♀) x *H. annuus* (RHA298) (♂)

$2n=6x=102$

$2n=2x=34$



F₁ $2n=4x=68$, citoplasma de *H. resinosus*

Libre polinización

F₁ x F₁

F₁ (♀) x *H. annuus* (♂)



~~F₂~~
 ~~$2n=4x=68$~~

RC₁ (♀) x *H. annuus* (SR3) (♂)

$2n=3x=51$



RC₂ (♀) x *H. annuus* (B1) (♂)

$2n=38-43$



RC₃ (♀) x *H. annuus* (RHA298) (♂)

$2n=34-39$



RC₄

$2n=2x=34$

citoplasma de *H. resinosus*

Plantas androestériles, CMSRES1

En este esquema, RHA298 y SR3 son líneas endocriadas que restauran la fertilidad del polen de CMSPET1, mientras que B1 es un compuesto de líneas mantenedoras de la androesterilidad de CMSPET1 formado por el cruzamiento controlado entre ocho líneas androfértiles originadas en EEUU.

Una fuente CMS debe reunir determinadas características para que sea eficiente su utilización en programas de producción de híbridos de girasol. La androesterilidad debe ser completa y estable en diferentes ambientes y deben existir genes, de fácil transferencia, que restauren la fertilidad masculina. La fuente CMSANT1 o Fundulea, por ejemplo, no es utilizada ya que sólo se han identificado genes que restauran la fertilidad de manera incompleta. Las plantas portadoras de este sistema de androesterilidad presentan entre 60 y 90% de granos de polen fértiles (Serieys 2002).

Un citoplasma que confiera androesterilidad no debe manifestar interacciones con los genes nucleares que determinen una menor aptitud de los individuos. En el girasol se conocen ejemplos de interacciones entre genes nucleares y citoplásmicos con respecto a la expresión de caracteres cuali y cuantitativos de relevancia económica. En esos trabajos de investigación, se han realizado algunas comparaciones entre líneas fértiles y líneas androestériles. Por ejemplo, Petrov (1992) estudió el efecto de los citoplasmas que condicionan androesterilidad, PET2, ANN1 y ANT1, sobre algunos caracteres agronómicos de relevancia económica y determinó que sólo el citoplasma PET2 no tiene ningún efecto sobre los caracteres evaluados. Jan (1997) sustituyó el citoplasma de la línea HA89 por los citoplasmas RIG1 y MAX2 y observó un efecto citoplásmico de reducción del vigor de las plantas. Marinkovic *et al.* (2000) compararon los citoplasmas PET1 y ANN5 y encontraron que ambos citoplasmas tienen efectos positivos sobre el rendimiento y la altura de las plantas.

Las plantas de una línea endocriada androestéril deben ser ginofértiles y exhibir una buena aptitud agronómica en combinación con diferentes líneas para la creación

de híbridos. Varios autores han estudiado la aptitud combinatoria de algunas líneas endocriadas de girasol con diferentes citoplasmas que condicionan la androesterilidad (Serieys 1992, 1997, 1999; Marinkovic *et al.* 2000; Patil 2003). A partir de estos trabajos se concluye que los citoplasmas tienen diferentes efectos sobre la expresión de los caracteres cuantitativos, dependiendo del genotipo en que estén incorporados.

A menudo es difícil identificar las secuencias génicas responsables de la androesterilidad genética-citoplásmica ya que están asociadas al ADN extracromosómico. Sin embargo, varios investigadores han caracterizado los citoplasmas que condicionan la androesterilidad y aquellos que permiten que la planta sea androfértil, mediante el análisis del genoma mitocondrial (ADNmt), han podido identificar marcos abiertos de lectura (*orf*) que se generan como productos de eventos de recombinación, constituyendo éste un mecanismo evolutivo importante reservado a los vegetales (Budar *et al.* 2003). En el girasol, el citoplasma más estudiado desde el punto de vista molecular ha sido PET1. Brown *et al.* (1986, citado por Jan 1997), al encontrar un plásmido circular de 1,45 Kb en el genoma mitocondrial de cuatro líneas androfértiles y detectar su ausencia en las correspondientes líneas CMSPET1, sugirieron que el ADNmt estaría involucrado en la expresión de la androesterilidad. Posteriormente, Sicutella y Palmer (1988), al comparar la organización física y la transcripción del ADNmt de líneas isonucleares, fértiles y androestériles (CMSPET1), encontraron una única diferencia en una región de 17 Kb en la que detectaron dos mutaciones: una inversión de 12 Kb y una inserción de 5 Kb. Estos cambios se localizaron en la región flanqueante 3' del *locus atpA*, siendo éste el único transcripto mitocondrial en que difirieron las líneas isonucleares. Horn *et al.* (1991) y Moneger *et al.* (1994) asociaron la condición de androesterilidad con la inserción del *orfH522* en la región 3' del gen *atpA*, que produce la síntesis de una nueva proteína de 15 KDa, responsable de tal fenotipo. Posteriormente, Horn *et al.* (1996) y Horn y Friedt (1999)

encontraron este mismo arreglo al analizar otros nueve sistemas CMS de distinto origen. Estos autores concluyeron que, si bien los cambios estructurales responsables de esta condición son diferentes y están involucrados en la síntesis de proteínas específicas de cada fenotipo, la región involucrada está entre los genes *atp6* y *coxIII* del genoma mitocondrial. Más tarde, Horn (2002) analizó 28 fuentes CMS diferentes a partir de datos de similitud genética obtenidos de los patrones de hibridación del tipo Southern, utilizando nueve genes mitocondriales conocidos y tres *orf* como sondas. Así, pudo distinguir 10 grupos diferentes en los que quedaron clasificados los 28 citoplasmas analizados.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel que juegan las mitocondrias en el desarrollo de la androesterilidad citoplásmica. Están basadas en que la mayor demanda energética que se requiere durante el proceso de la microsporogénesis, no es proporcionada por las mitocondrias del tejido floral de las plantas CMS debido a los cambios que se han producido en el ADNmt y por lo tanto, que conducen al aborto del polen. Veal (1984) postula que la energía no utilizada por las plantas androestériles CMS-PET1 en la producción de polen contribuye a una mayor producción de semillas y mayor contenido de aceite, cuando se las compara con las plantas de las líneas fértiles. Balk y Leaver (2001) atribuyen la androesterilidad en girasol, provocada por el citoplasma PET1, a la muerte prematura de las células del tapete, como consecuencia de la incapacidad de satisfacer la alta demanda energética. En el tapete, la muerte programada de las células está asociada a proteínas que se activan prematuramente por un mal funcionamiento mitocondrial. Ellos propusieron denominar este modelo como de "pérdida de función". Hay evidencias citológicas, metabólicas y moleculares de que existe una alta demanda energética durante la gametogénesis masculina, que se ajustan al modelo de "pérdida de función" que considera a la androesterilidad como una mutación mitocondrial.

Budar y Pelletier (2001) demostraron que el número de mitocondrias se incrementa varias veces en las microsporas y en las células del tapete y además los niveles de expresión de genes nucleares y mitocondriales que codifican subunidades de enzimas respiratorias varían notablemente durante la maduración del polen. Leipner y Horn (2002) también observaron cambios en la expresión de proteínas asociadas a la androesterilidad del girasol. Tales proteínas se localizan en el sistema de membranas mitocondriales e intervienen en la respiración. Por otro lado, Sabar *et al.* (2003) observaron que la actividad ATPasa en las plántulas de los híbridos se incrementa en comparación con las plántulas fértiles y estériles. Esto lleva a especular que el incremento de la actividad o eficiencia de la F_1F_0 -ATP sintetasa en la progenie F_1 híbrida puede contribuir al fenómeno conocido como vigor híbrido, una de las metas del mejoramiento genético vegetal.

CAPITULO 1

CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO CMSRES1

INTRODUCCIÓN

La esterilidad masculina debe ser completa y estable en diferentes ambientes para que una fuente de androesterilidad citoplásmica sea considerada en un programa de producción de híbridos.

Distintas irregularidades se pueden presentar en cualquiera de las etapas del proceso de formación de los granos de polen que conducen a variaciones en la producción y en la viabilidad de los granos de polen. Larsen y Lersten (1972) dividieron el proceso de formación de los granos de polen en ocho etapas, encontrando diferentes irregularidades en cualquiera de ellas:

1. célula madre de la microspora
2. meiosis I y meiosis II
3. tétrada
4. microspora inmadura, no vacuolada
5. microspora vacuolada
6. polen vacuolado
7. polen binucleado
8. polen trinucleado

Posteriormente, Frankel y Galun (1977) presentaron un esquema similar en el que pueden darse distintas irregularidades como asinapsis, desinapsis, ausencia de citocinesis. Tales irregularidades se pueden dar en la diferenciación estructural del androceo, por ejemplo, que no exista algún órgano floral. También se pueden producir

alteraciones en el desarrollo del microsporangio o de la antera, irregularidades en el proceso meiótico o en la microsporogénesis, alteraciones en la microgametogénesis o en la maduración del polen que conducen al aborto del microgametofito o bien, problemas en la dehiscencia de la antera (Frankel y Galun 1977).

En la literatura, se encuentran trabajos en los que se analiza el proceso meiótico de la microsporogénesis en plantas androestériles de girasol, siendo las plantas portadoras de CMSPET1 las más estudiadas. Paun (1974) observó dos comportamientos diferentes en las cuatro líneas CMSPET1 analizadas. En algunos casos, las células del tejido esporógeno degeneraban antes del inicio de la meiosis y no producían polen mientras que en otros, la meiosis era normal y la degeneración ocurría después de que las microsporas eran liberadas de las tétradas. En las correspondientes líneas B androfértiles, el proceso meiótico y el desarrollo de los granos de polen fueron normales, como era de esperar. Posteriormente, Whelan y Dedio (1980) determinaron que las plantas CMSPET2 y CMSGIG1 producen anteras indehiscentes y granos de polen blancos que no germinan, mientras que las plantas CMSMAX1 presentan vestigios de anteras, que contienen granos de polen pequeños o están vacías. Más tarde, Vrânceanu *et al.* (1986) observaron que el aborto de las células esporógenas en las plantas CMSANT1 fue pre-meiótico y no se desarrollaban las anteras. Atlagic *et al.* (1996) analizaron el comportamiento de los citoplasmas que confieren androesterilidad PET1, PET2, GIG1, MAX1, ANN5, ANN6 y ANN14 incorporados en cinco líneas endocriadas. Concluyeron que las fuentes CMS eran estables, excepto PET2 y GIG1. Además, detectaron diferencias en las etapas de la meiosis o de la microsporogénesis en el que se produjeron los sucesos que determinaron la androesterilidad. En las plantas CMSPET1 y CMSANN5 no se produjo la división meiótica, mientras que la meiosis fue normal en las plantas con las otras fuentes CMS, observándose microsporas liberadas de las tétradas, de manera que los

sucesos que condujeron al aborto de los granos de polen fueron post-meióticos.

Por otro lado, varios autores han concluido que la androesterilidad de las plantas CMSPET1 está asociada con la degeneración del tapete y/o con la falta de desarrollo de los granos de polen. Por lo tanto, las irregularidades ocurridas en las plantas CMSPET1 serían post-meióticas (Horner 1977; Whelan 1978; Laveau *et al.* 1989; Kini *et al.* 1994; Schnable y Wise 1998; Balk y Leaver 2001).

Los objetivos de este trabajo fueron determinar si la androesterilidad citoplásmica RES1 es estable y completa y conocer su expresión fenotípica y el estadio de la microgametogénesis en que se producen los sucesos que llevan a la expresión del carácter en dichas plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la generación RC₄, cuya obtención se describió en la sección ANTECEDENTES, se inició un segundo programa de retrocruzas para incorporar el citoplasma RES1 en diferentes líneas endocriadas de uso comercial. Para ello, se realizaron retrocruzamientos entre las plantas RC₄ ($2n=2x=34$, citoplasma *H. resinusus*) androestériles y las líneas endocriadas androfértiles HA89 B, RHA271, RHA274 y RHA801, siendo éstas los progenitores recurrentes. Se realizaron entre seis y ocho retrocruzas, dependiendo de las líneas endocriadas. Todas las generaciones de retrocruzamientos se obtuvieron en la UIB, Buenos Aires, Argentina (37°45`S – 58°18`O), excepto la RC₃ que se obtuvo en Yuto, Jujuy, Argentina (23°59`S – 64°30`O). Finalmente, se dispuso de las líneas isoplásmicas androestériles HA89 CMSRES1, RHA271 CMSRES1, RHA274 CMSRES1 y RHA801 CMSRES1. Las correspondientes líneas endocriadas androfértiles son mantenedoras de las líneas endocriadas CMSRES1.

Con el fin de determinar la expresión fenotípica de la androesterilidad RES1, al menos diez capítulos de cada una de las líneas isoplásmicas se examinaron a simple vista y luego las correspondientes anteras se observaron empleando un microscopio estereoscópico. Además, se realizaron observaciones en capítulos de la línea HA89 CMSPET1, con el fin de compararla con las correspondientes líneas isoplásmicas, HA89 CMSRES1 y HA89 B. Para determinar la presencia de granos de polen y su viabilidad, las anteras se abrieron con la ayuda de agujas histológicas y se tiñeron con el colorante de Alexander (1980). Con este colorante, el protoplasma de los granos de polen no abortados reacciona con la fucsina ácida produciendo un color púrpura, mientras que los granos de polen abortados permanecen de color verde porque no presentan protoplasma.

El girasol cultivado es una especie alógama de polinización predominantemente entomófila y debido a ello es necesario, cuando se quiere autofecundar una planta, cubrir la inflorescencia para evitar la contaminación con polen extraño. Para corroborar la androesterilidad de las plantas CMSRES1, diez plantas de cada una de las cuatro líneas endocriadas CMSRES1 se cubrieron con bolsas de papel desde antes de la antesis y hasta el momento de la cosecha para permitir que se autofecunden. La ausencia de semillas determinaría la completa androesterilidad de las plantas. Las correspondientes líneas androfértiles no se utilizaron como controles ya que es conocida su capacidad de producir semillas después de autofecundarse porque no evidencian problemas de autoincompatibilidad.

La meiosis fue analizada en dos plantas de cada una de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1, RHA271 CMSRES1, RHA274 CMSRES1 y RHA801 CMSRES1 para determinar si el proceso degenerativo ocurre antes, durante o después de la microsporogénesis. Para ello, se fijaron dos capítulos de cada línea en 3:1 etanol: ácido acético (v/v). Después de 24 h, los tejidos fueron transferidos a etanol 70% y

almacenados a 4°C hasta el análisis meiótico. Los distintos estadios meióticos fueron analizados en las anteras coloreadas utilizando la técnica de Snow (1963).

RESULTADOS

Las progenies resultantes del programa de retrocruzas conducidas para incorporar el citoplasma RES1 en las diferentes líneas endocriadas fueron todas completamente androestériles, independientemente de los ambientes en los que se desarrollaron, ya sea en Balcarce o en Yuto.

Los capítulos de las plantas CMS de las cuatro líneas endocriadas analizadas tuvieron un comportamiento similar. Se observó a simple vista que no había producción de polen. En la **Fig. 1.1.** se presentan los capítulos de las líneas endocriadas isoplásmicas HA89 B, HA89 CMSRES1 y HA89 CMSPET1. Se puede observar que HA89 CMSRES1 no produce polen al igual que HA89 CMSPET1, mientras que en la línea androfértil, las anteras son claramente visibles y con abundante producción de polen. A su vez, las flores pistiladas de las plantas CMSRES1 presentan las anteras deformadas, más cortas que las anteras de las plantas fértiles y generalmente permanecen retenidas dentro de la corola (**Fig. 1.2.**).

En el análisis microscópico de las anteras de las plantas HA89 CMSRES1 se observaron unos pocos granos de polen en la parte superior de las mismas y los sacos polínicos vacíos (**Fig. 1.3A**), en comparación con la línea androfértil donde los sacos polínicos estaban colmados de granos de polen (**Fig. 1.3B**). Las anteras de las plantas CMSPET1 presentaron un aspecto similar a las de las plantas CMSRES1 (**Fig. 1.3C**). Los escasos granos de polen producidos por las plantas androestériles CMSRES1 normalmente se tiñeron de verde, lo cual indica que no eran viables.

Figura 1.1. Capítulos de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1 **(A)**, HA89 B **(B)** y HA89 CMSPET1 **(C)**

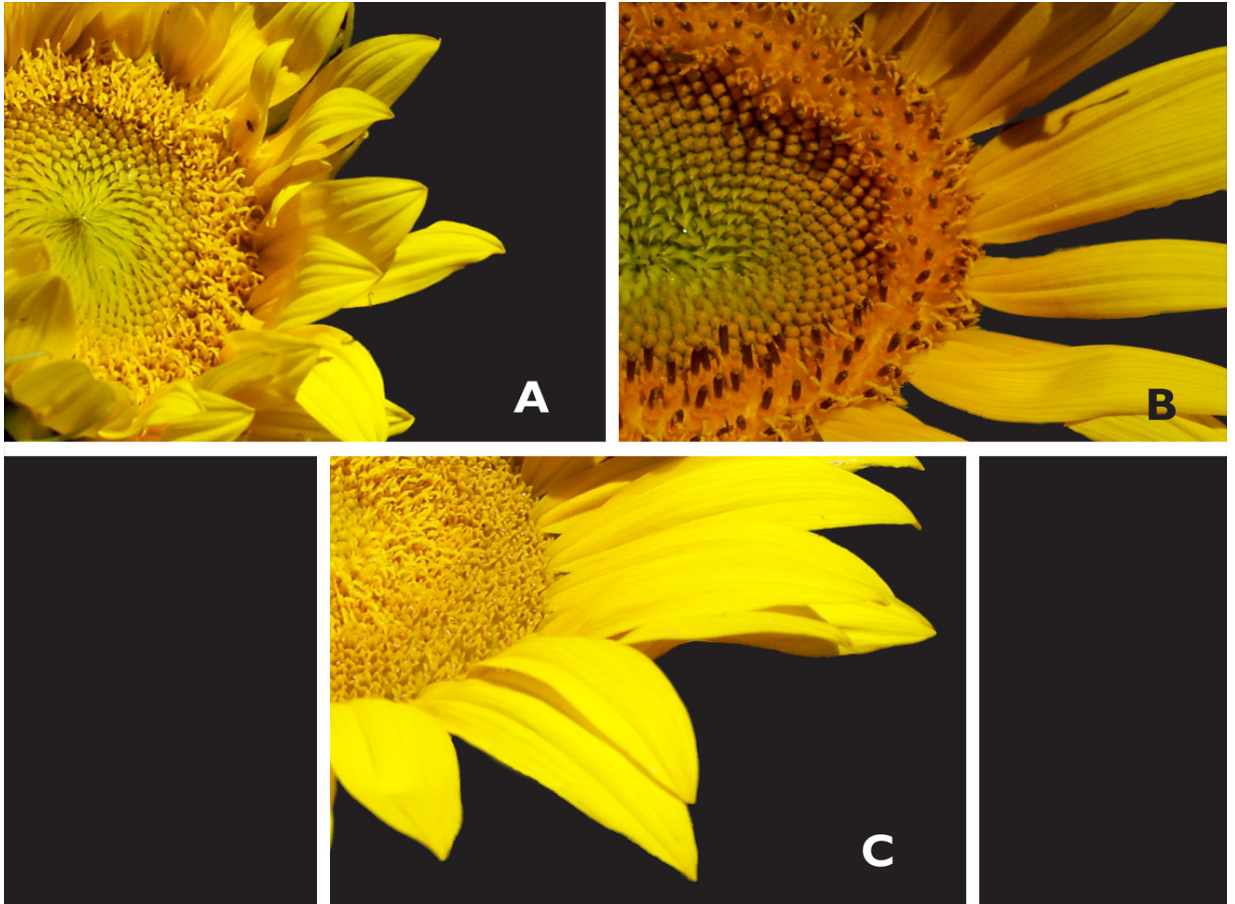


Figura 1.2. Flores pistiladas de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1 (izquierda) HA89 B (centro), HA89 CMSPET1 (derecha) (10x)

