

Análisis comparativo de la diversidad morfológica y molecular en líneas de girasol
(*Helianthus annuus L.*) luego de la incorporación de un carácter de tolerancia a
herbicidas (CLPlus)

Tesina de la alumna

ROMINA SOLEDAD REYNOSO

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, 4 de Febrero de 2013

Análisis comparativo de la diversidad morfológica y molecular en líneas de girasol
(*Helianthus annuus L.*) luego de la incorporación de un carácter de tolerancia a
herbicidas (CLPlus)

Tesina
de la alumna

ROMINA SOLEDAD REYNOSO

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.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Ing. Agr. Juan Carlos Suárez por su compromiso asumido en la realización de esta tesis, su confianza y su gran ayuda a lo largo de toda la carrera.

A mi co-director el Ing. Agr. Carlos Sala por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, y el tiempo dedicado.

Al Licenciado Mariano Bulos por su gran colaboración en esta tesis, la paciencia y tiempo dedicado 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.

Y por último a toda mi familia por su confianza en mí a lo largo de toda la carrera y el esfuerzo brindado para que esto sea posible.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 El cultivo de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	6
3.2 Genética de la resistencia a herbicidas.....	7
3.3 Introgresión de caracteres	9
3.4 Análisis de diversidad morfológica.....	9
3.5 Análisis de diversidad molecular.....	10
3.6 Los microsatélites	12
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 MATERIALES	16
6.2 MÉTODOS.....	18
6.2.1 Análisis morfológico	18
6.2.1.1 Diseño experimental	18
6.2.1.2 Descripción morfológica.....	19
6.2.1.3 Variables cuantitativas: Análisis de la varianza	25
6.2.1.4 Variables cualitativas: Análisis de estados	26
6.2.1.5 Análisis multivariado: Variables cuantitativas y cualitativas	27
6.2.2 Análisis molecular	29
6.2.2.1 Muestreo y extracción del ADN.....	29
6.2.2.3 Amplificación del ADN	31

6.2.2.4 Diversidad molecular	36
6.2.2.5 Análisis multivariado	38
6.2.2.5.1 Cálculo de las distancias moleculares	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1 Análisis morfológico	41
7.1.1 Análisis de las variables Morfológicas Cuantitativas	41
7.1.2 Análisis de las variables Morfológicas Cualitativas	45
7.1.3 Análisis de Similitud Morfológico	47
7.2 Análisis molecular	51
7.2.1 Análisis de similitudes moleculares	54
8. CONCLUSIONES	61
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
10. ANEXOS	71

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).

GL: Grupo de ligamiento.

INDEL: Marcador de inserción- deleción.

Líneas B: Líneas mantenedoras.

Líneas R: Líneas restauradoras.

ORS: Oregon State.

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.

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple.

SSR: Repeticiones de Secuencia Simple.

STS: Sitios Marcados por secuencia.

TRAP: Polimorfismo en la Región Diana Amplificada.

VNTR: Repetición en Tándem en Número Variable.

1. RESUMEN

En este trabajo se realizó la comparación morfológica y molecular de 5 líneas de girasol (*Helianthus annuus* L.) obtenidas luego de la incorporación de un carácter de tolerancia a herbicidas (CLPlus), con respecto a sus parentales recurrentes. Las líneas CLPlus fueron obtenidas por medio de retrocruzas asistidas por marcadores moleculares multipunto. Estas líneas y sus parentales recurrentes fueron analizadas a través de 40 variables morfológicas (19 cuantitativas y 21 cualitativas) y 59 loci SSRs con el objetivo de: i) determinar la similitud existente a nivel morfológico y molecular entre los pares de líneas convencionales y sus contrapartes CLPlus, ii) determinar la diversidad existente, a nivel morfológico y molecular, entre el grupo de líneas de girasol obtenidas luego de la incorporación del carácter y el grupo de líneas originales.

El análisis de las variables morfológicas cuantitativas realizado en los 5 pares de líneas arrojó diferencias significativas para 2 o 3 de las variables analizadas, dependiendo del par de líneas en cuestión. Durante el análisis de estado de las variables morfológicas cualitativas se pudo observar diferencias en 6 de las 21 variables, para alguno de los 5 pares de líneas bajo análisis.

