

**DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR ENTRE LÍNEAS ENDOCRIADAS DE
GIRASOL (*Helianthus annuus L.*)**

Tesina

de la alumna

VICTORIA GUADALUPE CABODEVILA

Este trabajo ha sido presentado como requisito

para la obtención del título de

INGENIERO AGRÓNOMO

Carrera: Ingeniería Agronómica

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Junín, 29 de Junio de 2011

**DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR ENTRE LÍNEAS ENDOCRIADAS DE
GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)**

Tesina

de la alumna

VICTORIA GUADALUPE CABODEVILA

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

.....
Ing. Agr. Juan Carlos Suárez
Director

.....
Ing. Agr. Carlos A. Sala
Co-Director

.....
Lic. Mariano Bulos
Asesor

.....
Ing. Agr. Amelia B. de Romano
Asesor

.....
Ing. Agr. Celia Romano
Asesor

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

"El componente esencial de la justicia social es adecuar el alimento a la humanidad. Si se desea paz hay que cultivar la justicia, pero al mismo tiempo hay que cultivar los campos para que produzcan más trigo"
Norman Bourlaug, 1970.

"Los más grandes males que acechan a nuestra tierra son la ignorancia y la opresión, y no la ciencia, la tecnología o la industria, cuyos instrumentos, cuando se manejan adecuadamente, son herramientas indispensables para salvar la sobrepoblación, el hambre y las enfermedades mundiales"

Párrafo extraído del Manifiesto presentado en la Cumbre de Río 1992, citado por Norman Bourlaug en un artículo escrito para Los Angeles Times.

No puedo dejar de agradecer a las siguientes personas que colaboraron conmigo para la realización de esta tesis:

A mi director, el Ing. Agr. Juan Carlos Suárez, que sin su ayuda no hubiese podido realizar esta tesis, por su confianza y por todas las oportunidades que me brindó a lo largo de toda la carrera.

A mi co-director, el Ing. Agr. Carlos Sala, por recibirme como tesista en su laboratorio y por su buena predisposición para el desarrollo del trabajo.

Al Lic. Mariano Bulos, por su gran colaboración en este trabajo y por su paciencia ante tantas consultas.

A la Ing. Agr. Amelia B. de Romano y a la Ing. Agr. Celia Romano, por su colaboración para la toma de datos y aporte de información.

A Juan Pablo y a Susana, por transportarme.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología de Venado Tuerto, por su buena predisposición para explicarme y su agradable trato y a los ayudantes de campo de Baigorrita, en especial a Lito.

A mi mamá y a mi papá, que sin la ayuda de ellos hubiera sido imposible este trabajo y por confiar en mí, más que yo misma, y a mi hermana, por soportar mis noches de desvelo durante toda la carrera.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 El cultivo de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) y su producción en Argentina.....	6
3.2 Caracterización de la diversidad	7
3.3 Marcadores moleculares	9
3.4 Los microsatélites (SSR)	10
3.5 Mapas de ligamiento para girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	11
3.6 Diversidad entre líneas de girasol y de sorgo a través del uso de marcadores moleculares	12
3.7 Diversidad molecular	13
3.8 Relación genética por análisis de dendograma	13
3.9 Estudios que relacionan las distancias morfológicas y moleculares en diversos cultivos	14
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 MATERIALES	18
6.2 MÉTODOS.....	18
6.2.1 Análisis morfológico	18
6.2.1.1 Diseño experimental	18
6.2.1.2 Descripción morfológica	20
6.2.1.3 Análisis de la varianza	26
6.2.1.4 Análisis de estados.....	26
6.2.1.5 Análisis multivariado	26
6.2.2 Análisis molecular	28
6.2.2.1 Análisis de la variabilidad molecular	28
6.2.2.2 Muestreo y extracción del ADN	29
6.2.2.3 Amplificación del ADN	30
6.2.2.4 Diversidad molecular	33
6.2.2.5 Análisis multivariado	34
6.2.2.5.1 Cálculo de las distancias genéticas	34
6.2.2.5.2 Análisis de agrupamiento	36
6.2.3 Análisis morfológico-molecular.....	36
7. RESULTADOS.....	38
7.1 Diversidad morfológica entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos.....	38
7.2 Diversidad molecular entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos.....	45
7.3 Relación entre la diversidad morfológica y molecular.....	54

8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	64
10. REFERENCIAS DE IMÁGENES	65
11. ANEXO.....	72
11.1 Sección I.....	72
11.1.1 Forma de las hojas.....	72
11.2 Sección II.....	73
11.2.1 Análisis de varianza (ANOVA): hipótesis y modelo.....	73
11.2.2 Estandarización de variables	73
11.2.3 UPGMA: método de pares no ponderados usando medias aritméticas.....	74
11.2.4 Distancia euclidiana	74
11.2.5 Distancias euclidianas entre líneas B, entre líneas R y entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos.....	74
11.2.6 Índice de contenido de polimorfismo	78
11.2.7 Frecuencias alélicas: hipótesis y estadístico.....	79
11.2.8 Coeficiente de similitud simple (SMC) entre líneas B, entre líneas R y entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos	80
11.2.9 Test de Mantel.....	82
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AFLP: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados.

CPVO: Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (Community Plant Variety Office).

INDEL: Marcador de inserción- deleción.

Líneas B: Líneas mantenedoras.

Líneas R: Líneas restauradoras.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PIC: Índice de Contenido de Polimorfismo.

RAPD: ADN Polimórfico Amplificado al Azar.

RFLP: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

SCAR: Región Amplificada de Secuencia Caracterizada.

SMC: Coeficiente de Similitud Simple.

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple.

SSR: Repeticiones de Secuencia Simple.

TRAP: Polimorfismo en la Región Diana Amplificada.

VNTR: Repetición en Tándem en Número Variable.

1. RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una caracterización morfológica de cada uno de los 29 materiales en estudio de girasol (*Helianthus annuus* L.) a través del análisis de 45 variables morfológicas, y una caracterización molecular mediante el uso de 15 *loci* SSRs para abordar los siguientes objetivos: 1) cuantificar la diversidad morfológica de los 29 materiales para 45 variables; 2) cuantificar la diversidad molecular de los 29 materiales para 15 *loci* SSRs y 3) determinar la asociación entre las estimaciones de diversidad medida a través de variables morfológicas y a través de marcadores moleculares.

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar líneas B con R para 14 de las 22 variables cuantitativas analizadas. A su vez se observó que, para las variables cualitativas, existieron diferentes estados entre los materiales para la mayoría de las variables, a excepción de superficie de la lámina, color de la corola, color de las anteras, color de los granos de polen, color del papus, pubescencia y moteado, en las cuales, todas las líneas presentaron idéntico estado. El análisis de agrupamiento sobre la base de sus afinidades morfológicas estuvo estructurado de acuerdo al grupo reproductivo, pudiendo separar las líneas de acuerdo a este criterio. La diversidad entre líneas de un mismo grupo reproductivo es diferente de acuerdo al grupo reproductivo al que pertenezcan. El promedio de distancias euclidianas para el grupo mantenedor ($7,30 \pm 0,61$) fue estadísticamente menor que para el grupo de líneas restauradoras ($8,18 \pm 1,04$). Esto indica que el germoplasma restaurador presenta más diversidad morfológica que el germoplasma mantenedor. Esto puede deberse a las fuentes de variabilidad de donde se nutren los mismos. El germoplasma mantenedor es generado mayoritariamente a través de cruzas entre líneas mantenedoras, mientras que el germoplasma restaurador se nutre no sólo de cruzas entre líneas restauradoras, las cuales además presentan gran variabilidad en los bancos de germoplasma disponibles,

sino que también provienen de cruzamientos de líneas R con híbridos y de autofecundaciones de híbridos.

Los 15 *loci* de microsatelites analizados sobre los 29 genotipos evaluados revelaron un total de 61 alelos, con un promedio de 4,07 por *locus* y un rango de 1 a 7. Los *loci* ORS1097 y ORS1128 resultaron ser monomórficos dentro de las líneas mantenedoras. Los valores de Índice de contenido de polimorfismo (PIC) oscilaron entre 0,21 (ORS510) y 0,78 (ORS1045-1). La diversidad genética (D) para la totalidad de los genotipos fue de $0,58 \pm 0,15$, para las líneas B fue de $0,44 \pm 0,23$ y para las R de $0,47 \pm 0,16$. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar ambos grupos reproductivos. El análisis de agrupamiento aplicado sobre la matriz de similitudes genéticas permitió una clara separación en líneas B y R. Solo una línea R (R4DMR) agrupó dentro del grupo mantenedor, probablemente debido a que la línea fue originada a partir de la autofecundación de un híbrido. El valor promedio de similitud entre el grupo de las líneas B y R fue de 0,65, significativamente menor que los promedios de SMC entre líneas dentro del mismo grupo reproductivo (0,77 para B y 0,75 para R). A su vez, en el análisis de frecuencias alélicas, se obtuvieron diferencias entre las líneas B y R para 11 de los 15 *loci* analizados. Esto confirma que la variabilidad estaría estructurada de acuerdo al grupo reproductivo (mantenedor o restaurador).

Al determinar la asociación entre las estimaciones de diversidad medida a través de variables morfológicas y a través de marcadores moleculares, se obtuvo una distribución de puntos de tipo triangular, con pocos puntos ubicados dentro de la zona considerada de baja distancia morfológica y alta distancia molecular. A su vez, utilizando el Test de Mantel, se obtuvo una correlación (r) entre las matrices de distancia generadas a partir de ambos tipos de variables de 0,44 con una probabilidad altamente significativa ($p= 0,002$).

2. INTRODUCCIÓN

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) es un importante recurso de aceite comestible. La producción anual de Argentina es de 2,48 millones de tn (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca - 2008/09), con un rendimiento promedio de 1364 kg/ha.

Históricamente, la caracterización del germoplasma se ha basado en caracteres de alta y de baja heredabilidad, medidos a través del fenotipo. La utilización del fenotipo para la caracterización trae como limitantes el bajo polimorfismo, la influencia ambiental, la dependencia del estado de desarrollo de la planta, entre otros obstáculos (Carrera *et al.*, 2010).

Los marcadores moleculares son una herramienta factible de utilizar para realizar estudios de diversidad. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia de ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo (Picca *et al.*, 2004).

En girasol, existen antecedentes de la cuantificación de la variabilidad a escala molecular utilizando marcadores moleculares, pero en ningún trabajo se han comparado las estimaciones de la diversidad morfológica con aquellas derivadas del uso de marcadores moleculares.

Los marcadores pueden permitir la caracterización de las líneas y establecer las relaciones genéticas entre ellas. Al mismo tiempo, proporcionan una medida de la variabilidad, dejando a un lado las influencias ambientales, lo que permite de esta manera la comparación de materiales entre años y entre diferentes laboratorios (Hillis & Moritz, 1990; Dahlberg, 2000).

Los marcadores moleculares microsatélites, o Repeticiones de Secuencia Simple (SSR) son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 4) flanqueadas por secuencia de copia única, que están

distribuidos densamente y al azar a través del genoma de los eucariotas. Son considerados como los marcadores moleculares con el más alto Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC), lo cual promovió su utilización como marcadores moleculares para huellas genéticas (Weising *et al.*, 1995; Diwan & Cregan, 1997; Ashikawa *et al.*, 1999), mapeo del genoma (Marino *et al.*, 1995; Broun & Tanksley, 1996; McCouch *et al.*, 1997; Röder *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999; Scotti *et al.*, 2000), filogenética y estudios de relaciones genéticas (Goldstein & Pollock, 1997), mejoramiento asistido por marcadores y genética poblacional (Goldstein *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se evaluará la estructuración de la diversidad morfológica (a través del fenotipo) y molecular (por medio de marcadores moleculares) y la asociación entre ambas medidas de cuantificación.

3. ANTECEDENTES

3.1 El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) y su producción en Argentina

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) es una planta herbácea de la familia de las Compuestas. Representa globalmente un importante recurso de aceite comestible y es universalmente conocida y ampliamente cultivada como ornamental, siendo una de las 48 especies de *Helianthus* (*Asteraceae*, subfamilia *Asteroideae*, tribu *Heliantheae*, género *Helianthus*) autóctona y distribuida por toda América del Norte (Tang *et al.*, 2002). El tamaño del genoma del girasol es de, aproximadamente, 3500 Mbp (Kolkman *et al.*, 2007), el número de cromosomas haploide es de 17 y se lo clasifica como diploide ($2n=34$) (Tang *et al.*, 2002).

El principal producto del grano de girasol es el aceite para consumo humano y para la industria oleoquímica. La harina de extracción surge como subproducto de la obtención de aceite, la cual es principalmente utilizada en la preparación de alimentos balanceados, como material forrajero (Satorre *et al.*, 2008).

La producción anual de Argentina es de 2,48 millones de tn (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca - 2008/09). La superficie cosechada en la campaña 2008/09 fue de 1,8 millones de ha, concentrándose principalmente en la provincia de Buenos Aires (49,4%), seguido de La Pampa (15,5%) y de Córdoba (14,6%), con un rendimiento promedio de 1364 kg/ha.

En Argentina se siembran cultivares o variedades híbridas de girasol obtenidos por el sistema de androesterilidad genético-citoplasmática. La androesterilidad es un carácter regido por un gen mitocondrial que impide el normal funcionamiento de los estambres. El sistema resulta de la interacción de los genes nucleares y de factores citoplasmáticos (deficiencias en el ADN de las mitocondrias). El citoplasma se clasifica como estéril (S) y normal (N), según su capacidad para que el genotipo pueda producir o no polen viable.

Existe en el núcleo un *locus*, denominado *Rf*, involucrado en la restauración de la fertilidad en los casos de citoplasma S. Al gen *Rf* se lo denomina factor de restauración de la fertilidad.

Para producir estos cultivares híbridos son necesarias tres tipos diferentes de líneas endocriadas: una línea A (usadas como hembra, estériles, sin los genes de restauración y citoplasma estéril), una línea B o mantenedora de la fertilidad (mantenedoras de la línea A, líneas fértiles, sin los genes de restauración, citoplasma normal) y una línea R (restauradoras de la fertilidad, con genes nucleares de restauración, citoplasma androestéril) (Fehr, 1987). Tanto las líneas A como B son líneas isogénicas o isolíneas, ya que difieren únicamente con respecto a la constitución del citoplasma, estéril para el caso de las líneas A y fértil para el caso de las líneas B, pero son idénticas para el genoma nuclear.

3.2 Caracterización de la diversidad

La información acerca de la diversidad genética y las relaciones entre líneas endocriadas y variedades no sólo es útil para la conservación del germoplasma y la identificación de líneas, sino también para la selección de líneas parentales para el mejoramiento de híbridos en los cultivos, incluyendo el girasol (Senior *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2001).

La caracterización de accesiones de germoplasma de sorgo y la diversidad que presentan las mismas se basan normalmente en estimaciones de la variación genotípica y fenotípica entre y dentro de ellas. La variación fenotípica ha sido la principal herramienta de evaluación hasta hace pocos años, y las inferencias basadas en la variabilidad fenotípica poseen algunas ventajas distintivas sobre aquellas basadas solamente en la variación genética. Las características fenotípicas son relativamente fáciles de medir en el campo, proveen descripciones de la morfología vegetativa y reproductiva que son

importantes tanto para la supervivencia de la planta como para predecir su potencial agronómico, y están implícitamente incluyendo una muestra de varios *loci* genéticos (Dahlberg, 2000). No obstante estas ventajas, se carece de una apreciación de la diversidad morfológica del germoplasma elite de girasol cultivado en la Argentina. Más aún, se desconoce si los descriptores comúnmente utilizados en la caracterización y registro de nuevas líneas de girasol en nuestro país son suficientes para comprobar la distinguibilidad de los nuevos genotipos obtenidos.

El análisis de coancestros ha jugado un rol importante en el estudio de la diversidad o similitud genética cuando los marcadores moleculares no estaban disponibles o eran de alto valor económico. Sin embargo, la incompleta información de pedigree y la estimación inexacta de la contribución de cada ancestro al genotipo pueden originar un agrupamiento inapropiado de los genotipos analizados, y algunos genotipos sin un pedigree claro pueden fallar en el agrupamiento. Por otro lado, los marcadores moleculares son de herencia estable y abundantes. Además, la aplicación de marcadores moleculares ha provisto de herramientas para lograr una mejor comprensión de la diversidad del germoplasma de un cultivo. Análisis de diversidad del germoplasma de girasol han sido conducidos usando diferentes isoenzimas (Carrera & Poverene, 1995; Cronn *et al.* 1997).

Estudios previos realizados en el cultivo demostraron que, la diversidad genética en el girasol cultivado ha sido reducida dramáticamente durante la domesticación y mejoramiento (Tang & Knapp, 2003; Liu & Burke, 2006). Sin embargo el esfuerzo realizado por mejoradores ha logrado mantener un buen nivel de variabilidad para el cultivo. Por ejemplo, en un estudio realizado utilizando marcadores moleculares del tipo TRAPs sobre un total de 177 líneas de girasol liberadas por el USDA, basado en 230 marcadores polimórficos de ADN, el promedio del coeficiente de similitud fue de 0,58,

indicando que la diversidad genética ha sido capturada y mantenida durante el desarrollo de esas líneas a través de los años (Yue *et al.*, 2009).

3.3 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta factible de utilizar para realizar estudios de diversidad. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia de ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo (Picca *et al.*, 2004).

Los marcadores pueden permitir la caracterización de las líneas y establecer las relaciones genéticas entre ellas. Al mismo tiempo proporcionan una medida de la variabilidad, dejando a un lado las influencias ambientales, lo que permite de esta manera la comparación de materiales entre años y entre diferentes laboratorios (Hillis & Moritz, 1990; Dahlberg, 2000).

Otras de las ventajas de los marcadores moleculares son, por un lado, que su número es virtualmente ilimitado y por otro lado, su habilidad para explorar variabilidad genética a nivel del ADN (Carrera *et al.*, 2010).

Un marcador ideal debe ser altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación y simple análisis y de detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta (Martínez *et al.*, 2010).

En la actualidad existen una gran variedad de marcadores genéticos, los cuales se pueden clasificar en las siguientes categorías: marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos (isoenzimas y proteínas de reserva) y marcadores moleculares. Estos últimos son los que adquirieron mayor importancia debido a que cumplen con las características previamente descritas como importantes y se los puede clasificar en aquellos basados en la hibridación del ADN, como los RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los

Fragmentos de Restricción), minisatélites o VNTR (Repetición en Tándem en Número Variable); los basados en la amplificación arbitraria o semi arbitraria del ADN, como los RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) y los AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) y los basados en la amplificación sitio-específica del ADN, como los SSR (Repeticiones de Secuencia Simple), SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple) y STS (Sitios Marcados por Secuencias), entre otros. (Martínez *et al.*, 2010).