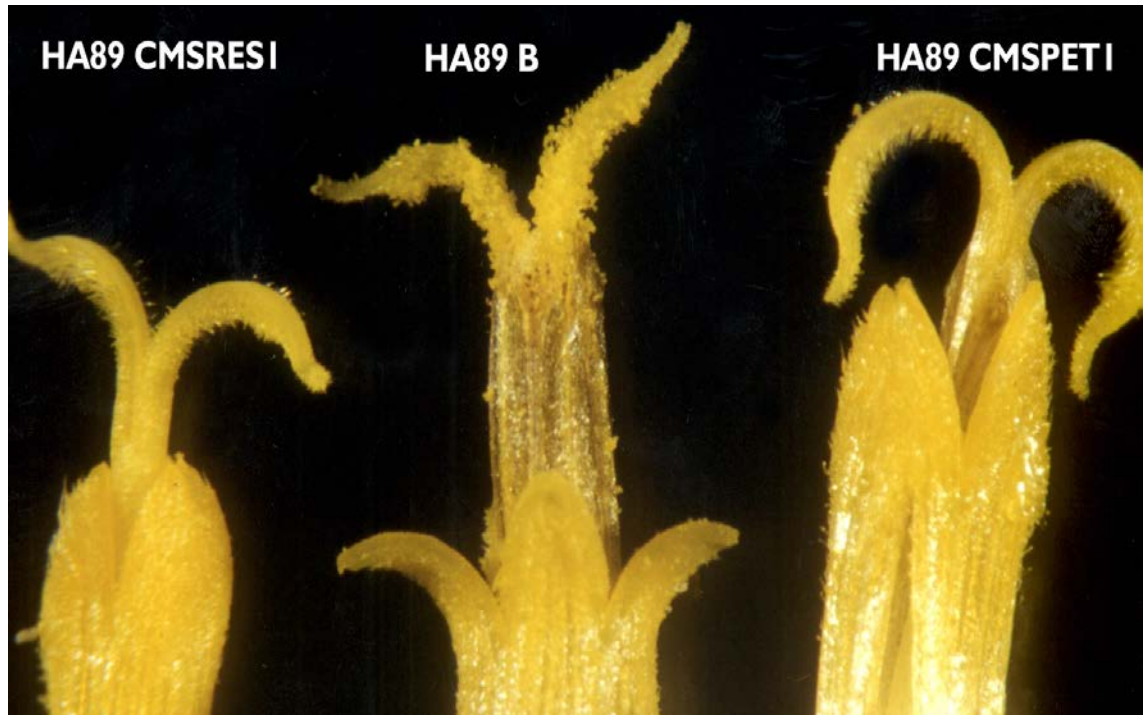
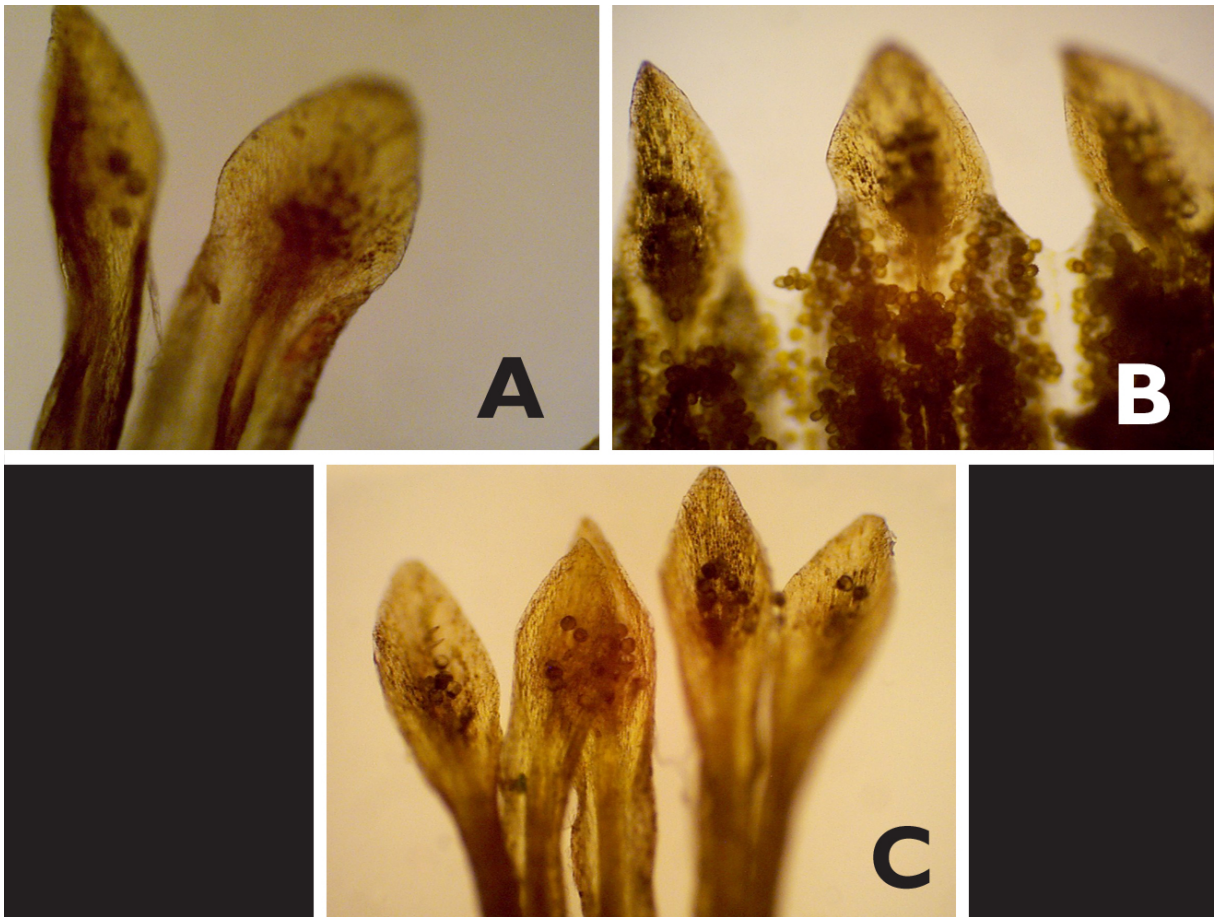


Figura 1.3. Anteras de las líneas endocriadas HA89 CMSRES1 **(A)** (25x), HA89 B **(B)** (20x) y HA89 CMSPET1 **(C)** (25x)



En los capítulos de las cuatro líneas endocriadas CMSRES1, que fueron cubiertos con las bolsas de papel para permitir que se autofecunden, no se produjeron semillas, confirmando así la condición de androestériles.

A partir de los análisis citológicos realizados, no se encontraron diferencias en el comportamiento meiótico entre las líneas endocriadas CMSRES1 y las correspondientes líneas androfértiles. En todos los casos, se formaron 17 bivalentes (17 II) en diacinesis. Se observaron cromosomas rezagados en baja frecuencia al principio de Telofase I, en algunas células de las plantas de las dos variantes de las líneas RHA271 y RHA801 y de RHA274 CMSRES1 y algunos micronúcleos en Telofase II en las células de las plantas de las dos variantes de la línea RHA271 (**Tabla 1.1.**).

Tabla 1.1. Análisis de diferentes estadios meióticos en líneas endocriadas androfértiles y androestériles

Línea endocriada	ESTADIO				
	Diacinesis 17 II	Telofase I (Díadas)		Telofase II (Tétradas)	
		Normal	Anormal(*)	Normal	Anormal(**)
Número de células					
HA89 B	72	114	-	340	-
HA89 CMSRES1	131	150	-	520	-
RHA271	96	229	16	463	3
RHA271 CMSRES1	77	186	19	357	7
RHA274	37	95	-	332	-
RHA274 CMSRES1	18	170	26	395	-
RHA801	65	99	1	453	-
RHA801 CMSRES1	86	117	5	307	-

(*) con cromosomas rezagados

(**) con micronúcleos

DISCUSIÓN

El hecho de que la androesterilidad encontrada en *H. resinusus* se mantuviera en las diferentes generaciones de retrocruzas que se obtuvieron para incorporar el citoplasma RES1 en las líneas endocriadas, no sólo confirma el origen citoplasmático de CMSRES1, sino que también confirma la estabilidad de la misma. Tal estabilidad fue corroborada, en primer lugar, en las plantas CMSRES1 que se desarrollaron tanto en Balcarce como en Yuto, ya que todas fueron completamente androestériles y, en segundo lugar, porque las plantas de las líneas endocriadas portadoras de este citoplasma (HA89, RHA271, RHA274, RHA801) fueron androestériles cuando fueron cultivadas por otros investigadores en Montpellier, Francia (H. Serieys, com. pers.) y en Fargo, EEUU (J.F. Miller, com. pers.). Se comprobó que la condición de androesterilidad es completa ya que al autofecundar las plantas CMSRES1 no se obtuvo semillas y que los escasos granos de polen producidos se colorearon de verde, y por lo tanto eran inviables. La presencia de anteras rudimentarias y algunos granos de polen que resultaron inviables en CMSRES1 fueron caracteres similares a los descritos por Leclercq (1969) cuando caracterizó a CMSPET1. Debido a su simple identificación visual, esta expresión fenotípica es una característica adecuada para la producción de híbridos comerciales u otras actividades relacionadas con el mejoramiento genético.

En todas las plantas de las líneas endocriadas portadoras del citoplasma RES1 que se estudiaron, el apareamiento cromosómico fue normal, al igual que la segregación de los cromosomas migrando 17 a cada polo, por lo que ambas divisiones meióticas concluyen satisfactoriamente. Probablemente, la presencia de cromosomas rezagados en el momento de la formación de las díadas, se deba a que el estadio de Telófase I era temprano y aún no había concluido esta etapa en alguna de las placas observadas. Ello se corroboró cuando no se observaron micronúcleos en las mismas

proporciones en las placas donde se pudo observar el final de la meiosis. Dado que estos micronúcleos se detectaron sólo en la línea RHA271, tanto en la versión fértil como en la correspondiente versión androestéril, se considera que no habría relación entre la presencia de estas anomalías y la condición de androesterilidad. Los resultados del análisis citológico realizado sugieren que los sucesos que conducen a la androesterilidad de las plantas RES1 se producen en estadios post-meióticos. En este sentido, este comportamiento se corresponde con las irregularidades post-meióticas observadas por varios autores en CMSPET1 (Horner 1977; Whelan 1978; Laveau *et al.* 1989; Kini *et al.* 1994; Schnable y Wise, 1998; Balk y Leaver 2001). Los sucesos que llevan al aborto de los microgametofitos y/o a su retención dentro de la antera, no se han dilucidado.

CONCLUSIONES

- La androesterilidad citoplásmica RES1 es estable y completa cuando el genoma citoplásmico de *H. resinosus* que la produce se combina con el genoma nuclear de *H. annuus*.
- Las plantas CMSRES1 presentan anteras más cortas que las normales de las plantas fértiles y escasa producción de granos de polen, que resultan inviables.
- En las plantas CMSRES1, el proceso meiótico se desarrolla normalmente, por lo que los sucesos que conducen a la androesterilidad se producen en estadios post-meióticos.

CAPITULO 2

BÚSQUEDA DE GENOTIPOS CON CAPACIDAD DE RESTAURAR LA FERTILIDAD MASCULINA DE LAS PLANTAS CMSRES1

INTRODUCCIÓN

En el sistema de androesterilidad genética-citoplásmica, los genes responsables de la restauración de la fertilidad masculina son genes nucleares, denominados *Rf*. Una vez que se dispone de la fuente CMS y de los genes que restauran la fertilidad masculina, es posible la explotación comercial de los sistemas CMS en la producción de semilla híbrida, ya que se logra un completo y eficiente control de la polinización porque no hay necesidad de la emasculación manual y se garantiza la producción de una progenie androfértil. En los esquemas de producción de semilla híbrida, las líneas CMS son utilizadas como progenitores femeninos, mientras que las líneas utilizadas como progenitores masculinos deben llevar el/los gen/es *Rf* que gobierna/n la restauración de la fertilidad masculina. De esta manera, el idiotipo de los híbridos F_1 fértiles está formado por el citoplasma CMS y por el/los gen/es *Rf* al estado heterocigótico. La utilización de CMSPET1 para la producción comercial de semillas híbridas de girasol, fue inmediata al encontrarse los genes *Rf*, poco tiempo después de la identificación del citoplasma PET1 (Kinman 1970; Enns *et al.* 1970; Leclercq 1971; Vrânceanu y Stoenescu 1971). Posteriormente, varios grupos de investigación se abocaron no sólo a la identificación de nuevas fuentes CMS sino también a la de los genes *Rf*, con el objetivo de ampliar la base genética y con ello reducir la vulnerabilidad genética generada por el uso de una sola fuente de androesterilidad genético-citoplásmica.

Las líneas restauradoras han sido utilizadas para diferenciar y clasificar las fuentes. Havekes *et al.* (1991) agruparon a las fuentes CMS en cuatro categorías:

I) CMSPET1, CMSANL1, CMSARG1, cuya fertilidad masculina no es restaurada por las líneas HA89 y P21, II) CMSPET2, CMSGIG1 y CMSMUT7, cuya fertilidad es completamente restaurada por la línea RHA294 y parcialmente por RPET2 y RGIG1, III) CMSMAX1, cuya restauración difiere de la que presentan las demás fuentes estudiadas, IV) CMSRIG1, CMSANN2 y CMSANN3, para las que no se encontraron genes de restauración entre las líneas evaluadas. Por otro lado, Chepurnaya *et al.* (2003) propusieron tres grupos para clasificar las fuentes CMS por su comportamiento frente a determinados genes *Rf*, con relación a CMSPET1: 1) “fuentes CMS tipo PET1” son aquellas que producen híbridos, utilizando a RHA274 como progenitor masculino, que son completamente fértiles, 2) “fuentes CMS alternativas” son aquellas que producen híbridos, utilizando a RHA274 como progenitor masculino, que son completamente estériles y 3) “fuentes de difícil restauración” son aquellas cuyos genes de restauración de la androfertilidad son difíciles de detectar en genotipos diploides.

En el girasol se han realizado varios estudios genéticos para determinar el modo de herencia de los genes que permiten la restauración de la fertilidad masculina en las plantas con diferentes fuentes CMS. Los resultados obtenidos por la mayoría de los trabajos realizados indican que la herencia de la restauración de la fertilidad masculina es bastante simple dado que está gobernada por pocos genes. Algunos investigadores han determinado que un gen dominante es suficiente para restaurar la fertilidad masculina de las plantas con los citoplasmas PET1, ANN2, ANN3, GIG1, MAX1, PEF1, PET2, ANL2. De esta manera en la generación F_2 se obtiene la clásica proporción fenotípica de 3 androfértiles: 1 androestéril (Kinman 1970; Leclercq 1971; Costa 1990; Jan 1991; Kural y Miller 1992; Horn y Friedt 1997). A su vez, otros autores han propuesto que la restauración de la fertilidad masculina está bajo el control de dos genes independientes y complementarios. La generación F_2 obtenida con los citoplasmas PET1, PET2, MAX1 ANN3 y ANN4 presenta una proporción de 9 plantas

fértiles: 7 androestériles (Fick y Zimmer 1974; Whelan 1980; Kural y Miller 1992; Megale *et al.* 1992; Horn y Friedt 1997). En la mayoría de los casos estudiados, el modo de herencia de la restauración de la fertilidad masculina es como alguno de los dos ejemplos mencionados anteriormente. También se han registrado casos en donde la restauración de la fertilidad del polen está condicionada por dos genes dominantes duplicados que producen en la generación F_2 una proporción de 15 androfértiles: 1 androestéril. Estos resultados se lograron para los citoplasmas PET2, ANN3, ANL1, MAX1 (Kural y Miller 1992; Megale *et al.* 1992; Horn y Friedt 1997).

Una vez que se ha identificado una fuente CMS, para que sea incorporada a un plan de mejoramiento genético, es importante identificar plantas que tengan la capacidad de restaurar la fertilidad masculina y conocer el modo de herencia de los genes que gobiernan este carácter. El objetivo de este capítulo fue identificar genotipos con capacidad de restaurar la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1 y conocer el modo de herencia de la restauración de la fertilidad del polen de las plantas CMSRES1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se completaron los cruzamientos iniciados por Rodríguez *et al.* (1996) para ampliar la base genética de los genotipos a evaluar por su capacidad de restauración de la fertilidad masculina de las plantas portadoras del citoplasma RES1. Para ello se realizaron cruzamientos entre plantas de la línea endocriada HA89 CMSRES1 y diferentes genotipos diploides ($2n=2x=34$) anuales y hexaploides ($2n=6x=102$) perennes del género *Helianthus*. Como genotipos diploides, se evaluaron:

- (a) 19 líneas endocriadas de girasol, algunas de las cuales restauran la fertilidad de otras fuentes CMS (**Tabla 2.1.**),
- (b) 19 poblaciones originadas a partir de germoplasma de origen interespecífico en el que *H. annuus* L. participó como progenitor en cada cruzamiento (**Tabla 2.2.**) y
- (c) dos especies silvestres anuales (**Tabla 2.3.**).

Como genotipos hexaploides se evaluaron cuatro especies silvestres perennes (**Tabla 2.3.**). *H. x laetiflorus* Pers. y *H. tuberosus* L. estuvieron representadas por un clon. De las especies *H. resinusus* Small y *H. pauciflorus* (= *H. rigidus* (Cass.) Desf.), se evaluaron poblaciones con una reducida variabilidad genética, ya que estaban formadas por diez plantas.

Se cruzaron tres plantas de la línea HA89 CMSRES1 con cada una de las introducciones consideradas como posible fuente de genes de restauración de la fertilidad masculina. Los capítulos de las plantas HA89 CMSRES1 se cubrieron con sobres de papel antes del inicio de la antesis y posteriormente se polinizaron dos días consecutivos con una mezcla del polen de algunas plantas de las introducciones evaluadas. El número de plantas que fueron muestreadas dependió de la población que se deseaba evaluar, utilizándose el polen de tres o cuatro plantas en el caso de líneas endocriadas y clones y de diez plantas, en el caso de las introducciones genéticamente variables.

Considerando que en la especie *H. resinusus*, donante del citoplasma RES1, estaría/n presente/s el/los gen/es responsable/s de la restauración de la fertilidad, se realizaron cruzamientos entre la línea HA89 B y polen proveniente de diez plantas de *H. resinusus* para comparar la producción de polen viable de la progenie de este cruzamiento con la del híbrido producido entre HA89 CMSRES1 y *H. resinusus* y así determinar si la producción de polen está asociada a la fuente de androesterilidad.

Tabla 2.1. Líneas endocriadas de girasol evaluadas como fuentes de restauración de la fertilidad masculina de plantas CMSRES1

Denominación	Origen
CM 29 (^)	Morden, Canadá
RHA271 (^)	USDA-ARS, EEUU
RHA274 (^)	USDA-ARS, EEUU
HA89 (^)	USDA-ARS, EEUU
HA821 (^)	USDA-ARS, EEUU
HA850 (^)	USDA-ARS, EEUU
PI 490324 (^)	USDA-ARS, EEUU
LB 5 (^)	INTA Balcarce, Argentina
LB 22 (^)	INTA Balcarce, Argentina
LB 30 (^)	INTA Balcarce, Argentina
LB 37 (^)	INTA Balcarce, Argentina
LB 598 (^)	INTA Balcarce, Argentina
HA338	USDA-ARS, EEUU
HA369	USDA-ARS, EEUU
HAR3	USDA-ARS, EEUU
HAR4	USDA-ARS, EEUU
RHA801	USDA-ARS, EEUU
R PET2	USDA-ARS, EEUU
R MAX1	USDA-ARS, EEUU

(^) Evaluados en Rodríguez *et al.* (1996)

Tabla 2.2. Poblaciones diploides derivadas de cruzamientos entre el girasol cultivado y especies silvestres, evaluadas como fuentes de restauración de la fertilidad masculina de plantas CMSRES1 (^)

Denominación	Especie silvestre parental	Origen
ARG-420-1	<i>H. argophyllus</i>	Seiler (1991a)
ARG-1575-1	<i>H. argophyllus</i>	Seiler (1991b)
ANO-1509-2	<i>H. anomalous</i>	Seiler (1991a)
BOL-774	<i>H. bolanderi</i>	Seiler (1991a)
DEB-CUC-1810	<i>H. debilis</i> ssp. <i>cucumerifolius</i>	Seiler (1991a)
DEB-SIL-367-2	<i>H. debilis</i> ssp. <i>silvestris</i>	Seiler (1991a)
DES-1474-2	<i>H. deserticola</i>	Seiler (1991b)
DES-1474-3	<i>H. deserticola</i>	Seiler (1991b)
HIR-1734-2	<i>H. hirsutus</i>	Seiler (1991c)
NEG-1255	<i>H. neglectus</i>	Seiler (1991a)
PAR-1673-1	<i>H. paradoxus</i>	Seiler (1991b)
PAR-1673-1	<i>H. paradoxus</i>	Seiler (1991b)
PRA RUN-417-1	<i>H. praecox</i> ssp. <i>runyonii</i>	Seiler (1991b)
PRA RUN-417-3	<i>H. praecox</i> ssp. <i>runyonii</i>	Seiler (1991b)
PRA RUN-1329-1	<i>H. praecox</i> ssp. <i>runyonii</i>	Seiler (1991b)
PRA HIR-437	<i>H. praecox</i> ssp. <i>hirtus</i>	Seiler (1991a)
PET PET-1741-1	<i>H. petiolaris</i> ssp. <i>petiolaris</i>	Seiler (1991a)
RES-834-2	<i>H. resinosus</i>	Seiler (1991c)
RES-834-3	<i>H. resinosus</i>	Seiler (1991c)

(^) Evaluados en Rodríguez *et al.* (1996)

Tabla 2.3. Especies silvestres de girasol evaluadas como fuentes de restauración de la fertilidad masculina de plantas CMSRES1

Especie silvestre	Ploidía	Origen
<i>H. argophyllus</i> (^) (PI 490291 y PI 494571)	2n=2x=34	USDA-ARS, EEUU
<i>H. petiolaris</i> (GRR 230)	2n=2x=34	INTA Balcarce, Argentina
<i>H. resinosus</i> (MPHE 243) (^)	2n=6x=102	INRA Montpellier, Francia
<i>H. pauciflorus</i> (MPHE 555 y 556)	2n=6x=102	INRA Montpellier, Francia
<i>H. x laetiflorus</i> (GRR 241)	2n=6x=102	INTA Balcarce, Argentina
<i>H. tuberosus</i> (GRR 110)	2n=6x=102	INTA Balcarce, Argentina

(^) Evaluados en Rodríguez *et al.* (1996)

Con el objeto de identificar la F_1 tetraploide, resultante de los cruzamientos entre las plantas diploides con los genotipos hexaploides, se determinó el número cromosómico de la descendencia. Las semillas de la F_1 se sembraron en macetas para realizar el recuento cromosómico en células mitóticas de los extremos de las raíces. Estos extremos se pretrataron en 8-hidroxiquinoleína 0,002 M durante 4 h, se fijaron en 3:1 etanol: ácido acético (v/v) durante 24 h y se almacenaron en etanol 70% a 4°C hasta que se realizó el recuento cromosómico. Para el recuento, las raíces fijadas se hidrolizaron en HCl 1N a 60°C durante 10 min. La coloración de las mismas se realizó según el método de Feulgen, reforzándose la coloración con hematoxilina acética (Núñez 1968).

Cuando las plántulas de la F_1 tenían tres pares de hojas se transplantaron al campo. La presencia o ausencia de granos de polen en las plantas F_1 se utilizó como criterio para clasificar a cada progenitor masculino evaluado como restaurador de la fertilidad o mantenedor de la androesterilidad, respectivamente. Cuando se hallaron granos de polen, se utilizó la técnica propuesta por Alexander (1980) para determinar el porcentaje de granos de polen no abortados de cada planta. Con esta técnica, el protoplasma de los granos de polen no abortados reacciona con la fucsina ácida produciendo un color púrpura. Por otra parte, los granos de polen abortados no son viables porque no presentan protoplasma y se colorean de verde. Como existe una correlación entre tinción del polen y viabilidad, el porcentaje de granos de polen no abortados da una estimación aproximada del porcentaje de viabilidad del polen. Se analizaron dos muestras de polen de cada planta híbrida F_1 y los datos se sometieron a un análisis de variancia (ANOVA), utilizando el procedimiento de modelo lineal generalizado (GLM) del software SAS (SAS Institute 1990). Se utilizó la prueba de la “diferencia mínima significativa” (LSD), con un nivel de significación de $P \leq 0,05$, para detectar si había diferencias en el porcentaje de granos de polen no abortados entre

introducciones.