Se compararon valores promedio de distancias euclidianas, obtenidas a partir del análisis de caracteres morfológicos, para los grupos de líneas obtenidas luego de la incorporación del carácter y el grupo de líneas originales, previo a su incorporación. Los materiales CLPlus obtenidos presentaron una distancia promedio entre ellos (7,41) significativamente mayor ($p < 0,05$) que la obtenida para los materiales convencionales originales (6,37). Esto demuestra que no existió una reducción en la diversidad morfológica luego del proceso de incorporación del carácter.

Los valores de distancias euclidianas obtenidos a partir de los datos moleculares no presentaron diferencias significativas ($p=0,13$) entre grupos, de materiales CLPlus ($DE=0,31$) y de materiales convencionales ($DE=0,38$). Por otro lado si se compara la diversidad de ambos grupos a través del promedio de Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC) para cada grupo, se observa nuevamente que no existen diferencias significativas ($p=0,18$) entre grupos de materiales CLPlus ($PIC=0,23$) y convencionales ($0,21$). Se concluye que las líneas obtenidas luego de la incorporación del carácter CLPlus presentan diferencias con respecto a las líneas recurrentes evaluadas, tanto a nivel morfológico como a nivel molecular, y que esta estrategia de introgresión no provocó una disminución de la diversidad morfológica ni de la diversidad molecular en el conjunto de líneas obtenidas con respecto a las líneas originales.

2. INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) pertenece a la familia de las Compuestas (*Asteraceae*, subfamilia *Asteroideae*, tribu *Heliantheae*, género *Helianthus*). Es una especie oleaginosa de elevada importancia debido a su capacidad para producir aceite de consumo en diversos países. La producción anual de Argentina es de 2,48 millones de tn (SIIA: Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2012), con un rendimiento promedio de 1364 kg/ha.

La genética de numerosos caracteres ha sido estudiada y comprendida durante la última década, y se ha logrado en muchos casos determinar la ubicación genómica de los factores responsables de ellos. Muchos de estos caracteres comprenden genes de resistencias a enfermedades tales como roya (Lawson *et al.*, 1996; Radwan, 2010) y downy mildew (Slabaugh *et al.*, 2003; Radwan *et al.*, 2004), genes que confieren características especiales al aceite de girasol (Lacombe *et al.*, 2002), genes responsables de las ramificaciones apicales (Rojas-Barros *et al.*, 2008), y genes que controlan la tolerancia a herbicidas (Bruniard, 2001; Sala *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos estos caracteres son de herencia monogénica, lo que permite la rápida introgresión de los mismos dentro del germoplasma elite para su aplicación en la agricultura comercial.

La introgresión masiva de un carácter dentro de un grupo de materiales elite puede traer consigo una disminución de la variabilidad genética del nuevo grupo de materiales obtenidos, particularmente cuando el dador del carácter utilizado es un único material. Si tenemos en cuenta solamente las relaciones de parentesco basadas en pedigree se puede especular que la contribución del material fuente del nuevo carácter será elevada (Bernardo *et al.*, 2000), lo cual contribuirá a una disminución de la diversidad genética del nuevo germoplasma en comparación con el germoplasma de partida. Si por el contrario el carácter es incorporado utilizando un esquema de retrocruzamiento asistido por marcadores

microsatelites es posible, luego de dos retrocruzas, recuperar casi la totalidad del trasfondo genético de las líneas originales (Sala *et al.*, 2010). De esta forma se obtienen líneas de igual potencial genético con la mejora del carácter incorporado.

Con el objetivo de incorporar un carácter, al mismo tiempo que se mejora el germoplasma original para otros caracteres útiles, se diseñó un esquema de selección asistida con marcadores multipunto (ver Figura 1, Anexo 1). En este esquema se penalizan las plantas que presentan mayor frecuencia de bandas (alelos) provenientes del material dador en cada retrocruza. Durante la generación RC2F1 varios individuos de cada proyecto de introgresión exhibieron el patrón de bandas característico del padre recurrente. Tales individuos presentan todavía una cantidad de fragmentos del genoma del padre dador del carácter al estado heterocigota, los cuales no son detectables debido a la naturaleza dominante del marcador utilizado (como por ejemplo marcadores TRAPs). Esto no sucede así durante una selección asistida utilizando marcadores SSRs donde, dada la naturaleza codominante del marcador, es siempre posible observar el alelo del dador para cada locus analizado. La autofecundación de los individuos provenientes de la RC2F1 obtenidos con la estrategia de marcadores multipunto proveerá un nivel de variabilidad que podría ser utilizada para propósitos de selección. Siguiendo este esquema se obtuvieron una serie de líneas CLPlus que incorporan el carácter de resistencia a imidazolinonas, las cuales fueron posteriormente seleccionadas por su performance agronómica.