3.4 Los microsatélites (SSR)

Los microsatélites, o Repeticiones de Secuencia Simple (SSR) son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 4) flanqueadas por secuencia de copia única, que están distribuidos densamente y al azar a través del genoma de los eucariotas. Fue demostrado que el número de microsatélites es altamente variable dentro y entre especies y subespecies. Debido a la alta tasa de mutación, son considerados como los marcadores moleculares con el más alto Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC). Esta característica promovió la utilización de los microsatélites como marcadores moleculares para huellas genéticas (Weising *et al.*, 1995; Diwan & Cregan, 1997; Ashikawa *et al.*, 1999), mapeo del genoma (Marino *et al.*, 1995; Broun & Tanksley, 1996; McCouch *et al.*, 1997; Röder *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999; Scotti *et al.*, 2000), filogenética y estudios de relaciones genéticas (Goldstein & Pollock, 1997), mejoramiento asistido por marcadores y genética poblacional (Goldstein *et al.*, 1999). Además de ser altamente polimórficos y encontrarse dentro del genoma de los eucariotas, las ventajas de los microsatélites radican en que tienen una herencia codominante, facilidad en la evaluación de sus alelos y reproducibilidad y acceso para los laboratorios sin necesidad de tener equipos de análisis muy costosos. Estas características fomentaron el desarrollo de microsatélites en diferentes especies de plantas como en soja (*Glycine max*; Akkaya *et al.*, 1992; Morgante & Olivieri, 1993;

Cregan *et al.*, 1994; Rongwen *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995), maíz (*Zea mays*; Senior & Heun, 1993), trigo (*Triticum aestivum* L.; Röder *et al.*, 1995), entre otras. Los resultados de estos estudios confirman que los microsatélites son abundantes y están bien distribuidos en el genoma de las plantas.

Los SSRs proveen una herramienta para establecer o validar pedigrees de híbridos de girasol, tal como lo indican Tang *et al.* (2003).

Posteriormente, Smith *et al.* (2009) mostraron que el uso de 75 SSRs provee una herramienta robusta para caracterizar el germoplasma de girasol, para revelar asociaciones entre germoplasmas que reflejan relaciones genéticas, incluyendo el potencial uso para ayudar a determinar EDV (variedades esencialmente derivadas) y para validar pedigrees.

3.5 Mapas de ligamiento para girasol (*Helianthus annuus* L.)

Los primeros mapas de ligamiento para el girasol cultivado fueron desarrollados por medio de marcadores del tipo RFLP (Berry *et al.*, 1995, 1996, 1997; Gentzbittel *et al.*, 1995, 1999; Jan *et al.*, 1998) y RAPD (Rieseberg *et al.*, 1993; Rieseberg, 1998). Posteriormente, fueron construidos varios mapas de ligamiento utilizando AFLPs (Peerbolte & Peleman, 1996; Gedil *et al.*, 2001).

Si bien los RAPD y los AFLP tienen innumerables usos, ambos son dominantes, multicopia, y usualmente de naturaleza no específica, en general, no son satisfactorios para establecer una estructura global de marcadores de ADN que abarque todos los grupos o mapas de ligamiento genético de una especie. Los marcadores de copia simple y codominantes, como es el caso de los SSRs son preferidos para tales propósitos, pero eran escasos para el caso del girasol.

A través del desarrollo de 1089 marcadores del tipo SSRs para el girasol cultivado (Gedil, 1999; Tang *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) se logró eliminar esta limitante que estaba

originada por la ausencia de marcadores de ADN de copia simple y entonces se generó la cantidad de marcadores de ADN necesaria para la creación de un mapa de referencia público. Así, Tang *et al.* (2002) construyeron el primer mapa de ligamiento para girasol basándose en marcadores SSR y el primer mapa de ligamiento público basándose también en marcadores de ADN de simple copia (o de escasas copias).

Posteriormente Yu *et al.* (2003) propusieron tres mapas construidos a partir de 1044 marcadores (701 SSR y 89 RFLP o INDEL).

3.6 Diversidad entre líneas de girasol y de sorgo a través del uso de marcadores moleculares

En la última década, se realizaron análisis de diversidad genética y de coascendencia usando RAPD (Arias & Rieseberg, 1995), RFLP (Berry *et al.*, 1995; Gentzbittel *et al.*, 1995) y AFLP (Hongtrakul *et al.*, 1997; Cheres & Knapp, 1998).

Estudios realizados en girasol utilizando RFLPs permitieron una clara diferenciación entre líneas mantenedoras y restauradoras (Gentzbittel *et al.*, 1994) indicando que la diversidad genética entre líneas estaría estructurada según el grupo reproductivo.

Zhang *et al.* (1995) también a través del uso de RFLP pudieron separar entre 26 líneas endocriadas de girasol, por un lado las líneas mantenedoras (hembras) y por otro, las restauradoras (machos). Luego de dividir las 26 líneas en germoplasma mantenedor y restaurador, la estimación de la diferenciación de genes mostró que la distancia absoluta (Dm) entre machos y hembras fue solo del 5%.

Para el caso del sorgo, otro cultivo que utiliza el sistema de androesterilidad genético-citoplasmático, el estudio realizado por Rivero (2004) utilizando SSRs mostró que el germoplasma mantenedor presenta menos variabilidad morfológica que el

restaurador y que, nuevamente, la estructuración de la diversidad está principalmente explicada por el grupo reproductivo.

3.7 Diversidad molecular

Yu *et al.* (2002) utilizaron 16 líneas, donde se incluían líneas públicas de aceite, algunas de confitura y algunas líneas propietarias. El número de alelos promedio por *locus* fue de 3,99 al utilizar 74 SSR polimórficos. El rango de alelos varió entre 2 y 15. Yu discriminó los valores según el tipo de SSR (di, tri o tetranucleótido) siendo los valores obtenidos de 0,18-0,88, 0,18-0,80, 0,62-0,93.

Yue *et al.* (2009) al utilizar marcadores moleculares TRAPs y 177 líneas de girasol, principalmente líneas públicas, tanto mantenedoras como restauradoras, y tanto de aceite como de confitura, liberadas por el USDA, hallaron valores de PIC de 0,02 a 0,5 y valores de diversidad de 0,40. A su vez, obtuvieron un promedio de similitud genética (SMC) de 0,58.

El valor promedio de similitud genética (SMC) obtenido por Rönicke *et al.* (2005) para 25 líneas de girasol fue de 0,70.

3.8 Relación genética por análisis de dendograma

Un número limitado de líneas endocriadas de girasol fueron caracterizadas para obtener similitud genética usando AFLP o RFLP y fueron agrupadas en mantenedoras y restauradoras (Berry *et al.* 1994; Gentzbittel *et al.* 1994).

A su vez, Zhang *et al.* (1995) a través de RFLP, pudieron separar entre 26 líneas endocriadas de girasol, por un lado las líneas mantenedoras y por otro, las restauradoras.

También, a través del análisis cluster, 24 líneas endocriadas de girasol, a través del uso de AFLP, pudieron ser separadas en dos grupos, correspondiendo los mismos a líneas B y líneas R (Hongtrakul *et al.* 1997).

Cheres & Knapp (1998) separaron 156 líneas endocriadas de girasol de acuerdo a su uso (aceitero o confitero) y de acuerdo a la restauración de la fertilidad (restauradoras o mantenedoras).

Del mismo modo, Yu *et al.* (2002) en el análisis de agrupamiento usando 74 SSR, para 16 líneas endocriadas de girasol cultivado, pudieron diferenciar las líneas de acuerdo a su uso o a su grupo reproductivo (aceitero o confitero y mantenedor o restaurador, respectivamente).

Yue *et al.* (2009), al utilizar TRAP y a través de análisis de agrupamiento, lograron separar sus 177 líneas de girasol en dos grupos: por un lado, girasol aceitero y por el otro confitero, y éstos a su vez en dos subgrupos: un grupo mantenedor y otro grupo restaurador.

Smith *et al.* (2009) pudieron hacer la separación de 101 líneas a través del uso de SSR, obteniéndose como resultado que en la gran mayoría las líneas endocriadas se agruparon de acuerdo a su categoría de machos o hembras.

3.9 Estudios que relacionan las distancias morfológicas y moleculares en diversos cultivos

Numerosos estudios han intentado precisar las relaciones existentes entre los índices de distancia estimados a nivel fenotípico y los índices de distancia estimados a partir de marcadores genéticos. Los resultados ponen en evidencia “relaciones triangulares” entre los dos tipos de distancias: bajas distancias moleculares están sistemáticamente asociadas a bajas distancias fenotípicas, mientras que altas distancias moleculares se corresponden tanto con bajas o altas distancias fenotípicas. Dos

genotipos diferentes pueden tener el mismo fenotipo aunque sean diferentes para cada *locus*, mientras que genotipos que son idénticos si o si tendrán el mismo fenotipo (Burstin & Charcosset, 1997).

Otro estudio fue realizado por Burstin *et al.* (1994), en el cual se analizaban 21 líneas de maíz a través de 142 marcadores resultantes del análisis de enzimas, RFLP y proteínas polimórficas anónimas, también encontraron relaciones triangulares: bajas distancias moleculares fueron asociadas con bajas distancias fenotípicas, mientras que altas distancias moleculares fueron asociadas con un alto rango de distancias fenotípicas.

Una relación triangular también fue encontrada entre distancias moleculares calculadas a partir de 222 marcadores de loci y la distancia de Mahalanobis para 10 caracteres fenotípicos para 10440 pares de líneas de maíz (Bar-Hen & Charcosset, 1995; Dillmann, *et al.* 1997).

Rivero (2004) comparó las distancias morfológicas evaluadas por medio de 37 variables morfo-agronómicas y la distancia estimada a partir de 31 microsatélites para un conjunto de 46 líneas de sorgo. Los resultados ponían en evidencia “relaciones triangulares”, donde a menor distancia molecular, la distancia fenotípica era también menor. En cambio a mayores distancias moleculares se apreciaba un amplio rango de valores en distancias morfológicas.

Beyene *et al.* (2005) realizaron un estudio comparativo de métodos de descripción molecular y morfológica en maíz. Uno de los objetivos de este trabajo era evaluar la correlación entre distancias estimadas a través de caracteres morfológicos y a través de marcadores moleculares (AFLP y SSR). Como resultado de la aplicación del Test de correspondencia entre matrices de Mantel (1967), se obtuvo que hubo una correlación significativa entre los datos moleculares mediante AFLPs y los datos morfológicos ($r=0,39$, $p=0,001$) y entre SSRs y datos morfológicos ($r= 0,43$, $p=0,001$).

4. HIPÓTESIS

Las hipótesis que se formulan en este trabajo son:

- 1.** La diversidad morfológica en girasol está estructurada según los grupos reproductivos de este cultivo.
- 2.** La diversidad molecular en girasol está estructurada según los grupos reproductivos de este cultivo.
- 3.** Existe una asociación estrecha entre ambas medidas de cuantificación de la diversidad del cultivo.

5. OBJETIVOS

En relación a las hipótesis formuladas, los objetivos de este trabajo fueron:

1. Cuantificar la diversidad morfológica de 15 líneas mantenedoras y 14 líneas restauradoras de girasol para 45 variables morfológicas.
2. Cuantificar la diversidad molecular de 15 líneas mantenedoras y 14 líneas restauradoras de girasol para 15 *loci* SSRs distribuidos a lo largo de todo el genoma.
3. Determinar la asociación existente entre las estimaciones de diversidad medida a través de variables morfológicas y marcadores moleculares.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

Se utilizaron 29 líneas endocriadas (15 mantenedoras y 14 restauradoras) de girasol (Tabla I), 27 de ellas propiedad de NIDERA S.A. ⁽¹⁾ y dos de ellas (HA89 y RHA274) son líneas públicas liberadas por el USDA en el año 1971 y 1973 (Tabla I).

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Análisis morfológico

6.2.1.1 Diseño experimental

Las líneas se sembraron a campo de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado (DCA) en la localidad de Baigorrita, provincia de Buenos Aires (34°45' 6.55" latitud Sur y 60°56'42.96" longitud Oeste), en el Criadero Baigorrita de NIDERA S.A.

Cada línea se sembró en parcelas de tres surcos de 6 metros de largo, con dos repeticiones. La separación entre surcos fue de 0,70 metros y de 0,20 metros entre plantas dentro del surco.

Previo a la siembra, las semillas se trataron con Etefon (Ethrel SL 480, Bayer CropScience) con el objetivo de romper la dormición. El tratamiento se realizó durante 12 horas, se enjuagó posteriormente la semilla con hipoclorito de sodio 20% y agua desmineralizada, y posteriormente se efectuó la siembra.

Ésta se realizó el 10 de octubre del 2009 y se ejecutó manualmente, con dos semillas por golpe y se raleó a una planta una vez establecidas.

⁽¹⁾ Llamamos líneas propietarias a aquellas líneas que pertenecen a una compañía (bajo sistema de registro o son parentales de algún híbrido registrado). No son líneas disponibles en forma pública.

Tabla I. Nombres, grupos reproductivos y observaciones de las 29 líneas endocriadas analizadas.

Nombre del material	Grupo reproductivo	Observaciones
B14DMR	B	Convencional ⁽²⁾
B19DMR	B	Convencional
B12DMR	B	Convencional
B16DMR	B	Convencional
B11DMR	B	Convencional
B13DMR	B	Convencional
IB21	B	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN ⁽³⁾
IB14	B	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
OB3	B	Alto oleico
OB4	B	Alto oleico
OB5	B	Alto oleico
OB6DMR	B	Alto oleico
IB7	B	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
IB8	B	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
R6	R	Convencional
R11	R	Convencional
R9DMR	R	Convencional
R19	R	Convencional
IR8	R	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
IR9	R	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
R10DMR-RRO	R	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN, Resistente a Roya Negra
R20DMR-RRO	R	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN, Resistente a Roya Negra
OR6DMR	R	Alto oleico
IR20DMR	R	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
R4DMR	R	Convencional
R12DMR	R	Convencional
IR35DMR	R	Resistente a Imidazolinonas, portador del carácter IMISUN
HA89	B	Convencional Pedigree: VNIIMK 8931Sel
RHA274	R	Convencional Pedigree: CMS PI343765/HA119//HA62-4- 5/2/T66006-2

⁽²⁾ Línea convencional: línea que comercialmente no se distinguen con ningún carácter en particular, como por ejemplo, resistencia a herbicidas o alto oleico.

⁽³⁾ IMISUN: es un carácter de resistencia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas. Este carácter está gobernado por el Alelo Ahas1-1 del *locus* Ahas1.

Los datos morfológicos fueron tomados sobre cinco plantas del surco central de cada parcela y en competencia perfecta.

6.2.1.2 Descripción morfológica

Se evaluaron 45 variables morfológicas en diferentes estadios fenológicos del cultivo: emergencia, floración, madurez y cosecha, de acuerdo a los descriptores morfológicos para girasol utilizados por el Instituto Nacional de Semillas (INASE) dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Tabla II).

A los 10 días post emergencia se tomaron los datos de emergencia, que consistía en evaluar la pigmentación del hipocótilo.

Los caracteres tomados a floración y la metodología seguida para evaluar los mismos, fue la descrita a continuación. Las escalas o codificación de los estados de los caracteres puede observarse resumidos en la Tabla II.

-Altura (cm): se midió desde el cuello de la raíz hasta el capítulo, manteniéndolo al mismo erguido.

-Diámetro (cm): se midió a la altura del primer entrenudo.

-Pilosidad del tallo (ausente/ débil/ medio/ fuerte): se evaluó mediante tacto en la parte trasera de inserción del capítulo al tallo.

-Forma de las hojas (oblonga/ lanceolada/ triangular/ cordada/ redondeada): ver Anexo- Sección I Inciso 1.

-Color de las hojas (verde claro/ verde medio/ verde oscuro): se evaluó la coloración de las hojas.

-Número de hojas: se contó el número de hojas verdaderas presentes y cicatrices en aquellas hojas en las cuales se había producido la abscisión de las mismas.

-Largo de la lámina (cm): se midió en la parte media de las hojas de la parte central de la planta, coincidiendo con la nervadura central.

Tabla II. Caracteres morfo-agronómicos evaluados, el momento del estado fenológico en el que se realizó la evaluación y la codificación de los estados para cada variable.

Variable morfológica	Momento fenológico de su evaluación	Unidad o codificación de estado
Pigmentación del hipocótilo	Emergencia	ausente(1), débil(3), medio(5), fuerte(7), muy fuerte(9)
Altura de la planta	Floración	cm
Pilosidad del tallo	Floración	ausente(2), débil(4), medio(6), fuerte(8)
Forma de las hojas	Floración	oblonga(1), lanceolada (3), triangular (5), cordada(7), redondeada(9)
Color de las hojas	Floración	verde claro(3), verde medio(5), verde oscuro(7)
Número de hojas	Floración	número
Largo de la lámina	Floración	cm
Ancho de la lámina	Floración	cm
Relación ancho/largo de la lámina	Floración	
Longitud del peciolo	Floración	cm
Superficie de la lámina	Floración	rugosa(1), medianamente rugosa(5), lisa (9)
Aserrado del borde foliar	Floración	nulo(2), medio(4), fuerte(6), muy fuerte(8)
Inclinación de la lámina	Floración	<45°(1), 45°-90°(5), >90°(9)
Cantidad de flores liguladas	Floración	número
Ancho de la lígula	Floración	cm
Largo de la lígula	Floración	cm
Color de la lígula	Floración	amarillo claro(2), amarillo anaranjado(4), amarillo dorado(6), otro(8)
Color de la corola	Floración	amarillo(2), anaranjado(4), rojo(6), otro (8)
Color de la anteras	Floración	marrón(1), otro(9)
Color de los granos de polen	Floración	blanco(1), amarillo(9)
Color del papus	Floración	verde(1), rojo(9)
Antocianinas del estigma	Floración	ausente(1), presente(9)
Ramificación apical	Floración	ausente (1), presente (9)
Días de emergencia/Inicio de floración (10%antesís)	Floración	número de días
Días de emergencia/Plena floración (50%antesís)	Floración	número de días
Diámetro del tallo	Madurez fisiológica (R9)	cm
Forma del capítulo	Madurez fisiológica	cóncavo(2), plano(4), convexo(6), deforme(8)
Diámetro del capítulo ⁽⁴⁾	Madurez fisiológica	cm
Posición del capítulo a la madurez	Madurez fisiológica	horizontal(1), inclinado(3), vertical(5), medio, hacia abajo(7), hacia abajo(9)
Relación largo de bráctea/radio del capítulo	Madurez fisiológica	
Espesor del receptáculo	Madurez fisiológica	fino(3), mediano(5), grueso(7)
Número de aquenios por capítulo	Cosecha	número
Ancho de los aquenios	Cosecha	mm
Largo de los aquenios	Cosecha	mm

⁽⁴⁾En los multifloros, el capítulo principal.