Debido a que los híbridos provenientes del cruzamiento de las plantas CMSRES1 con plantas de *H. resinosus* produjeron granos de polen, se realizaron cruzamientos para confirmar la fertilidad masculina. Por un lado, se cruzaron entre sí diez plantas híbridas tetraploides y por el otro, se utilizaron estas plantas F₁ para polinizar diez plantas diploides CMSRES1 y diez plantas diploides CMSPET1. En ambos casos se determinó si hubo producción de semillas y su nivel de ploidía. Para ello, se realizó el recuento cromosómico en células mitóticas de extremos de raíces, de la manera anteriormente descrita.

Por otro lado, con el fin de conocer el modo de herencia de la restauración de la fertilidad de los granos de polen, se analizó la segregación de los fenotipos androestériles y fértiles en la F₂ proveniente de los cruzamientos entre las plantas F₁ tetraploides originadas del cruzamiento entre HA89 CMSRES1 y *H. resinosus*. Se analizó la producción de polen en 24 plantas F₂. Para determinar el número de genes que estarían involucrados en la restauración de la fertilidad, los datos fueron sometidos a la prueba de χ^2 . Dado que el tamaño de la población F₂ fue pequeño, se consideró oportuno incluir la corrección de Yates en el análisis de χ^2 para tener una mayor exactitud en las determinaciones. Esta corrección es utilizada cuando la muestra es pequeña, hay un grado de libertad y la frecuencia esperada en cualquier clase debe ser mayor de cinco (Crow 1976; Stansfield 1991).

RESULTADOS

Todos los genotipos diploides evaluados como posibles restauradores de la fertilidad se comportaron como mantenedores de la androesterilidad de las plantas CMSRES1, ya que ninguna planta híbrida produjo polen.

Todas las plantas F₁ tetraploides que se desarrollaron hasta la floración,

resultantes de los cruzamientos entre las plantas diploides CMSRES1 y las especies hexaploides, presentaron polen. Por lo tanto, las cuatro especies hexaploides evaluadas se comportaron como restauradoras de la androfertilidad de las plantas CMSRES1. Algunas de las plántulas F₁ se murieron, a causa del trasplante al campo, antes de llegar a la antesis. Al analizar los granos de polen producidos en las cuatro F₁ tetraploides resultantes de los cruzamientos interespecíficos con las especies hexaploides, se detectaron variaciones en los porcentajes de granos de polen no abortados (**Tabla 2.4.**). Los mayores porcentajes de granos no abortados se obtuvieron cuando *H. resinosus* y *H. x laetiflorus* actuaron como progenitores masculinos, mientras que en las otras dos F₁ analizadas los porcentajes fueron menores.

Tabla 2.4. Porcentaje de granos de polen no abortados de plantas F₁ (HA89 x especies hexaploides)

Progenitor femenino	Progenitor masculino	N° plantas F ₁		Granos de polen no abortados (%)	
		obtenidas	analizadas	Media (±)	Rango
HA89 B	<i>H. resinosus</i>	26	10	62 a	45 – 70
HA89 CMSRES1	<i>H. resinosus</i>	48	36	57 a	27 – 75
HA89 CMSRES1	<i>H. x laetiflorus</i>	22	6	55 a	47 – 62
HA89 CMSRES1	<i>H. tuberosus</i>	7	2	30 b	29 – 31
HA89 CMSRES1	<i>H. pauciflorus</i>	15	8	21 b	7 – 35

± Medias con distinta letra difieren significativamente, con P ≤ 0,05.

No se detectaron diferencias entre el porcentaje de granos de polen no abortados de las plantas F_1 de HA89 B x *H. resinosus* y el porcentaje de las plantas F_1 de HA89 CMSRES1 x *H. resinosus*.

En todos los cruzamientos realizados entre plantas F_1 tetraploides provenientes del cruzamiento entre HA89 CMSRES1 x *H. resinosus* y cuando éstas, a su vez, fueron utilizadas como polinizadoras de plantas diploides, ya sean con citoplasma RES1 o PET1, se produjeron semillas que dieron origen a plántulas tetraploides ($2n=4x=68$) y triploides ($2n=3x=51$), respectivamente. El número de semillas por capítulo fue variable ya que se obtuvieron entre 2 y 25 semillas por capítulo en la progenie tetraploide y entre 10 y más de 200 semillas por capítulo en la progenie triploide.

Para determinar el modo de herencia de los genes de restauración, se analizaron 24 plantas F_2 tetraploides provenientes del cruzamiento entre HA89 CMSRES1 y *H. resinosus*. Se estableció que 21 plantas eran fértiles y 3 androestériles. Si se considera que el responsable de la restauración de la fertilidad es un único gen, se esperaría una segregación de 3 plantas fértiles: 1 planta androestéril en la F_2 . El valor del estadístico χ^2 calculado para esta segregación fue de 2,00 ($P_{1gl} = 0,15$) y el χ^2 corregido por Yates fue de 1,39 ($P_{1gl} = 0,24$). A partir de estos resultados se considera que la relación encontrada entre plantas fértiles y androestériles se ajusta a la segregación esperada en un individuo poliploide que presenta herencia disómica en la que un único gen controla la expresión de este carácter, siendo el alelo dominante el que determina la restauración de la fertilidad masculina.

DISCUSIÓN

Se discuten en forma conjunta los resultados parciales presentados por (Rodríguez *et al.* 1996) y los generados en esta tesis ya que ambos trabajos fueron desarrollados por la autora de la presente tesis. Los resultados mostraron un comportamiento diferente de los genotipos diploides y hexaploides con respecto a la restauración de la androfertilidad de las plantas CMSRES1. Todo el germoplasma diploide evaluado se comportó como mantenedor de la androesterilidad de las plantas CMSRES1, a pesar de representar una base genética amplia, donde se incluyeron líneas endocriadas que restauran la fertilidad masculina de otras fuentes CMS (Miller y Fick 1997; Serieys 1999). De las líneas endocriadas seleccionadas para el presente estudio, las líneas RHA poseen genes *Rf* para distintas fuentes CMS, tales como ARG1, ARG2, ANN8, ANN10, PEF1, MAX1, GIG1, PET1, PET2 y MUT7. La línea HA89 restaura la fertilidad de las fuentes CMSANL1, ANN8 y EXI1. Finalmente, la línea RPET2 restaura la fertilidad de CMSANN3, PET2, RIG1, mientras que la línea RMAX1 hace lo propio con los citoplasmas ANL1, ANL2, ANN2 y MAX1. En consecuencia, el citoplasma RES1 pertenecería al grupo IV de la clasificación propuesta por Havekes *et al.* (1991) ya que no se encontraron genes *Rf* entre las líneas evaluadas o al grupo de fuentes de androesterilidad de difícil restauración, de acuerdo a Chepurnaya *et al.* (2003).

Considerando que en las especies donantes de citoplasmas que condicionan la androesterilidad se encuentran los genes de restauración de la fertilidad del polen, se seleccionaron las poblaciones diploides de origen interespecífico RES-834-2 y RES-834-3, por tener germoplasma de *H. resinosus*. Ambas poblaciones se originaron a partir de la misma introducción de *H. resinosus*, PI 435864, que dio origen al citoplasma RES1. Estas poblaciones provienen de varias plantas derivadas del cruzamiento HA89 CMSPET1 x *H. resinosus*. Luego, se realizaron algunas retrocruzadas

con la forma fértil del progenitor femenino (Seiler 1991c). Las plantas provenientes de esta serie de retrocruzas fueron polinizadas entre sí durante una o dos generaciones y posteriormente, las plantas se autofecundaron. En estas poblaciones no se hallaron genes que resultaran efectivos en la restauración de la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1, ya que tanto RES-834-2 como RES-834-3 se comportaron también como líneas mantenedoras de la androesterilidad RES1. Es decir, los genes restauradores para CMSRES1 de *H. resinosus* no estaban presentes en este germoplasma interespecífico. La ausencia de estos genes que condicionan la restauración de la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1 en las poblaciones RES-834-2 y RES-834-3 puede ser explicada porque tales poblaciones fueron seleccionadas para restaurar la androfertilidad de las plantas CMSPET1 y tal vez por azar los genes que restauran la androfertilidad de las plantas CMSRES1 podrían no haber permanecido en estas poblaciones.

El germoplasma hexaploide evaluado restauró la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1. La capacidad de restauración de la fertilidad del polen de *H. resinosus* era esperable, ya que es la especie donante de CMSRES1. Probablemente, la F₁ tetraploide proveniente del cruzamiento *H. resinosus* (MPHE 243) x *H. annuus* (RHA298) (ya descrito en ANTECEDENTES) resultó androfértil, al igual que las F₁ originadas de HA89 CMSRES1 x *H. resinosus*, como resultado de la presencia de genes restauradores de la fertilidad provenientes de la especie silvestre. *H. x laetiflorus*, *H. tuberosus* y *H. pauciflorus* también restauraron la fertilidad masculina de CMSRES1, a pesar de que el número de genotipos muestreados fue pequeño. Esto sugiere que los factores responsables de la restauración de CMSRES1 se encuentran en alta frecuencia en estas especies hexaploides.

Por otro lado, la fertilidad del polen en todos los híbridos F₁ interespecíficos fue parcial ya que se observaron granos de polen abortados. El porcentaje de granos de

polen no abortados que se produjeron en estos híbridos F_1 tetraploides es concordante con los citados por otros autores que también han cruzado *H. annuus* con *H. resinosus* (Georgieva-Todorova 1983; Sukno *et al.* 1999), con *H. pauciflorus* (Atlagic 1990) y con *H. tuberosus* (Heiser y Smith 1964; Atlagic 1990). Además, se obtuvieron porcentajes similares de granos de polen no abortados del recuento realizado en los granos de polen producidos por las plantas provenientes del cruzamiento HA89 B x *H. resinosus* y de HA89 CMSRES1 x *H. resinosus* (Tabla 2.4.). Por lo tanto, se deduce que la causa de la semiesterilidad exhibida por estas plantas F_1 no tiene relación con la fuente de androesterilidad citoplásmica RES1. Probablemente, la reducción de la fertilidad masculina de los híbridos F_1 tetraploides interespecíficos esté asociada con anomalías en la meiosis, con una irregular separación de los cromosomas en Anafase I de esta división que conducen a la formación de granos de polen abortados. Estas anomalías han sido observadas dentro del género *Helianthus* en plantas provenientes de cruzamientos interespecíficos entre especies diploides y especies hexaploides, que difieren de las estudiadas en el presente trabajo (Jan 1988; Kräuter *et al.* 1991; Sukno *et al.* 1998). La variación en los porcentajes de granos de polen no abortados entre los cuatro híbridos F_1 provenientes del cruzamiento entre HA89 CMSRES1 y las especies hexaploides puede ser el resultado de la diferente homología cromosómica entre los progenitores en cada combinación híbrida. Posiblemente si se hubiera estudiado el apareamiento cromosómico en divisiones meióticas de tales F_1 tetraploides, se podría haber explicado la variación detectada. Los porcentajes de granos de polen no abortados calculados en las plantas de la F_1 originada del cruzamiento entre HA89 CMSRES1 y *H. resinosus* variaron en un rango menor al encontrado por Georgieva-Todorova (1983) en las plantas de la progenie derivada de *H. annuus* y *H. resinosus*, mientras que el rango fue similar al encontrado por Sukno *et al.* (1998).

La obtención de progenies tetraploides cuando las plantas F_1 provenientes del cruzamiento HA89 CMSRES1 x *H. resinosus* se cruzaron entre sí, y de progenies triploides cuando dichas plantas F_1 se utilizaron como polinizadores de plantas CMSRES1 y CMS PET1, confirma la fertilidad de los granos de polen no abortados de estas plantas F_1 . El mayor número de semillas de la progenie triploide puede atribuirse a que la meiosis es normal en el progenitor diploide mientras que en la meiosis masculina y en la femenina de los progenitores de las progenies tetraploides no se da una segregación balanceada de los cromosomas. Otro factor que seguramente ha influido en el número de semillas obtenidas es que el tamaño del capítulo del progenitor diploide es mucho mayor que el del tetraploide y en consecuencia, el número de flores que se polinizan por capítulo es más alto.

Como estaba previsto, si se detectaban genotipos restauradores en el germoplasma evaluado era importante conocer el modo de herencia de la restauración de la fertilidad del polen de las plantas CMSRES1. Lamentablemente, no se identificaron genotipos diploides restauradores, por lo cual el estudio genético debió realizarse al nivel tetraploide y con una progenie formada por un número bajo de individuos. En la generación F_2 obtenida a partir del cruzamiento entre plantas de la progenie F_1 , que a su vez provenía del cruzamiento HA89 CMSRES1 x *H. resinosus*, se encontró segregación para el carácter fertilidad ya que se hallaron tres plantas androestériles en un total de 24 plantas. Los valores de probabilidad obtenidos cuando se calcularon los estadísticos de χ^2 , no corregido y corregido por Yates, no fueron contradictorios ya que ambos valores condujeron a la misma conclusión en cuanto a que no hubo evidencias para rechazar la hipótesis propuesta. Considerando que la constitución genómica de *H. resinosus* es $B_r B_r A_{t1} A_{t1} A_{t2} A_{t2}$ y la de *H. annuus* es $B_a B_a$ y que un gen está segregando para el carácter fertilidad, la segregación observada de 3 fértiles: 1 androestéril estaría indicando que el gen de restauración se

encuentran en el genoma B_r ($RfRf$), la F_1 fue heterocigótica ($Rfrf$), ya que *H. resinosus* aportó el alelo dominante y *H. annuus* el alelo recesivo, y en la F_2 se manifestaron todos los genotipos ($RfRf$, $Rfrf$ y $rfrf$) los que se agruparon en dos clases fenotípicas (Rf_+ : fértil y $rfrf$: androestéril). En el girasol se han identificado dos genes dominantes duplicados involucrados en la restauración de la fertilidad masculina de CMSPET1, CMSMAX1 (Kural y Miller 1992) y CMSPEF1 (Miller 1996; Horn y Friedt 1997). Como alternativa, cabría la posibilidad de considerar la segregación de 15:1 correspondiente a dos genes dominantes duplicados en el control de la restauración de la fertilidad del polen. Esta hipótesis no pudo ponerse a prueba porque la frecuencia esperada en la clase fenotípica menor de la población estudiada era menor que cinco, con lo cual queda invalidada la utilización de la prueba de χ^2 .

Un aspecto que debe remarcarse es que los resultados logrados a partir del análisis de la progenie originada a partir del cruzamiento entre HA89 CMSRES1 y *H. resinosus*, sugieren que el gen *Rf* no está localizado en alguno de los cromosomas de los genomas A_{t1} o A_{t2} de *H. resinosus* porque si hubiera estado en esos genomas no hubiera habido segregación y en consecuencia, no habrían aparecido plantas androestériles en la generación F_2 .

Al no encontrarse genotipos diploides con capacidad de restauración de la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1, se debería realizar un programa de retrocruzas a partir de las plantas F_1 tetraploides parcialmente androfértiles, utilizando al girasol cultivado como padre recurrente. Los resultados presentados sugieren que el gen *Rf*, presente en *H. resinosus*, se encuentra en el genoma B_r que es homoeólogo con el B_a de *H. annuus*. En la meiosis del híbrido F_1 HA89 CMSRES1 x *H. resinosus* se forman principalmente bivalentes por lo que se produce el apareamiento entre los cromosomas de los genomas B_r y B_a (Rodríguez, R.H. com. pers.). Si además del apareamiento, se producen entrecruzamientos intersticiales, entonces sería posible

transferir en un programa de retrocruzas los genes *Rf* de la especie silvestre al girasol cultivado.

Aún en el caso de que no se dispusiera de los genes restauradores de la androfertilidad, este citoplasma podría ser utilizado, por ejemplo, en programas de mejoramiento genético cuyo objetivo sea la obtención de cultivares de girasol para ser liberados como ornamentales.

CONCLUSIONES

- Los genes responsables de la restauración de la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1 no se encuentran en el germoplasma diploide evaluado.

- Los genes *Rf* se encuentran en las especies hexaploides, *H. resinosus*, *H. pauciflorus*, *H. tuberosus* y *H. x laetiflorus* .

- El/los gen/es *Rf* estaría/n localizado/s en cromosomas de *H. resinosus* que son homeólogos con los de *H. annuus*, por lo cual sería factible la transferencia de este/os gen/es al girasol cultivado.

CAPITULO 3

CARACTERIZACIÓN DEL CITOPLASMA RES1 POR SUS EFECTOS SOBRE ALGUNOS CARACTERES AGRONÓMICOS Y LA APTITUD COMBINATORIA DE UNA LÍNEA ENDOCRIADA

INTRODUCCION

En numerosas especies vegetales, incluyendo al girasol, se han descrito interacciones beneficiosas entre los genes nucleares y los citoplasmáticos. Entre estas interacciones se destacan las que se establecen entre los genes nucleares restauradores de la fertilidad de los granos de polen y los citoplásmicos que condicionan la androesterilidad, lo cual ha contribuido al desarrollo de los híbridos comerciales. En cualquier programa de mejoramiento genético destinado al desarrollo de híbridos promisorios se debería diversificar el uso de las fuentes CMS, como así también identificar potenciales progenitores con buena aptitud combinatoria general. Es importante que los citoplasmas que producen androesterilidad no presenten efectos adversos sobre caracteres de relevancia económica, incluyendo la resistencia a algunas enfermedades como la podredumbre húmeda del capítulo de girasol. Si los efectos que producen estos citoplasmas son favorables, entonces las ventajas genéticas y/o agronómicas que confieren resultarán decisivas para alentar su uso en un programa de mejoramiento genético.

Los trabajos de investigación que desean comparar el comportamiento de líneas endocriadas fértiles y androestériles demandan trabajo adicional, ya que hay que introducir el citoplasma en las diferentes líneas luego de sucesivas retrocruzas. Petrov (1992) estudió el efecto de los citoplasmas que condicionan androesterilidad PET2, ANN1 y ANT1 sobre la altura de la planta, el diámetro de los capítulos, el número de

hojas, el rendimiento y el contenido de aceite, al incorporarlos al girasol luego de cinco retrocruzas. Este investigador, al comparar las líneas androestériles con las correspondientes líneas androfértiles, encontró que el citoplasma ANN1 tenía un efecto negativo sobre el rendimiento y que el citoplasma ANT1 aumentaba el diámetro de los capítulos mientras que el citoplasma PET2 no tenía efectos sobre ninguno de los caracteres estudiados por lo cual sugirió que este último citoplasma podría ser considerado para el desarrollo de híbridos comerciales. Jan (1997) observó un efecto citoplásmico de reducción del vigor de las plantas de la línea HA89 CMSRIG1 y HA89 CMSMAX2. Vear (1984) determinó que las plantas androestériles portadoras del citoplasma PET1 superan a las plantas fértiles en su contenido de aceite y rendimiento.

La aptitud combinatoria de las líneas portadoras de diferentes citoplasmas que condicionan la androesterilidad en girasol ha sido analizada por varios autores y sus resultados difieren. Vear (1984) detectó que el CMSPET1 en combinaciones híbridas tiene un efecto positivo sobre el rendimiento. Serieys (1992) determinó que CMSPEF1 y ANN2 disminuyen la aptitud combinatoria del rendimiento mientras que CMSPEF1, PET2, ANN1, ANN2 y ANL2, en combinaciones híbridas, aumentan la altura de la planta. Además, estos últimos citoplasmas, junto con CMSGIG1, provocan que las plantas híbridas florezcan más tarde. Posteriormente, Serieys (1997) demostró que la presencia de CMSANN2 y CMG2 producen un efecto positivo sobre el rendimiento de los híbridos, mientras que CMSANL2, ANN4, CMG1, CMG3 y PEF1 tienen un efecto negativo. El mismo autor encontró que CMSANL2, CMG1 y PEF1 disminuyen el contenido de aceite de las semillas, que CMS ANN1, ANN2, CMG1 y PEF1 aumentan la altura de la planta y CMSANL2, ANN1, ANN4, CMG3 y PEF1 alargan el ciclo a floración de las plantas híbridas. Luego, Serieys (1999) confirmó estos resultados y además, al evaluar diferentes combinaciones híbridas en las que participaron líneas

endocriadas CMSGIG1, MAX1 y PET2, encontró que CMSPET2 provoca una disminución sobre la altura de las plantas, el rendimiento y el contenido de aceite. Además, detectó que CMSMAX1 disminuye el rendimiento y alarga el período a floración mientras que CMSGIG1 aumenta el rendimiento. Patil *et al.* (2003) analizaron las combinaciones híbridas cuyo progenitores femeninos fueron tres líneas isoplásmicas, en las que el citoplasma de la línea endocriada HA852 fue reemplazado por el de las especies silvestres *H. petiolaris* (PET1), *H. petiolaris* ssp. *petiolaris* (PEP1) y *H. annuus* ssp. *lenticularis* (ANL1) y sólo encontraron que CMSANL1 produce un incremento del contenido de aceite. Estos citoplasmas no tienen efectos en el rendimiento, la altura de la planta y el diámetro del capítulo.

Marinkovic *et al.* (2000) evaluaron tanto el comportamiento de cuatro líneas endocriadas con los citoplasmas PET1 y ANN5 como el de 36 combinaciones híbridas, a fin de estudiar los efectos de estos citoplasmas. Demostraron que las líneas con estos citoplasmas aumentan el rendimiento y la altura de las plantas mientras que en combinaciones híbridas estos citoplasmas tienen diferentes efectos sobre la expresión de los caracteres cuantitativos dependiendo del genotipo en que estén incorporados.

Por otro lado, las pérdidas de rendimiento debidas a la pudrición húmeda del capítulo de girasol ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* son severas, particularmente en ambientes templado-húmedos, como es el área girasolera de nuestro país. Por esta razón, esta enfermedad fúngica es considerada una de las principales de la Argentina (Gulya *et al.* 1997). En la literatura son escasos los trabajos que han estudiado el efecto de los citoplasmas sobre alguna enfermedad. En uno de ellos, Crognale (2002) no detectó diferencias en el comportamiento frente a *Sclerotinia* de cinco líneas isoplásmicas de HA89, portadoras de los citoplasmas B, PET1, PET2, GIG1 y PEF1. En cambio, cuando comparó el comportamiento frente a este hongo de seis líneas endocriadas CMSPET1 con respecto al de las líneas androfértiles, con

citoplasma normal, observó que la incidencia promedio de la enfermedad fue menor en las seis líneas CMSPET1.