En el presente trabajo se determina la diversidad existente a nivel morfológico y molecular entre el grupo de líneas de girasol selectas luego de la incorporación del carácter CLPlus por medio de la metodología antes descrita y el grupo de las líneas originales. A su vez se analiza la similitud existente entre los pares de líneas convencionales y CLPlus a nivel morfológico y molecular.

3. ANTECEDENTES

3.1 El cultivo de girasol (*Helianthus annuus L.*)

El centro de origen más probable del girasol (*Helianthus annuus L.*) se ubica en el Sudoeste de los Estados Unidos de Norte América y México desde 1200 a. C. (Lentz *et al.*, 2008; Harter *et al.*, 2004). Su semilla era utilizada como alimento por los habitantes de estas regiones (Weiss, 2000). Durante el siglo XVI, el girasol se introdujo en los países europeos donde comenzó a ser producido con fines comerciales. Es una de las plantas herbáceas de extracción de aceite para consumo humano más cultivadas en el mundo. Se utiliza especialmente para la producción de aceite y en menor medida como ornamental, para fines de confitura y para la alimentación de aves.

La producción anual de Argentina es de 2,48 millones de tn. 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. (SIIA: Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2012).

En nuestro país se siembran cultivares o variedades híbridas de girasol, producidas 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: las líneas A o estériles (usadas como hembra, sin los genes de restauración y con citoplasma estéril), las líneas B o mantenedoras de las líneas A (líneas fértiles, sin los genes de restauración, y con citoplasma normal) y las líneas R restauradoras de la fertilidad (con genes nucleares de restauración), (Fehr, 1987). Las líneas A y B son isogénicas, su única diferencia se basa en la constitución del citoplasma, estéril para el caso de las líneas A y fértil para el caso de las líneas B, pero idénticas para el genoma nuclear. Las líneas A se multiplican anualmente mediante cruces con sus isolíneas B. El híbrido comercial se produce mediante cruzamientos entre una línea A y una línea R. En general las líneas A y R deben estar genéticamente distanciadas entre sí con el objeto de maximizar la heterocigosis y, por ende, la heterosis o vigor híbrido en el cultivar resultante. Es por esta razón que los programas de mejoramiento de cada grupo reproductivo (mantenedor o restaurador) se conducen por separado.

En cuanto a sus características genéticas, 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).

3.2 Genética de la resistencia a herbicidas

La enzima acetohidroxiácido sintasa (*AHAS*, también conocida como acetolactato sintasa, *ALS*) es la primer enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, tales como valina, leucina, e isoleucina (Singh, 1999). Esta enzima ha demostrado ser el sitio de acción de diferentes clases de herbicidas colectivamente conocidos como inhibidores de la *AHAS*: sulfonilureas (*SU*), imidazolinonas (*IMI*), triazolopirimidinas (*TZ*), pyrimidinyloxybenzoatos (*POB*), y sulfonilaminocarbonyl-triazolinonas. La tolerancia en la mayoría de estos casos se debe a una forma modificada de la enzima *AHAS*, donde la subunidad grande (*AHASL*) es menos sensible a la inhibición por el herbicida (Tranel y

Wright 2002, Tan *et al.* 2005). Esta reducción en la unión herbicida es causada por mutaciones en sitios claves de los genes que codifican para la subunidad catalítica de *AHAS*. Varios autores han revisado las mutaciones conocidas de los genes *AHAS* que confieren tolerancia a los herbicidas inhibidores de *AHAS* en plantas (Preston y Mallory-Smith, 2001; Tranel y Wright, 2002). Plantas tolerantes a imidazolinonas y/o sulfonilurea con genes y enzimas *AHAS* modificados han sido descubiertos en muchas especies, incluyendo especies silvestres y cultivadas, lo que permitió el desarrollo y comercialización de varios cultivos tolerantes a herbicidas (Tan *et al.*, 2005).