Variable morfológica	Momento fenológico de su evaluación	Unidad o codificación de estado
Espesor de los aquenios	Cosecha	mm
Pubescencia de los aquenios	Cosecha	ausente(1), presente(9)
Moteado de los aquenios	Cosecha	ausente(1), presente(9)
Color principal del pericarpio	Cosecha	negro(1), castaño(3), blanco(5), gris(7), otro(9)
Estrías	Cosecha	ausente(1), presente(9)
Color de las estrías	Cosecha	blanco(1), gris(3), marrón(5), negro(7), otro(9) marginal(1), lateral(3), marginal y lateral(5), central(7), otro (9)
Posición de las estrías	Cosecha	central(7), otro (9)
Peso de 1000 aquenios	Cosecha	grs.
Porcentaje de pepita	Cosecha	%
Porcentaje de aceite	Cosecha	%
Días de emergencia/Madurez fisiológica/madurez de cosecha (R9)	Cosecha	número de días

- Ancho de la lámina (cm): se midió en la parte media transversal de la hoja.
- Relación ancho/largo de la lámina: resultó de la razón entre el ancho de la lámina (cm) y el largo de la misma (cm).
- Longitud del pecíolo (cm): se midió el pecíolo desde la inserción al tallo hasta la inserción a la lámina de la hoja.
- Superficie de la lámina (rugosa/ medianamente rugosa/ lisa): se evaluó mediante tacto de la misma.
- Aserrado del borde foliar (nulo/ medio/ fuerte/ muy fuerte): se evaluó mediante comparación con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO) (ver Figura 1).
- Inclinación de la lámina (<45°/ 45°-90°/ >90°): se evaluó el ángulo de inserción del pecíolo al tallo.
- Cantidad de flores liguladas: se contó el número de flores liguladas de cada capítulo.
- Ancho de la lígula (cm): se midió en la parte media de la lígula.
- Largo de la lígula (cm): se midió en la parte media longitudinal de la lígula.
- Color de la lígula (amarillo claro/ amarillo anaranjado/ amarillo dorado/ otro): se evaluó la coloración de la lígula.
- Color de la corola (amarillo/ anaranjado/ rojo/ otro): se evaluó la coloración de la corola.
- Color de las anteras (marrón/ otro): se evaluó la coloración de las anteras.
- Color de los granos de polen (blanco/ amarillo): se evaluó la coloración de los granos de polen.
- Color del papus (verde/ rojo): se evaluó la coloración del papus. El papus, es un conjunto de pelos o cerdas que corona ciertos frutos y semillas, facilitando su diseminación anemófila (Cabrera & Zardini, 1993).
- Antocianinas del estigma (presente/ ausente): se evaluó la presencia o ausencia de antocianinas.

-Ramificación apical (ausente/ presente): se evaluó la presencia o ausencia de ramificación apical.

-Días de emergencia/Inicio de floración: se evaluó al 10 % de antesis.

-Días de emergencia/plena floración: se evaluó al 50% de antesis.

A los 135 días post-siembra se tomaron los datos de madurez. Se describen a continuación caracteres y metodología utilizada para la evaluación de los mismos. Las escalas o codificación de los estados de los caracteres, se puede consultar en la Tabla II.

-Forma del capítulo (cóncavo/ plano/ convexo/ deforme): se evaluó la forma del capítulo del lado de los aquenios, mediante comparación con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO) (ver Figura 2).

-Diámetro a la madurez (cm): se evaluó en la parte media del capítulo. En los casos de las líneas policéfalas, se evaluó el capítulo principal.

-Posición a la madurez (horizontal/ inclinado/ vertical/ medio, hacia abajo/ hacia arriba): se evaluó mediante comparación con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO) (ver Figura 3).

-Relación largo de la bráctea/radio del capítulo: se calculó mediante la razón entre el largo de la bráctea (cm) y el radio del capítulo (cm).

-Espesor del receptáculo (fino/ mediano/ grueso): se midió el espesor del capítulo.

Posteriormente se cosechó cada línea y se trilló, utilizando una trilladora manual, con el objetivo de tomar los datos de cosecha, a los 140 días post-siembra. A continuación, se describen los caracteres y la forma para evaluarlos. En la Tabla II, se pueden observar las escalas o codificación de estado de los mismos.

-Número promedio de aquenios por capítulo: se sometió a trilla el capítulo y se contó el número de aquenios.

-Ancho promedio (mm): se evaluó el ancho de los aquenios en la parte media de los mismos.

- Largo promedio (mm): se evaluó el largo de los aquenios.
- Espesor promedio (mm): se evaluó el espesor de los aquenios.
- Pubescencia (ausente/ presente): se evaluó la pubescencia de los aquenios mediante evaluación con lupa.
- Moteado (ausente/ presente): se evaluó el moteado de los aquenios.
- Color principal del pericarpio (negro/ castaño/ blanco/ gris/ otro): se evaluó el color principal del pericarpio. Se entiende por color principal a aquel color que ocupa la mayor área. En caso de no saber cuál es la mayor área, se determina que el color principal es el color más oscuro de acuerdo con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO).
- Estrías (ausente/ presente): se evaluó la presencia de estrías en los aquenios.
- Color de las estrías (blanco/ gris/ marrón/ negro/ otro): se evaluó el color de las estrías de los aquenios.
- Posición de las estrías (marginal/ lateral/ marginal y lateral/ central/ otro): se evaluó la posición de las estrías de los aquenios de manera visual, comparando con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO).
- Peso de 1000 aquenios (g): se evaluó el peso de 1000 aquenios.
- Porcentaje de pepita: se tomó el peso de 100 aquenios con cáscara (g). A continuación se pelaron las mismas y se tomó su peso (g) sin cáscara. Con estos dos datos se calculó el porcentaje de pepita de la siguiente manera:

$$\text{peso sin cáscara} \times 100 / \text{peso con cáscara}$$

- Porcentaje de aceite: se evaluó mediante el método de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) utilizando el equipo OXFORD 4000 NMR Analyser. Se procedió a pesar 20 gramos

de aquenios mediante balanza de precisión. Se sometieron a estufa por espacio de 48 horas a 35 °C, para luego evaluarlos con el instrumento antes descrito.

-Días de emergencia/ Madurez fisiológica/ Madurez de cosecha: se evaluó en el estadio de R9.

6.2.1.3 Análisis de la varianza

Se realizó sobre 22 caracteres cuantitativos, a través del análisis de datos de Excel 2007, utilizando la función Análisis de Varianza de un solo factor.

El objetivo era determinar, cuáles de los caracteres exhibían diferencias significativas entre grupos reproductivos.

Las hipótesis planteadas y el modelo utilizado pueden observarse en el Anexo-Sección II Inciso 1.

6.2.1.4 Análisis de estados

Se realizó un análisis de estados con 23 variables cualitativas. Se entiende por estado a los diferentes valores que puede adoptar una variable cualitativa. Se determinaron diferencias de estado entre grupos reproductivos, y se estableció presencia o ausencia de estados exclusivos para alguno de los grupos reproductivos. La hipótesis a evaluar fue la siguiente:

Hipótesis: Los grupos reproductivo mantenedor (B) y restaurador (R) tienen los mismos estados.

6.2.1.5 Análisis multivariado

Para evaluar la similitud morfológica entre líneas se utilizó también el análisis de agrupamiento.

Para realizarlo se partió de una matriz compuesta de las 29 OTUs (Unidades taxonómicas operacionales) en las columnas, por 45 caracteres a estudiar (filas), formando así una Matriz Básica de Datos (MBD). El cuerpo de la misma, contenía los valores morfológicos promedios de cada OTU para cada una de las variables.

Luego se procedió a la normalización o estandarización de la misma (Anexo–Sección II Inciso 2), formando de esta manera una Matriz Básica de Datos Estandarizada (MBDE).

Sobre ésta y los coeficientes de correlación se elaboró una Matriz de Similitud (Sokal & Sneath, 1963). Esta matriz posee tanto en filas como en columnas las 29 líneas, y cada valor del cuerpo de la matriz corresponde a la correlación que existe entre las líneas.

Posteriormente, se elaboró el cluster o dendograma en base a esa matriz utilizando el método de pares no ponderados usando medias aritméticas (UPGMA) (Ver Anexo–Sección II Inciso 3), utilizando como parámetro el coeficiente CORR.

Los detalles de los métodos y procedimientos numéricos pueden hallarse en Crisci & López Armengol (1983).

Los datos fueron procesados mediante el programa NTSYS-pc versión 2.1 desarrollado por Rohlf (2000).

Posteriormente, se procedió a calcular las distancias euclidianas (Anexo–Sección Inciso 4) entre cada par de líneas, formando así una matriz de disimilitud.

A partir de la matriz de disimilitud, se calcularon los valores promedios de distancias euclidianas para el grupo de líneas de cada grupo reproductivo.

También, se estimaron los valores promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (Distancia Euclidiana Global); los promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea y todas las líneas del mismo grupo reproductivo y los valores promedios para cada línea, de las

distancias entre esa línea y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto. El objetivo era determinar si la similitud promedio entre genotipos pertenecientes a un mismo grupo reproductivo era estadísticamente mayor, igual o menor que la similitud entre genotipos de diferentes grupos reproductivos. La comparación de los promedios se realizó mediante una prueba “t”.

A su vez, se compararon, mediante prueba “t”, los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas B y todas las líneas R con los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas B y todas las líneas restantes de su mismo grupo reproductivo.

Se realizó el mismo procedimiento (prueba “t”), pero se compararon los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas B y todas las líneas R con los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas R y todas las líneas restantes de su mismo grupo reproductivo.

Todas las hipótesis planteadas, al igual que el estadístico utilizado y el procedimiento se pueden observar detallado en el Anexo-Sección II Inciso 5.

6.2.2 Análisis molecular

6.2.2.1 Análisis de la variabilidad molecular

De las 29 líneas mencionadas se sembraron 30 semillas por línea. Éstas fueron tratadas con Etefon (Ethrel SL 480, Bayer CropScience) previo a la siembra, con el objetivo de romper la dormición. El tratamiento se realizó durante 12 horas, se enjuagó posteriormente la semilla con hipoclorito de sodio 20% y agua desmineralizada, y posteriormente estas fueron pre-germinadas en cámara a 25°C. Las siembras se realizaron en macetas de 3 litros.

Estas plantas crecieron bajo condiciones de invernáculo, con 16 horas de fotoperíodo y temperaturas día/noche de 26°C/15°C hasta el momento de ser muestreada.

Todo lo referente a la parte molecular, como la liofilización, extracción de ADN, evaluación de microsatélites, amplificaciones, electroforesis, entre otras actividades, fueron llevadas a cabo en el Departamento de Biotecnología de NIDERA S.A. de la localidad de Venado Tuerto (Santa Fe).

6.2.2.2 Muestreo y extracción del ADN

Se muestrearon hojas jóvenes en activo crecimiento con sacabocados, de cada una de las plántulas obtenidas de cada material. Luego se colocaron las muestras en nitrógeno líquido en tubos Falcon de 15ml por 10 minutos para posteriormente liofilizarlas. La liofilización es un proceso de deshidratación de productos bajo baja presión (vacío) y moderada temperatura. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido, normal en procesos de secados, sino la sublimación del hielo.

Luego de liofilizadas, las muestras fueron molidas en forma mecánica usando un homogeneizador de tipo vórtex, hasta obtener un polvo fino.

Las muestras molidas se colocaron en tubos de 2ml, llenando 2-3 mm del fondo del tubo, realizando la extracción por medio de la técnica SDS (Dellaporta, 1994), como se explica a continuación.

El buffer de extracción utilizado se muestra a continuación:

Componentes	Concentración
Agua	
Tris-HCl pH=8	100mM
EDTA pH=8	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl)	500mM
SDS	2,50%
2-mercaptoetanol	10 μ M

Tris: hidroximetil amino etano

EDTA: Ácido etilendiamintetracético di sódico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

A cada tubo con material vegetal molido, se le agregó 1 ml del buffer descrito anteriormente. Luego se incubó en baño termostático a 65°C durante 10 minutos, agitando en forma manual cada 2-3 minutos. A continuación se los dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Luego se agregó a cada tubo 300 µl de buffer de precipitación (acetato de potasio 0,7% P/V), se mezcló bien por agitación y se colocaron en agua a 2°C aproximadamente durante 20 minutos, para posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 11000 rpm. Para que el ADN precipite, se transfirió 1 ml del sobrenadante de cada muestra a un tubo de 2 ml que contenía previamente 1 ml de isopropanol frío, hasta observar un precipitado. Posteriormente, se centrifugó durante 6 minutos a 11000 rpm, descartando el sobrenadante.

A continuación, se agregó etanol al 80% y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 11000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se secaron los tubos con papel absorbente. Los tubos conteniendo el ADN se secaron en flujo laminar por espacio de 30 minutos, para finalmente agregar 200 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH=8) para resuspender el ADN.

La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría ultravioleta utilizando el espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech), asumiendo que 1DO (1 densidad óptica a 260 nm) equivale a 50µg de ADN. Como última actividad, las muestras fueron diluidas hasta una concentración final de 8ng/µl.

6.2.2.3 Amplificación del ADN

Se utilizaron marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los mismos fueron del tipo microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat). En la Tabla III, pueden observarse los marcadores microsatélites utilizados, las secuencias de cada uno de los cebadores, la temperatura de apareamiento y el grupo de ligamiento donde se ubican.

Tabla III. Nombre del marcador microsatélite, secuencia de los cebadores directos (D) y reversos (R), temperatura de apareamiento y grupo de ligamiento (GL).

Nombre del marcador microsatélite	Secuencias de los pares de cebadores	Temperatura de apareamiento (°C)	Grupo de ligamiento (GL)
ORS 008	D TTGGATCGATTGATGATTGTTG R GAATCCGTCATGTATAAACGA	52	15
ORS 166	D CAGCCACATGCCCTCTGAC R TGTTAAGAACCGCGACAACCTGC	55	8
ORS 495	D CCAGGATTAGGTAGCTTAGTTTCG R GCGATCTGAGGTTGACTCGT	54	16
ORS 510	D CATCGCGTCCCTCTCTCTAA R CCAACCATCACGCAATCAG	58	9
ORS 595	D TGATGGTAATGCATCGGGTA R CACACCATCCCTTGTAATAATCA	58	10
ORS 838	D TGCATCTTGTAATTGTGTGGGTA R AACGACTCCTCTTTGATCTCGTC	59	9
ORS 844	D ACGATGCAAAGAATATACTGCAC R CATGTTAATAGGTTTTAATTCTAGGG	59	9
ORS 1024	D GGGAAAGTGGGCTTGTCTATGTAT R AACACACCGAAATCACCTATGAA	59	5
ORS 1039	D AGAAATGCTCTTTGGAGGAGATG R TTGTCAACTTCCTTTCTTCATCTTT	59	1
ORS 1045	D GGTGACAAGAGGGGTGTTTCAG R GGACAAATGAGTGTGGGAGTTT	59	2
ORS 1095	D AAGTTGCACCATGTTATTTTCACAG R TGTTTGATTCTCATGCACATATTGA	59	10
ORS 1097	D GACCAAGTGGACTGACACGAG R CGGTGGTGGCTTAGATTGTATAGT	59	17
ORS 1128	D TCTGTGCCATACCACTTTATTTCG R GGCGATAATAGATGCGACACTC	59	1
ORS 1256	D GATGTTGATGTTGGTGAAGTTGC R CTCCGTCACCTTAAGCACTTGTA	59	6

Se trabajó con 14 marcadores tipo SSR los cuales fueron previamente mapeados (Yu, *et al.* 2003).

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el siguiente buffer:

Componente	Concentración
BSA (acetilada) 10mg/ml	1µl/ml
Tris-HCl pH=8	90mM
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	20mM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	2,5mM
dNTP'S Mix 1,25mM c/u	100µM c/u
Taq polimerasa 5U/µl	1U
Primer Mix 5 µM c/u	160nM c/u
ADN 8ng/µl	40 ng

BSA: Albumina bovina sérica
Tris: hidroximetil amino etano
dNTP's: desoxirribonucleótidos trifosfato

El volumen final de la reacción fue de 15µl.

El programa de amplificación consistió en desnaturalización de 1 minuto a 95°C. Luego se produjeron 22 ciclos de PCR "touch down" que consistieron en: 1 minuto a 95°C y 45 segundos a 65°C, esto repetido durante dos ciclos y luego 2 ciclos bajando 1°C la temperatura hasta llegar a 55°C durante 45 segundos.

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida para resolver los productos de amplificación.

Los productos de amplificación se mezclaron con 3µl de buffer de carga (formamida 98% (v/v), 10 mM EDTA pH=8, 0,3% (p/v) de azul de bromofenol y 0,3% (p/v) de xilen cianol), desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos y puestos inmediatamente en hielo. Posteriormente se sembraron 7µl de cada muestra en geles de acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 6% con urea 7M, 5M de TBE (Tris borato 9mM, EDTA 10 mM), persulfato de amonio 10% y 65 µl de TEMED (N,N,N',N'- tetranetil etilen diamina). La corrida fue efectuada usando un buffer de corrida TBE 0,5% por un período de 3 a 4 horas a 60W. Los fragmentos amplificados fueron separados conjuntamente con un marcador de peso molecular con el objetivo de determinar el tamaño de cada fragmento.

Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel fue fijado en ácido acético al 10% durante 20 minutos. Posteriormente el mismo fue lavado 3 veces por espacio de 2 minutos con agua destilada. En segundo término se incubó el gel durante 30 minutos en agitación en la solución de tinción, la cual consistió en nitrato de plata (0,1% p/v) y formaldehído (0,055% v/v). A continuación se realizó un lavado con agua por no más de 10 segundos con la finalidad de eliminar el remanente de nitrato de plata. Luego, se lo incubó en la solución de revelado conformada por carbonato de sodio (3% p/v), formaldehído (0,055% v/v) y tiosulfato de sodio (0,002mg/ml), a una temperatura de 8-10°C. El revelado se dejó cursar hasta que se obtuvo la intensidad deseada en la bandas de manera tal de poder realizar las lecturas de los diferentes alelos. Finalmente, se detuvo la tinción con una solución de ácido acético al 10% y por último, se lavó el gel con agua destilada durante 3 minutos.

6.2.2.4 Diversidad molecular

Para calcular la variabilidad presente en cada *locus*, se calculó el Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC) (Anderson *et al.*, 1993), que se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_{ij}^2$$

donde:

p_{ij} es la frecuencia del alelo i para el *loci* j .

Un PIC igual a 0 indica que el marcador es monomórfico y un PIC alto (mayor a 0,70) indica que el marcador es altamente polimórfico y que tal polimorfismo está distribuido uniformemente entre los individuos estudiados (Sala *et al.*, 2010).

Se procedió a calcular los valores de PIC para cada uno de los genotipos de las líneas B y R así como para el total (PIC global). Luego se analizaron estos valores y también, se compararon mediante una prueba “t” suponiendo varianzas iguales, previo

análisis mediante prueba F, para determinar la relación entre varianzas. El objetivo de la prueba “t” era determinar si existían o no diferencias significativas entre los valores de PIC de las líneas B y de las R. Las hipótesis planteadas se pueden observar en el Anexo- Sección II Inciso 6.

Para evaluar la variación genética, se utilizó como medida la Diversidad Genética (D) calculada de la siguiente manera:

$$D = 1 - 1/L \sum_l \sum_i p_i^2$$

donde:

p_i es la frecuencia del alelo i en el *locus* l

L es el número de *loci*.