El objetivo propuesto para el presente capítulo fue caracterizar el citoplasma RES1 por sus efectos sobre algunos caracteres agronómicos y sobre la aptitud combinatoria de una línea endocriada con respecto a estos caracteres.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CMSRES1 y caracteres de relevancia agronómica

Con el fin de evaluar si la androesterilidad citoplásmica RES1 produce algún efecto sobre caracteres de interés agronómico, se evaluaron las líneas endocriadas HA89, RHA271, RHA274 y RHA801 en sus formas androestéril, CMSRES1, y androfértil. La línea HA89 androfértil (HA89 B) posee citoplasma de *H. annuus*, mientras que las líneas RHA androfértiles tienen el citoplasma de *H. petiolaris* que produce androesterilidad (CMSPET1) y genes nucleares de restauración de la fertilidad masculina. La línea HA89 fue obtenida a partir de un proceso de endocria de la variedad de origen ruso VNIIMK8931 y liberada en 1971. Las líneas RHA271 y RHA274 se liberaron en 1973 y se han utilizado como progenitores masculinos en la producción de híbridos comerciales de girasol. La línea RHA801 fue derivada a partir de un compuesto de líneas restauradoras de la fertilidad de CMSPET1 y liberada en mayo de 1980. Las plantas de la línea HA89 tienen un sólo capítulo mientras que las plantas de las líneas RHA son pluricéfalas. Todos estos genotipos fueron liberados como líneas endocriadas públicas por el Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA).

En la UIB, durante los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00 se condujo un ensayo con un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela estaba conformada por un surco de 6 m, donde crecían de

20 a 22 plantas, de las cuales se seleccionaban 10 plantas en competencia para evaluar diferentes caracteres agronómicos. La presencia de insectos aseguró la polinización de las plantas.

Los caracteres que se evaluaron fueron:

- altura de la planta
- diámetro del capítulo al inicio de la floración, estadio R5.2 (según Schneiter y Miller 1981)
- días a floración, desde la emergencia de las plántulas
- número de semillas por capítulo
- peso de semillas por capítulo
- porcentaje de aceite de las semillas.

En las plantas de las líneas RHA se tomaron datos solamente del capítulo principal. El contenido de aceite se determinó por el método de resonancia magnética nuclear (RMN) sobre una muestra de semillas de cada parcela. Para ello, se contó con la colaboración de la empresa Advanta Semillas que disponía del equipamiento necesario (RMN Oxford Analytical, Oxford 4000).

Las hipótesis que se probaron al realizar este ensayo fueron:

H₀: todos los genotipos tienen el mismo valor medio μ ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$)

H₁: los valores medios de los genotipos difieren (algún $\mu_i \neq \mu_j$, para $i \neq j$)

Para la evaluación de los caracteres de los que se disponía de un dato por planta, se consideró el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j(a)_i + \zeta_k + \zeta_k^* a_i + \varepsilon_{ijk} + \delta_{ijkl}$$

$i = 1, 2, \dots, r$ (ambientes), $j = 1, 2, \dots, s$ (bloques), $k = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos) y

$l = 1, 2, \dots, v$ (observaciones)

Donde:

Y_{ijkl} es la observación hecha en el i -ésimo ambiente dentro del bloque j -ésimo bajo el tratamiento k -ésimo considerando la l -ésima submuestra.

μ es la media general

a_i es el efecto del i -ésimo ambiente

$b_j(a)_i$ es el efecto del j -ésimo bloque dentro del i -ésimo ambiente

ζ_k es el efecto del k -ésimo tratamiento o genotipo. Constituyen una población finita por lo que el modelo es de efectos fijos.

$\zeta_k^* a_i$ es el efecto de la interacción del k -ésimo tratamiento o genotipo en el i -ésimo ambiente.

ε_{ijk} es el error asociado a la interacción del k -ésimo tratamiento o genotipo en el j -ésimo bloque dentro del i -ésimo ambiente.

δ_{ijkl} es el error de submuestreo o la contribución de la l -ésima planta.

En este modelo se consideró la partición de la fuente de variación correspondiente a tratamientos (genotipos). Los siete grados de libertad que le corresponden a esta fuente de variación fueron particionados en tres grados de

libertad para medir los efectos de las cuatro líneas (HA89, RHA271, RHA274 y RHA801), un grado de libertad para analizar los efectos de las dos formas en que pueden presentarse las líneas (fértil o androestéril) y los restantes tres grados de libertad para medir los efectos de la interacción entre las líneas y las condiciones de fertilidad.

El modelo propuesto se aplicó en el análisis de todos los caracteres evaluados, excepto para el porcentaje de aceite de las semillas donde se eliminó el término correspondiente a la *l*-ésima planta ya que se disponía de un dato por parcela.

Los análisis de variancia (ANOVA) se realizaron mediante el procedimiento del modelo lineal general (PROC GLM) del programa estadístico SAS® (SAS Institute, 1990). Con el fin de establecer si hay diferencias entre los genotipos evaluados, se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel de significación de $P \leq 0,05$. Cuando se detectó que existía interacción entre los genotipos y los ambientes, se realizó el ANOVA de los datos en cada ambiente.

2. Diferentes CMS (incluido RES1) y caracteres de relevancia agronómica

Con el fin de determinar si las plantas con CMSRES1 difieren de las plantas con otras fuentes CMS y del citoplasma normal con respecto a algunos caracteres de interés agronómico, se evaluó la línea endocriada HA89 en su forma fértil (HA89 B) y en siete versiones isoplásmicas androestériles: RES1, PET1, PET2, PEF1, RIG1, GIG1 y MAX1 (**Tabla 3.1.**).

Tabla 3.1. Citoplasmas que producen androesterilidad evaluados por el efecto sobre algunos caracteres de relevancia agronómica

Citoplasma	Especie donante	Año de aparición	Autor
1. RES1	<i>H. resinosus</i>	1995	Rodríguez, R.H.
2. PET1	<i>H. petiolaris</i>	1969	Leclercq, P.
3. PET2	<i>H. petiolaris</i>	1980	Whelan, E.D.P.
4. PEF1	<i>H. petiolaris</i> ssp. <i>fallax</i>	1980	Serieys, H.
5. RIG1	<i>H. pauciflorus</i> (= <i>rigidus</i>)	1972	Vulpe, V.
6. MAX1	<i>H. maximiliani</i>	1980	Whelan, E.D.P.
7. GIG1	<i>H. giganteus</i>	1981	Whelan, E.D.P.

La metodología utilizada con respecto al diseño experimental, a los periodos agrícolas en los que se realizaron los ensayos y a los caracteres evaluados fue la misma que se describió en el inciso 1.

Además, se realizó un ensayo con un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones en el período agrícola 1998/99 donde se evaluaron los mismos genotipos por su comportamiento frente a la podredumbre húmeda del capítulo causada por infecciones artificiales de *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De Bary. Cada parcela estaba conformada por un surco de 5 m donde se evaluaron al menos 15 plantas que crecían en óptimas condiciones y sin restricciones hídricas. Con los datos de las plantas de cada parcela, se calcularon dos índices: incidencia de la enfermedad e índice de incubación de las infecciones artificiales de *S. sclerotiorum*. Para realizar esta evaluación, se procedió de la siguiente forma: El inóculo necesario para realizar la infección artificial de *S. sclerotiorum* se obtuvo a partir de esclerocios recolectados sobre rastrojos de girasol infestados naturalmente por *S. sclerotiorum*. La obtención de las ascosporas se realizó según la metodología propuesta por Tourvieille *et al.* (1978),

mientras que para la inoculación se siguió el protocolo descrito por Tourvieille y Vear (1984). En el estadio R5.2, cuando los capítulos tenían tres círculos de flores hermafroditas abiertas, se inoculó con 5 ml de una suspensión acuosa, que contenía 5×10^3 ascosporas / ml. Tales inoculaciones se realizaron con un pulverizador manual, con una bomba a presión de caudal conocido que permite controlar la cantidad de inóculo depositado. Los capítulos fueron cubiertos inmediatamente con bolsas de papel Kraft, que mantenían las condiciones necesarias para el desarrollo de la enfermedad. También se inocularon entre 36 y 40 plantas de comportamiento conocido, la mitad de ellas eran de un genotipo resistente (TR) y la otra mitad de un genotipo susceptible (TS) a la enfermedad, las cuales actuaron como testigos. En el ensayo se aplicaron dos riegos semanales de 5 mm cada uno, con regadores a presión, hasta la madurez del cultivo. Transcurridos 20 días desde la primera inoculación y hasta la madurez del cultivo, se realizaron las observaciones dos veces por semana, en la búsqueda de síntomas de la podredumbre. Con este fin, se examinaron los capítulos cubiertos con las bolsas de papel, mediante el tacto, para detectar partes blandas. Cuando esto ocurrió, se retiró la bolsa de papel del capítulo para confirmar la existencia de los síntomas de la enfermedad. En cada una de las fechas de observación se registró el número de capítulos enfermos y la fecha en la cual se había realizado la inoculación.

Finalizada la toma de datos, se procedió a cuantificar dos índices para cada genotipo evaluado:

1. Índice de Incidencia (I)

$$I = \frac{\text{número de capítulos con síntomas}}{\text{número de capítulos inoculados}} \times 100$$

2. Índice de incubación (Ii)

$$I_i = \frac{\text{período de incubación del genotipo a evaluar}}{\text{período de incubación del TR}}$$

El período de incubación es el número de días que tardan los capítulos de las plantas inoculadas en manifestar síntomas de podredumbre. Para todos los genotipos, el índice de incubación se relacionan al calculado para el genotipo de probada resistencia a la enfermedad ya que se deseaba detectar híbridos con elevado índice de incubación (es decir de mayor nivel de resistencia). El testigo susceptible fue usado solamente como referencia de la presencia de la enfermedad.

Un $I_i < 1$ indica que el genotipo evaluado muestra síntomas de enfermedad más rápidamente que el TR, lo que equivale a tener un nivel de resistencia menor que el mismo. Por el contrario, un $I_i > 1$ significa que el genotipo en estudio demora más tiempo en manifestar síntomas de la enfermedad, es decir que se considera como de un nivel de resistencia mayor al del TR.

Las hipótesis que se probaron en este análisis y el modelo propuesto para el análisis de la variancia fueron las mismas que se detallaron en el *inciso 1*, excepto para los índices correspondientes a *Sclerotinia* donde no se incluyeron el efecto ambiental y el del submuestreo en el modelo propuesto. Los análisis de variancia se realizaron siguiendo el procedimiento ya descrito.

3. Diferentes CMS (incluido RES1) y aptitud combinatoria de la línea HA89

Con el objeto de evaluar si CMSRES1 produce algún efecto diferente al de otros citoplasmas que producen androesterilidad sobre la aptitud combinatoria de la línea HA89, se utilizó el diseño de cruzamientos de Carolina del Norte II (Comstok *et al.*

1949). Se dispuso de la línea endocriada HA89 en siete versiones isoplásmicas androestériles, RES1, PET1, PET2, PEF1, RIG1, GIG1 y MAX1 (**Tabla 3.1.**), como progenitores femeninos, y de las líneas HA338, HA369, HA821, HA850, RHA271, RHA274 y LB598 como progenitores masculinos. Estos últimos actuaron como “probadores” y fueron seleccionados por tener distintas características.

En la UIB, se realizaron los cruzamientos en todas las combinaciones posibles de los siete progenitores femeninos con los siete progenitores masculinos para obtener las 49 F₁, durante los períodos agrícolas 1996/97 y 1997/98. Durante los dos períodos agrícolas siguientes, 1998/99 y 1999/00, se realizó un ensayo con un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones donde se evaluaron los 63 genotipos (14 progenitores y 49 híbridos). El tamaño de cada parcela era de un surco de 6 m, donde crecieron de 20 a 22 plantas, de las cuales se seleccionaron 10 plantas en buena competencia para evaluar los siguientes caracteres:

- altura de la planta
- diámetro del capítulo al inicio de la floración, estadio R5.2
- días a floración, desde la emergencia de las plántulas
- peso de semillas por capítulo
- porcentaje de aceite de las semillas

Las mediciones del contenido de aceite en las semillas se realizaron con la metodología descrita anteriormente.

Además, durante el período agrícola 1998/99 se realizó un ensayo donde se evaluaron estos genotipos por su comportamiento frente a la podredumbre húmeda del capítulo causada por infecciones artificiales de *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De Bary. La metodología utilizada fue descrita en el *inciso 2*. Los índices que se evaluaron fueron el de incidencia y el de incubación de la enfermedad.

Las hipótesis que se probaron en este análisis, para cada una de los caracteres en estudio fueron:

H₀: todos los genotipos tienen el mismo valor medio μ ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$)

H₁: los valores medios de los genotipos difieren (algún $\mu_i \neq \mu_j$, para $i \neq j$)

Para el análisis de los datos correspondientes, se obtuvieron los valores promedio para cada parcela y se consideró el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j(a)_i + \zeta_k + \zeta_k^* a_i + \varepsilon_{ijk}$$

$i = 1, \dots, r$ (ambientes), $j = 1, 2, \dots, s$ (bloques), $k = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos) y

$l = 1, 2, \dots, v$ (observaciones)

Donde:

Y_{ijk} es la observación hecha en el i -ésimo ambiente dentro del bloque j -ésimo bajo el tratamiento k -ésimo

μ es la media general

a_i es el efecto del i -ésimo ambiente

$b_j(a)_i$ es el efecto del j -ésimo bloque dentro del i -ésimo ambiente

ζ_k es el efecto del k -ésimo tratamiento o genotipo. Constituyen una población finita por lo que el modelo es de efectos fijos.

$\zeta_k^* a_i$ es el efecto de la interacción del k -ésimo tratamiento o genotipo en el i -ésimo ambiente

ε_{ijk} es el error asociado a cada observación o componente aleatoria. Es el efecto de la interacción del k -ésimo tratamiento o genotipo en el j -ésimo bloque dentro del i -ésimo ambiente.

En este modelo fue considerada la partición de la fuente de variación correspondiente a tratamientos (genotipos). Los 62 grados de libertad que le correspondían a esta fuente de variación fueron particionados en 13 grados de libertad para medir los efectos de las líneas utilizadas como progenitores y en 48 grados de libertad para analizar las combinaciones híbridas. Además, los 13 grados de libertad correspondientes a los progenitores fueron particionados en 6 grados de libertad para evaluar el comportamiento de la línea HA89 con los siete citoplasmas que producen androesterilidad y 6 grados de libertad para evaluar a los progenitores masculinos. Los 48 grados de libertad correspondientes a los híbridos fueron particionados en 6 grados de libertad para establecer si hay diferencias en la aptitud combinatoria general de la línea HA89 con los siete citoplasmas, 6 grados de libertad para establecer si hay diferencias en la aptitud combinatoria general de los progenitores masculinos y 36 grados de libertad para la interacción entre ambos tipos de progenitores, es decir para establecer si hay diferencias en la aptitud combinatoria específica.

El modelo propuesto para los índices correspondientes a la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* no incluye el efecto ambiental ni el de la interacción entre genotipos y ambientes. Los análisis de variancia se realizaron siguiendo el procedimiento ya descrito.

RESULTADOS

1. CMSRES1 y caracteres de relevancia agronómica

A partir del análisis de variancia de los datos correspondientes a los cuatro períodos agrícolas que se evaluaron (**Tabla 3.2.**) se determinó que hubo diferencias entre dichos períodos y que los genotipos difieren en todos los caracteres medidos.

Tabla 3.2. Valores promedios de los caracteres evaluados en las cuatro líneas endocriadas, androfértiles y androestériles, en los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00

	Altura de la planta (cm)	Diámetro del capítulo (cm)	Días a floración	N° de semillas/capítulo	Peso de semillas/capítulo (g)	Contenido de aceite (%)
Genotipos:						
HA89 B	104,9 b	8,5 a	74,4 b	933 a	45,7 a	48,5 ab
HA89 CMSRES1	107,3 b	7,6 b	73,8 b	973 a	50,1 a	49,7 a
RHA271	120,5 a	6,9 c	76,8 a	698 b	18,1 b	47,3 b
RHA271 CMSRES1	110,0 b	6,2 d	75,1 b	427 c	15,7 bc	44,4 d
RHA274	108,7 b	6,4 cd	65,4 e	510 c	11,8 bcd	42,5 e
RHA274 CMSRES1	103,0 b	5,4 e	66,2 e	423 c	8,9 d	40,4 f
RHA801	87,4 c	6,1 d	70,0 d	422 c	9,0 d	45,9 c
RHA801 CMSRES1	88,2 c	4,5 f	72,1 c	385 c	9,3 cd	44,7 cd
Interacción Genotipo *						
Ambiente	*	*	*	ns	*	*
CVE (%)	37,2	36,3	8,9	70,3	81,0	10,5

Valores promedios con distinta letra difieren significativamente, con $P \leq 0,05$

* : diferencias significativas

ns : diferencias no significativas

En la **Tabla 3.3.** se puede observar que, como era de esperar, hay diferencias en el promedio de los caracteres entre las cuatro líneas, salvo en los días necesarios para que se produzca la floración. No se detectaron diferencias entre el promedio de las líneas androestériles y el de las fértiles, salvo en el diámetro del capítulo. Las plantas androestériles de las líneas que portan el citoplasma RES1 tienen un diámetro menor del capítulo que las plantas fértiles. Sin embargo, en la **Tabla 3.2.** se destaca el comportamiento particular de la línea endocriada RHA271. La línea RHA271 CMSRES1 presenta valores menores en todas las medias de los caracteres evaluados, salvo en el peso de las semillas al compararla con la versión androfértil de esta línea.

En todos los caracteres no se detectó interacción entre las cuatro líneas endocriadas y las dos condiciones de fertilidad, salvo en el número de semillas por capítulo, lo cual sugiere que el comportamiento de las líneas con las dos condiciones de fertilidad es similar. En la **Tabla 3.3.** también se destacó que la línea HA89 fue la que presentó mayor número y peso de las semillas, como así también el mayor porcentaje de aceite. Estas características, propias de este genotipo, no son afectadas por el citoplasma RES1.

Dado que se evidenció la existencia de interacción entre los genotipos y los ambientes en la altura de las plantas, el diámetro de los capítulos, los días a floración, el peso de las semillas por capítulo y el porcentaje de aceite de las semillas, se realizó el análisis de variancia de los datos de estos caracteres de cada período agrícola. En estos análisis de los datos, también se destaca que hay un efecto del citoplasma RES1 sobre el diámetro del capítulo, es decir que las plantas androestériles con citoplasma RES1 tienen un diámetro menor del capítulo que las plantas fértiles de los mismos genotipos, en tres de los períodos agrícolas evaluados (1997/98, 1998/99 y 1999/00).

Tabla 3.3. Valores promedios de los caracteres evaluados en las dos condiciones de fertilidad, androesterilidad y androfertilidad, y de las cuatro líneas endocriadas, en los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00

	Altura de la planta (cm)	Diámetro del capítulo (cm)	Días a floración	N° semillas/capítulo	Peso de semillas/capítulo (g)	Contenido de aceite (%)
Condición fertilidad:						
Androfértil	103,6 a	6,9 a	72,4 a	644 a	21,7 a	45,3 a
Androestéril	102,3 a	6,0 b	72,8 a	588 a	22,1 a	45,5 a
Condición fertilidad*ambiente	ns	*	ns	*	ns	ns
Líneas:						
HA89	106,1 a	8,07 a	74,0 a	953 a	47,9 a	49,1 a
RHA271	112,0 a	6,53 b	76,2 a	553 b	16,8 b	46,5 ab
RHA274	106,1 a	5,97 b	66,1 a	481 b	10,2 b	42,1 c
RHA801	87,8 b	5,16 c	71,0 a	406 b	9,2 b	45,5 b
Condición fertilidad * línea	ns	ns	ns	*	ns	ns

Valores promedios con distinta letra difieren significativamente, con $P \leq 0,05$

* : diferencias significativas

ns : diferencias no significativas

2. Diferentes CMS (incluido RES1) y caracteres de relevancia agronómica

Con el análisis de variancia combinado de los cuatro períodos agrícolas (**Tabla 3.4.**), se detectaron por un lado, diferencias en la altura de las plantas, el diámetro del capítulo, el número de semillas por capítulo y el porcentaje de aceite de las semillas entre las líneas isoplásmicas HA89 y por el otro, una interacción entre los genotipos y los períodos agrícolas evaluados para estos mismos caracteres. Debido a esto, se realizaron análisis de variancia de los datos de estos caracteres de cada período agrícola. Los coeficientes de variación del error de los datos de los caracteres fueron aceptables (**Tabla 3.4.**), salvo aquellos caracteres relacionados con las semillas (número de semillas por capítulo y peso de las semillas por capítulo) que resultaron elevados (47,3% y 72,8% respectivamente).

No se encontraron diferencias entre la altura de las plantas de la línea HA89 CMSRES1 y las de HA89 CMSPET1 en los períodos agrícolas 1997/98 y 1998/99. En todos los períodos agrícolas las plantas de la línea HA89 CMSRES1 fueron más altas que las de la línea HA89 fértil.

Tanto las plantas de HA89 CMSRES1 como las de HA89 CMSPET1 y las de la línea fértil tuvieron el mismo número de semillas por capítulo en los períodos agrícolas 1996/97 y 1998/99.

No se encontraron diferencias entre el porcentaje de aceite de las semillas de la línea HA89 CMSRES1 y las de HA89 CMSPET1 en dos de los períodos agrícolas evaluados, 1998/99 y 1999/00.

En los cuatro períodos agrícolas, las plantas de HA89 CMSRIG1 tuvieron en promedio, mayor altura, menor porcentaje de aceite en las semillas y mayor diámetro del capítulo que las plantas de HA89 con cualquier otro citoplasma, excepto las plantas de HA89 CMSPET2, de las que no se diferenciaron por la altura de las plantas.

Estas diferencias no se detectaron cuando se analizaron los períodos agrícolas por separado.