Basado en estudios moleculares, Kolkman *et al.* (2004) identificó y caracterizó tres genes que codifican para las subunidades catalíticas *AHAS* en girasol (*Ahas1*, *Ahas2* y *Ahas3*). *Ahas1* es un locus multialélico y el único miembro de esta pequeña familia, donde todas las mutaciones que confieren tolerancia a herbicidas han sido halladas (Sala *et al.*, 2008b). *Ahas1-1* (también conocida como *Imr1* o *Arpur*, Bruniard y Miller 2001; Kolkman *et al.* 2004, respectivamente) alberga una mutación de C a T en el codón 205 que confiere una tolerancia moderada a imidazolinonas. Este alelo es el responsable de la tolerancia a imidazolinonas observada en el carácter Imisun. *Ahas1-2* (también conocido como *Arkan*) muestra una mutación de C a T en el codón 197 y confiere altos niveles de tolerancia a sulfonilureas (Kolkman *et al.*, 2004). *Ahas1-3* presenta una mutación de G a A en el codón 122, que confiere un alto nivel de tolerancia a imidazolinonas (Sala *et al.*, 2008b). El alelo *Ahas1-3* es el responsable de la tolerancia a imidazolinonas observada en el carácter CLPlus.

El carácter CLPlus fue desarrollado por mutagénesis de semillas y selección con el herbicida imazetapir (Sala *et al.*, 2008b). Basado en una gran cantidad de condiciones ambientales, y a través de una amplia serie de estudios bioquímicos se demostró que el carácter CLPlus, presenta mayor tolerancia al herbicida que su antecesor IMISUN (Sala *et al.*, 2008). Uno de los beneficios asociados con el carácter CLPlus es la no modificación

del porcentaje de aceite en materiales CLPlus en contraposición de su antecesor Imisun (Weston *et al.*, 2012; Trucillo Silva *et al.*, 2010).

Imisun fue el primer carácter comercial desarrollado en girasol para resistencia a herbicidas de la familia de las Imidazolinonas, y fue desarrollado a comienzos de 1996 cuando se descubrió en Kansas, USA, la tolerancia a imidazolinonas en girasol silvestre.

3.3 Introgresión de caracteres

La introgresión de un carácter a una variedad o grupo de variedades puede realizarse utilizando diferentes estrategias. La estrategia seleccionada tendrá impacto de manera directa sobre el porcentaje de genoma perteneciente al material dador del carácter que permanecerá dentro del genotipo obtenido luego de finalizado este proceso. Una de las estrategias elegida frecuentemente para intentar minimizar la contribución de genoma del material dador es la introgresión por retrocruzas (Brennan y Butler, 1992). Esta estrategia ha sido posteriormente mejorada mediante el uso de marcadores moleculares para la recuperación del trasfondo genético (Hospital y Charcosset, 1992; Openshaw *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos demuestran que es posible obtener una recuperación del trasfondo genético superior al 98% a partir de una retrocruza 2, mediante la utilización de marcadores microsatelites homogéneamente distribuidos (Sala *et al.*, 2010).

3.4 Análisis de la diversidad morfológica

Históricamente, los estudios relacionados con diversidad genética en plantas han estado relacionados con datos botánicos, arqueológicos, morfológicos, entre otros. Desde el punto de vista agronómico y económico, la caracterización del germoplasma se ha basado en características de alta y de baja heredabilidad, medidas a través del fenotipo. 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). Por otro lado, la utilización del fenotipo trae como limitantes la interacción del ambiente y el tiempo requerido para la recolección de datos (Becerra y Paredes, 2000).

En girasol existe un amplio número de caracteres morfológicos que son considerados como discriminantes. Estos han sido utilizados como herramienta de diferenciación por el INASE durante la inscripción de nuevos materiales (INASE, 2011), y fueron utilizados recientemente para describir la variabilidad fenotípica existente en un grupo de líneas elite de girasol por Cabodevilla (2011).

3.5 Análisis de la diversidad molecular

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 y Moritz, 1990; Dahlberg, 2000).

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.

Existe una gran variedad de marcadores moleculares, según sea su metodología de análisis. 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).