Esto equivale a realizar el promedio de los valores de PIC a lo largo de todos los microsatélites analizados.

Por otro lado, se calcularon las frecuencias alélicas para los 15 *loci* de microsatélites para ambos grupos reproductivos. Posteriormente, se procedió a comparar mediante una prueba de χ^2 , las frecuencias alélicas en cada *locus* para los dos grupos reproductivos, con el objetivo de determinar la existencia de diferencias entre frecuencias alélicas entre grupos reproductivos (Anexo-Sección II Inciso 7).

6.2.2.5 Análisis multivariado

6.2.2.5.1 Cálculo de las distancias genéticas

Se construyó como primer paso, una Matriz Básica de Datos (MBD), M x A, donde M representan las columnas de la matriz, correspondiendo a las líneas analizadas, y A, las filas de la matriz, las cuales corresponden a los *loci* de los microsatélites empleados.

En el cuerpo de la matriz se encuentran los nombres de los alelos correspondientes a cada genotipo y a cada *loci* de microsatélite.

Posteriormente, se procedió a la construcción de una matriz binaria, M x A, de M genotipos y A alelos de *loci* de microsatélites. Esta matriz binaria posee en el cuerpo de la misma solo dos posibles valores, 0 y 1, indicando el primero ausencia y el segundo presencia de ese alelo del *loci* de microsatélite en el genotipo analizado.

Sobre esta matriz, se calcularon los coeficientes de similitud entre genotipos a través del Coeficiente de Similitud Simple (SMC, Sneath & Sokal, 1973), el cual se describe a continuación:

$$\text{SMC} = m / (m + n)$$

donde:

m: representa el número de alelos idénticos

n: representa el número de alelos diferentes.

Este coeficiente, representa la proporción de caracteres que comparten las dos muestras (Winzer *et al.*, 2010).

Luego, con estos datos, se construyó una matriz de similitud. Esta matriz posee tanto en las filas como en las columnas, los genotipos analizados y en su interior los valores de similitud obtenidos a partir del uso del Coeficiente de Similitud Simple (SMC).

A partir de los datos de SMC entre cada par de genotipos, se procedió a calcular los SMC promedios para el grupo de líneas de cada grupo reproductivo.

También, se estimaron los valores promedios, para cada línea, de la similitud (SMC) entre esa línea y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (SMC Global); los promedios, para cada línea, de la similitud entre esa línea y todas las líneas del mismo grupo reproductivo y los valores promedios para cada línea, de la similitud entre esa línea y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto. El objetivo era determinar si la similitud promedio entre genotipos pertenecientes a un mismo grupo reproductivo era

estadísticamente mayor, igual o menor que la similitud entre genotipos de diferentes grupos reproductivos. La comparación de los promedios se realizó mediante una prueba “t”.

Se realizó el mismo procedimiento (prueba “t”), pero se compararon los valores promedios de similitud (SMC) entre cada una de las líneas B y todas las líneas R con los valores promedios de similitud entre cada una de las líneas R y todas las líneas restantes de su mismo grupo reproductivo.

Todas las hipótesis planteadas, al igual que el estadístico utilizado y el procedimiento se pueden observar detallado en el Anexo-Sección II Inciso 8.

6.2.2.5.2 Análisis de agrupamiento

Partiendo de la MBD, se procedió a aplicar el Coeficiente de Similitud Simple (SMC), y posteriormente se construyó una matriz de similitud. A esta se le aplicó la técnica de agrupamiento conocida como método de pares no ponderados usando medias aritméticas (UPGMA) (Ver Anexo-Sección II Inciso 3). Estos resultados se volcaron en una representación gráfica en forma de árbol conocido como dendograma. El mismo, contiene en el eje de las abscisas los valores del coeficiente de similitud (SMC) y en el eje de las ordenadas todas las líneas analizadas. Este tipo de representación permite apreciar claramente las relaciones de agrupación entre las diferentes líneas e incluso entre grupos de ellas.

6.2.3 Análisis morfológico-molecular

Se procedió a elaborar un gráfico en el cual se comparaban las distancias morfológicas (eje “x”) y las distancias moleculares (eje “y”). Posteriormente, se realizó una comparación de las matrices de distancia molecular y morfológica a través del Test de

Mantel (1967) con un número de permutaciones de 1000 (Ver Anexo-Sección II Inciso 9).

El software utilizado fue NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000).

7. RESULTADOS

7.1 Diversidad morfológica entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos

Al realizar la comparación de las líneas mantenedoras y restauradoras utilizadas a través de las variables morfológicas cuantitativas se encontraron diferencias significativas, para 14 de las 22 variables cuantitativas analizadas (Tabla IV). Ellas son: número de hojas, ancho de la lámina, número de flores liguladas, diámetro del capítulo, relación largo de la bráctea/ radio del capítulo, número de aquenios por capítulo, ancho de los aquenios, largo de los aquenios, espesor de los aquenios, peso de 1000 aquenios, porcentaje de aceite, días de emergencia a inicio de floración, días de emergencia a plena floración y días de emergencia a madurez fisiológica y madurez de cosecha. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos reproductivos B y R para los siguientes caracteres: altura de la planta, diámetro del tallo, largo de la lámina, relación ancho/ largo de la lámina, longitud del pecíolo, ancho de la lígula, largo de la lígula y porcentaje de pepita.

En el análisis de estados realizado para el caso de las variables cualitativas se pudo observar que existieron diferentes estados entre los materiales para la mayoría de las variables (Tabla V), a excepción de superficie de la lámina, color de la corola, color de las anteras, color de los granos de polen, color del papus, pubescencia y moteado. En estos casos, todas las líneas analizadas presentaban idéntico estado. Así, la superficie de la lámina era medianamente rugosa, las corolas de color amarillo anaranjado, las anteras de color marrón, los granos de polen de color amarillo, el papus de color verde, granos con pubescencia y sin moteado.

Tabla IV. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para los 22 caracteres cuantitativos analizados.

VARIABLE	Promedio B	Promedio R	B versus R RAV	Promedio general	CME ⁽⁸⁾	CV ⁽⁹⁾
Altura de la planta (cm)	127,93	126,43	NS ⁽⁵⁾	127,21	377,87	15,28
Diámetro del tallo (cm)	2,41	2,21	NS	2,31	0,11	14,55
Número de hojas	32,27	23,14	** ⁽⁶⁾	27,86	12,69	12,79
Largo de la lámina (cm)	22,54	21,04	NS	21,81	9,96	14,47
Ancho de la lámina (cm)	24,56	22,24	* ⁽⁷⁾	23,44	7,31	11,54
Relación ancho/largo de la lámina	1,10	1,09	NS	1,09	0,01	10,52
Longitud del pecíolo (cm)	13,93	11,32	NS	12,67	12,19	27,56
Número de flores liguladas	52,53	36,57	**	44,83	150,41	27,36
Ancho de la lígula (cm)	1,63	1,62	NS	1,62	0,07	16,64
Largo de la lígula (cm)	5,95	6,39	NS	6,16	0,52	11,65
Diámetro del capítulo (cm)	14,63	9,52	**	12,16	3,92	16,27
Relación largo de la bráctea/ radio del capítulo	0,66	0,84	**	0,74	0,02	16,57
Número de aquenios por capítulo	1038,87	634,14	**	843,48	59860,57	29,01
Ancho de aquenios (mm)	4,73	4,14	*	4,45	0,27	11,61
Largo de aquenios (mm)	10,22	9,21	**	9,73	0,60	7,95
Espesor de aquenios (mm)	3,30	2,77	**	3,04	0,17	13,60
Peso 1000 aquenios (gr)	56,48	38,28	**	47,69	86,60	19,51
Porcentaje de pepita	75,71	72,78	NS	74,30	16,55	5,48
Porcentaje de aceite	44,96	49,25	*	47,03	22,93	10,18
Días emergencia/ inicio floración	65,21	59,15	*	62,29	26,80	8,31
Días emergencia/ plena floración	67,21	61,15	*	64,29	26,80	8,05
Días emergencia/ madurez fisiológica/ madurez cosecha	107,21	101,23	*	104,33	26,59	4,94

⁽⁵⁾ No significativa.

⁽⁶⁾ Diferencia significativa 0,05.

⁽⁷⁾ Diferencia altamente significativa 0,005

⁽⁸⁾ Cuadrado Medio Entre.

⁽⁹⁾ Coeficiente de Variación.

Tabla V. Estado para cada una de las variables cualitativas analizadas para la totalidad de los materiales.

CARACTER	ESTADOS ⁽¹⁰⁾ LÍNEAS B	ESTADOS LINEAS R	ESTADOS TOTALES
Pigmentación de hipocótilo	1, 3, 5 y 7 ⁽¹¹⁾	1, 3, 5 y 7	1, 3, 5 y 7
Pilosidad del tallo	4 y 6	4 y 6	4 y 6
Forma de las hojas	7	5 y 7	5 y 7
Color de las hojas	5 y 7	5 y 7	5 y 7
Superficie de la lámina	5	5	5
Aserrado del borde foliar	4 y 6	4	4 y 6
Inclinación de la lámina	9	5 y 9	5 y 9
Color de la lígula	4 y 6	4 y 6	4 y 6
Color de la corola	4	4	4
Color de las anteras	1	1	1
Color de los granos de polen	9	9	9
Color del papus	1	1	1
Antocianinas del estigma	1 y 9	1 y 9	1 y 9
Ramificación apical	1	9	1 y 9
Forma del capítulo	4, 6 y 8	4 y 6	4, 6 y 8
Posición a la madurez	5, 7 y 9	7 y 9	5, 7 y 9
Espesor del receptáculo	5 y 7	3 y 5	3, 5 y 7
Pubescencia	9	9	9
Moteado	1	1	1
Color principal del pericarpio	1	1, 3 y 7	1, 3 y 7
Estrías	1 y 9	1 y 9	1 y 9
Color de las estrías	3	1, 3, 5 y 7	1, 3, 5 y 7
Posición de las estrías	5	5 y 9	5 y 9

⁽¹⁰⁾ Se entiende por estado a los diferentes valores que puede adoptar una variable cualitativa.

⁽¹¹⁾ Ver codificación de estados para cada variable cualitativa en Tabla II.

Para 6 caracteres, las líneas B presentaron un único estado (forma de las hojas, inclinación de la lámina, color principal del pericarpio, color de las estrías, posición de las estrías y ramificación apical) mientras que en las líneas R, sólo dos de ellas resultaron ser monomórficas (aserrado del borde foliar y ramificación apical).

Existieron estados que se presentaron únicamente en uno de los grupos reproductivos y no así en el otro. Así es como, el aserrado del borde foliar fuerte, el capítulo deforme, la posición vertical del capítulo, el espesor del receptáculo grueso y la ausencia de ramificación apical fueron solo observados en las líneas B. Por otro lado, los estados presentes solo en las líneas restauradoras fueron los siguientes: forma de la hoja triangular, inclinación de la lámina entre 45° y 90°, espesor del receptáculo fino, color principal del pericarpio castaño y gris, color de las estrías blancas, marrones y negras, posición de las mismas de otra forma que no sea marginal, lateral o ambas y ramificación apical presente.

En lo referente al análisis multivariado, en la Figura 4, se puede observar el dendograma obtenido como resultado de la aplicación del método de agrupamiento UPGMA. El coeficiente utilizado fue CORR (correlación). Con un valor negativo de coeficiente (-0,19) se puede observar una primera separación en dos grupos claramente distinguibles: por un lado, un grupo conteniendo a todas las líneas B (grupo I) y por el otro, un grupo conteniendo a todas las líneas R (grupo II).

Dentro del grupo I, a -0,05 de coeficiente de correlación, se observa una división, en la cual, deja por un lado tres líneas (grupo Ia), B14DMR, B11DMR y OB6DMR, siendo todas resistentes a las mismas razas de downy mildew (enfermedad causada por *Plasmopara halstedii*) y solo una de ellas (OB6DMR) de alto oleico, y un grupo Ib con el resto de líneas. Dentro de las mantenedoras, las líneas B14DMR y B11DMR fueron las que mostraron más similitud, siendo el coeficiente entre ellas de 0,73.

A los 0,04 de coeficiente de correlación se puede observar una división del grupo II en 2 subgrupos: uno (grupo IIa) que contiene tres líneas portadoras del carácter IMISUN de resistencia a Imidazolinonas (IR8, IR9 y IR20DMR) y además tres líneas convencionales (R6, R11 y RHA274). El segundo subgrupo (grupo IIb), contiene tres líneas convencionales resistentes a todas las razas conocidas de downy mildew (R9DMR, R12DMR y R4DMR), una línea convencional susceptible a downy mildew (R19) y sólo una línea resistente a Imidazolinonas (IR35DMR). Este grupo también incluyó a las dos líneas con resistencia a roya negra (R10DMR-RRO y R20DMR-RRO) enfermedad causada por *Puccinia helianthi* y a una línea con el carácter alto oleico (OR6DMR). Dentro de las líneas restauradoras, las que presentaron mayor porcentaje de similitud fueron las líneas R9DMR y R10DMR-RRO con un coeficiente de correlación de 0,74.

Los promedios del coeficiente euclidiano para cada línea analizada con respecto a la totalidad de las mismas pueden observarse en forma separada en la Tabla VIa para las líneas mantenedoras y en la Tabla VIb para las líneas restauradoras. Allí también se pueden observar los promedios de distancia obtenidos para cada línea con respecto a su propio grupo reproductivo y al opuesto.

Dentro de las líneas mantenedoras, la línea B19DMR fue la que presentó menor valor de distancia promedio al comparar con las otras líneas y con las R (7,26 y 7,68 respectivamente). La línea IB21 fue la que presentó menor valor promedio de distancia euclidiana al comparar con su mismo grupo reproductivo (6,29). Los mayores valores los presentó la línea IB14 tanto al comparar con el resto de las líneas, como al comparar con su mismo grupo y con el grupo opuesto (9,51, 8,10 y 10,92 respectivamente) (Tabla VIa).

Al analizar las líneas restauradoras, los menores valores con respecto a la totalidad de las líneas y para las líneas de su mismo grupo reproductivo fueron para la línea IR35DMR (7,42 y 6,69 respectivamente) y con respecto al grupo de las B fue la línea OR6DMR (7,71).

Tabla VIa. Distancias euclidianas promedio para cada línea mantenedora con respecto a la totalidad de las líneas, con respecto a las líneas de su mismo grupo reproductivo y con respecto a las líneas del grupo reproductivo opuesto.

	LÍNEAS	DISTANCIA	DISTANCIA	DISTANCIA
		EUCLIDIANA	EUCLIDIANA	EUCLIDIANA
		GLOBAL ⁽¹²⁾	B ⁽¹³⁾	R ⁽¹⁴⁾
LÍNEAS MANTENEDORAS	HA89	8,56	7,40	9,72
	B14DMR	8,26	7,41	9,11
	B19DMR	7,26	6,83	7,68
	B12DMR	8,53	7,68	9,37
	B16DMR	9,19	7,81	10,57
	B11DMR	8,25	8,04	8,46
	B13DMR	8,01	6,78	9,25
	IB21	7,27	6,29	8,26
	IB14	9,51	8,10	10,92
	OB3	7,93	6,87	9,00
	OB4	9,00	8,00	9,99
	OB5	7,33	6,51	8,14
	OB6DMR	8,47	7,93	9,01
	IB7	7,91	6,74	9,07
	IB8	7,90	7,11	8,69
Promedio		8,22	7,30	9,15
Desvío estándar		0,68	0,61	0,88

⁽¹²⁾ Distancia Euclidiana Global: valores promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea B y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (B y R).

⁽¹³⁾ Distancia Euclidiana B: valores promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea B y todas las líneas del mismo grupo reproductivo (B).

⁽¹⁴⁾ Distancia Euclidiana R: valores promedios para cada línea, de las distancias entre esa línea B y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto (R).

Tabla Vlb. Distancias euclidianas promedio para cada línea restauradora con respecto a la totalidad de las líneas, con respecto a las líneas de su mismo grupo reproductivo y con respecto a las líneas del grupo reproductivo opuesto.

		DISTANCIA EUCLIDIANA GLOBAL ⁽¹⁵⁾	DISTANCIA EUCLIDIANA B ⁽¹⁶⁾	DISTANCIA EUCLIDIANA R ⁽¹⁷⁾
LÍNEAS RESTAURADORAS		LÍNEAS		
	RHA274	11,04	11,71	10,27
	R6	7,58	8,04	7,06
	R11	9,10	9,66	8,46
	R9DMR	8,10	8,63	7,48
	R19	7,64	7,89	7,35
	IR8	8,33	8,97	7,59
	IR9	8,78	9,24	8,26
	R10DMR-RRO	9,17	9,92	8,31
	R20DMR-RRO	9,23	9,77	8,61
	OR6DMR	7,63	7,71	7,53
	IR20DMR	8,76	8,92	8,58
	R4DMR	7,99	7,75	8,27
	R12DMR	11,03	11,84	10,10
	IR35DMR	7,42	8,06	6,69
Promedio		8,70	9,15	8,18
Desvío estándar		1,17	1,34	1,04

⁽¹⁵⁾ Distancia Euclidiana Global: valores promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea R y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (B y R).

⁽¹⁶⁾ Distancia Euclidiana B: valores promedios para cada línea, de las distancias entre esa línea R y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto (B).

⁽¹⁷⁾ Distancia Euclidiana R: valores promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea R y todas las líneas del mismo grupo reproductivo (R).

Los mayores valores de distancia promedio con respecto a las demás líneas y su grupo reproductivo fueron para la línea RHA274 con valores de 11,04 y 10,27 respectivamente. El mayor valor de distancia euclidiana promedio con respecto al grupo de líneas B correspondió a la línea R12DMR (11,84) (Tabla VIb).

El valor de distancia euclidiana promedio entre las líneas mantenedoras y restauradoras fue de 9,15 resultando ser significativamente mayor que el promedio de las distancias entre líneas del mismo grupo reproductivo (para las líneas B de 7,30 y para las líneas R de 8,18). Al comparar el promedio del grupo de líneas B y del grupo reproductivo opuesto, se obtuvieron diferencias significativas. El promedio de distancias entre las líneas mantenedoras fue el menor.

7.2 Diversidad molecular entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos

Al realizar el análisis de los 15 *loci* de microsatélites, se pudo determinar la existencia de un total de 61 alelos entre todos los genotipos estudiados (29 líneas) (Ver Tabla VII). El *locus* que más alelos evidenció fue el ORS1045-1, con un total de 7 alelos. Seguidos con 6 alelos cada uno se encuentran el ORS1095 y el ORS595 y con 5, los *loci* ORS166, ORS1256 y ORS844. El promedio de alelos totales fue de 4,07 con un rango de 1 a 7.

Las 15 líneas mantenedoras mostraron 43 alelos, siendo el promedio de alelos de 2,87 y su rango de 1 a 6. El *locus* que evidenció más alelos para estas líneas, fue el ORS1045-1, con un total de 6, seguido por los *loci* ORS844 y ORS595, con 4 alelos.