Con el análisis de variancia de los índices de resistencia a la enfermedad causada por *S. sclerotiorum*, no se detectaron diferencias en la incidencia de la enfermedad y el índice de incubación correspondientes a las líneas isoplásmicas HA89.

Tabla 3.4. Valores promedios de los caracteres evaluados en las siete líneas isoplásmicas HA89, en los períodos agrícolas 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/00

	Altura de la planta (cm)	Diámetro del capítulo (cm)	Días a floración	N° de semillas/capítulo	Peso de semillas/capítulo (g)	Contenido de aceite (%)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ⁽¹⁾	
							Indice Incidencia	Indice de Incubación
Genotipos								
HA89 CMSRES1	107,3 bc	7,6 b	73,8 a	973 a	50,1 a	49,4 cd	93,94 a	1,09 a
HA89 CMSPET1	107,5 bc	8,5 b	74,3 a	962 a	47,0 a	50,6 ab	100 a	1,17 a
HA89 CMSPET2	109,0 ab	8,6 b	74,5 a	854 abc	47,9 a	49,6 bc	90,91 a	1,08 a
HA89 CMSPEF1	105,4 bc	8,0 b	74,6 a	853 abc	41,5 a	50,0 abc	100 a	1,33 a
HA89 CMSRIG1	112,6 a	13,4 a	74,4 a	824 bc	40,0 a	46,7 e	66,7 a	1,12 a
HA89 CMSMAX1	105,9 bc	7,5 b	73,4 a	731 c	41,9 a	49,1 cd	91,1 a	1,28 a
HA89 CMSGIG1	108,6 bc	8,9 b	75,3 a	917 ab	47,4 a	51,0 a	97,2 a	1,38 a
HA89 B	104,9 c	8,5 b	74,3 a	932 ab	45,9 a	48,4 d	87,2 a	0,94 a
Interacción								
Genotipo* Ambiente	*	*	ns	*	ns	*	-	-
CVE (%)	16,3	23,8	12,4	47,3	72,8	9,2	13,2	12,2

Valores promedios con distinta letra difieren significativamente, con $P \leq 0,05$

* : diferencias significativas

ns : diferencias no significativas

⁽¹⁾ : Se evaluó en el período agrícola 1998/99

3. Diferentes CMS (incluido RES1) y la aptitud combinatoria de la línea HA89

Al realizar el análisis de variancia de los caracteres evaluados en los dos períodos agrícolas, se detectaron diferencias entre los ambientes, los bloques dentro de cada ambiente y los 63 genotipos. Los coeficientes de variación del error de los datos de los caracteres fueron aceptables (**Tabla 3.5.**), salvo el del peso de las semillas por capítulo que resultó algo elevado (29,3%).

De los dos períodos agrícolas en los que se realizaron los ensayos (1998/99 y 1999/00) los genotipos tuvieron un mejor comportamiento en el segundo de ellos (**Tabla 3.6.**). Esto estuvo relacionado con las condiciones climáticas, ya que si bien las temperaturas ambientales que afectaron el cultivo no difirieron demasiado, las precipitaciones fueron muy dispares. En el primer período agrícola (1998/99) de noviembre a marzo, solamente se registraron 229 mm de lluvia mientras que en el segundo período llovió 626 mm. Es de destacar que la cantidad de lluvia registrada en el primer período es menor a la normal para la zona, lo cual indica que hubo un déficit hídrico.

Tabla 3.5. Análisis de variancia de los caracteres evaluados en siete líneas endocriadas isoplásmicas HA89 androestériles, siete líneas endocriadas utilizadas como progenitores masculinos y las F₁, en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00

Fuente de variación	gl	Altura de la planta	Diámetro del capítulo	Días a floración	Peso de semillas/capítulo	Contenido de aceite	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ⁽¹⁾	
							Indice de Incidencia	Indice de Incubación
Ambientes		*	*	*	*	*	-	-
Bloques (ambientes)		*	*	*	*	*	*	*
Genotipos	62	*	*	*	*	*	*	*
Líneas	13	*	*	*	*	*	*	*
Líneas isoplásmicas androestériles	6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Líneas ♂	6	*	*	*	*	*	*	ns
Híbridos	48	*	*	*	*	*	ns	ns
ACG ♀	6	ns	*	ns	*	*	ns	ns
ACG ♂	6	*	*	*	*	*	ns	ns
ACE	36	*	*	*	*	ns	ns	ns
Interacción Genotipo * Ambiente		*	*	*	*	*	-	-
Interacción Línea * Ambiente		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Interacción Híbridos* Ambiente		*	*	*	*	*	-	-
CVE (%)		7,1	13,3	3,5	29,3	12	12,4	14,3

⁽¹⁾: Se evaluó sólo en el período agrícola 1998/99

Tabla 3.6. Valores promedios de los caracteres evaluados en siete líneas endocriadas isoplásmicas HA89 androestériles, siete líneas endocriadas utilizadas como progenitores masculinos y las F₁, en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00

	Altura de la planta (cm)	Diámetro del capítulo (cm)	Días a floración	Peso de semillas / capítulo (g)	Contenido de aceite (%)
Período agrícola 1998/99	107,3	7,6	70,7	47,2	45,9
Período agrícola 1999/00	135,1	10,2	65,0	50,9	47,4
CVE (%)	7,1	13,3	3,5	29,3	12

Dado que el fin de este trabajo de investigación es saber si el citoplasma RES1 se diferencia de otros citoplasmas que producen androesterilidad en cuanto al efecto que puede tener sobre diferentes caracteres de relevancia agronómica, se consideró en primera instancia, si hay diferencias entre las siete líneas isoplásmicas HA89 androestériles y en la aptitud combinatoria general (ACG) de estas siete líneas, en los análisis de variancia.

No se detectaron diferencias en todos los caracteres evaluados entre las siete líneas isoplásmicas HA89 androestériles (**Tabla 3.5**). Por otro lado, estas mismas siete líneas isoplásmicas difieren en la ACG del diámetro del capítulo, el peso de las semillas por capítulo y el porcentaje de aceite de las semillas, no así en el resto de los caracteres.

La interacción entre los 63 genotipos y los dos ambientes fue significativa, lo cual sugirió que el comportamiento relativo de los genotipos era diferente en los dos períodos agrícolas. Al analizar los dos períodos por separado, se detectaron diferencias en todos los caracteres entre los 63 genotipos y dentro de éstos, entre las 14 líneas y entre las 49 F₁. Sin embargo, no se detectó interacción entre las 14 líneas progenitoras y los dos períodos agrícolas, lo cual establece que el comportamiento relativo de las líneas en cada uno de los períodos agrícolas fue similar, es decir que, tampoco hubo diferencias en los caracteres entre las líneas isoplásmicas HA89 androestériles en cada uno de los dos períodos agrícolas (1998/99 y 1999/00).

Las líneas que actuaron como progenitores masculinos difieren en todos los caracteres evaluados, excepto en el índice de incubación de *S. sclerotiorum*. Las diferencias tuvieron la misma magnitud en los dos períodos agrícolas.

Considerando que no existe interacción entre las líneas y los períodos agrícolas, se detallan en la **Tabla 3.7** los promedios de los caracteres de las líneas isoplásmicas HA89 androestériles y de su aptitud combinatoria.

Tabla 3.7. Valores promedios de los caracteres evaluados en las siete líneas endocriadas isoplásmicas HA89 androestériles y su aptitud combinatoria general, en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00

Genotipos	Altura de la planta (cm)		Diámetro del capítulo (cm)		Días a floración		Peso semillas/capítulo (g)	
	Línea	ACG	Línea	ACG	Línea	ACG	Línea	ACG
HA89 CMSRES1	103,9	124,5	7,6	8,3 c	69	68,0	45,9	51,2 bc
HA89 CMSPET1	108,5	122,2	9,0	9,6 ab	66,4	67,4	42,3	58,2 b
HA89 CMSPET2	103,6	120,7	8,3	9,0 bc	70,8	68,3	34,8	51,0 bc
HA89 CMSPEF1	100,0	128,9	7,8	9,7 ab	69,1	67,6	31,7	57,3 b
HA89 CMSRIG1	106,9	123,7	7,9	8,3 c	68,8	67,0	30,7	42,9 c
HA89 CMSMAX1	112,0	121,7	8,2	8,8 c	66,7	67,9	33,2	50,8 bc
HA89 CMSGIG1	103,6	128,3	9,0	10,3 a	71,3	67,0	41,1	66,8 a
	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*

Genotipos	Contenido de aceite (%)		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ⁽¹⁾			
	Línea	ACG	Incidencia		Índice de Incubación	
			Línea	ACG	Línea	ACG
HA89 CMSRES1	45,4	47,3 bc	90,9	92,7	1,10	1,21
HA89 CMSPET1	46,4	47,9 ab	100	91,9	1,16	1,25
HA89 CMSPET2	44,7	47,9 ab	86,3	96,5	1,07	1,25
HA89 CMSPEF1	45,7	46,7 c	100	92,2	1,25	1,24
HA89 CMSRIG1	45,3	45,4 d	66,7	90,4	1,12	1,17
HA89 CMSMAX1	44,5	48,3 a	91,1	93,8	1,29	1,18
HA89 CMSGIG1	48,1	48,1 ab	97,2	96,5	1,39	1,25
	ns	*	ns	ns	ns	ns

Valores promedios con distinta letra difieren significativamente, con $P \leq 0,05$

* : diferencias significativas

ns : diferencias no significativas

⁽¹⁾: Se evaluó sólo en el período agrícola 1998/99

Como se dijo anteriormente, las líneas isoplásmicas difirieron en la ACG relativa a tres de los caracteres evaluados: el diámetro del capítulo, el peso de las semillas por capítulo y el porcentaje de aceite de las semillas, cuando se consideran los dos períodos agrícolas en conjunto. Del análisis de variancia de cada uno de los períodos surge que solamente se detectan diferencias en la ACG de estos caracteres en el segundo período, el que tuvo mejores condiciones ambientales.

En la **Tabla 3.7.** se destaca en primer lugar, que las plantas F_1 que tienen el citoplasma RES1 tienen menor diámetro de capítulo que las plantas F_1 que poseen los citoplasmas PET1, PEF1 y GIG1.

En segundo lugar, cuando se consideran los promedios de ambos períodos agrícolas, las plantas F_1 que presentan el citoplasma RES1 no se diferencian en el peso de las semillas producidas de las plantas que tienen el citoplasma PET1. Sin embargo, se detectaron diferencias en el rendimiento entre estas plantas F_1 en el segundo período agrícola evaluado, el mejor para el desarrollo de las plantas. Es de destacar, que las plantas F_1 que poseen el citoplasma GIG1 tienen más rendimiento de semillas que las plantas con otro citoplasma que condiciona androesterilidad.

En tercer lugar, las semillas de las plantas F_1 que tienen el citoplasma RES1 no se diferencian en el porcentaje de aceite de las de las plantas F_1 con citoplasma PET1, sin embargo, tienen menor porcentaje de aceite que las semillas de las plantas F_1 que presentan el citoplasma MAX1 y mayor porcentaje que las de las plantas F_1 con citoplasma RIG1.

Se detectaron diferencias en la aptitud combinatoria específica de las líneas progenitoras, es decir la interacción entre las líneas isoplásmicas androestériles y las líneas progenitoras masculinas fue significativa en todos los caracteres, salvo en el porcentaje de aceite de las semillas (**Tabla 3.5.**). De esto se desprende que las diferencias detectadas en la ACG de las líneas isoplásmicas HA89 androestériles,

solamente se mantienen para la aptitud combinatoria específica de cada una de estas líneas con cada una de las líneas progenitoras masculinas cuando se considera el porcentaje de aceite de las semillas. Es de destacar que, a causa de que algunas de las líneas progenitoras masculinas tienen genes restauradores de la fertilidad de las plantas con algunos de los citoplasmas evaluados en este trabajo, ocho de las 49 F_1 produjeron granos de polen. Como era de esperar, todas las F_1 con citoplasma RES1 fueron androestériles.

Con el análisis de variancia de los datos correspondientes al comportamiento de los genotipos frente al hongo *S. sclerotiorum* no se detectaron diferencias en los índices evaluados tanto, entre las líneas isoplásmicas como entre la ACG de estas líneas.

DISCUSION

A pesar de que se determinó que las plantas de las cuatro líneas endocriadas androestériles, portadoras del citoplasma RES1, tienen un diámetro menor del capítulo que las correspondientes líneas endocriadas isoplásmicas fértiles, no se detectó que esta característica estuviera relacionada con el número de semillas o el peso de las semillas por capítulo. De todas maneras, hay que realizar más estudios sobre el efecto de este citoplasma sobre la producción de semillas dado que el coeficiente de variación del error del ensayo es considerado elevado (Tablas 3.2., 3.4., 3.5. y 3.6.). Un factor que pudo haber tenido influencia en la obtención de los valores elevados de este coeficiente fue que el número de plantas muestreadas no fue suficiente, considerando que ambos caracteres están muy influenciados por el ambiente. Tal vez, debido a esto, no se detectaron diferencias en el número y peso de las semillas por capítulo entre las plantas androestériles y las fértiles.

Hay que destacar que las cuatro líneas endocriadas androfértiles que se evaluaron no presentan el mismo citoplasma ya que por un lado, la línea HA89 tiene un citoplasma propio de la especie *H. annuus* y por el otro, las líneas RHA poseen el citoplasma PET1. Las diferencias detectadas en el diámetro del capítulo entre las líneas endocriadas androestériles y las fértiles pueden ser atribuidas tanto al tipo de citoplasma como a la fertilidad masculina. Se deberán realizar otros estudios si se desea dilucidar esta cuestión.

Por otro lado, si se considera que el número de semillas de las plantas de las líneas endocriadas CMSRES1 no difiere de las correspondientes líneas fértiles, se puede deducir que la fertilidad femenina no se afecta en las plantas portadoras del citoplasma RES1 y por lo tanto el mismo no presenta inconvenientes para su utilización en programas de mejoramiento genético. Tal vez habría que evaluar con un muestreo más exhaustivo si el citoplasma RES1 tiene un efecto negativo en el número de semillas de las plantas de la línea endocriada RHA271.

Como era de esperar, se detectaron las diferencias normalmente manifestadas entre las cuatro líneas evaluadas. Estas diferencias dan indicios de que las plantas pudieron desarrollarse de acuerdo a su potencial genético. Por otro lado, las diferencias detectadas en el número y en el peso de las semillas entre la línea HA89 y las tres líneas RHA se debieron a que la primera sólo presenta un capítulo y que las segundas son ramificadas. A éstas últimas solamente se les tomaron datos del número y peso de las semillas al capítulo principal.

De la comparación de las ocho líneas isoplásmicas HA89, entre ellas, HA89 B que es androfértil y siete de ellas portadoras de distintos citoplasmas que condicionan androesterilidad, no se puede deducir si hay un efecto manifiesto del tipo de citoplasma sobre los caracteres de relevancia agronómica evaluados en los cuatro períodos agrícolas. También en este ensayo, los datos del número y el peso de las

semillas por capítulo tuvieron un coeficiente de variación del error elevado, probablemente debido a que el número plantas muestreadas fue insuficiente.

De todas maneras, con el fin de caracterizar los efectos que puede producir el citoplasma RES1, se le dio especial importancia a la detección de efectos negativos o positivos con respecto al citoplasma PET1, por ser éste el utilizado casi exclusivamente en la producción mundial de híbridos de girasol.

Es importante ahondar más en el estudio del efecto del tipo de citoplasma sobre el porcentaje de aceite de las semillas, por dos razones. Por un lado, en los períodos agrícolas 1996/97 y 1997/98, las semillas de las plantas de la línea HA89 CMSRES1 tuvieron un menor contenido relativo de aceite que las de la línea HA89 CMSPET1 y por el otro, se detectó una variación importante en el porcentaje de aceite entre las líneas isoplásmicas androestériles: HA89 CMSGIG1 (51%) y HA89 CMSRIG1 (46,7%).

En los ensayos que se realizaron durante dos períodos agrícolas (1998/99 y 1999/00) y que incluyeron las siete líneas isoplásmicas HA89 androestériles, las siete líneas endocriadas que actuaron como progenitores masculinos y las 49 F₁ que resultaron de todos los cruzamientos posibles entre las 14 líneas, se determinó que, a pesar de que no se detectó que el tipo de citoplasma afecte los caracteres de la línea HA89, afecta su aptitud combinatoria general, con respecto al diámetro del capítulo, el peso de las semillas y el porcentaje de aceite de las semillas. Esto se puso de manifiesto en el período agrícola 1999/00 que tuvo mejores condiciones ambientales para el desarrollo del cultivo.

Los análisis de los resultados obtenidos en los períodos agrícolas 1998/99 y 1999/00 no detectaron las diferencias entre las líneas isoplásmicas HA89 que se manifestaron cuando se evaluaron los cuatro períodos agrícolas. De todas maneras, los dos períodos agrícolas mencionados fueron suficientes para encontrar diferencias

en la aptitud combinatoria general de dichas líneas isoplásmicas. Hay que destacar que, tanto en promedio como en cada una de las F_1 , las plantas CMSRES1 tuvieron un diámetro menor de capítulo que aquellas CMSPET1 pero que no se diferencian en el rendimiento de semillas. Por otro lado, dos de las progenies F_1 con CMSPET1 fueron androfértiles. Debido a esto, las diferencias detectadas en el diámetro del capítulo entre las F_1 con CMSRES1 y las F_1 con CMSPET1 pueden ser atribuidas tanto al tipo de citoplasma como a la fertilidad masculina. Cuando se evaluaron las líneas isoplásmicas HA89 en los cuatro períodos agrícolas, no se detectaron diferencias en el diámetro del capítulo entre las plantas de la línea HA89 CMSRES1 y las de HA89 CMSPET1. Esto daría indicios de que hay un efecto de CMSRES1 sobre el diámetro del capítulo pero que además, hay un efecto de interacción entre el citoplasma y el genotipo nuclear. Petrov (1992) determinó que las plantas de los genotipos de girasol portadores de CMSANT1 tienen un diámetro mayor de capítulo que las plantas con otros citoplasmas que evaluó, lo cual indicaría también que el tipo de citoplasma afecta el tamaño del capítulo.

Así como las semillas de las plantas de la línea HA89 CMSRIG1 tienen un menor porcentaje de aceite que las del resto de las líneas isoplásmicas HA89, también las progenies F_1 cuyo progenitor femenino fue la misma línea tienen menor porcentaje de aceite que las F_1 con cualquier otro citoplasma. Por otro lado, así como entre todas las líneas isoplásmicas, las semillas de la línea HA89 CMSGIG1 fueron las que presentaron mayor porcentaje de aceite, también las progenies F_1 con CMSGIG1 fueron las que presentaron mayor porcentaje de aceite, aunque sin diferenciarse de las progenies F_1 con CMS PET1 y PET2.

Serieys (1997; 1999) al evaluar una gran cantidad de citoplasmas que producen androesterilidad en el girasol, encontró que tanto las plantas CMSPET2 como las plantas CMSPEF1 tienen menores altura, rendimiento y porcentaje de aceite en las

semillas que las plantas con otros citoplasmas. De ello surge, por un lado, que en la literatura sobre el tema también se ha detectado un efecto del citoplasma sobre el porcentaje de aceite de las semillas y por el otro, que tal vez, cuando un carácter se afecte, otros se vean también afectados por estar relacionados. En este trabajo de investigación se detectó un efecto del citoplasma RES1 sobre el diámetro del capítulo pero no se determinó que exista un efecto sobre el peso o el número de semillas del capítulo. Tal vez si se hubieran muestreado una mayor cantidad de plantas en cada parcela del ensayo, el coeficiente de variación del error correspondiente al peso y al número de semillas hubiera sido menor y se habrían detectado diferencias entre las plantas portadoras de los diferentes citoplasmas. Esto no se hizo porque el ensayo hubiera abarcado una gran superficie, lo cual hace prácticamente imposible que no haya variaciones ambientales dentro de los bloques. De ello se deduce que sería necesario evaluar mejor si existe algún efecto del citoplasma RES1 sobre algunos de los componentes del rendimiento.

La realización de un único ensayo brindó información preliminar sobre el comportamiento frente a *S. sclerotiorum* de siete citoplasmas que condicionan la androesterilidad en el girasol, ya sea en el comportamiento de las plantas de las líneas isoplásmicas HA89 o en la aptitud combinatoria general de estas líneas. Los resultados indicaron que las fuentes CMS RES1, PET1, PET2, PEF1, RIG1, MAX1 y GIG1 tienen el mismo comportamiento con respecto a la podredumbre del capítulo. Crognale (2002), al evaluar el comportamiento de las líneas isoplásmicas HA89 B, CMS PET1, PET2, GIG1 y PEF1 frente a *S. sclerotiorum*, mediante los dos índices utilizados en este trabajo, determinó que estos citoplasmas que condicionan la androesterilidad no afectan dicho comportamiento. Tanto el trabajo de investigación de Crognale (2002) como el presente trabajo fueron realizados en el mismo campo experimental, aunque en diferentes períodos agrícolas.

El hecho de que la interacción entre las líneas isoplásmicas androestériles y las líneas progenitoras masculinas sea significativa en todos los caracteres, salvo en el porcentaje de aceite de las semillas, indica que existe una interacción entre el citoplasma y el genotipo nuclear que define la aptitud combinatoria específica de las líneas con respecto a varios caracteres de relevancia agronómica. Las condiciones ambientales de los dos períodos agrícolas permitieron que se manifiesten las diferencias que normalmente se observan entre las líneas endocriadas elegidas como “probadores”, es decir las que actuaron como progenitores masculinos. Esto indica que se eligieron “probadores” con una amplia variabilidad genética.

Se debe considerar que el estudio realizado en las líneas isoplásmicas HA89 no puede hacerse extensivo a otros genotipos nucleares pero da indicios de la relación que existe entre los citoplasmas que condicionan la androfertilidad y diversos caracteres de relevancia agronómica en el girasol.

CONCLUSIONES

- Las plantas androestériles, con citoplasma RES1, de los genotipos evaluados tienen un menor tamaño del capítulo que las plantas que portan el citoplasma PET1.
- La producción de semillas, y por lo tanto, la fertilidad femenina no se afecta en las plantas portadoras del citoplasma RES1.