En girasol numerosos análisis moleculares han sido realizados utilizando distintos tipos de marcadores. En estos trabajos se logró determinar el grado de diversidad existente dentro del germoplasma analizado y de qué forma estaba estructurada la diversidad. Yu y colaboradores (2002), desarrollaron una gran cantidad de nuevos marcadores SSRs de los cuales 74 fueron utilizados para analizar 16 líneas de girasol. El número de alelos promedio por *locus* fue de 3,99. El rango de alelos varió entre 2 y 15 (para el ORS256). Los marcadores SSRs ya habían demostrado ser más polimórficos que los RFLPs en otros cultivos (Akkaya *et al.*, 1992; Rongwen *et al.*, 1995; Plaschke *et al.*, 1995; Röder *et al.*, 1995a; Wu y Tanksley, 1993; Olufowote *et al.*, 1997; Saghai-Marroof *et al.*, 1994; Kresovich *et al.*, 1995). Sin embargo, en girasol el polimorfismo y los valores de PIC de RFLPs y SSRs no parecen variar drásticamente (Berry *et al.*, 1994).

Por otra parte, una serie de líneas endocriadas de girasol fueron caracterizadas para obtener una medida de similitud genética usando AFLP o RFLP. En base a las distancias calculadas entre ellas, se lograron distinguir los grupos de líneas mantenedoras y restauradoras (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. Una situación idéntica se

observó en el trabajo realizado por Cabodevila (2011) donde utilizando marcadores SSRs se logró discriminar claramente el grupo de líneas mantenedoras del grupo de líneas restauradoras. Para Cabodevila (2011) el rango de PIC para 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.

3.6 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 y Cregan, 1997; Ashikawa *et al.*, 1999), mapeo del genoma (Marino *et al.*, 1995; Broun y Tanksley, 1996; McCouch *et al.*, 1997; Röder *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999; Scotti *et al.*, 2000), estudios filogenéticos (Goldstein y 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 y Olivieri, 1993; Cregan *et al.*, 1994; Rongwen *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995), maíz (*Zea mays*; Senior y Heun, 1993), trigo (*Triticum aestivum* L.; Röder *et*

al., 1995b), entre otras. Los resultados de estos estudios confirman que los microsatélites son abundantes y están bien distribuidos en el genoma de las plantas.

En sucesivos esfuerzos se logró el desarrollo de 1089 marcadores del tipo SSRs para el girasol cultivado (Gedil *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), cantidad de marcadores de ADN necesaria para la creación de un mapa de referencia público. Así, Tang y colaboradores (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 y colaboradores (2003) propusieron tres mapas construidos a partir de 1044 marcadores (947 SSR, 80 RFLP y 17 INDEL).

4. HIPÓTESIS

Las hipótesis que fueron puestas a prueba en este trabajo son:

1. Las líneas CLPlus obtenidas luego de la incorporación del carácter de tolerancia a herbicida usando la metodología de selección por marcadores moleculares multipunto difieren de sus pares convencionales tanto a nivel morfológico como a nivel molecular.

2. La incorporación de un carácter a un grupo de líneas de girasol usando la metodología de selección por marcadores moleculares multipunto provoca un incremento en la diversidad morfológica y molecular entre el conjunto de líneas obtenidas con respecto al conjunto de líneas originales. Es decir, que la variabilidad entre las líneas convertidas es mayor a la variabilidad entre las líneas originales.

5. OBJETIVOS

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

1. Determinar la similitud existente a nivel morfológico y molecular entre los pares de líneas convencionales y sus contrapartes, CLPlus, luego del proceso de introgresión usando la metodología de selección por marcadores moleculares multipunto
2. Determinar la diversidad existente a nivel morfológico y molecular, entre el grupo de líneas de girasol obtenidas luego de la incorporación de un dado carácter usando la metodología de selección por marcadores moleculares multipunto, y el grupo de líneas originales previo a la incorporación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

Se utilizaron 5 líneas obtenidas luego de la incorporación de un carácter de resistencia a herbicidas, CLPlus, y sus respectivos parentales recurrentes, 10 líneas en total (Tabla 1). Las líneas CLPlus provienen de la retrocruza 2, utilizando selección asistida por marcadores multipunto para la recuperación del trasfondo genético, posterior fijación del carácter y endocría. Estas líneas fueron seleccionadas por pruebas de rendimiento “*per se*” en condiciones de campo. Todas las líneas utilizadas pertenecen al programa de mejoramiento de girasol de la empresa Nidera S.A. Las líneas son líneas propietarias, y los pedigríes de las mismas son cerrados, es por este motivo que no se muestra esta información en el presente trabajo. Se destaca el parentesco entre algunas de las líneas convencionales, como es el caso de las líneas R21, R55 y R39.