En lo referente al grupo de las restauradoras, con 14 genotipos, éstas presentaron un total de 47 alelos, siendo el promedio de 3,13 y su rango de 2 a 5. El *locus* con más alelos fue el ORS1045-1, con 5. Los *loci* que presentaron 4 alelos fueron el ORS1024, ORS1256, ORS844 y ORS1095.

Tabla VII. Número de alelos totales, número de alelos para el grupo reproductivo B y para el grupo reproductivo R, detectados a través de las 29 líneas.

LOCUS	GRUPO DE LIGAMIENTO	NÚMEROS DE ALELOS TOTALES	NÚMERO DE ALELOS PARA B	NÚMERO DE ALELOS PARA R
ORS166	8	5	3	3
ORS1045-1	2	7	6	5
ORS1045-2	2	3	2	3
ORS1097	17	3	1	3
ORS1024	5	4	3	4
ORS008	15	3	3	2
ORS1256	6	5	3	4
ORS844	9	5	4	4
ORS495	16	3	3	3
ORS1039	1	4	3	2
ORS1095	10	6	3	4
ORS595	10	6	4	3
ORS1128	1	2	1	2
ORS510	9	2	2	2
ORS838	9	3	2	3
Σ		61	43	47
Promedio		4,07	2,87	3,13
Rango		1 a 7	1 a 6	2 a 5

Las líneas restauradoras presentaron más cantidad de alelos, pero con un menor rango, que las líneas mantenedoras. El *locus* ORS 1045-1 fue el que presentó mayor número de alelos totales (7) y también en número máximo para las B y las R.

Los resultados de “Índice de Contenido Polimorfismo” (PIC) se puede observar en la Tabla VIII. Los valores globales de PIC oscilaron entre 0,21 y 0,78, para los *loci* ORS510 y ORS1045-1 respectivamente. Estos *loci* también expresaron los mínimos y máximos valores para las líneas mantenedoras (sin tener en cuenta los *loci* ORS1097 y ORS1128 para los cuales el valor de PIC fue de 0), siendo de 0,12 para el ORS510 y de 0,73 para el ORS1045-1. Para las líneas restauradoras, el valor máximo se observó en los *loci* ORS1024 y ORS844, siendo de 0,66, mientras que el valor mínimo fue de 0,13 y fue para el *locus* ORS008.

Hay dos microsatélites que para las líneas mantenedoras no expresaron polimorfismo (ORS1097 y ORS1128).

La diversidad genética (D) global fue de $0,58 \pm 0,15$, mientras que la de las líneas B fue de $0,44 \pm 0,23$ y para las líneas restauradoras fue de $0,47 \pm 0,16$. Como resultado de la prueba t, no se observaron diferencias significativas entre los valores de PIC de las líneas B y de las R.

La aplicación de las técnicas de agrupamiento UPGMA sobre la matriz de similitud generó el dendograma que se muestra en la Figura 5. A un valor de coeficiente SMC de 0,64, se observa una primer división, en la cual se separan, por un lado el testigo de las líneas restauradoras (RHA274) y por otro un gran grupo (grupo I) conteniendo al resto de los materiales (Figura 5).

A un valor de SMC de 0,65 existe una división en la cual se pueden reconocer claramente dos grupos. Un grupo (grupo II) formado por las líneas HA89, B14DMR, IB14, B11DMR, OB6DMR, OB4, B19DMR, B12DMR, B13DMR, IB21, OB5, OB3, B16DMR, IB7, IB8 y R4DMR, siendo en su mayoría líneas mantenedoras B (a excepción de la R4DMR) y

Tabla VIII. Valores de PIC promedio para la totalidad de las líneas, para las líneas mantenedoras y restauradoras.

LOCUS	GRUPO DE LIGAMIENTO	PIC B	PIC R	PIC GLOBAL
ORS166	8	0,55	0,50	0,73
ORS1045-1	2	0,73	0,58	0,78
ORS1045-2	2	0,42	0,30	0,51
ORS1097	17	0,00	0,56	0,38
ORS1024	5	0,48	0,66	0,58
ORS008	15	0,42	0,13	0,59
ORS1256	6	0,48	0,64	0,57
ORS844	9	0,72	0,66	0,74
ORS495	16	0,55	0,58	0,66
ORS1039	1	0,56	0,34	0,54
ORS1095	10	0,55	0,56	0,60
ORS595	10	0,58	0,36	0,73
ORS1128	1	0,00	0,34	0,47
ORS510	9	0,12	0,29	0,21
ORS838	9	0,44	0,58	0,59
PROMEDIO (D)		0,44	0,47	0,58
DESVÍO ESTÁNDAR		0,23	0,16	0,15

otro grupo (grupo III) conteniendo en su totalidad líneas restauradoras de la fertilidad (R). A este tercer grupo corresponden las líneas R6, R19, R11, R12DMR, IR35DMR, R10DMR-RRO, OR6DMR, R9, R20DMR-RRO, IR9, IR20DMR y IR8.

A 0,70 se observa dentro del grupo II una división, en la cual se dividen todas las líneas B (grupo IV) de la única R que permaneció en este grupo. A 0,70 se produjo una división dentro del grupo IV, en la cual concentró, por una lado a todas las líneas B y por el otro a la línea B (HA89). Las líneas que evidenciaron mayor similitud fueron la IB21 y la OB5, con un coeficiente de 0,95.

En el grupo de las restauradoras (grupo III), se puede observar que con un coeficiente de similitud de 0,71, se separan la línea IR8 del resto de los materiales restauradores.

Las líneas R6 y R19 exhibieron un 97% de similitud, siendo ambas restauradoras y líneas convencionales.

Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas en ambos grupos reproductivos, se puede observar que las frecuencias alélicas del grupo mantenedor mostraron diferencias significativas con respecto al restaurador en 11 de los 15 *loci* analizados (Tabla IX). De estos 11 *loci* de microsatélites, 4 mostraron diferencias poco significativas ($p=0.05$) y fueron el ORS1045-1, ORS495, ORS1095 y el ORS838. También 4 *loci*, fueron los que mostraron una diferencia altamente significativa ($p=0.001$), siendo para los *loci* ORS166, ORS008, ORS595 y ORS1128.

Para 4 *loci* no se evidenció diferencia estadísticamente significativa (ORS1024, ORS1256, ORS844 y ORS510).

Los promedios del coeficiente de similitud para cada línea analizada con respecto a la totalidad de las mismas puede observarse en forma separada en la Tabla Xa para las líneas mantenedoras en la Tabla Xb para las líneas restauradoras.

Tabla IX. Frecuencias alélicas y valores de χ^2 para los *loci* de microsatélites analizados para las líneas mantenedoras y restauradoras.

LOCUS	ALELO	FRECUENCIAS		
		LÍNEAS B	LÍNEAS R	GLOBAL
ORS166	356	0,13	0,00	0,07
	364	0,60	0,00	0,31
	354	0,27	0,29	0,28
	348	0,00	0,64	0,31
	368	0,00	0,07	0,03
χ^2				20,99***⁽¹⁸⁾
ORS1045-1	174	0,07	0,14	0,10
	164	0,20	0,07	0,14
	182	0,47	0,00	0,24
	176	0,13	0,64	0,38
	166	0,13	0,00	0,07
	178	0,07	0,07	0,07
	152	0,00	0,14	0,07
χ^2				16,78*⁽¹⁹⁾
ORS1045-2	148	0,73	0,14	0,45
	145	0,33	0,86	0,59
	143	0,00	0,07	0,03
χ^2				10,09**⁽²⁰⁾
ORS1097	178	1,00	0,50	0,76
	208	0,00	0,07	0,03
	204	0,00	0,43	0,21
χ^2				9,89**
ORS1024	244	0,07	0,14	0,10
	248	0,27	0,29	0,28
	242	0,67	0,50	0,59
	238	0,00	0,14	0,07
χ^2				2,90 NS⁽²¹⁾
ORS008	215	0,20	0,00	0,10
	213	0,73	0,07	0,41
	211	0,07	0,93	0,48
χ^2				21,61***
ORS1256	181	0,27	0,29	0,28
	179	0,67	0,50	0,59
	177	0,07	0,00	0,03
	185	0,00	0,07	0,03
	175	0,00	0,14	0,07
χ^2				4,50 NS

(18) ***: significativo, p= 0,001.

(19) *: significativo, p= 0,05.

(20) **: significativo, p= 0,01.

(21) NS: no significativo.

ORS844	277	0,20	0,07	0,14
	273	0,20	0,14	0,17
	283	0,40	0,43	0,41
	243	0,20	0,00	0,10
	247	0,00	0,36	0,17
χ²				9,18 NS
ORS495	169	0,07	0,50	0,28
	167	0,40	0,43	0,41
	152	0,53	0,14	0,34
χ²				8,15*
ORS1039	221	0,47	0,00	0,24
	219	0,47	0,79	0,62
	223	0,07	0,00	0,03
	234	0,00	0,21	0,10
χ²				11,87**
ORS1095	211	0,27	0,00	0,14
	213	0,60	0,64	0,62
	188	0,13	0,00	0,07
	193	0,00	0,29	0,14
	195	0,00	0,07	0,03
	198	0,00	0,07	0,03
χ²				12,05*
ORS595	154	0,60	0,00	0,31
	163	0,20	0,00	0,10
	147	0,07	0,00	0,03
	150	0,13	0,07	0,10
	158	0,00	0,14	0,07
	123	0,00	0,79	0,38
χ²				26,33***
ORS1128	278	1,00	0,21	0,62
	276	0,00	0,79	0,38
χ²				18,99***
ORS510	275	0,93	0,86	0,90
	266	0,07	0,21	0,14
χ²				1,19 NS
ORS838	323	0,67	0,21	0,45
	325	0,33	0,57	0,45
	329	0,00	0,21	0,10
χ²				7,44*

Tabla Xa. Valores promedio del coeficiente de similitud para cada línea mantenedora con respecto a la totalidad de las líneas y con respecto a las líneas de su mismo grupo reproductivo y al opuesto.

	LÍNEAS	SMC GLOBAL ⁽²²⁾	SMC B ⁽²³⁾	SMC R ⁽²⁴⁾
LÍNEAS MANTENEDORAS	HA89	0,65	0,70	0,60
	B14DMR	0,69	0,76	0,63
	B19DMR	0,73	0,80	0,67
	B12DMR	0,73	0,78	0,63
	B16DMR	0,73	0,77	0,69
	B11DMR	0,69	0,75	0,63
	B13DMR	0,72	0,80	0,65
	IB21	0,74	0,81	0,66
	IB14	0,71	0,76	0,65
	OB3	0,74	0,80	0,69
	OB4	0,70	0,72	0,68
	OB5	0,73	0,80	0,66
	OB6DMR	0,69	0,75	0,63
	IB7	0,72	0,79	0,65
	IB8	0,69	0,73	0,65
		Promedio	0,71	0,77
	Desvío estándar	0,02	0,03	0,02

⁽²²⁾ SMC Global: valores promedios, para cada línea, de la similitud (SMC) entre esa línea B y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (B y R).

⁽²³⁾ SMC B: valores promedios, para cada línea, de la similitud entre esa línea B y todas las líneas del mismo grupo reproductivo (B).

⁽²⁴⁾ SMC R: valores promedios para cada línea, de la similitud entre esa línea B y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto (R).

Tabla Xb. Valores promedio del coeficiente de similitud para cada línea restauradora con respecto a la totalidad de las líneas y con respecto a las líneas de su mismo grupo reproductivo y al opuesto.

	LÍNEAS	SMC GLOBAL ⁽²⁵⁾	SMC B ⁽²⁶⁾	SMC R ⁽²⁷⁾
LINEAS RESTAURADORAS	RHA274	0,64	0,64	0,64
	R6	0,69	0,63	0,77
	R11	0,72	0,66	0,78
	R9DMR	0,71	0,65	0,78
	R19	0,70	0,64	0,77
	IR8	0,69	0,67	0,70
	IR9	0,73	0,67	0,80
	R10DMR-RRO	0,69	0,64	0,73
	R20DMR-RRO	0,71	0,67	0,76
	OR6DMR	0,70	0,66	0,74
	IR20DMR	0,68	0,61	0,77
	R4DMR	0,66	0,70	0,63
	R12DMR	0,70	0,64	0,78
	IR35DMR	0,72	0,65	0,79
	Promedio	0,70	0,65	0,75
	Desvío estándar	0,02	0,02	0,05

⁽²⁵⁾ SMC Global: valores promedios, para cada línea, de la similitud (SMC) entre esa línea R y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (B y R).

⁽²⁶⁾ SMC B: valores promedios para cada línea, de la similitud entre esa línea R y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto (B).

⁽²⁷⁾ SMC R: valores promedios, para cada línea, de la similitud entre esa línea R y todas las líneas del mismo grupo reproductivo (R).

Allí también podemos observar los valores promedios de coeficiente de similitud para cada línea con respecto a su grupo reproductivo y al opuesto.

Dentro de las líneas mantenedoras la línea HA89, fue la que presentó menor valor de coeficiente promedio, tanto comparada con el resto de las líneas, como con respecto a su grupo reproductivo y al opuesto (0,65, 0,70 y 0,60 respectivamente). El mayor valor al comparar las líneas mantenedoras con el grupo reproductivo opuesto fue para las líneas B16DMR y OB3 (0,69 para ambas). Ésta última línea, junto con la línea IB21, fueron las que presentaron el valor máximo con respecto a la totalidad de las líneas (0,74). El mayor valor de coeficiente en comparación con las líneas de su mismo grupo reproductivo, fue para la línea IB21 con un valor de 0,81 (Tabla Xa).

Al analizar las líneas restauradoras, el menor valor de coeficiente de similitud fue para la línea RHA274 con respecto a la totalidad de las líneas (0,64). Al comparar con las líneas B, el menor valor lo presentó la línea IR20DMR (0,61) y con respecto a las líneas R, el menor valor fue para la línea R4DMR (0,63). Los mayores valores los presentaron las líneas IR9, tanto para la totalidad de las líneas (0,73), como en comparación con las R (0,80), y la línea R4DMR, al comparar con las B (0,70) (Tabla Xb).

El valor de similitud promedio entre líneas B y R, fue de 0,65, significativamente menor que el promedio entre líneas B (0,77) y que el promedio entre líneas R (0,75) (Tablas Xa y Xb).

7.3 Relación entre la diversidad morfológica y molecular

En la Figura 6 se puede observar la relación entre las distancias morfológicas y moleculares. La distribución de puntos obtenidas es del tipo triangular, sin embargo existen pocos puntos ubicados dentro de la zona considerada de baja distancia morfológica y alta distancia molecular.

Como resultado de la aplicación del Test de correspondencia entre matrices de Mantel (1967), se obtuvo una correlación (r) entre la matriz de distancia morfológica y la matriz de distancia molecular de 0,44, con un valor de probabilidad de 0,002, resultando la misma ser altamente significativa.

8. DISCUSIÓN

Entre las 29 líneas en estudio, no se encontró variabilidad para siete de las 23 variables cualitativas analizadas. Éstas siete variables (superficie de la lámina, color de la corola, color de las anteras, color de los granos de polen, color del papus, pubescencia y moteado) no tendrían valor para distinguir estos materiales.

Tanto las restantes 16 variables cualitativas observadas, como las 22 variables cuantitativas mostraron ser útiles para la diferenciación de las líneas. De hecho, todos los materiales pudieron ser diferenciados sobre la base de sus atributos morfológicos. Aún las dos líneas R9DMR y R10DMR-RRO que mostraron la mayor afinidad morfológica entre sí pudieron distinguirse por medio de 2 variables cualitativas (pilosidad del tallo y color de las hojas).

El agrupamiento de los materiales estudiados sobre la base de sus afinidades morfológicas tuvo valor para inferir las relaciones reproductivas. Así, los grupos determinados en el análisis de agrupamiento (Figura 4) fueron conformados por un lado con todas las líneas B y por otro lado con todas las líneas R. A su vez cada grupo tuvo líneas resistentes a downy mildew, líneas portadoras del carácter alto oleico, líneas convencionales y portadores del carácter de resistencia a imidazolinonas. En el grupo de las restauradoras, además de líneas con los atributos antes mencionados, también se presentaron líneas con el carácter de resistencia a roya negra.

Independientemente del análisis de agrupamiento realizado, se intentó verificar si los dos grupos reproductivos podían diferenciarse entre sí por algunas variables morfológicas y si además diferían en la diversidad presente en cada uno.

Así se pudo determinar que, las líneas R difieren de las B en 14 de las 22 variables cuantitativas analizadas (Tabla IV). Esta diferencia observada entre grupos está determinada por el tipo de caracteres que son seleccionados para obtener las líneas de ambos grupos reproductivos. Las líneas R en girasol, son seleccionadas para que

posean, por ejemplo, ramificación apical, lo cual hace que, como efecto secundario, muchos otros caracteres sean inmediatamente modificados, ya que están asociados a este tipo de fenotipo, así por ejemplo se modifica el número de aquenios por capítulo y tamaño del capítulo entre otros caracteres.

La diversidad existente entre líneas de un mismo grupo reproductivo es diferente según se considere al grupo B o al R. Así, el promedio de distancia Euclidiana para el grupo de líneas mantenedoras fue de $7,30 \pm 0,61$ (Tabla VIa), significativamente menor que para el grupo de líneas restauradoras cuyo valor promedio de distancia es de $8,18 \pm 1,04$ (Tabla VIb). Esto indica que la diversidad morfológica global para caracteres cuantitativos y cualitativos, es menor entre genotipos mantenedores que entre restauradores.

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se comprueba fehacientemente que el germoplasma mantenedor presenta menos variabilidad morfológica que el germoplasma restaurador. Esto puede deberse a las fuentes de variabilidad de donde se nutren los mismos. El germoplasma mantenedor es generado mayoritariamente a través de cruzas entre líneas mantenedoras, mientras que el germoplasma restaurador se nutre no sólo de cruzas entre líneas restauradoras, las cuales presentan gran variabilidad en los bancos de germoplasma disponibles, sino que también provienen de cruzamientos de líneas restauradoras con híbridos y de la autofecundación de híbridos. La mayoría de los híbridos comerciales son portadores del citoplasma PET1 y del gen de restauración (Rf1) en estado heterocigoto. De su autofecundación para derivar nuevos materiales, se obtendrán líneas estériles y líneas fértiles. Las líneas fértiles, que presentan el gen de restauración pueden endocriarse y estabilizarse sin dificultad dando así nuevas líneas R. Los híbridos son una crusa F_1 entre una línea A y una línea R, por lo que no es de extrañar, que su autofecundación y la posterior obtención de líneas R derivadas de estos híbridos, lleve consigo a un incremento en la diversidad dentro del grupo de las líneas R y

que esta diversidad sea mayor que dentro del grupo de líneas B e indistinto del que presentan todas las líneas (tanto B como R) tomadas en conjunto.