CAPITULO 4

CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE LAS PLANTAS

CMSRES1

INTRODUCCION

Algunas investigaciones realizadas en varias especies vegetales, que incluyen maíz, *Petunia*, girasol, *Brassica* y poroto, demostraron que diferentes modificaciones del genoma mitocondrial están asociadas con el fenotipo de la androesterilidad (Budar y Pelletier 2001). La mayoría de los genes mitocondriales, que están relacionados con esta condición tienen una función conocida y, generalmente, en esta asociación queda involucrada la co-transcripción de genes mitocondriales esenciales.

Los genomas mitocondriales de las plantas superiores varían tanto en estructura como en tamaño. Aunque se consideran muy grandes (200-2400 Kb), en relación al genoma mitocondrial animal, y a menudo es dificultoso detectar las secuencias responsables de la androesterilidad, es posible identificar marcos abiertos de lectura (*orf*) que se generan al producirse diferentes sucesos de recombinación. Así, estos genes que resultan de duplicaciones y reordenamientos de las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) introducen diversidad genética, constituyendo un importante mecanismo evolutivo reservado a los vegetales (Budar *et al.* 2003). En muchos casos, los transcriptos originados de estos *orf* alterados son traducidos a proteínas únicas que interfieren con las funciones mitocondriales y el desarrollo de los granos de polen. Sin embargo, el conocimiento acerca de los procesos fisiológicos involucrados en el proceso abortivo durante la microsporogénesis es escaso.

Desde el punto de vista molecular, el citoplasma PET1 ha sido el más estudiado entre los citoplasmas que producen androesterilidad en girasol. Las primeras

evidencias de que el ADNmt condiciona la androesterilidad PET1 fueron aportadas por Brown *et al.* (1986, citado por Jan 1997), quienes encontraron un plásmido circular de 1,45 Kb en el genoma mitocondrial de cuatro líneas endocriadas fértiles pero no en las correspondientes líneas CMSPET1. Posteriormente, se pusieron de manifiesto modificaciones estructurales en el genoma mitocondrial que fueron las responsables de la condición de androesterilidad. Tales modificaciones se dan entre los genes *atpA* y *cob*, involucrando la inversión de un fragmento de 11 Kb y la inserción de otro fragmento de 5 Kb. Ello conlleva a crear un nuevo marco de lectura, el *orfH522* en la región flanqueante 3' del gen *atpA* (Sicutella y Palmer 1988; Kohler *et al.* 1991, Laver *et al.* 1991). Entonces, junto con el gen *atpA* se co-transcribe una nueva proteína de 16 KDa, responsable del fenotipo de androesterilidad PET1 (Horn *et al.* 1991; 1996). Tales arreglos se dan en la región comprendida entre los genes *atp6* y *coxIII*, involucrando al menos cinco *loci*, *atp6*, *atp9*, *atpA*, *nad 1+5* y *coxIII* (Spasova *et al.* 1994).

Por otro lado, en el citoplasma que condiciona la androesterilidad MAX1, si bien está presente la secuencia del *orfH522*, con un 93% de homología respecto de la secuencia de CMSPET1, no se transcribe el polipéptido de 16 KDa (Hahn y Friedt 1994). El arreglo "tipo PET1", caracterizado por la presencia del *orfH522* y de la proteína específica de 16 KDa, fue encontrado en nueve fuentes CMS: una apareció espontáneamente y dos por mutagénesis en *H. annuus*, mientras que seis aparecieron por hibridación interespecífica (Horn *et al.* 1996).

En otras fuentes de androesterilidad citoplásmica se dan otros reordenamientos en el genoma mitocondrial, con varias sustituciones nucleotídicas, inserciones y deleciones que sintetizan otras proteínas específicas, las que fueron determinadas a partir de hibridaciones con el *orfH708* y el *orfH873* (Horn y Friedt 1999). Por ejemplo, en las plantas CMSARG3 y CMSRIG1 se detectó una proteína de 17,5 KDa, en las

CMSGIG1 y CMSPET2 se identificó una proteína de 12,4 KDa y en las CMS ANN1 y ANN3 se detectaron tres proteínas de 16,3, 16,9 y 34 KDa. Estas proteínas pudieron haberse creado por la hibridación interespecífica o bien porque ciertas configuraciones del ADNmt estarían presentes en las especies silvestres de *Helianthus* (Horn y Friedt 1999). Posteriormente, Horn (2002) analizó la organización del genoma mitocondrial, mediante la técnica de *Southern*, en 28 fuentes CMS. A partir de los patrones de hibridación obtenidos, utilizando nueve genes mitocondriales conocidos y tres *orf* como sondas, pudo distinguir 10 grupos de citoplasmas en el género *Helianthus*, según su similitud genética. Además, se demostró que los citoplasmas provenientes de distintos orígenes pueden mostrar una similitud considerable, que no es la que se esperaría a partir de su genealogía.

Dado que muchos de los citoplasmas que condicionan la androesterilidad en el girasol se han caracterizado por modificaciones en la región comprendida entre los genes *atp6* y *coxIII* del genoma mitocondrial, se consideró como objetivo determinar si existen cambios moleculares, con respecto a CMS PET1 y MAX1, situados en dicha región del ADNmt de las plantas CMSRES1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron, desde el punto de vista molecular, las líneas endocriadas HA89, RHA271 y RHA801 con diferentes citoplasmas. Los genotipos que se evaluaron se detallan en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Líneas endocriadas utilizadas en el estudio molecular del citoplasma RES1

<u>Línea</u>	<u>citoplasma</u>	<u>fenotipo</u>
HA89 B	normal	androfétil
HA89 CMSPET1	PET1	androestéril
HA89 CMSPET2	PET2	androestéril
HA89 CMSRES1	RES1	androestéril
HA89 CMSMAX1	MAX1	androestéril
RHA271	PET1	androfétil
RHA271 CMSRES1	RES1	androestéril
RHA801	PET1	androfétil
<u>RHA801 CMSRES1</u>	<u>RES1</u>	<u>androestéril</u>

Se cultivaron diez plantas de cada una de las líneas endocriadas en macetas, en condiciones controladas de invernáculo. Cuando las plantas habían alcanzado el cuarto par de hojas se procedió a la extracción de ADN total de tejido foliar. Este procedimiento se realizó siguiendo la metodología propuesta por Saghai-Marooof *et al.* (1984). Se lograba una concentración igual o mayor a 20 ng/μl de ADN de óptima calidad.

1. Amplificación mediante cebadores universales

Se realizaron diferentes reacciones de amplificación (PCR), mediante la enzima polimerasa, en condiciones de ciclado específicas que se detallan en la **Tabla 4.2**. En esta primera etapa, para determinar la calidad del ADN molde, sólo fue analizada la línea HA89 en tres versiones: B, CMSPET1 y CMSRES1. Los cebadores universales utilizados fueron: *tubulina*, como cebador nuclear; *psbc-trnS*, como cebador cloroplástico; *nad1* exones B-C, *nad4* exones 1-2 y exones 2-4, *coxIII* y *rpS14-cob*, como cebadores mitocondriales (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2. Cebadores y condiciones de ciclado utilizados en las reacciones de amplificación por PCR

Cebador 5´	Secuencia	Cebador 3´	Secuencia	Tamaño esperado	Condiciones de ciclado	Referencia
Tubulina 5´	5´-GTGACTTGAAC CATCTGATCTC-3´	Tubulina 3´	5´-CATGCCTTCCCC GGTATACCA-3´	500 pb	35 ciclos: 94° 1min; 60° 1min; 72° 1min Δ t 5 seg 72° 4min	Iglesias (1994)
<i>psbC</i>	5´-GGTCGTGACC AAGAAACCAC-3´	<i>TrnS</i>	5´-GTTCGAATCCTC TCTCTC-3´	1680 pb	30 ciclos: 92° 45 seg; 60° 1min; 72° 2min 72° 10min	Demesure <i>et al.</i> (1995)
<i>nad 1</i> exon B	5´-CATTACGATCT GCAGCTCA-3´	<i>nad 1</i> exon C	5´- GGAGCTCGATTAGT TTCTGC -3´	1550 pb	30 ciclos: 92° 45 seg; 57,5° 1min; 72° 2min 72° 5min	Demesure <i>et al.</i> (1995)
<i>nad 4</i> exon 1	5´-AGTGGGTTGGT CTGGTATG-3´	<i>nad 4</i> exon 2	5´- TCATATGGGCTACT GAGGAG-3´	1700 pb	30 ciclos: 92° 45 seg; 56° 1min; 72° 2min 72° 10min	Demesure <i>et al.</i> (1995)

- continúa -

- continuación -

<i>coxIII</i> 5'	5'-GTAGATCCAAG TCCATGGC-3'	<i>coxIII</i> 3'	5'- AACCACGTCTACAA AATGCC-3'	700 pb	35 ciclos: 92° 45 seg; 60° 1min; 72° 2min Δt 5 seg 72° 5min	Iglesias (1994)
<i>RpS14</i>	5' CACGGGTCGCC CTCGTTCCG-3'	<i>cob</i>	5'- GTGTGGACGATATA GGTTGT-3'	1640 pb	30 ciclos: 92° 45 seg; 56,8° 1min; 72° 2min 72° 10min	Demesure <i>et al.</i> (1995)
<i>nad</i> 4 exon 2	5'-TGTTTCCCGA AGCGACACTT-3'	<i>nad</i> 4 exon 4	5'-GGAACAATTTGG GGTGAACA-3'	4000 pb	35 ciclos: 92° 45 seg; 60° 1min; 72° 2min Δt 5seg 72° 5min	Demesure <i>et al.</i> (1995)
<i>orfH522</i> 5'	5'-CCCCCTCCCTG GTGATCCGGCG-3'	<i>orfH522</i> 3'	5'- CCCTCTATGAGTAC CGTTCTCTCACG-3'	350 pb (CMSPET1 y CMSMAX1)	30 ciclos: 94° 30 seg; 55° 30 seg; 72° 2min 72° 5min	Rambaud <i>et al.</i> (1997)

Sistema triple de cebadores

<i>atpA</i> 5'	5'-GCCGCTAAACG ATCGGACCAGACA GGCGCA-3'	<i>orfH522</i> 3'	5'-GCCCTTAGGGCC ACCTTGCGAAGTCA G-3'	840 pb (HA89 B)	35 ciclos: 94° 1min; 62° 1 min; 72° 90 seg 72° 5min	Rieseberg <i>et al.</i> (1994)
		<i>orfH873</i> 3'	5'-TGGAATCCCGG GGGAGCCCGTTCCT AGA-3'	1450 pb (CMSPET1)		

Los productos de amplificación de cada uno de los cebadores se separaron en geles de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

Posteriormente, en la búsqueda de polimorfismos, sólo se analizaron los fragmentos obtenidos utilizando los cebadores mitocondriales *coxIII*, *nad4* exones 2 - 4 y *rpS14-cob*. Tales fragmentos se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2%, extraídos del gel, purificados con Agar ACE®(Promega), según el protocolo comercial, y digeridos en forma combinada con las enzimas de restricción *HpaII* y *HaeIII*®(Promega). El producto de la digestión enzimática se separó en geles de acrilamida al 8% (29:1, acrilamida : bisacrilamida) en condiciones nativas y visualizado por tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador Φ x174/*HaeIII*®(Promega), como referencia para el tamaño de bandas. A partir de las comparaciones visuales entre las bandas del marcador y las bandas obtenidas en cada caso, se estimó el tamaño de los fragmentos obtenidos.

2. Amplificación mediante cebadores específicos de girasol

Para lograr una caracterización más detallada, como así también para determinar si las diferencias estructurales involucraban a la región comprendida entre los *loci atp6* y *coxIII* del ADNmt, se utilizaron cebadores específicos de regiones implicadas en otras fuentes CMS de girasol. En este análisis se evaluaron todos los genotipos indicados en la **Tabla 4.1**. Los cebadores específicos utilizados fueron:

- el *orfH522*, por ser un marco de lectura abierto producido por una alteración “*downstream*” del gen *atpA* en el genoma mitocondrial, que condiciona la androesterilidad, tanto en las plantas portadoras del citoplasma PET1 como de MAX1 (Spasova *et al.* 1994).

- un sistema conformado por tres cebadores que detectan la presencia de una región homóloga con las porciones mitocondriales correspondientes a los *loci atpA, orfH522 y orfH873* (Rieseberg *et al.* 1994).

Las condiciones de ciclado fueron específicas de cada cebador y se detallan en la **Tabla 4.2**. Los productos de las reacciones de amplificación se separaron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. El marcador de referencia utilizado en estos geles fue 1 Kb ladder (®Promega).

3. Hibridaciones de tipo Southern

Se analizaron todos los genotipos indicados en la **Tabla 4.1**. Los ADN se digirieron con las siguientes cuatro enzimas de restricción: *BglII*, *EcoRI*, *HlnDIII* y *Sall* (®Promega). Luego, los respectivos fragmentos se separaron en geles de agarosa al 1%, se depurinizaron, se denaturalizaron y se neutralizaron, siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente, los fragmentos se transfirieron a una membrana de nylon con carga positiva (Hybond-N+, ®Amersham).

Las sondas que se utilizaron en la hibridación se correspondían con los siguientes genes mitocondriales conocidos:

- *atpA* (700 pb),
- *atp9* (2200 pb),
- *coxIII* (1100 pb).

Tales sondas se obtuvieron, mediante una amplificación por PCR, utilizando los cebadores *pUC/M13* (®Promega), a partir de plásmidos *pUC* que contenían los genes citados.

Además, se utilizó como sonda una secuencia correspondiente al marco abierto de lectura *orfH522*. Esta sonda se obtuvo por la amplificación del ADN de plantas de la

línea HA89 CMSPET1, mediante los cebadores específicos *orfH522for* y *orfH522rev* (Rambaud *et al.* 1997).

Una vez logrados los fragmentos por la amplificación, se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 2%. Los cuatro fragmentos se extrajeron de los geles de agarosa y se purificaron utilizando el protocolo comercial QiAquick (®Qiagen). Estos fragmentos posteriormente se marcaron con fosfatasa alcalina utilizando el protocolo comercial de detección AlkPhos Direct Labelling (®Amersham). Luego de la hibridación, se detectaron los fragmentos por quimioluminiscencia, utilizando el sistema de detección AlkPhos (®Amersham).

RESULTADOS

1. Amplificación mediante cebadores universales

Las bandas que se obtuvieron a partir de los genomas de las líneas HA89 B, HA89 CMSPET1 y HA89 CMSRES1, utilizando cebadores universales del genoma nuclear y de regiones hipervariables del genoma de mitocondrias y cloroplastos, se detallan en la **Tabla 4.3**.

Las bandas obtenidas con los cebadores nucleares y cloroplásticos permiten deducir que no hay diferencias en el tamaño de los fragmentos de ADN correspondientes a dichos cebadores entre las plantas de las distintas versiones de la línea HA89 (B, CMSPET1 y CMSRES1). Estos fragmentos tuvieron el tamaño en pares de bases (pb) esperado. Con esto quedó demostrado que la calidad del ADN molde era óptima para las reacciones de amplificación.

Tabla 4.3. Bandas obtenidas por la amplificación de diferentes cebadores (expresada en pares de bases) en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestériles (CMS PET1 y RES1)

Cebadores	Líneas isoplásmicas		
	HA89 B	HA89 CMSPET1	HA89 CMSRES1
<i>Nuclear:</i>			
Tubulinas	500	500	500
<i>Cloroplástico:</i>			
<i>psbC- trnS</i>	1600	1600	1600
<i>Mitocondriales:</i>			
<i>nad1</i> exones B – C	-	-	-
<i>nad4</i> exones 1 – 2	-	2000	2000
<i>coxIII</i>	700	700	700
<i>rpS14 – cob</i>	1000	1000	1000
<i>nad4</i> exones 2 – 4	600	600	600

Cuando se trabajó con los cebadores mitocondriales, no se obtuvieron productos de la amplificación en todos los genotipos. Los resultados del análisis de los productos de amplificación logrados, que incluye la comparación con el tamaño que se esperaba de estos cebadores mitocondriales (**Tabla 4.2.**), fueron los siguientes:

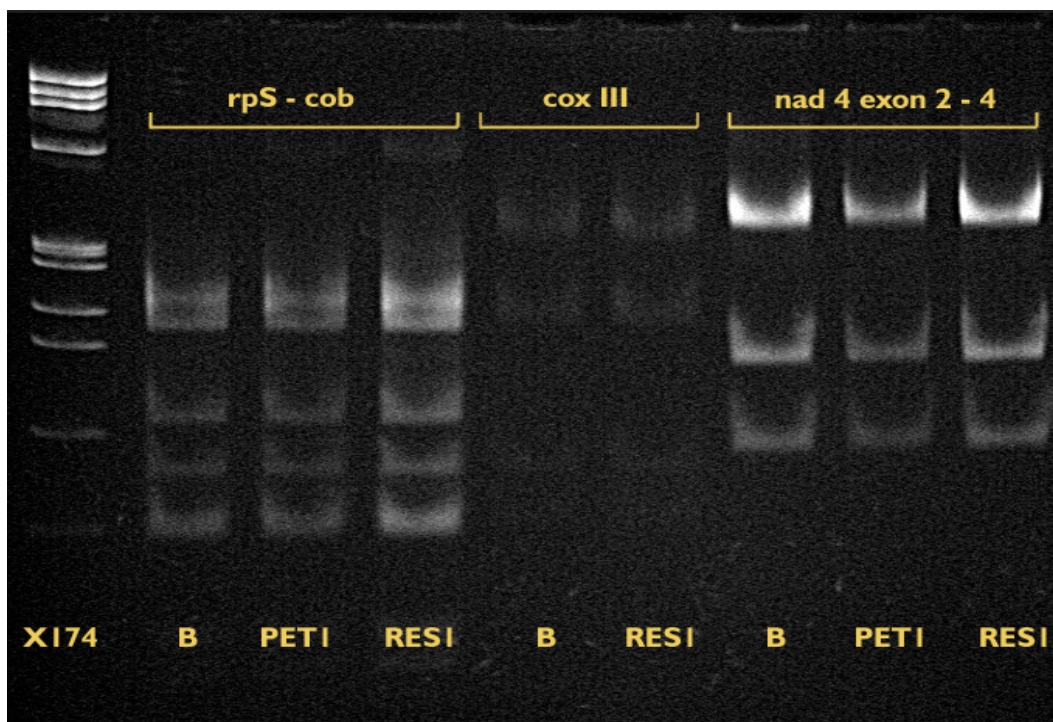
- *nad1* exones B – C: no se lograron productos de amplificación,
- *nad4* exones 1 - 2, *coxIII* y *rpS14 – cob*: los fragmentos obtenidos fueron de tamaño similar al esperado (2000, 700 y 1000 pb respectivamente)
- *nad4* exones 2-4: el tamaño del fragmento (600 pb) fue menor que lo esperado (4000 pb).

En la búsqueda de polimorfismos, sólo se evaluaron los fragmentos amplificados con *coxIII*, *rpS14 – cob* y *nad4* exones 2 – 4, debido a que fueron los que se detectaron en las tres versiones de la línea HA89 que se evaluaron. Los productos de la digestión enzimática, con *HpaII* y *HaeIII*, aportaron diferentes perfiles de bandeo, según los cebadores, pero no se observaron diferencias entre los genotipos evaluados (**Fig. 4.1.**). Las bandas que se lograron para los fragmentos amplificados y digeridos fueron:

- *rpS14 – cob*: bandas de 250, 220, 160, 120, 100 y 70 pb que totalizaron 920 pb.
- *coxIII*: bandas de 350, 230, 100 y 80 pb que totalizaron 760 pb.
- *nad4*, exones 2 – 4: bandas de 380, 180 y 110 pb que totalizaron 670 pb.

Si bien se obtuvieron diferencias en la suma total de las bandas, de entre 60 y 80 pb, al comparar el tamaño total de las bandas digeridas con las enzimas de restricción y el tamaño de las bandas sin digerir, dichas diferencias no son considerables.

Figura 4.1. Polimorfismos de los fragmentos amplificados con *rpS14-cob*, *coxIII* y *nad4*, exones 2-4, digeridos con las enzimas de restricción *HpaII* y *HaeIII* en las líneas isoplásmicas de girasol HA89 fértil (B) y HA89 androestéril (CMS PET1 y RES1).



X174 corresponde al marcador de peso molecular, $\text{Ø}x174/HaeIII$.

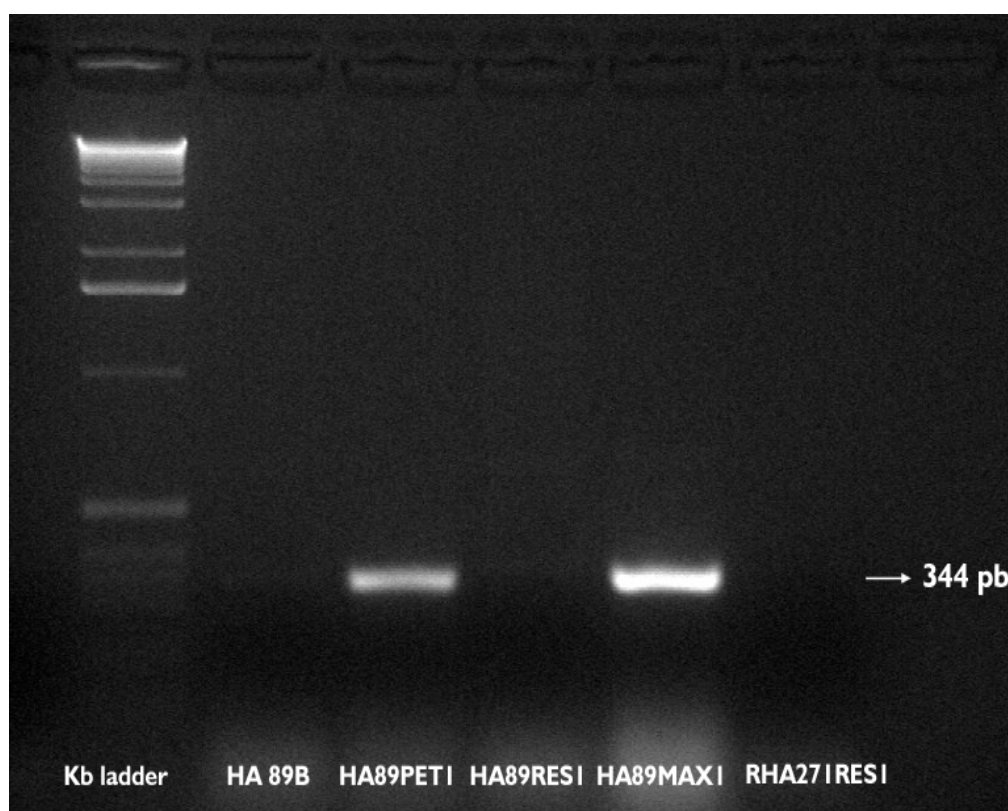
2. Amplificación mediante cebadores específicos de girasol

Al utilizar el *orfH522* como cebador específico de girasol, tanto en HA89 CMSPET1 como en HA89 CMSMAX1, se obtuvo la banda esperada de 344 pb (**Tabla 4.2.**). Sin embargo, tanto en HA89 B como en HA89 CMSRES1 y en las líneas RHA portadoras del citoplasma RES1 no se logró la amplificación de ninguna banda (**Fig. 4.2.**).