Tabla 1. Nombres, grupos reproductivos, ciclo y observaciones de las 10 líneas endocriadas analizadas.

NOMBRE DEL MATERIAL	GRUPO REPRODUCTIVO	CICLO (DAF)	OBSERVACIONES
B84	B	72	Convencional
B76	B	75	Convencional
R21	R	72	Convencional
R55	R	76	Convencional
R39	R	66	Convencional
B784	B	75	Resistente a Imidazolinonas. Línea derivada de B84
B776	B	78	Resistente a Imidazolinonas. Línea derivada de B76
R721	R	75	Resistente a Imidazolinonas. Línea derivada de R21
R755	R	74	Resistente a Imidazolinonas. Línea derivada de R55
R739	R	67	Resistente a Imidazolinonas. Línea derivada de R39

B: Líneas mantenedoras

R: Líneas restauradoras

DAF: Días a floración

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Análisis morfológico

6.2.1.1 Diseño experimental

Los materiales fueron sembrados a campo, 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., sobre la base de un diseño en bloques completamente aleatorizados (DBCA), con dos repeticiones siendo los datos del mismo los siguientes:

- Largo de la parcela: 6 m x 3 surcos
- Separación entre surcos: 0,70 m
- Semillas por metro: 5 semillas

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.

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

6.2.1.2 Descripción morfológica

Las líneas fueron descritas utilizando las variables morfológicas y agronómicas que aparecen en el descriptor oficial para girasol del Instituto Nacional de Semillas (INASE) dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Tabla 2).

Se evaluaron 40 variables morfológicas en diferentes estadios fenológicos del cultivo: emergencia, floración, madurez y cosecha.

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 2.

- 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): se evaluó de acuerdo a lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO, 2002).
- Color de las hojas (verde claro/ verde medio/ verde oscuro)
- 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.
- Ancho de la lámina (cm): se midió en la parte media transversal de la hoja.

Tabla 2. 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 MORFOLOGICA	MOMENTO FENOLOGICO DE SU EVALUACIÓN		UNIDAD O CODIFICACIÓN DE ESTADO
Altura de la planta	Floración		cm ausente(2), débil(4), medio(6), fuerte(8)
Pilosidad del tallo	Floración		oblonga(1), lanceolada (3), triangular (5), cordada(7), redondeada(9)
Forma de las hojas	Floración		verde claro(3), verde medio(5), verde oscuro(7)
Color de las hojas	Floración		número
Número de hojas	Floración		cm
Largo de la lámina	Floración		cm
Ancho de la lámina	Floración		
Relación ancho/largo de la lámina	Floración		
Longitud del pecíolo	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 amarillo claro(2), amarillo anaranjado(4), amarillo dorado(6), otro(8)
Color de la lígula	Floración		amarillo(2), anaranjado(4), rojo(6), otro (8)
Color de la corola	Floración		marrón(1), otro(9)
Color de la anteras	Floración		blanco(1), amarillo(9)
Color de los granos de polen	Floración		verde(1), rojo(9)
Color del papus	Floración		ausente(1), presente(9)
Antocianinas del estigma	Floración		
Diámetro del tallo	Madurez fisiológica (R9)		cm
Forma del capítulo	Madurez fisiológica		cóncavo(2), plano(4), convexo(6), deforme(8)
Diámetro del capítulo ¹	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
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)
Posición de las estrías	Cosecha		marginal(1), lateral(3), marginal y lateral(7), central(7), otro (9)

VARIABLE MORFOLOGICA	MOMENTO FENOLOGICO DE SU EVALUACIÓN	UNIDAD O CODIFICACIÓN DE ESTADO
Peso de 1000 aquenios	Cosecha	grs.
Porcentaje de pepita	Cosecha	%
Porcentaje de aceite	Cosecha	%

¹ En los multifloros el capítulo principal

- Relación ancho/largo de la lámina: resultó de la relación 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, 2002). (ver Figura 2).
- Inclinação 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)
- Color de la corola (amarillo/ anaranjado/ rojo/ otro)
- Color de las anteras (marrón/ otro)
- Color de los granos de polen (blanco/ amarillo)
- Color del papus (verde/ rojo)
- Antocianinas del estigma (presente/ ausente): se evaluó la presencia o ausencia de antocianinas en forma visual.