Como ya se explicó anteriormente, la evaluación fenotípica es una herramienta muy utilizada, todos los descriptores internacionales la siguen usando para fines de registro de materiales y protección, aunque cuenta con ciertas desventajas, como la influencia ambiental y el tiempo requerido para la recolección de datos. El uso de marcadores moleculares permite eliminar estas desventajas y están siendo ampliamente utilizados, en una gran variedad de tareas, como la descripción de líneas parentales, la determinación de diversidad genética, y la identificación de variedades, entre otras cosas.

Varios análisis de diversidad en girasol han sido dirigidos usando diferentes isoenzimas (Carrera & Poverene, 1995; Cronn *et al.*, 1997) y marcadores de ADN como RFLP (Berry, *et al.*, 1994; Gentzbittel *et al.* 1994), AFLP (Hongtrakul *et al.*, 1997), SSR (Yu *et al.*, 2002) y SNP (Liu & Burke, 2006).

De los 15 *loci* de microsatélites analizados sobre los 29 genotipos evaluados en este trabajo revelaron un total de 61 alelos. El promedio de los mismos por *locus* fue de 4,07, con un rango entre 1 a 7 por *locus* (Tabla IX). Los valores de PIC tuvieron un mínimo de 0,21 y un máximo de 0,78 para los *loci* ORS510 y ORS1045-1 respectivamente (Tabla VIII). El valor de diversidad, D, fue de 0,58.

Para Yu *et al.* (2002), que utilizaron 16 líneas de girasol, el número de alelos promedio por *locus* fue de 3,99 al utilizar 74 SSR polimórficos, es decir, un valor muy similar al obtenido en nuestro trabajo. Sin embargo para el caso de Yu, el rango de alelos varió entre 2 y 15 (para el ORS256). En el caso de los rangos de valores de PIC, el trabajo realizado por Yu *et al.* (2002) discriminaron los valores según el tipo de SSR (di, tri o tetranucleótido) siendo los valores obtenidos de 0,18-0,88, 0,18-0,70, 0,62-0,93, mientras que en nuestro caso el rango para todos los SSR evaluados fue de 0,21-0,78, dando como resultado una diversidad de 0,58, algo mayor a la obtenida por Yu *et al.*

(2002) de 0,55. Al utilizar marcadores moleculares TRAPs, Yue *et al.* (2009) hallaron valores de PIC inferiores (0,02 a 0,50), resultado esperado dado el tipo de marcador y por lo tanto también un resultado mucho menor de diversidad que fue de 0,40.

En el análisis de agrupamiento (Figura 5) se observa que a un valor de SMC de 0,65 existe una división en la cual se pueden reconocer claramente dos grupos. Un grupo en su mayoría formado por líneas mantenedoras B (a excepción de la R4DMR) y otro grupo conteniendo en su totalidad líneas restauradoras de la fertilidad (R). El motivo por el cual la línea R4DMR se agrupó dentro de las mantenedoras, se puede explicar debido a que esa línea fue originada a partir de la autofecundación de un híbrido. Los genotipos generados con esta estrategia suelen combinar regiones genómicas pertenecientes a ambos padres del híbrido, muchas de las cuales no sufren ningún tipo de selección durante el proceso de obtención de las líneas restauradoras en sí. Probablemente algunos de los marcadores moleculares escogidos para el análisis se localicen en este tipo de regiones y por lo tanto los alelos observados pueden ser aquellos con alta frecuencia en las líneas mantenedoras.

Este análisis de agrupamiento (Figura 5) permitió claramente la separación de las líneas de acuerdo al grupo reproductivo. Yue *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares, al utilizar TRAP y a través del análisis de agrupamiento separar sus 177 materiales en dos grupos: por un lado, girasol aceitero y por el otro lado, confitero, y estos a su vez divididos en subgrupos: un grupo mantenedor y otro grupo restaurador. También, a través del análisis cluster, 24 líneas endocriadas de girasol, a través del uso de AFLP, pudieron ser separadas en dos grupos, correspondiendo los mismos a líneas B y líneas R (Hongtrakul *et al.*, 1997). Coincidiendo con esto, Cheres & Knapp (1998) separaron 156 líneas endocriadas de girasol de acuerdo a su uso (aceitero o confitero) y de acuerdo a la restauración de la fertilidad (restauradoras o mantenedoras). También se pudo hacer la separación de 101 líneas a través del uso de SSR, obteniéndose como resultado que en

la gran mayoría las líneas endocriadas se agruparon de acuerdo a su categoría de machos o hembras (Smith *et al.*, 2009). De manera similar, Yu *et al.* (2002) usando SSR, en el análisis de agrupamiento pudieron diferenciar las líneas de acuerdo a su uso o a su grupo reproductivo.

Un número limitado de líneas endocriadas de girasol fueron caracterizadas para obtener similitud genética usando AFLP o RFLP y fueron agrupadas en grupos de líneas mantenedoras (B) y restauradoras (R) (Berry *et al.*, 1994; Gentzbittel *et al.*, 1994). Del mismo modo, Zhang *et al.* (1995) a través de RFLP, pudieron separar, entre 26 líneas endocriadas de girasol, por un lado las líneas mantenedoras y por otro, las restauradoras.

Dados los resultados previos citados y nuestros resultados resulta evidente que independientemente del tipo de marcador, y utilizando inclusive un número relativamente bajo de ellos, como fue el caso de nuestro trabajo, existe una estructuración de la diversidad a nivel molecular que permite distinguir ambos grupos reproductivos. Esto sin dudas se debe al tipo de prácticas realizadas dentro de los programas de mejoramiento, donde rara vez se realizan cruzamientos entre ambos grupos reproductivos. Además, para el caso de la autofecundación de híbridos, que suele utilizarse para el incremento de la base genética de restauradores, es probable que la selección fenotípica ejercida, por ejemplo, donde la selección de materiales policéfalos y que restauren la fertilidad, ejerce una selección a nivel genotípico que es coincidente con el tipo de agrupamiento observado.

El valor promedio de SMC entre el grupo de las líneas B y el grupo de las líneas R fue de 0,65, significativamente menor que los valores promedios de SMC entre líneas dentro del mismo grupo reproductivo (0,77 para B y 0,75 para R) (Tabla Xa y Xb).

A su vez, en el análisis de frecuencias alélicas, se obtuvieron diferencias significativas entre las líneas B y las R para 11 de 15 *loci* analizados (Tabla IX). Estos resultados confirman que la variabilidad genética estaría estructurada de acuerdo al grupo

reproductivo (mantenedor o restaurador) y que esta estructura está distribuida a través de todo el genoma. En nuestro caso no se utilizaron marcadores ligados al gen *Rf1*, presente en todas las líneas restauradoras, ubicado en el grupo de ligamiento 13. Otro gen presente en líneas restauradoras es *b1*, ubicado en el grupo de ligamiento 10, en este caso, existen dos marcadores, ORS595 y ORS1095, ubicados a 10,7cM y 19,3 cM respectivamente según el mapa de Rojas-Barros *et al.* (2008). Para el caso de ORS595, existe una distribución alélica sesgada según el grupo reproductivo analizado, esto puede observarse en la tabla IX, donde la diferencia de frecuencias alélicas es altamente significativas entre ambos grupos reproductivos, mientras que para ORS1095, el cual se encuentra más lejano, la diferencia de frecuencias alélicas entre ambos grupos reproductivos es escasamente significativa.

El valor promedio de similitud genética (SMC) en el presente trabajo fue de 0,70, resultando similar al obtenido por Rönicke *et al.* (2005), siendo el promedio para 25 líneas de girasol de 0,70. Yue *et al.* (2009) obtienen un promedio de similitud genética de 0,58, menor al del presente trabajo, pudiendo deberse esta diferencia al tipo de marcador utilizado y a la base genética que utiliza el programa de mejoramiento de la Universidad de North Dakota. Es importante considerar que la base genética de un programa de girasol privado debe ser lo suficientemente amplia como para poder enfrentar el desafío de generar productos nuevos y mejores año a año. Es de resaltar que el valor de diversidad del grupo reproductivo restaurador es mayor que para el grupo mantenedor (D para las líneas R es de $0,47 \pm 0,16$; D para las líneas B es de $0,44 \pm 0,23$) (Tabla VIII), aunque estas diferencias no son significativas. Esta mayor diversidad es coherente con la mayor diversidad encontrada a nivel fenotípico para el grupo reproductivo restaurador.

Numerosos estudios han intentado calcular las relaciones existentes entre las distancias calculadas a nivel fenotípico y las distancias calculadas a nivel de marcadores. Tanto el resultado teórico y experimental mostraron formas triangulares: bajas distancias

moleculares están asociadas a bajas distancias fenotípicas, mientras que altas distancias moleculares se corresponden con altas y bajas distancias fenotípicas (Burstin & Charcosset, 1997; Vicario *et al.*, 2010). Si dos individuos están muy relacionados a nivel de marcadores es muy probable que también lo estén a nivel morfológico. Por el contrario, una gran distancia molecular entre dos individuos no permite en realidad ninguna inferencia acerca de su parecido morfológico (éste puede ser muy alto o muy bajo). Esta relación puede explicarse por el determinismo generalmente poligénico de los caracteres que se utilizan en la estimación de las distancias morfológicas, que pueden conducir a fenómenos de convergencia. Por ejemplo, si se consideran 4 *loci* bialélicos con efectos iguales y se denotan respectivamente + y – los alelos favorables y desfavorables, las líneas portadoras de las combinaciones de alelos + + - - y - - + + presentará el mismo fenotipo pero diferirán para los 4 *loci* considerados (Sala *et al.*, 2010).

En el presente trabajo también fueron halladas relaciones triangulares, pero con la particularidad de que no existe una gran cantidad de puntos ubicados en la zona de baja distancia morfológica y alta distancia molecular. Esto podría deberse a que en el cultivo de girasol los materiales de baja distancia morfológica son únicamente aquellos que pertenecen a los mismos grupos reproductivos, lo cual ha sido discutido durante el análisis multivariado basado en este tipo de distancias, y que a su vez, la mayoría de los estudios realizados, incluido el del presente trabajo, utilizando marcadores moleculares han demostrado que también la diversidad molecular se estructura diferenciando ambos grupos reproductivos. Por lo tanto a bajas distancias morfológicas solamente encontramos materiales con baja distancia molecular, es decir pertenecientes a iguales grupos reproductivos. Esto no sucede así en cultivos como el sorgo (Rivero, 2004) donde a pesar de haber diferencias moleculares entre grupos reproductivos, los fenotipos de ambos grupos no son discernibles en forma tan evidente.

Burstin *et al.* (1994), también encontraron como resultado relaciones triangulares, al analizar 21 líneas de maíz a través de 142 marcadores resultantes del análisis de enzimas, RFLP y proteínas polimórficas anónimas.

Una relación triangular también fue encontrada entre distancias moleculares calculadas a partir de 222 marcadores de *loci* y la distancia de Mahalanobis para 10 caracteres fenotípicos para 10440 pares de líneas de maíz (Bar-Hen & Charcosset, 1995; Dillman *et al.* 1997). En sorgo algo similar fue informado por Chantereau (1993).

Beyene *et al.* (2005), como resultado de la aplicación del Test de correspondencia entre matrices de Mantel (1967), obtuvieron una correlación significativa entre los datos moleculares mediante AFLPs y los datos morfológicos ($r=0,39$, $p=0,001$) y entre SSRs y datos morfológicos ($r= 0,43$, $p=0,001$). Resultados similares a los obtenidos por Beyene *et al.* (2005), se presentaron en el presente trabajo, en el cual el valor de correlación entre matrices de distancia morfológica y molecular a través del uso de SSRs mediante el Test de correspondencia de Mantel (1967) fue de 0,44, con un valor de probabilidad (p) de 0,002, por lo cual existe una asociación entre ambas matrices con una probabilidad altamente significativa.

Por lo tanto, estos resultados sostienen aún más que la forma triangular que se desprende del gráfico obtenido entre la comparación de distancias estimadas a través de datos morfológicos y las distancias estimadas a través de marcadores moleculares (Figura 6), no sería al azar, sino debido a la existencia de alguna asociación entre las matrices, como lo indica este análisis, y como fue explicado anteriormente.

9. CONCLUSIONES

Utilizando 45 variables morfológicas para la descripción de 29 líneas endocriadas de girasol se demuestra que existe claramente una estructura determinada por el grupo reproductivo.

El mismo caso se presenta al analizar dichas líneas utilizando 15 marcadores SSRs, es decir, que a nivel molecular se mantiene el mismo tipo de estructura de la diversidad.

Ambas estructuras se basan en grupo reproductivo, y su relación presenta una distribución del tipo triangular ya descrita para otros cultivos.

10. REFERENCIAS DE IMÁGENES

Figura 1: Aserrado del borde foliar.

Figura 2: Forma del capítulo.

Figura 3: Posición del capítulo.

Figura 4: Dendograma construido a partir de los 29 materiales y 45 caracteres morfológicos analizados.

Figura 5: Dendograma construido a partir de las 29 líneas analizadas por medio de 15 microsatélites.

Figura 6: Relación entre la distancia morfológica y la distancia molecular.

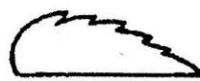
Figura 1. Aserrado del borde foliar.



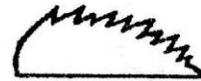
nulo (2)



medio(4)



fuerte(6)



muy fuerte (8)

Figura 2. Forma del capítulo.

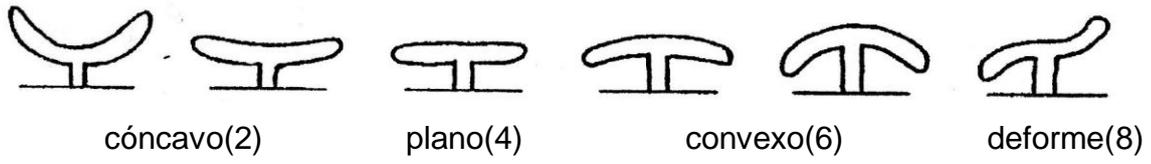


Figura 3. Posición del capítulo.

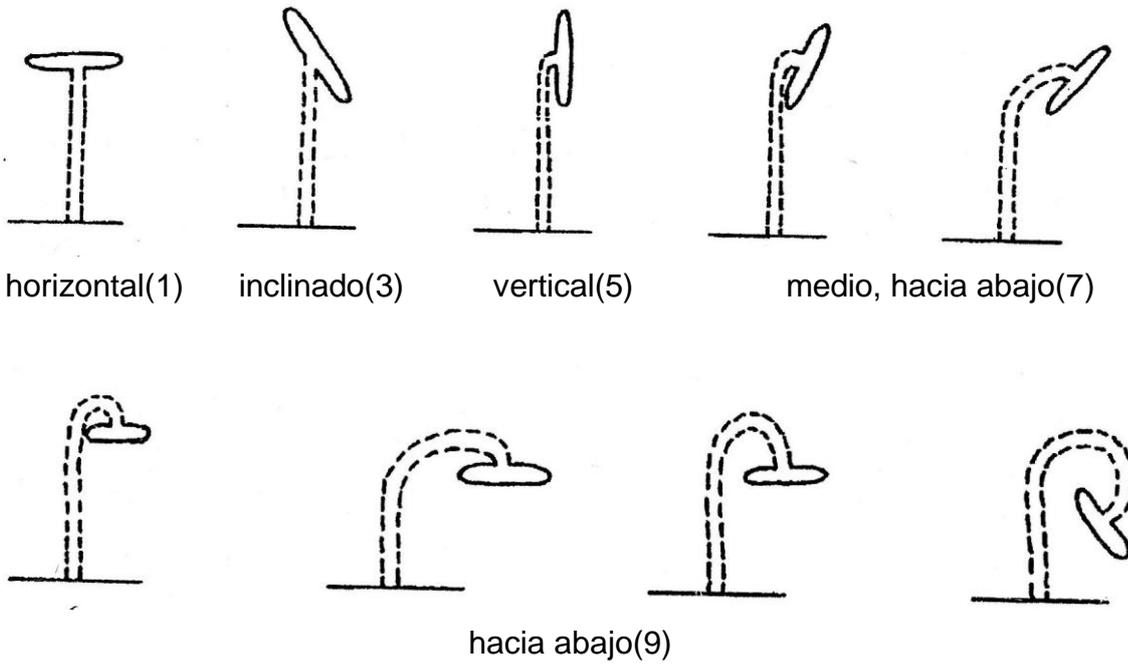


Figura 4. Dendograma construido a partir de los 29 materiales y 45 caracteres morfológicos analizados.

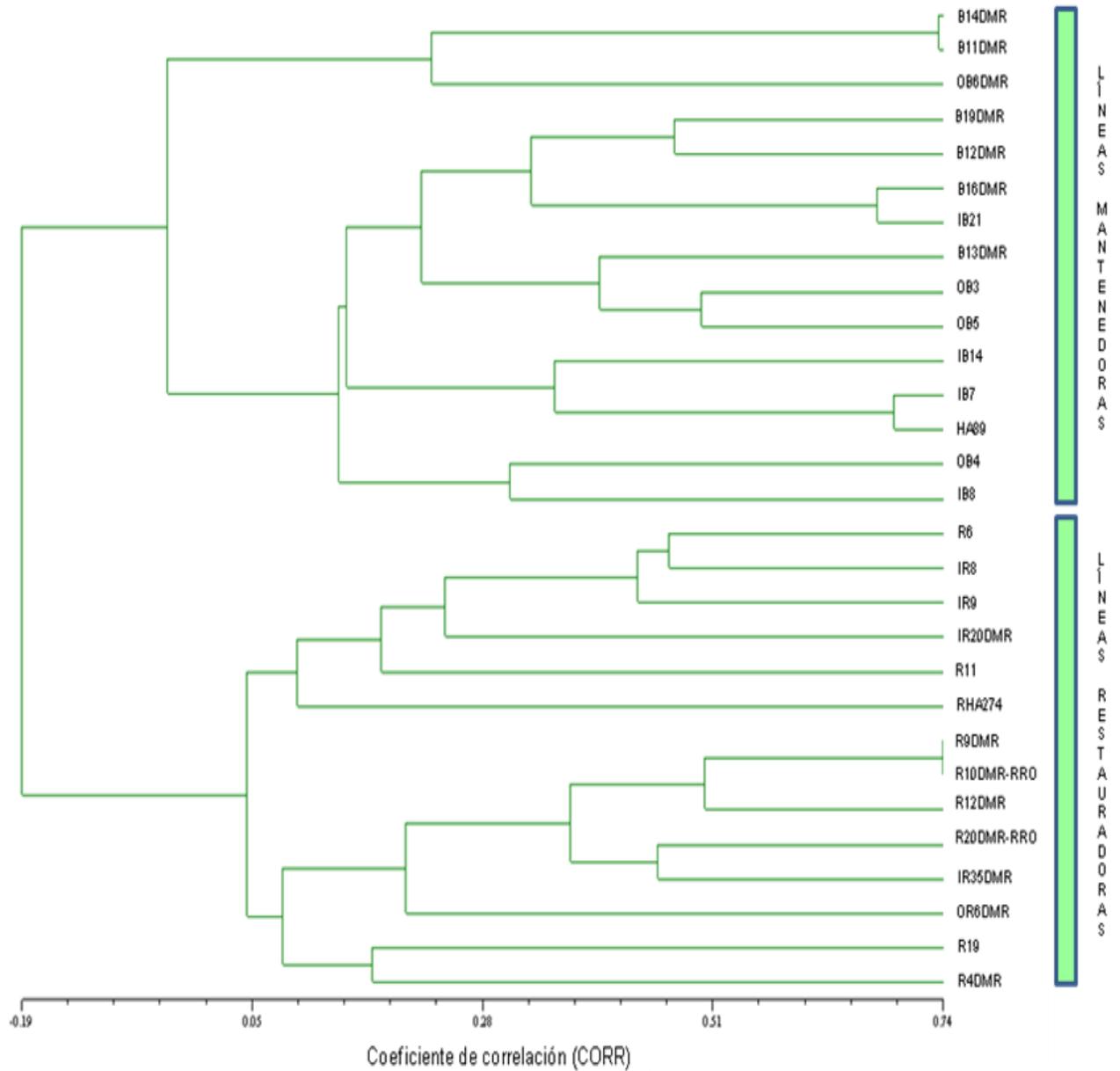


Figura 5. Dendograma construido a partir de las 29 líneas analizadas por medio de 15 microsatélites.