Cuando se utilizó el sistema triple de cebadores, dependiendo de los genotipos, se obtuvieron los tres productos de amplificación que se detallan (**Fig. 4.3.**):

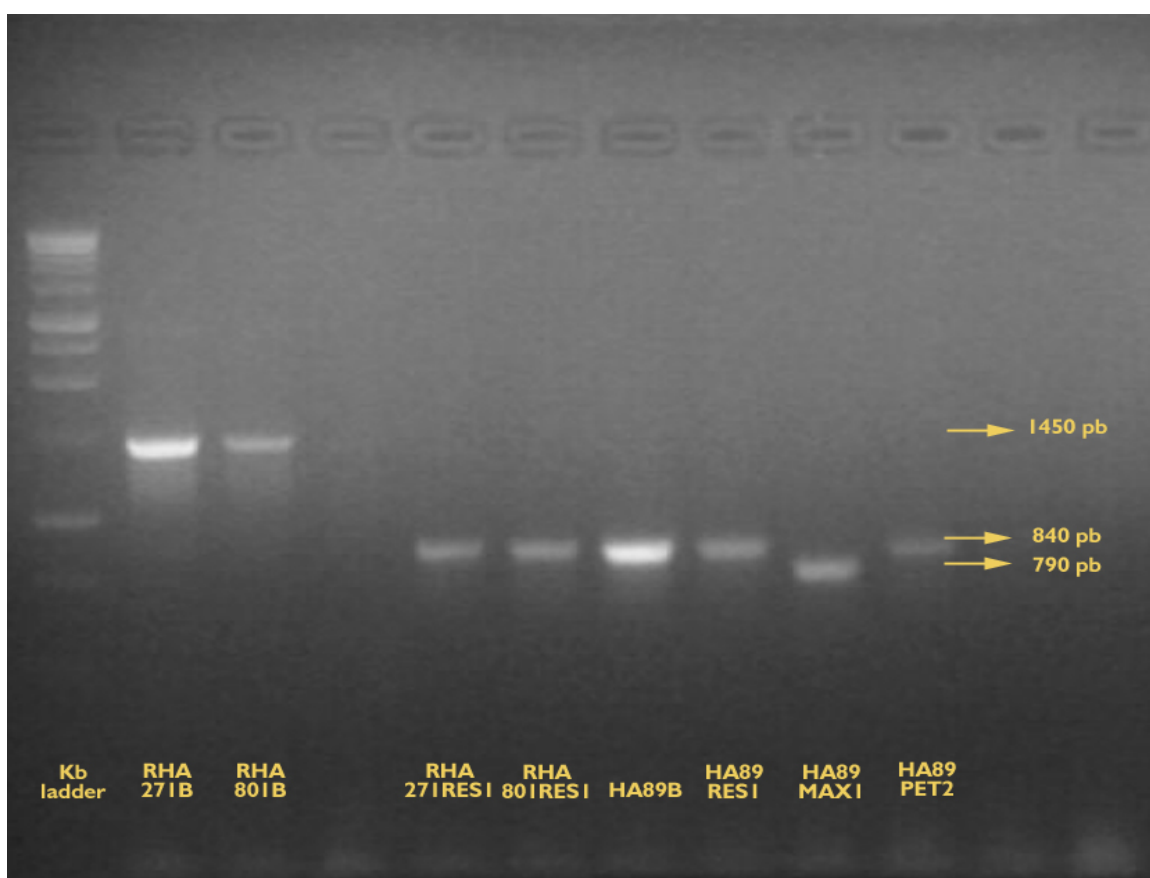
- una banda de 1450 pb: en los genotipos que presentaban el citoplasma PET1 (RHA271, RHA801 y HA89)
- una banda de 840 pb: en los genotipos que presentaban el citoplasma RES1 (HA89, RHA271 y RHA801), en el genotipo HA89 CMSPET2 y en la línea fértil HA89 B
- una banda de 790 pb: en el genotipo HA89 CMSMAX1.

Figura 4.2. Productos de la amplificación obtenidos con el cebador específico de girasol *orfH522* en las líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y HA89 androestéril (CMS PET1, RES1 y MAX1) y en la línea androestéril RHA271 CMSRES1



Kb ladder corresponde al marcador de peso molecular, 1Kb ladder

Figura 4.3. Productos de la amplificación obtenidos con el sistema triple de cebadores específicos de girasol en las líneas isoplásmicas de girasol, RHA271 fértil (B) y androestéril (CMSRES1), RHA801 fértil (B) y androestéril (CMSRES1) y HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1, MAX1 y PET2)



Kb ladder corresponde al marcador de peso molecular, 1Kb ladder

3. Hibridación de tipo Southern

El detalle de las bandas que se obtuvieron se presenta en la **Tabla 4.4**. Al digerir el ADN con las enzimas de restricción *BglII*, *EcoRI*, *HinDIII* y *SalI*, y al hibridar posteriormente con la sonda *atpA*, se obtuvieron distintos resultados. Con *BglII*, los patrones de hibridación entre la línea HA89 fértil y los tres genotipos con el citoplasma RES1 fueron iguales (**Fig. 4.4B**). Con *EcoRI*, se obtuvo el mismo patrón en la línea HA89 B y HA89 CMSRES1 (**Fig. 4.5**). Con *HinDIII*, las líneas HA89 B, HA89 CMSRES1 y RHA271 CMSRES1 tuvieron la misma banda mientras que en RHA271 se observó una banda de menor tamaño.

Mediante la digestión con *Sall*, se detectaron dos bandas de 23 y 4,8 Kb en HA89 B, una banda adicional en HA89 CMSRES1 de 18 Kb y una cuarta banda en HA89 CMSPET1 de 9 Kb (**Fig. 4.4A**). Al analizar los productos de la hibridación de los digestos de *BglII*, en la línea HA89 CMS MAX1 sólo se obtuvo una banda de 7,8 Kb mientras que en HA89 CMSPET2 se obtuvieron tres bandas de 9, 8 y 6 Kb respectivamente. Cuando se analizaron los patrones de bandas de las líneas RHA271 y RHA801, se encontraron diferencias entre las líneas B y las CMSRES1. Se obtuvo una banda única, de 5,5 Kb en las líneas fértiles y de 8 Kb en las líneas androestériles con *BglII* mientras que con *Sall* se obtuvieron dos bandas, de 23 y 9 Kb, en los genotipos fértiles y una sola banda de 23 Kb en los genotipos CMSRES1.

Cuando se analizaron los patrones de hibridación de la sonda *atp9* sobre el ADN genómico de las líneas digerido con *BglII*, se observó que la línea HA89 B tiene el mismo comportamiento que HA89 CMSRES1, HA89 CMSMAX1, RHA271 CMSRES1 y RHA801 CMSRES1. Las líneas HA89 CMS PET1 y PET2 presentaron dos bandas, de 11 y 10 Kb, mientras que en las líneas RHA271 y RHA801 se detectó la banda de 10 Kb. En los patrones de bandeado obtenidos luego de la digestión con *EcoRI* se encontraron diferencias. Se reconoce un fragmento de 6 Kb tanto en HA89 B como en

HA89 CMSRES1, un fragmento de 18,5 Kb sólo en HA89 B y una banda de 11 Kb en HA89 CMSRES1 (**Fig. 4.6B**). Utilizando esta misma sonda pero con los digestos de *HinDIII* se observó un número variable de bandas, entre dos y cuatro. Las bandas de tamaño intermedio eran las que estaban siempre presentes (**Fig. 4.6A**). Como no todas las bandas estuvieron presentes, las diferencias no fueron consistentes y quizás se debieron a problemas de la técnica. Al analizar los ADN genómicos digeridos con *Sall*, no se observó ninguna banda.

Utilizando la sonda *coxIII* sobre los ADN digeridos con *BglIII* o *HinDIII*, se observaron diferencias en esa región entre las líneas isoplásmicas HA89, RHA271 y RHA801, tanto CMSRES1 como CMSPET1. Con esta sonda se detectó una banda de 8 Kb en HA89 B y otra banda de 5,5 Kb en CMSRES1 cuyo ADN se digirió con *BglIII* (**Fig. 4.7.**). A partir de los digestos con *HinDIII* se detectó una banda de 7 Kb en la línea HA89 fértil y un fragmento de 5 Kb en el caso de las plantas HA89 CMSRES1. Utilizando esta sonda sobre el ADN digerido con *Sall*, no se obtuvieron diferencias entre los genotipos ya que en todos se observó una sola banda de 9 Kb.

Cuando se utilizó la sonda *orfH522* y considerando tanto los digestos con *BglIII* como con *Sall*, se obtuvo el mismo patrón de bandas en las líneas CMSPET1, independientemente del genoma nuclear (HA89, RHA271 o RHA801). En estos genotipos se observó una única banda de 1 Kb. En la línea portadora del citoplasma MAX1 se determinó la existencia de una banda de 2 Kb. Sin embargo, no se detectó hibridación en ninguna de las líneas portadoras del citoplasma RES1, como tampoco en la línea fértil HA89 B ni en HA89 CMS PET2 (**Fig. 4.8.**). Al analizar los ADN digeridos con *EcoRI* como *HinDIII*, la hibridación no fue satisfactoria.

Tabla 4.4. Tamaño de las bandas (expresado en Kb) obtenidas por hibridación de tipo *Southern*, con diferentes combinaciones de sondas y enzimas de restricción en las líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS PET1, RES1, MAX1 y PET2), RHA271 fértil (B) y androestéril (CMSRES1), RHA801 fértil (B) y androestéril (CMSRES1)

Sonda	<i>atpA</i>				<i>atp9</i>				<i>cox III</i>				<i>orfH522</i>			
	<i>BglIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HlnDIII</i>	<i>Sall</i>	<i>BglIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HlnDIII</i>	<i>Sall</i>	<i>BglIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HlnDIII</i>	<i>Sall</i>	<i>BglIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HlnDIII</i>	<i>Sall</i>
Genotipo																
HA89 B	8	56 38	37	23 4,8		18,5 6	45 35 28,5 25		8	47	7	9	-			-
HA89 CMSPET1				23 18 9 4,9	11 10				8			9	1			1
HA89 CMSRES1	8	56 38	37	23 18 4,7		11 6	45 35 28,5		5,5	47 7,5 3	5	9	-			-
HA89 CMSMAX1	7,8												2			2
HA89 CMSPET2	9 8 6				11 10				5,5							

- continúa -

- continuación -

RHA271	5,5	42 38	29	23 9	10		45 35 28,5 25			47		9	1			1
RHA271CMSRES1	8		37	23			35 28,5		5,5	47 7,5 3		9	-			-
RHA801	5,5			23 9	10				8			9	1			1
RHA801CMSRES1	8			23					5,5			9	-			-

NOTA: en azul, diferencias que más se destacan

Figura 4.4. *Southern blots* obtenidos con la sonda *atpA* en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1 y PET1). **(A)** ADN digerido con la enzima de restricción *SalI*. **(B)** ADN digerido con la enzima de restricción *BglII*

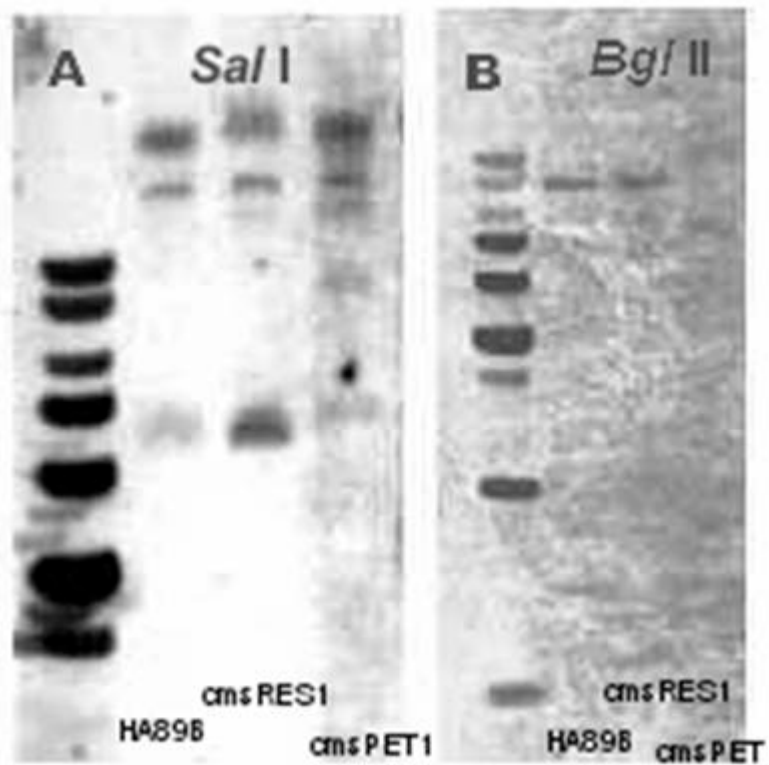


Figura 4.5. *Southern blot* obtenido con la sonda *atpA* en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMSRES1); ADN digerido con la enzima de restricción *EcoRI*

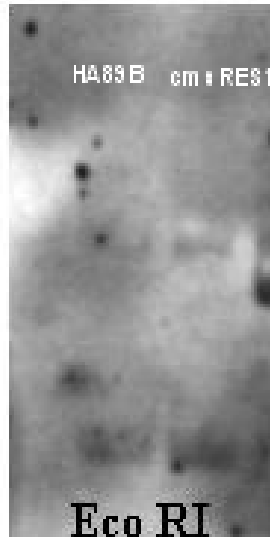


Figura 4.6. *Southern blots* obtenidos con la sonda *atp9* en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1 y PET1). **(A)** ADN digerido con la enzima de restricción *HinDIII*. **(B)** ADN digerido con la enzima de restricción *EcoRI*

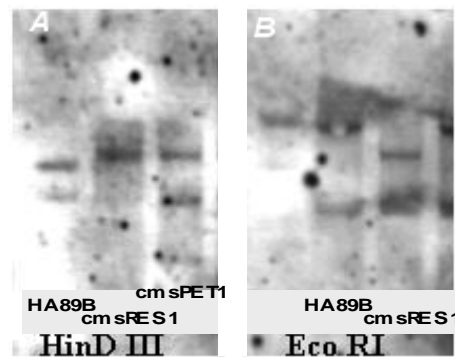


Figura 4.7. *Southern blot* obtenido con la sonda *coxIII* en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1 y PET1); ADN digerido con la enzima de restricción *BglIII*

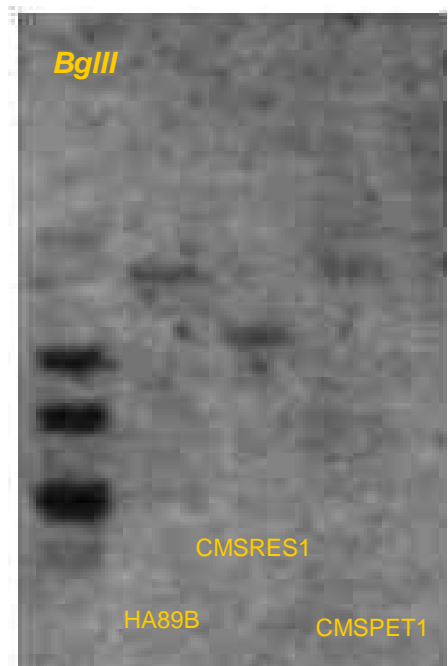
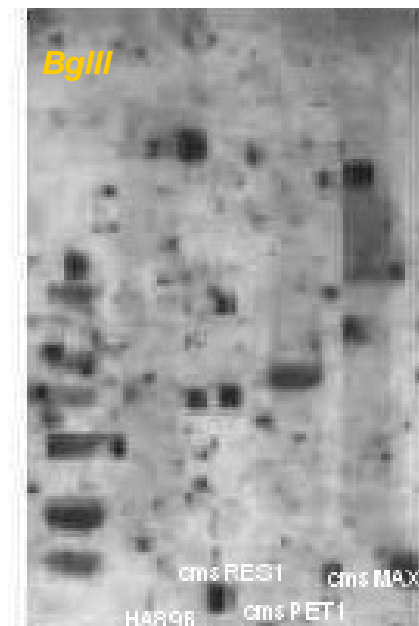


Figura 4.8. *Southern blot* obtenido con la sonda *orfH522* en distintas líneas isoplásmicas de girasol, HA89 fértil (B) y androestéril (CMS RES1, PET1 y MAX1); ADN digerido con la enzima de restricción *BglIII*



DISCUSIÓN

A partir de los patrones de bandeo obtenidos por la amplificación de secuencias específicas universales, no fueron encontradas diferencias entre las líneas isoplásmicas HA89 B, HA89 CMSPET1 y HA89 CMSRES1, tanto al utilizar los cebadores nucleares como los mitocondriales y los cloroplásticos. Considerando que los cebadores mitocondriales utilizados son universales, quizás se analizó la región donde no se habían producido los cambios estructurales y por lo tanto, no se encontraron diferencias. Además, tampoco se detectaron polimorfismos en los fragmentos amplificados con *coxIII*, *rpS14 – cob* y *nad4* exones 2 – 4, lo que reafirma la similitud de los fragmentos de ADNmt de las líneas isoplásmicas, correspondientes a estos cebadores.

Al analizar los productos obtenidos en las reacciones de amplificación con el cebador específico *orfH522*, se observó que la banda obtenida en las plantas CMSPET1 y CMSMAX1 concuerda con lo citado por Rambaud *et al.* (1997). Este cambio estructural que se manifiesta tanto en las plantas CMSPET1 como en las CMSMAX1 no se observó en todas las líneas CMSRES1 ni en HA89 B. Esto indica que el *orfH522* no está presente en el genoma del ADNmt de las plantas CMSRES1 y, por lo tanto, no sería el responsable de la condición de androesterilidad.

Cuando se utilizó el triplete de cebadores, apareció la banda de 1450 pb en las líneas HA89 CMSPET1, RHA271 y RHA801 la cual era la que se esperaba encontrar en estos genotipos portadores de CMSPET1. La presencia de la banda de 840 pb señala la falta de hibridación del cebador *orfH522* antisentido en los genotipos evaluados. Este resultado corroboró, por un lado, la similitud estructural de la región 3´ del gen *atpA - orfH873* entre los ADNmt de la línea HA 89 fértil y las tres líneas CMSRES1 y, por el otro, la diferencia que presentan los ADNmt de las líneas CMSPET1 y CMSMAX1, en esta región. Por último, la banda de 790 pb encontrada

en las plantas CMSMAX1 puede ser explicada por la hibridación de los cebadores *orfH522* antisentido y *orfH873* antisentido, pues en HA89 CMSMAX1 estos marcos abiertos de lectura son contiguos y divergentes (Hahn y Friedt 1994).

Los análisis de hibridación por *Southern* han demostrado que varias fuentes CMS del género *Helianthus* presentan diferencias en las regiones de las familias de genes *cox* y *atp* (Horn 2002). También se encontraron alteraciones estructurales alrededor de estos genes en las plantas de líneas CMS de otras especies, como *Petunia* (Young y Hanson 1987), *Brassica napus* (Dieterich *et al.* 2003), zanahoria (Szklarczyk *et al.* 2000) y *Lolium perenne* (Kiang y Kavanagh 1996). En el presente análisis, se ha mostrado que CMSRES1 también presenta secuencias génicas en el ADNmt diferentes a las del ADNmt de la línea HA89 B. A pesar de que no se detectaron diferencias estructurales asociadas a las regiones *rpS14*, *cob*, *nad1* y *nad4* u *orfH522*, se encontraron diferencias en los patrones de hibridación entre las líneas isoplásmicas HA89 B y CMSRES1 en el área que circunda a los genes *atp9* y *coxIII*. En dichas áreas podrían localizarse las diferencias estructurales responsables del fenotipo CMSRES1. Schnable y Wise (1998) determinaron el rol central que tienen los transcritos anormales de *atp9*, asociados a la androesterilidad, en varias especies vegetales tales como *Brassica napus* (Dieterich *et al.* (2003) y sorgo (Tang *et al.* 1996). En girasol, Spassova *et al.* (1994) involucraron a este mismo *locus* en el citotipo CMS3, mientras que De la Canal *et al.* (2001) explicaron la androesterilidad en las plantas CMSPEF1 a partir de la existencia de una inserción de 0,5 Kb en el extremo 3' no codificante del gen *atp9*. Por otro lado, si se agregan las evidencias aportadas por la amplificación del cebador *orfH522*, se puede concluir que la base molecular responsable de la androesterilidad de las plantas de girasol con el citoplasma RES1 es diferente a la propuesta para las plantas CMSPET1 y CMSMAX1. Con el fin de determinar con mayor precisión cuáles son los cambios estructurales

que se presentan en el ADNmt de las plantas CMSRES1, se debería determinar la secuencia de la región circundante a los *loci atp9* y *coxIII* y a partir de allí, precisar las homologías y diferencias con las secuencias de ADNmt establecidas en otras fuentes CMS. De esta manera, se podría dilucidar la presencia y naturaleza de una modificación génica en las plantas CMSRES1.

CONCLUSIONES

- El citoplasma RES1 presenta diferencias estructurales en las áreas circundantes a los genes *atp9* y *coxIII*, los cuales se encuentran dentro de la región comprendida entre los genes *atp6* y *coxIII* del ADNmt.
- El citoplasma RES1 se diferencia de los citoplasmas PET1 y MAX1 por la ausencia del *orfH522* en el ADNmt.