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 2.

- 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, 2002). (ver Figura 3).
 - 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 abajo): se evaluó mediante comparación con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO, 2002). (ver Figura 4).
 - 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)
- 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 2, 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 y el número de capítulos.
 - Ancho promedio de los aquenios (mm): se evaluó el ancho de los aquenios en la parte media de los mismos, sobre una muestra representativa de 20 aquenios.
 - Largo promedio de los aquenios (mm): se evaluó el largo de los aquenios, sobre una muestra representativa de 20 aquenios.
 - Espesor promedio de los aquenios (mm): se evaluó el espesor de los aquenios, sobre una muestra representativa de 20 aquenios.
 - Pubescencia de los aquenios (ausente/ presente): se evaluó la pubescencia de los aquenios mediante evaluación con lupa, sobre una muestra representativa de 20 aquenios.

- Moteado de los achenios (ausente/ presente): se evaluó el moteado de los achenios, sobre una muestra representativa de 20 achenios.
- Color principal del pericarpio (negro/ castaño/ blanco/ gris/ otro): Se entiende por color principal a aquel color que ocupa la mayor área. En caso de no saberse 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, 2002).
- Estrías (ausente/ presente): se evaluó la presencia de estrías en los achenios, sobre una muestra representativa de 20 achenios.
- Color de las estrías (blanco/ gris/ marrón/ negro/ otro): se evaluó el color de las estrías de los achenios, sobre una muestra representativa de 20 achenios.
- Posición de las estrías (marginal/ lateral/ marginal y lateral/ central/ otro): De manera visual, comparando con lo establecido por la Oficina de Variedades de Plantas de la Comunidad (CPVO, 2002), sobre una muestra representativa de 20 achenios.
- Peso de 1000 achenios (g)
- Porcentaje de pepita: se tomó el peso de 100 achenios 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:

$\% \text{ de Pepita} = \text{peso sin cáscara} \times 100 / \text{peso con cáscara}$

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

6.2.1.3 Variables cuantitativas: Análisis de la varianza

El objetivo de este análisis fue evaluar cuáles de los caracteres cuantitativos exhibían diferencias significativas entre las líneas convencionales y sus contrapartes CLPlus.

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula)= $\mu_C = \mu_{CL}$. No existen diferencias significativas entre los promedios poblacionales de las líneas convencionales y sus correspondientes líneas CLPlus para una determinada variable cuantitativa.

H_1 (Hipótesis alternativa)= $\mu_C \neq \mu_{CL}$. Existen diferencias significativas entre los promedios poblacionales de las líneas convencionales y sus correspondientes líneas CLPlus para una determinada variable cuantitativa.

Este análisis se llevó a cabo sobre 19 caracteres cuantitativos a través del análisis de datos de Excel 2007, utilizando las funciones: Análisis de varianza de un solo factor y Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo. Para el caso de aquellos caracteres cuantitativos que contaban con una sola repetición (Altura, Diámetro del tallo, N° de hojas, Largo de la lámina, Ancho de la lámina, Relación ancho/largo de la lámina, Longitud del peciolo, Cantidad de flores liguladas, Ancho de lígula y Largo de lígula), se realizó el Análisis de varianza de un solo factor, comparando los grupos de líneas: convencionales y CLPlus, por un lado las líneas R y por otro las B, por lo cual las repeticiones, en este caso, pasan a ser los valores de las variables para cada una de las líneas R y cada una de líneas B. Y para el resto de los caracteres que poseían varias repeticiones se llevó a cabo el Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo, comparando los pares de líneas convencional/CLPlus. Estos caracteres son: Diámetro del capítulo, Relación largo de bráctea/radio de capítulo, N° de aquenios por capítulo, Ancho promedio (mm), Largo promedio (mm), Espesor promedio (mm), Peso 1000aquenios (gr), Porcentaje de pepita, Porcentaje de aceite.