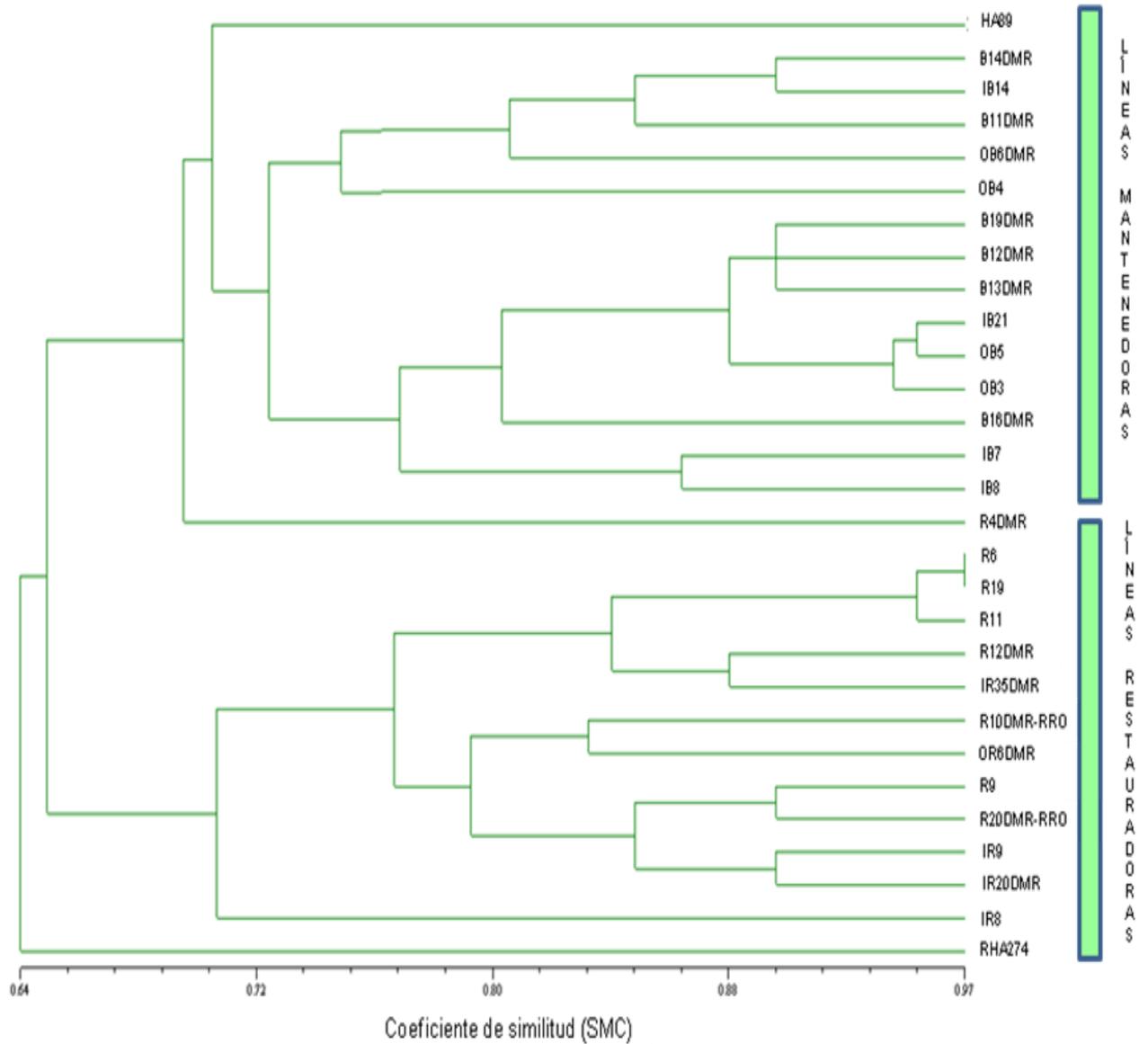
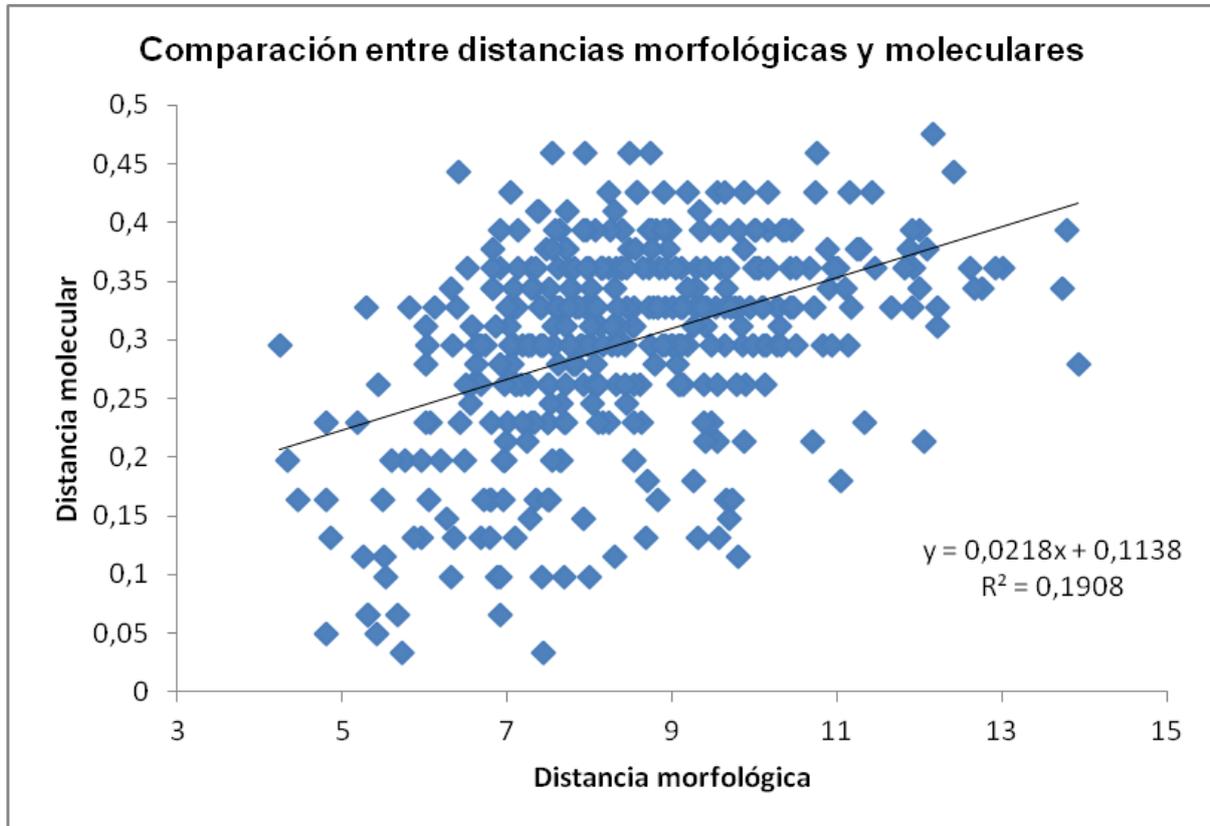


Figura 6. Relación entre la distancia morfológica y la distancia molecular

11. ANEXO

11.1 Sección I

11.1.1 Forma de las hojas

Oblonga: hoja alargada y con bordes paralelos.

Lanceolada: hoja que tiene la forma de la punta de una lanza, es decir, alargado, con los dos extremos agudos y el diámetro transversal mayor en el tercio inferior.

Triangular: hoja de forma triangular. Que tiene tres puntas.

Cordado: hoja en forma de corazón, es decir, ovado, con el ápice muy agudo y una escotadura en la base.

Redondeada: hoja circular. Cuando la base es completamente redonda y el ápice curvo.

11.2 Sección II

11.2.1 Análisis de varianza (ANOVA): hipótesis y modelo

Las hipótesis planteadas, para el análisis de varianza realizado sobre los 22 caracteres cuantitativos, en el análisis morfológico, fueron las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula) = $\mu_B = \mu_R$. No existen diferencias significativas entre los promedios de las poblaciones de líneas B (Mantenedoras) y de líneas R (Restauradoras) para una determinada variable cuantitativa.

H_1 (Hipótesis alternativa) = $\mu_B \neq \mu_R$. Existen diferencias significativas entre los promedios de las poblaciones de líneas B (Mantenedoras) y de líneas R (Restauradoras) para una determinada variable cuantitativa.

El modelo utilizado fue el que se describe a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij},$$

donde:

Y_{ij} = Valor de cada grupo reproductivo (i) en cada repetición (j);

μ = Valor promedio de la población;

α_i = Efecto del grupo reproductivo (B o R) (i);

ε_{ij} = Efecto del error experimental, en la j-ésima repetición del i-ésimo grupo reproductivo.

11.2.2 La estandarización de variables

La estandarización consiste en transformar todo el conjunto de datos en otro, con media (\bar{X}) igual a 0 y varianza (σ^2) igual a 1. El objetivo es reducir los datos a un mismo punto de referencia y a una escala común (Chao, 1993). Se transforma una variable X (\bar{X} ; σ^2) en una Z (0; 1) a través de la siguiente fórmula:

$$Z = (X - \mu) / \sigma$$

donde:

μ : media poblacional, y

σ : desviación estándar poblacional.

11.2.3 UPGMA: Método de pares no ponderados usando medias aritméticas

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means – Método de Pares No ponderados usando Medias Aritméticas) es un método sencillo para la construcción de diagramas de árbol o dendograma. El método usa un algoritmo de agrupamiento secuencial, en el cual la homología entre OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales) es identificada en orden de similitud, y el árbol es construido paso a paso. Las dos OTUs con mayor similitud son agrupadas y luego son consideradas como una nueva OTU compuesta. Posteriormente, entre el nuevo grupo de OTUs (compuestas y simples), el par con la mayor similitud es agrupada. Este proceso se repite hasta que resten solo dos OTUs. El algoritmo asume que las dos OTUs mas cercanamente relacionadas presentan más similitud una con la otra, que con el resto (Sneath & Sokal, 1973).

11.2.4 Distancia euclidiana

La distancia euclidiana o “línea recta” (Johnson & Wichern, 1982) entre dos puntos P y Q con coordenadas $P=(x_1, x_2, \dots, x_p)$ y $Q=(y_1, y_2, \dots, y_p)$ está dada por:

$$d(P,Q) = \sqrt{(x_1-y_1)^2 + (x_2-y_2)^2 + \dots + (x_p-y_p)^2}$$

11.2.5 Distancias euclidianas entre líneas B, entre líneas R y entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos.

Se estimaron los valores promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (Distancia Euclideana Global); los

promedios, para cada línea, de las distancias entre esa línea y todas las líneas del mismo grupo reproductivo y los valores promedios para cada línea, de las distancias entre esa línea y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto. El objetivo era determinar si la similitud promedio entre genotipos pertenecientes a un mismo grupo reproductivo era estadísticamente mayor, igual o menor que la similitud entre genotipos de diferentes grupos reproductivos.

Las Hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de las distancias entre cada línea B y todas las líneas de su mismo grupo reproductivo es igual al promedio poblacional de las distancias entre cada línea R y todas las líneas de su mismo grupo reproductivo.

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de las distancias entre cada línea B y todas las líneas de su mismo grupo reproductivo es diferente al promedio poblacional de las distancias entre cada línea R y todas las líneas de su mismo grupo reproductivo.

Las Hipótesis planteadas fueron evaluadas mediante una prueba "t":

$$t_c = (X_B - X_R) - (\mu_B - \mu_R) / \sqrt{((S^2_B / (n_B - 1)) + (S^2_R / (n_R - 1)))}$$

donde:

t_c es el valor del estadístico "t" calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_B + n_R - 1$ grados de libertad;

X_B y X_R son las medias muestrales de las líneas B y R, respectivamente;

μ_B y μ_R son las medias poblacionales de las líneas B y R, respectivamente;

S^2_B y S^2_R son las varianzas muestrales de las líneas B y R, respectivamente; y

n_B y n_R son el número de líneas que representan cada uno de los grupos citoplasmáticos.

Previo a evaluar esta hipótesis se evaluó mediante el estadístico "F" si las varianzas poblacionales de ambos grupos eran iguales, a los efectos de determinar qué varianza muestral usar para evaluarla.

A su vez, se compararon los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas B y todas las líneas R con los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas B y todas las líneas restantes de su mismo grupo reproductivo.

Se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de la distancia de cada línea B con las demás líneas B (μ_B) es igual o mayor que el promedio poblacional de la distancia de cada línea B con todas las líneas R ($\mu_{B \times R}$).

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de la distancia de cada línea B con las demás líneas B (μ_B) es menor que el promedio poblacional de la distancia de cada línea B con todas las líneas R ($\mu_{B \times R}$).

Las Hipótesis planteadas fueron evaluadas mediante una prueba "t":

$$t_c = (X_B - X_{B \times R}) - (\mu_B - \mu_{B \times R}) / \sqrt{((S^2_B / (n_B - 1)) + (S^2_{B \times R} / (n_{B \times R} - 1))};$$

donde:

t_c es el valor del estadístico "t" calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_B + n_{B \times R} - 1$ grados de libertad;

$X_{B \times R}$ y X_B son las medias muestrales de la distancia euclidiana de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas B con todas las líneas B restantes, respectivamente;

$\mu_{B \times R}$ y μ_B son las medias poblacionales de la distancia euclidiana de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas B con todas las líneas B restantes, respectivamente;

$S^2_{B \times R}$ y S^2_B son las varianzas muestrales de la distancia euclidiana de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas B con todas las líneas B restantes, respectivamente; y

$n_{B \times R}$ y n_B son el número de líneas que representan las líneas B y R evaluadas conjuntamente y las líneas B, respectivamente.

Previo a evaluar esta hipótesis se evaluó mediante el estadístico “F” si las varianzas poblacionales de ambos grupos eran iguales, a los efectos de determinar qué varianza muestral usar para evaluarla.

Se realizó el mismo procedimiento, pero se compararon los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas B y todas las líneas R con los valores promedios de distancia euclidiana entre cada una de las líneas R y todas las líneas restantes de su mismo grupo reproductivo.

Se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de la distancia de cada línea R con todas las líneas B es igual o menor que el promedio poblacional de la distancia de cada línea R con las demás líneas R.

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de la distancia de cada línea R con todas las líneas B es mayor que el promedio poblacional de la distancia de cada línea R con las demás líneas R.

Las Hipótesis planteadas fueron evaluadas mediante una prueba “t”:

$$t_c = (X_{B \times R} - X_R) - (\mu_{B \times R} - \mu_R) / \sqrt{((S^2_{B \times R} / (n_{B \times R} - 1)) + (S^2_R / (n_R - 1))};$$

donde:

t_c es el valor del estadístico “t” calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_{B \times R} + n_R - 1$ grados de libertad;

$X_{B \times R}$ y X_R son las medias muestrales de la distancia euclidiana de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y de cada una de las líneas R con todas las líneas R restantes, respectivamente;

$\mu_{B \times R}$ y μ_R son las medias poblacionales de la distancia euclidiana de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas R con todas las líneas R restantes, respectivamente;

$S^2_{B \times R}$ y S^2_R son las varianzas muestrales de la distancia euclidiana de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas R con todas las líneas R restantes, respectivamente; y

$n_{B \times R}$ y n_R son el número de líneas que representan las líneas B y R evaluadas conjuntamente y las líneas R, respectivamente.

Previo a evaluar esta hipótesis se evaluó mediante el estadístico “F” si las varianzas poblacionales de ambos grupos eran iguales, a los efectos de determinar qué varianza muestral usar para evaluarla.

11.2.6 Índice de contenido de polimorfismo (PIC): hipótesis

Para calcular la variabilidad presente en cada *locus*, se calculó el Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC) (Anderson *et al.*, 1993), que se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_{ij}^2$$

donde:

p_{ij} es la frecuencia del alelo i para el *loci* j .

Se procedió a calcular los valores de PIC para cada uno de los genotipos de las líneas B y R así como para el total (PIC global). Luego se analizaron estos valores y también, se compararon mediante una prueba “t”. El objetivo de la prueba “t” era determinar si existían o no diferencias significativas entre los valores de PIC de las líneas B y de las R.

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H₀ (Hipótesis nula): $\mu_B = \mu_R$. No existen diferencias significativas de los promedios poblacionales PIC entre líneas B (Mantenedoras) y líneas R (Restauradoras).

H₁ (Hipótesis alternativa): $\mu_B \neq \mu_R$. Existen diferencias significativas de los promedios poblacionales PIC entre líneas B (Mantenedoras) y líneas R (Restauradoras).

11.2.7 Frecuencias alélicas: hipótesis y estadístico

Se calcularon las frecuencias alélicas para los 15 *loci* de microsatélites para ambos grupos reproductivos. Posteriormente, se procedió a comparar mediante una prueba de χ^2 , las frecuencias alélicas en cada *locus* para los dos grupos reproductivos, con el objetivo de determinar la existencia de diferencias entre frecuencias alélicas entre grupos reproductivos

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H₀ (Hipótesis nula): $\mu_B = \mu_R$. Hay independencia entre las frecuencias alélicas y los grupos reproductivos de las líneas (la frecuencia de los alelos es independiente del grupo reproductivo al que pertenecen las líneas)

H₁ (Hipótesis alternativa): $\mu_B \neq \mu_R$. No hay independencia entre las frecuencias alélicas y los grupos reproductivos de las líneas (la frecuencia de los alelos no es independiente del grupo reproductivo al que pertenecen las líneas)

Las hipótesis planteadas se evaluaron con el estadístico:

$$\chi^2_c = (O - C)^2 / C,$$

donde :

χ^2_c es el valor calculado del estadístico Ji-Cuadrado, con (f-1) x (c-1) grados de libertad, siendo f el número de alelos y c el número de grupos de líneas (B y R).