CONCLUSIONES FINALES

La androesterilidad genética–citoplásmica es un sistema que se ha utilizado con éxito en la producción de híbridos en varias especies de importancia económica mundial como lo son el maíz, trigo, sorgo, colza y el girasol. Con excepción del maíz, donde la producción de semilla híbrida puede prescindir del sistema de androesterilidad genético – citoplásmico, en el resto de las especies antes mencionadas es imposible la producción comercial de este tipo de cultivar si no se cuenta con este mecanismo genético.

Como se dijo anteriormente, en la siembra del girasol se utiliza semilla de híbridos desarrollados sobre la base del sistema de androesterilidad genético-citoplásmico. Se considera que el 100% de la semilla híbrida se produce utilizando el citoplasma PET1, por lo cual es evidente que el cultivo de girasol presenta una vulnerabilidad genética muy grande por el uso exclusivo de esta fuente CMS. Es por ello que en diferentes centros de investigación del mundo se han conducido proyectos de investigación con el objetivo de identificar nuevas fuentes de androesterilidad. La Unidad Integrada de Balcarce fue uno de los centros de investigación que, a través de un programa de hibridación interespecífica, identificó una fuente CMS denominada RES1 y proveniente de la especie perenne hexaploide *H. resinosus*.

Cuando se identifica una nueva fuente CMS, es necesario que la misma cumpla con tres características para que pueda ser utilizada de manera eficiente en la producción de cultivares híbridos, donde el producto económico es la semilla. La expresión del fenotipo androestéril por parte de las plantas debe ser estable en los diferentes ambientes de crecimiento de las mismas. A su vez, se tienen que identificar genotipos restauradores de la fertilidad masculina y conocer el modo de herencia, el cual debe estar bajo el control de genes simples para facilitar la incorporación de los

mismos en los individuos que serán los parentales masculinos en la producción de los híbridos. Otra condición que debe cumplir el sistema CMS es que no tenga efectos adversos sobre caracteres de importancia agronómica.

Una parte significativa de este trabajo fue desarrollada con la finalidad de caracterizar al citoplasma RES1 con respecto a los tres requerimientos que se mencionaron. Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La androesterilidad citoplásmica RES1 es estable y completa cuando el genoma citoplásmico de *H. resinosus* que la produce se combina con el genoma nuclear de *H. annuus*.
- Las plantas CMSRES1 presentan anteras más cortas que las normales de las plantas fértiles y escasa producción de granos de polen, que resultan inviables.
- En las plantas CMSRES1, el proceso meiótico se desarrolla normalmente, por lo que los sucesos que conducen a la androesterilidad se producen en estadios post-meióticos.
- Los genes responsables de la restauración de la fertilidad masculina de las plantas CMSRES1 no se encuentran en el germoplasma diploide evaluado.
- Los genes *Rf* se encuentran en las especies hexaploides, *H. resinosus*, *H. pauciflorus*, *H. tuberosus* y *H. x laetiflorus*.
- - El/los gen/es *Rf* estaría/n localizado/s en cromosomas de *H. resinosus* que son homeólogos con los de *H. annuus*, por lo cual sería factible la transferencia de este/os gen/es al girasol cultivado.
- Las plantas androestériles, con citoplasma RES1, de los genotipos evaluados tienen un menor tamaño del capítulo que las plantas que portan el citoplasma PET1.

- La producción de semillas, y por lo tanto, la fertilidad femenina no se afecta en las plantas portadoras del citoplasma RES1.
- El citoplasma RES1 presenta diferencias estructurales en las áreas circundantes a los genes *atp9* y *coxIII*, los cuales se encuentran dentro de la región comprendida entre los genes *atp6* y *coxIII* del ADNmt.
- El citoplasma RES1 se diferencia de los citoplasmas PET1 y MAX1 por la ausencia del *orfH522* en el ADNmt.

El citoplasma RES1 es apropiado para ser utilizado en programas de producción de híbridos de girasol, si se logra transferir el gen responsable de la restauración de la fertilidad a plantas de *H. annuus*. De todas maneras, puede ser usado con éxito en programas de mejoramiento genético de girasoles ornamentales en los que la finalidad no es la producción de semilla.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M.P., 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* **55**, 13-18.
- ATLAGIC, J., 1990. Pollen fertility in some *Helianthus* L. species and their F₁ hybrids with the cultivated sunflower. *Helia* **13**, 47-54.
- ATLAGIC, J., D. SKORIC and R. MARINKOVIC, 1996. Cytogenetic study of different sources of CMS in sunflower. In Proceedings of 14th International Sunflower Conference, Beijing, China. June 12-20. International Sunflower Association, Paris, France. pp.156-161.
- BALK, J. and C. J. LEAVER, 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *The Plant Cell* **13**, 1803-1818.
- BUDAR, F. and G. PELLETIER, 2001. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *C R Academy of Science III* **324**, 543-550.
- BUDAR, F., P. TOUZET and R. DE PAEPE, 2003. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica* **117**, 3-16.
- CHEPURNAYA, A.L., S.V. SHERSTYUK and V.T. TIKHOMIROV, 2003. Cms-Rf system for sunflower breeding. *Helia* **26**, 59-66.
- COMSTOCK, R., H. ROBINSON and P.H. HARVEY, 1949. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agronomy Journal* **41**, 360-367
- COSTA, F., 1991. Restauración de la fertilidad del polen de girasol en el citoplasma androsteril "petiolaris". Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce, Argentina. 32p.
- CROGNALÉ, L.M., 2002. Efecto de diferentes citoplasmas productores de la androesterilidad en girasol frente a las inoculaciones de *Sclerotinia sclerotiorum* en capítulo. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce, Argentina. 53p.
- CRONN, R., M. BROTHERS, K. KLIER, P.K. BRETTING and J.F. WENDEL, 1977. Allozyme variation in domestical annual sunflower and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 532-545.
- CROW, J., 1976. Genetic notes. 7th ed. Minneapolis. Burgess Publ. Co. 278p.
- DE LA CANAL, L., D. CROUZILLAT, F. QUETIER and G. LEDOIGT, 2001. A transcriptional alteration on the *atp9* gene is associated with a sunflower male-sterile cytoplasm. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 1185-1189.
- DEMESURE, B., N. SODZI and R. J. PETIT, 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* **4**, 192-131.
- DIETERICH, J., H. BRAUN and U. SCHMITZ, 2003. Alloplasmic male sterility in *Brassica napus* (CMS "Tournfortii-Stiewe") is associated with a special gene arrangement around a novel *atp9* gene. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 723-731.

- ENNS, H., D.G. DORRELL, J.A. HOES and W.O. CHUBB, 1970. Sunflower research, a progress report. *In Proceedings of 4th International Sunflower Conference*, Memphis, TN, USA. 23-25 June 1970. International Sunflower Association, Paris, France. pp.162-167.
- FICK, G.N. and D.E. ZIMMER, 1974. Fertility restoration in confectionery sunflowers. *Crop Science* **14**, 895-896.
- FRANKEL, R. and E. GALUN, 1977. Allogamy. *In Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. pp.196-234.
- GEORGIEVA -TODOROVA, Y., 1983. Hybridization between *Helianthus annuus* L. (2n=34) and *H. resinosus* Small. (2n=102). *C.R. Academy Bulgare Science* **36**, 963-966.
- GULYA, T., K. RASHID and S. MASIREVIC, 1997. Sunflower diseases. *In A.A. Schneiter (ed). Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph N^o 35. ASA, CSSA and SSSA. Madison, WI, USA. pp.263-379.
- HAVEKES, F.W.J., J.F. MILLER and C.C. JAN, 1991. Diversity among sources of cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* **55**, 125-129.
- HAHN, V. and W. FRIEDT, 1994. Molecular analysis of the cms-inducing MAX1 cytoplasm in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* **89**, 379-385.
- HEISER, C. B. and D. M. SMITH, 1964. Species crosses in *Helianthus*: II. Polyploid species. *Rhodora* **66**, 344-358.
- HENN, H.J., R. U. STEINER, R. WINGENDER and H. SCHNABLE, 1997. Wild type sunflower clones: sources for resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary stem infection. *Angrew Botany* **71**, 5-9.
- HORN, R., 2002. Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus*. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 562-570.
- HORN, R. and W. FRIEDT, 1997. Fertility restoration of new CMS sources in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* **116**, 317-322.
- HORN, R. and W. FRIEDT, 1999. CMS sources in sunflower: different origin but same mechanism? *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 195-201.
- HORN R., R. KOHLER and K. ZETSCHKE, 1991. A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic sterility in sunflower. *Plant Molecular Biology* **17**, 29-36.
- HORN, R., J.E.G. HUSTEDT, A. HORDTMAYER, J. HAHNEN, K. ZETSCHKE and W. FRIEDT, 1996. The CMS-associated 16 kDa protein encoded by *orfH522* in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasm of sunflower. *Plant Molecular Biology* **30**, 523-538.
- HORNER, H.T., 1977. A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *American Journal of Botany* **64**, 745-759.
- IGLESIAS, V., 1994. Genetic transformation studies in wheat using particle bombardment. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich. *Dis # 10628*.

- JAN, C. C., 1988. Chromosome doubling of wild x cultivated sunflower interspecific hybrids and its direct effect on backcross success. *In Proceedings of 12th International Sunflower Conference*, Novi Sad, Yugoslavia. July 25-29. International Sunflower Association, Paris, France. pp.297-292.
- JAN, C. C., 1991. Cytoplasmic male-sterility and fertility restoration of two wild *Helianthus annuus* accessions. *In Agronomy Abstracts ASA*, Madison WI, USA. pp. 100.
- JAN, C. C., 1992. Inheritance and allelism of mitomycin C- and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop Science* **32**, 317-320.
- JAN, C. C., 1997. Cytology and interspecific hybridization. *In A.A. Schneiter (ed). Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph N° 35. ASA, CSSA and SSSA. Madison, WI, USA. pp.497-558.
- JAN, C. C. and J.N. RUTGER, 1988. Mitomycin C- and streptomycin – induced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Science* **28**, 792-795.
- KIANG, A. and T. KAVANAGH, 1996. Cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. 2. The mitochondrial genome of a CMS line is rearranged and contains a chimaeric *atp9* gene. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 308-315.
- KINI, A.V., A. SEETHARAM and S.S. JOSHI, 1994. Mechanism of pollen abortion in cytoplasmic male sterile line of sunflower. *Cytologia*, **59**, 121-124.
- KINMAN, M.L., 1970. New developments in the USDA and state experiments station sunflower breeding programs. *In Proceedings of 4th International Sunflower Conference*, Memphis, TN, USA. 23-25 June 1970. International Sunflower Association, Paris, France. pp.181-183.
- KOHLER, R.H., R. HORN, A. LÖSSL and K. ZETSCHE, 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Molecular Gene and Genetics* **227**, 369-376.
- KRÄUTER, R., A. STEIMETZ and W. FRIEDT, 1991. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo rescue" and characterization of the hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* **82**, 521-525.
- KURAL, A. and J.F. MILLER, 1992. The inheritance of male fertility restoration of the PET1, GIG1 and MAX1 sunflower cytoplasmic male sterile sources. *In Proceedings of 13th International Sunflower Conference*, Pisa, Italy. Sept. 7-11. International Sunflower Association, Paris, France. pp.1107-1112.
- LASER, K.D. and N.R. LERSTEN, 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile Angiosperms. *The Botanical Review* **38**, 425-454.
- LAVEAU, J. H., C. SCHNEIDER and A. BERVILLE, 1989. Microsporogenesis abortion in cytoplasmic male sterile plants from *H. petiolaris* or *H. petiolaris fallax* crossed by sunflower (*Helianthus annuus*). *Annals of Botany* **64**, 137-148.
- LAVER, H., S. REYNOLDS, F. MONEGER and C. LEAVER, 1991. Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Journal* **1**, 185-193.
- LECLERCQ, P., 1969. Une sterilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. *Annales d'Amélioration des Plantes* **19**, 99-106.

- LECLERCQ, P., 1971. La sterilité mâle cytoplasmique du tournesol. I. Premières études sur la restauration de la fertilité. *Annales d'Amélioration des Plantes* **21**, 45-54.
- LEIPNER, J. and R. HORN, 2002. Nuclear and cytoplasmic differences in the mitochondrial respiration and protein expression of CMS and maintainer lines of sunflower. *Euphytica* **123**, 411-419.
- MARINKOVIC, R., D. SKORIC, B. DOZET and D. JOVANOVIC, 2000. Effect of PET1 and ANN5 cytoplasm on some quantitative traits in sunflower lines and hybrids. *Helia* **23**, 73-86.
- MEGALE, P., M. BALDINI, F. CECCONI, A. BENVENUTI and G.P. VANNOZZI, 1992. Fertility restoration analysis and genetic determinism of F₂ hybrid progenies of three CMS sources in sunflower. In Proceedings of 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy. Sept 7-11. International Sunflower Association, Paris, France. pp.1141-1151.
- MILLER, J.F., 1996. Inheritance of restoration of *Helianthus petiolaris* sp *fallax* (PEF1) cytoplasmic male sterility. *Crop Science* **36**, 83-86.
- MILLER, J.F. and G.N. FICK, 1997. The genetics of sunflower. In A.A. Schneiter (ed). *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph N° 35. ASA, CSSA and SSSA. Madison, WI, USA. pp. 441-495.
- MONERGER, F., C.J. SMART and C.J. LEAVER, 1994. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. *EMBO Journal* **13**, 8-17.
- NÚÑEZ, O., 1968. An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryologia* **21**, 115-119.
- PAUN, L., 1974. The cytologic mechanism of male sterility in sunflower. In Proceedings of 6th International Sunflower Conference Bucharest, Romania. 22-24 July 1974. International Sunflower Association, Paris, France. pp.249-257.
- PATIL S.A., A. GAFOOR and R.L. RAVIKUMRA, 2003. Impact of cytoplasmic male sterile sources on seed yield and yield components in sunflower. *Helia* **26**, 67-72.
- PETROV, P., 1992. Effect of various cytoplasmic male sterility sources (CMS) on some sunflower qualities. In Proceedings of 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy. Sept. 7-11, 1992. International Sunflower Association, Paris, France. pp.1211-1214.
- PUTT, E.D. 1997. Early history of sunflower. In A.A. Schneiter (ed). *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph N° 35. ASA, CSSA and SSSA. Madison, WI, USA. pp.1-19.
- RAMBAUD, C., A. BELLAMY, A. DUBREUCQ, J. BOURQUIN and J. VASSEUR, 1997. Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid. *Plant Breeding* **116**, 481-486.
- RIESEBERG, L.H., C. VAN FOSSEN, D. ARIAS and R.L. CARTER, 1994. Cytoplasmic male sterility in sunflower: Origin, inheritance and frequency in natural populations. *Journal of Heredity* **85**, 233-238.
- RODRÍGUEZ, R.H. y V.R. PEREYRA, 1993. Androesterilidad citoplásmica en la descendencia de híbridos interespecíficos entre *Helianthus resinosus* Small y *H. annuus* L. In Resúmenes XXIV Congreso Argentino de Genética, Posadas, Argentina. 5-8 Oct. 1993. pp.81.

- RODRÍGUEZ, R.H., M.M. ECHEVERRÍA y M.T. SALABERRY, 1996. Restauración de la fertilidad del polen en el citoplasma androestéril de *Helianthus resinosus* Small. *Noticiero de Biología* **4**, 146.
- RÖNICKE, S., V. HAHN, R. HORN, I. GRONE, L. BRAHM, H. SCHNABLE and W. FRIEDT, 2004. Interspecific hybrids of sunflower as a source of *Sclerotinia* resistance. *Plant Breeding* **123**, 152-157.
- SABAR, M., D. GAGLIARDI, J. BALK and C.J. LEAVER, 2003. ORFB is a subunit of F1F0-ATP synthase: insight the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO reports* **4**, 381-386.
- SAGHAI-MAROOF, M., K. SOLIMAN, R. JORGENSEN and R. ALLARD, 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **78**, 7463-7467.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Vol.2. Cold Spring Harbor, New York, USA. pp9.31-9.57.
- SAS Institute, 1990. SAS/STAT User's Guide, version 6, 4th ed. vol.1. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA.
- SCHEIFELE, G.L., R.R. NELSON and C. KOONS, 1970. Increased susceptibility to southern leaf spot (*Helminthosporium maydis*) in inbred lines and hybrids of maize with Texas male-sterile cytoplasm. *Plant Disease Report* **54**, 501-503.
- SCHILLING, E.E. and C.B. HEISER, 1981. Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon* **30**, 393-403.
- SCHNABLE, P.S. and R.P. WISE, 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and male fertility restoration. *Trends in Plant Science* **3**, 175-180.
- SCHNEITER, A.A. and J.MILLER, 1981. Description of sunflower grown stages. *Crop Science* **21**, 901-903.
- SEILER, G., 1988. The genus *Helianthus* as a source of genetic variability for cultivated sunflower. In Proceedings of 12th International Sunflower Conference, Novi Sad, Yugoslavia. July 25-29, 1988. International Sunflower Association, Paris, France. pp. 17-58.
- SEILER, G., 1991a. Registration of 15 interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species. *Crop Science* **31**, 1389-1390.
- SEILER, G., 1991b. Registration of 13 downy mildew tolerant interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species. *Crop Science* **31**, 1714-1716.
- SEILER, G., 1991c. Registration of six interspecific sunflower germplasm lines derived from wild perennial species. *Crop Science* **31**, 1097-1098.
- SERIEYS, H., 1992. Cytoplasmic effects on some agronomical characters in sunflower. In Proceedings of 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy. Sept. 7-11, 1992. International Sunflower Association, Paris, France. pp. 1245-1250.
- SERIEYS, H., 1997. Report on the 1995-1996 activities of the FAO working group: Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources. FAO Technical Meeting on Sunflower. Giessen, Germany. 20-23 Mar. 1997. 18p.

- SERIEYS, H., 1999. Progress Report on the 1996-1999 activities of the FAO working group: Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources, FAO Technical Meeting on Sunflower. *Proceedings of IX FAO Consultation on Sunflower Subnetwork*, Dobrich, Bulgaria. July 27-30, 1999, 14p.
- SERIEYS, H., 2002. Progress Report 1999-2001 activities of the FAO working group: Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources, FAO Technical Meeting on Sunflower. *Proceedings of X FAO Consultation on Sunflower Subnetwork*, Montpellier, France. October 7-9, 2002. 56p.
- SERIEYS, H. and P. VINCOURT, 1987. Characterization of some new sources from *Helianthus* genus. *Helia* **10**, 9-13.
- SICULLELA L. and J. PALMER, 1988. Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower, CMS-associated alterations in structure and transcription of the ATP A gene. *Nucleic Acids Research* **16**, 3787-3799.
- SKORIC, D., 1993. Wild species use in sunflower breeding- results and future directions. *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter* **93**, 17-23.
- SNOW, R., 1963. Alcoholic-hydrochloric acid carmine as a stain of chromosome in squash preparations. *Stain Technology* **38**, 9-13.
- SPASSOVA, M., F. MONEGER, C.J. LEAVER, P. PETROV, A. ATANASSOV and P. NIJKAMP, 1994. Characterisation and expression of the mitochondrial genome of a new type of cytoplasmic male-sterile sunflower. *Plant Molecular Biology* **26**, 1819-1831.
- STANSFIELD, W.D., 1992. *Genética* 3° ed. México. Mc Graw-Hill. 574p.
- SUKNO, S.A., C. C. JAN, J.M. MELERO-VARA and J.M. FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 1998. Reproductive behaviour and broomrape resistance in interspecific hybrids of sunflower. *Plant Breeding* **117**, 279-285.
- SUKNO, S., J. RUSO, C. C. JAN, J. M. MELERO-VARA and J. M. FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 1999. Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica* **106**, 69-78.
- SZKLARCZYK, M., M. OCZKOWSKI, H. AUGUST VNIK, T. BORNER, B. LINKE and B. MICHALIK, 2000. Organization and expression of mitochondrial *atp9* genes from CMS and fertile carrots. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 263-270.
- TANG, S. and S.J. KNAPP, 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 990-1003.
- TANG, H.D., D.R. PRING, L.C. SHAW, R.A. SALAZAR, F.R. MUZA, B. YAN and K.F. SCHERTZ, 1996. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. *Plant Journal* **10**, 123-133.
- TOURVIEILLE, D. and F. VEAR, 1984. Comparaison de methods d'estimation de la résistance du tournesol à *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Agronomie* **4**, 517-525.
- TOURVIEILLE, D., J. GUILLAUMIN, F. VEAR and C. LAMARQUE, 1978. Rôle des ascospores dans l'infection du tournesol par *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Annales Phytopathologie* **10**, 417-431.
- ULLSTRUP, A.J., 1972. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. *Annual Review of Phytopatology* **10**, 37-50.

- VEAR, F., 1984. The effect of male sterility on oil content and seed yield in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie* **4**, 901-904.
- VRÂNCEANU, V.A., 1970. Advances in sunflower breeding in Romania. In Proceedings of 4th International Sunflower Conference, Memphis, TN, USA. June 23-25, 1970. International Sunflower Association, Paris, France. pp. 136-148.
- VRÂNCEANU, V.A. and F.M. STOENESCU, 1971. Pollen fertility restorer gene from cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* **20**, 536-541.
- VRÂNCEANU, V.A., M. IUORAS and F.M. STOENESCU, 1986. A contribution to the diversification of the CMS sources in sunflower. *Helia* **9**, 21-25.
- WHELAN, E.D.P., 1978. Cytology and interspecific hybridization. In J. F. Carter *et al.* (ed.) *Sunflower Science and Technology*. Agronomy Monograph N° 19, ASA, CSSA and SSSA. Madison, USA. pp. 339-370.
- WHELAN, E.D.P., 1980. A new source of cytoplasmic male sterility in sunflower. *Euphytica* **29**, 33-46.
- WHELAN, E.D.P. and W. DEDIO, 1980. Registration of sunflower germplasm composite crosses CMG1, CMG2 and CMG3. *Crop Science* **20**, 832.
- WISE, R.P., C.R. BRONSON, P.S. SCHNABLE and H.T. HORNER, 1999. The genetic, pathology and molecular biology of T-cytoplasm male sterility in maize. *Advances in Agronomy* **65**, 79-130.
- YOUNG, E. and M. HANSON, 1987. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* **50**, 41-49.