O es el número observado de cada alelo en las líneas B y R,

C es el valor calculado resultante del producto de la frecuencia global de un alelo en un determinado locus y el número de líneas.

11.2.8 Coeficiente de Similitud Simple (SMC) entre líneas B, entre líneas R y entre líneas pertenecientes a diferentes grupos reproductivos

A partir de los datos de SMC entre cada par de genotipos, se procedió a calcular los SMC promedios para el grupo de líneas de cada grupo reproductivo.

También, se estimaron los valores promedios, para cada línea, de la similitud (SMC) entre esa línea y todas las líneas de ambos grupos reproductivos (SMC Global); los promedios, para cada línea, de la similitud entre esa línea y todas las líneas del mismo grupo reproductivo y los valores promedios para cada línea, de la similitud entre esa línea y todas las líneas del grupo reproductivo opuesto. El objetivo era determinar si la similitud promedio entre genotipos pertenecientes a un mismo grupo reproductivo era estadísticamente mayor, igual o menor que la similitud entre genotipos de diferentes grupos reproductivos.

Se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de la similitud de cada línea B con las demás líneas B (μ_B) es igual o menor que el promedio poblacional de la similitud de cada línea B con todas las líneas R ($\mu_{B \times R}$).

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de la similitud de cada línea B con las demás líneas B (μ_B) es mayor que el promedio poblacional de la similitud de cada línea B con todas las líneas R ($\mu_{B \times R}$).

Las Hipótesis planteadas fueron evaluadas mediante una prueba "t":

$$t_c = (X_B - X_{B \times R}) - (\mu_B - \mu_{B \times R}) / \sqrt{((S^2_B / (n_B - 1)) + (S^2_{B \times R} / (n_{B \times R} - 1))}$$

donde:

t_c es el valor del estadístico “t” calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_{B \times R} + n_B - 1$ grados de libertad;

$X_{B \times R}$ y X_B son las medias muestrales de la similitud de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas B con todas las líneas B restantes, respectivamente; $\mu_{B \times R}$ y μ_B son las medias poblacionales de la similitud de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas B con todas las líneas B restantes, respectivamente;

$S^2_{B \times R}$ y S^2_B son las varianzas muestrales de la similitud de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas B con todas las líneas B restantes, respectivamente; y

$n_{B \times R}$ y n_B son el número de líneas que representan las líneas B y R evaluadas conjuntamente y las líneas B, respectivamente.

Previo a evaluar esta hipótesis se evaluó mediante el estadístico “F” si las varianzas poblacionales de ambos grupos eran iguales, a los efectos de determinar qué varianza muestral usar para evaluarla.

Se realizó el mismo procedimiento, pero se compararon los valores promedios de similitud (SMC) entre cada una de las líneas B y todas las líneas R con los valores promedios de similitud entre cada una de las líneas R y todas las líneas restantes de su mismo grupo reproductivo.

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de la similitud de cada línea R con todas las líneas B es igual o mayor que el promedio poblacional de la similitud de cada línea R con las demás líneas R.

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de la similitud de cada línea R con todas las líneas B es menor que el promedio poblacional de la similitud de cada línea R con las demás líneas R.

Las Hipótesis planteadas fueron evaluadas mediante una prueba “t”:

$$t_c = (X_{B \times R} - X_R) - (\mu_{B \times R} - \mu_R) / \sqrt{((S^2_{B \times R} / (n_{B \times R} - 1)) + (S^2_R / (n_R - 1))};$$

donde:

t_c es el valor del estadístico “t” calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_{B \times R} + n_R - 1$ grados de libertad;

$X_{B \times R}$ y X_R son las medias muestrales de la similitud de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas R con todas las líneas R restantes, respectivamente;

$\mu_{B \times R}$ y μ_R son las medias poblacionales de la similitud de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas R con todas las líneas R restantes, respectivamente;

$S^2_{B \times R}$ y S^2_R son las varianzas muestrales de la similitud de cada una de las líneas B con todas las líneas R; y cada una de las líneas R con todas las líneas R restantes, respectivamente; y

$n_{B \times R}$ y n_R son el número de líneas que representan las líneas B y R evaluadas conjuntamente y las líneas R, respectivamente.

Previo a evaluar esta hipótesis se evaluó mediante el estadístico “F” si las varianzas poblacionales de ambos grupos eran iguales, a los efectos de determinar qué varianza muestral usar para evaluarla.

11.2.9 Test de Mantel

El test de Mantel (Mantel, 1967) es un test de correlación entre dos matrices. El procedimiento adoptado es una clase de test de permutación. Las filas y columnas de las matrices están sujetas a permutaciones aleatorias varias veces, recalculado el coeficiente luego de cada permutación (Mantel, 1967). En este test, la hipótesis nula supone que las

distancias en la matriz A son independientes de las distancias, para los mismos objetos, en la otra matriz B. El razonamiento se basa en que si la hipótesis nula supone que no existe relación entre las matrices, luego cambiando las filas y columnas de la matriz debería ser igualmente probable producir un coeficiente mayor o menor. Además, para superar los problemas presentados por la dependencia estadística de los elementos dentro de cada una de las matrices, el uso de permutaciones supone que no hay confianza colocada en la suposición acerca de la distribución estadística de los elementos dentro de las matrices (Mantel, 1967).

El estadístico utilizado para la medición de la correlación entre matrices es el coeficiente de correlación de Pearson:

$$r = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N [(A_{ij} - \bar{A})/S_A] [B_{ij} - \bar{B}]/S_B]$$

donde:

N: es el número de elementos de la parte superior o inferior de la matriz triangular;

\bar{A} : es el promedio de elementos de la matriz A;

S_A : es la desviación estándar de los elementos de la matriz A;

\bar{B} : es el promedio de elementos de la matriz B, y;

S_B : es la desviación estándar de elementos de la matriz B.

En el caso del presente trabajo A y B corresponderían a las matrices de distancias morfológicas y de distancias moleculares.

El procedimiento consiste en calcular los valores r_{AB} usando la ecuación anteriormente citada. Posteriormente, permutar aleatoriamente las filas y las correspondientes columnas de una de las matrices, creando así, una nueva matriz A'. Luego se calcula el $r_{A'B}$ entre la matriz A' y la matriz B, usando la ecuación ya citada. Finalmente, se repiten los dos últimos pasos un gran número de veces (el número de

repeticiones determinará la precisión global del test ≈ 5000 para $\alpha = 0,01$; ≈ 10000 para una gran precisión (Manly, 1997)).

Finalmente se obtendrá un valor de correlación entre las matrices (r) con una probabilidad p , cuyo valor dependerá del número de permutaciones. En base a estos dos valores se infiere la relación que existe entre ambas matrices.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akkaya, S.M., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* **132**: 1131–1139.
2. Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D., Zorregéis, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**: 181-186.
3. Arias, D.M., Rieseberg, L.H. 1995. Genetic relationship among domesticated and wild sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Econ. Bot.* **49**: 239–248.
4. Ashikawa, I., Kurata, N., Saji, S., Umehara, Y., Sasaki, T. 1999. Application of restriction fragment fingerprinting with a rice microsatellite sequence to assembling rice YAC clones. *Genome* **42**: 330–7.
5. Bar-hen, A., Charcosset, A. 1995. Relationship between molecular and morphological distances in a maize inbred lines collection - application for breeders' rights protection. *In*: van Ooijen, J. W. and Jansen, J. (eds) *Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers*, pp. 57-66. Proceedings of the Ninth Meeting of the EUCARPIA Section Biometrics in Plant Breeding, Wageningen.
6. Berry, S.T., Allen, R.J., Barnes, S.R., Caligari, P.D.S. 1994. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L.: 1. Restriction fragment length polymorphism between inbred lines of cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 435–441.
7. Berry, S. T., Leon, A.J., Hanfrey, C.C., Challis, P., Burkholz, A., Barnes, S.J., Rufener, G.K., Lee, M., Caligari, P.D.S. 1995. Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. II. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 195-199.
8. Berry, S.T., Leon, A.J., Challis, P., Livini, C., Jones, R., Hanfrey, C.C., Griffiths, S., Roberts, A. 1996. Construction of a high density, composite RFLP linkage map for

- cultivated sunflower *Helianthus annuus*. In: Pro. 14th Int. Sunflower Conf., Beijing, China. Vol. **2**: 1150-1160.
9. Berry, S.T., Leon, A.J., Peerbolte, R., Challis, C., Livini, C., Jones, R., Feingold, S. 1997. Presentation of the Advanta sunflower RFLP linkage map for public research. In Proc. 19th Sunflower Res. Workshop, Fargo, ND. p. 113-118.
 10. Berry, D.A., Seltzer, J.D., Xie, C., Wright, C., Jones, E.S. 2002. Assessing probability of ancestry using simple sequence repeat profiles: Applications to maize hybrids and inbreds. *Genetics* **161**: 813-824.
 11. Beyene, J., Botha, A. N., Myburg, A. A. 2005. A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. *African Journal of Biotechnology* **4**: 586-595.
 12. Broun, P., Tanksley, S.D. 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 39–49.
 13. Burstin, J., De Vienne, D., Dubreuil, P., Damerval, C. 1994. Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize. I. Genetic diversity among 21 maize inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 943-950.
 14. Burstin, J., Charcosset, A. 1997. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. *Heredity* **79**: 477-483.
 15. Cabrera, A. L., Zardini, E. M. 1993. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Editorial ACME S.A.C.I. Buenos Aires. P.:721.
 16. Carrera, A., Poverene, M. 1995. Isozyme variation in *Helianthus petiolaris* and sunflower, *H. annuus*. *Euphytica* **81**:251–257.
 17. Carrera, A., Tranquilli, G., Garayalde, A., Helguera, M. 2010. Aplicaciones de los marcadores moleculares. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte III. Cap. 2*: 311- 324.

18. Chantereau, J. 1993. Etude de l'hétérosis chez le sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench) par l'exploitation d'écotypes et l'analyse de leurs divergences. Ph.D. Thesis, Université Paris Sud.
19. Chao, L. L. 1993. Estadística para las ciencias administrativas. McGraw-Hill Interamericana, SA. Santafé de Bogotá, Colombia. 3° edición. Pp: 60-61.
20. Cheres, M.T., Knapp, S. 1998. Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: coancestry analysis of public germplasm. *Crop Sci.* **38**: 1476–1482.
21. Cregan, P.B., Bhagwat, A.A., Akkaya, M.S., Rongwen, J. 1994. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**: 49–61.
22. Crisci, J.V., López Armengol, M. F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington, D.C.
23. Cronn, R., Brothers, M., Klier, K., Bretting, P.K., Wendel, J.F. 1997. Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 532–545.
24. Dahlberg, J.A. 2000. Classification and characterization of Sorghum. *In: Sorghum: Origin, History, Technology and Production.* 99-130.
25. Dellaporta, S. 1994. Plant DNA miniprep and microprep: versions 2.1-2.3. *The Maize Handbook.* P: 522.
26. Dillmann, C., Bar-Hen, A., Guerin, D., Charcosset, A., Murigneux, A. 1997. Comparison of RFLP and morphological distances between maize *Zea mays* L. inbred lines. Consequences for germplasm protection purposes. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 92-102.

27. Diwan, N., Cregan, P.B. 1997. Automated sizing of fluorescent labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 723–733.
28. Fehr, W.R. 1987. Principles of cultivar development. Volume 1. Theory and Technique. Macmillan Publishing Company. A division of Macmillan, Inc. Nueva York.
29. Gedil, M.A. 1999. Marker development, genome mapping, and cloning of candidate disease resistance genes in sunflower, *Helianthus annuus* L. Ph.D. Thesis. Oregon State Univ., Corvallis, OR.
30. Gedil, M.A., Wye, C., Berry, S., Segers, B., Peleman, J., Jones, R., Leon, A., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J. 2001. An integrated restriction fragment length polymorphism–amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. *Genome* **44**: 213–221.
31. Gentzbittel, L., Zhang, Y. X., Vear, F., Griveau, B., Nicolas, P. 1994. RFLP studies of genetic relationship among inbred lines of cultivated sunflower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germplasm pools. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 419-425.
32. Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang, Y.X., Berville, A., Nicolas, P. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 1079–1086.
33. Gentzbittel, L., Mestries, E., Mouzeyrat, F., Badaoqui, S., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P. 1999. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 218-234.
34. Goldstein, D.B., Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. *J. Hered.* **88**: 335–42.

35. Goldstein, D.B., Roemer, G.W., Smith, D.A., Reich, D.E., Bergman, A., Wayne, R.K. 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics* **151**: 797–801.
36. Hillis, D.M., Moritz, C. 1990. *Molecular systematic*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
37. Hongtrakul, V., Huestis, G.M., Knapp, S. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 400–407.
38. Jan, C.C., Vick, B.A., Miller, J.K., Kahler, A.L., Butler, E.T. I. 1998. Construction of a RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 15–22.
39. Johnson, R. A.; Wichern, D. W. 1982. *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
40. Kolkman, J.M., Berry, S.T., Leon, A.J., Slabaugh, M.B., Tang, S., Gao, W., Shintani, D.K., Burke, J.M., Knapp, S.J. 2007. Single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium in sunflower. *Genetics* **177**: 457-468.
41. Liu, A., Burke, J.M. 2006. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics* **173**: 321–330.
42. Manly, B.J.F. 1997. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*. 2° edición. London: Chapman and Hall.
43. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
44. Marino, M.A., Turni, L.A., Del Rio, S.A., Williams, P.E., Cregan, P.B. 1995. The analysis of simple sequence repeats DNA in soybean by capillary gel electrophoresis. *Appl. Theor. Electrophor.* **5**: 1–5.
45. Martinez, M.C., Helguera, M., Carrera, A. 2010. Marcadores moleculares. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte I. Cap. 5*: 70-85.

46. Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A., Buss, R.G. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* **38**: 715–723.
47. McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T., Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* **35**: 89–99.
48. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Datos campaña 2008/09. <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>
49. Morgante, M., Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* **3**: 175–182.
50. Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad - Community Plant Variety Office (CPVO). Protocol for distinctness, uniformity and stability tests. *Helianthus annuus L.* Sunflower (UPOV Species Code: HLNTS_ANN). Unión Europea. 2002.
51. Picca, A., Helguera, M., Salomón, N., Carrera, A. 2004. Marcadores moleculares. *Biología y Mejoramiento vegetal*. Ediciones INTA: Parte II Cap 4: 61- 68.
52. Peerbolte, R.P., Peleman, J. 1996. The Cartisol sunflower RFLP map (146 *loci*) extended with 291 AFLP markers. In Proc. 18th Sunflower Res. Workshop, Fargo, ND. Pp: 174–178.
53. Rieseberg, L.H., Choi, H., Chan, R., Spore, C. 1993. Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity* **70**: 285–293.
54. Rieseberg, L.H. 1998. Genetic mapping as a tool for studying speciation. In D.E. Soltis et al. (ed.) *Molecular systematics of plants*. 2nd edition. Chapman and Hall, New York. p. 459–487.
55. Rivero, M.V. 2004. Caracterización molecular y fenotípica del sorgo granífero (*Sorghum bicolor (L.) Moench*). Tesis de grado. UNR.

56. Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganai, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 327–331.
57. Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganai, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* **149**: 2007–2023.
58. Rohlf, F. 2000. NTSYS-pc version 2.1. Exeter Software. USA.
59. Rojas-Barros, P., Hu, J., Jan, C. C. 2008. Molecular mapping of an apical branching gene of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **117**: 19–28.
60. Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U., Cregan, P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 43–48.
61. Röncke, S., Hahn, V., Friedt, W. 2005. Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of “high oleic” sunflower inbred lines. *Plant Breed.* **124**: 376–381.
62. Sala, C., Bulos, M., Fresco, A., Altieri, E. 2010. Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte III. Cap. 3*: 325–337.
63. Satorre, E., Benech Arnold, R., Slafer, G., De la Fuente, E., Miralles, D., Otegui, M., Savin, R. 2008. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires.
64. Scotti, I., Magni, F., Fink, R., Powell, W., Binelli, G., Hedley, P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome* **43**: 41–6.
65. Senior, M.L., Heun, N. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the target repeats using a CT primer. *Genome* **36**: 884–889.

66. Senior, M.L., Murphy, J.P., Goodman, M.M., Stuber, C.W. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci.* **38**: 1088-1098.
67. Smith, J., Hoefft, E., Cole, G., Lu, H., Jones, E., Wall, S., Berry, D. 2009. Genetic diversity among U.S. sunflower inbreds and hybrids: assessing probability of ancestry and potential for use in plant variety protection. *Crop Sci.* **49**: 1295-1303.
68. Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
69. Sokal, R.R.; Sneath, P.H.A. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*, Freeman, San Francisco.
70. Sun, G.L., William, M., Liu, J., Kasha, K.J., Pauls, K.P. 2001. Microsatellite and RAPD polymorphisms in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings. *Mol. Breed.* **7**: 13-24.
71. Tang, S., Yu, J., Slabaugh, M. B., Shintani, D. K., Knapp, S.J. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 1124-1136.
72. Tang, S., Knapp, S.J. 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 990–1003.
73. Tang, S., Kishore, V.K., Knapp, S.J. 2003. PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker *loci* in cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **107**: 6-19.
74. Vicario, A.L., Labarta, M., Loray, M. A. 2010. Identificación y registro de variedades. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte III. Cap. 4*: 339-350.
75. Weising, K., Atkinson, R.G., Gardner, R.C. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Appl.* **4**: 249–255.

- 76.** Winter, P., Pfaff, T., Udupa, S.M., Huttel, B., Sharma, P.C., Sahi, S., Arreguin-Espinoza, R., Weigand, F., Muehlbauer, F.J., Kahl, G. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 90–101.
- 77.** Winzer, N., Di Renzo, M., Olmos, S., Ibañez, M. 2010. Métodos multivariados para estimar la variabilidad genética. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte II. Cap 9*: 283-294.
- 78.** Yu, J. K., Mangor, J., Thompson, L., Edwards, K. J., Slabaugh, M. B., Knapp, S.J. 2002. Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. *Genome* **45**: 652-660.
- 79.** Yu, J. K., Tang, S., Slabauhg, M. B., Heesacker, A., Col, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W. C., Webb, D. M., Thompson, L., Edwards, K. J., Berry, S., Leon, A. J., Grondona, M., Olungu, C., Maes, N., Knapp, S. J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.* **43**: 367-387.
- 80.** Yue, B., Cai, X., Vick, B., Hu, J. 2009. Genetic Diversity and Relationships among 177 Public Sunflower Inbred Lines Assessed by TRAP Markers. *Crop Sci.* **49**: 1242-1249.
- 81.** Zhang, Y. X., Gentzbittel, L., Vear, F., Nicolas, P. 1995. Assessment of inter- and intra- inbred line variability in sunflower (*Helianthus annuus*) by RFLPs. *Genome* **38**: 1040-1048.