El modelo utilizado para caracteres con una sola repetición fue el que se describe a continuación:

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

dónde:

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

μ = Valor promedio de la población;

α_i = Efecto del grupo de líneas (convencional o CLPLUS) (i);

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

El modelo utilizado para caracteres con varias repeticiones fue el que se describe a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \pi_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

dónde:

Y_{ij} = Observación en la unidad experimental

μ = Parámetro, efecto medio

π_i = Parámetro, efecto del tratamiento i

β_j = Parámetro, efecto del bloque j

ε_{ij} = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental, i,j

6.2.1.4 Variables cualitativas: Análisis de estados

Se realizó un análisis de estados con 21 variables cualitativas. Se entiende por estado a los diferentes valores que puede adoptar una variable cualitativa. Se determinaron diferencias de estado entre los 5 pares de isolíneas (convencionales y CLPlus), y se estableció presencia o ausencia de estados exclusivos para alguno de los grupos.

6.2.1.5 Análisis multivariado: Variables cuantitativas y cualitativas.

Las variables medidas para cada línea fueron utilizadas para crear una matriz básica de datos que fue analizada utilizando el programa NTSys 2.1 (Rohlf, 2000). La matriz fue estandarizada y se obtuvo a partir de ella una matriz triangular de distancias euclidianas. Se obtuvo la media de las distancias entre líneas originales y se comparó con la media resultante de las líneas obtenidas, luego del proceso de integración, utilizando una prueba T.

Para determinar las distancias entre líneas se partió de una matriz compuesta de las 10 OTUs (Unidades taxonómicas operacionales) en las columnas, por 40 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, formando de esta manera una Matriz Básica de Datos Estandarizada (MBDE). La estandarización consiste en transformar el conjunto de datos en otro con media (\bar{X}) igual a 0 y varianza (σ^2) igual a 1. El objetivo es transformar los datos para que tengan un mismo punto de referencia y una escala común (Chao, 1993), para que todas las variables tengan la misma ponderación. Se transforma una variable X ($\bar{X}; \sigma^2$) en una Z (0; 1) a través de la siguiente fórmula:

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

dónde:

μ : media poblacional, y

σ : desviación estándar poblacional.

Sobre ésta y los coeficientes de correlación se elaboró una Matriz de Similitud (Sokal y Sneath, 1963). Esta matriz posee tanto en filas como en columnas las 10 líneas, y cada

valor del cuerpo de la matriz corresponde a la correlación que existe entre las líneas para todas las variables.

Posteriormente, se procedió a calcular las distancias euclidianas 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 cada grupo de líneas (convencionales y CLPlus).

La distancia euclidiana o "línea recta" (Johnson y 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:

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

El objetivo era determinar si la similitud promedio entre genotipos pertenecientes al grupo de las líneas convencionales era estadísticamente mayor, igual o menor que la similitud entre genotipos del grupo de las líneas obtenidas luego de la introgresión.

Las Hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de las distancias entre las líneas convencionales es igual o menor al promedio poblacional de las distancias entre las líneas CLPlus.

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de las distancias entre las líneas convencionales es mayor al promedio poblacional de las distancias entre las líneas CLPlus.

Las Hipótesis planteadas fueron evaluadas mediante una prueba "t" con $gl = n_C + n_{CL} - 1$ Y $\alpha = 0,10$:

$$t_c = (X_C - X_{CL}) - (\mu_C - \mu_{CL}) / \sqrt{((S^2_C / (n_C - 1)) + (S^2_{CL} / (n_{CL} - 1)))}$$

donde:

t_c es el valor del estadístico "t" calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_C + n_{CL} - 1$ grados de libertad;

X_C es la media muestral de las distancias entre las líneas convencionales; y

X_{CL} es la media muestral de las distancias entre las líneas CLPLUS

μ_C y μ_{CL} son las medias poblacionales de las distancias entre las líneas convencionales y entre las líneas CLPLUS, respectivamente;

S^2_C y S^2_{CL} son las varianzas muestrales entre las líneas convencionales y entre las líneas CLPlus, respectivamente

n_C y n_{CL} son el número de líneas que representan cada uno de los grupos de líneas.

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.

6.2.2 Análisis molecular

6.2.2.1 Muestreo y extracción del ADN

De las 10 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.

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).

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 15 ml por 10 minutos para posteriormente liofilizarlas. La

lío-filización es un proceso de deshidratación de productos sometidos a baja presión (vacío) y moderada temperatura. En la lío-filización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido, normal en procesos de secados, sino la sublimación del hielo.

Luego de lío-filizadas, 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 2 ml, 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 μ l 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 50 µg de ADN. Como última actividad, las muestras fueron diluidas hasta una concentración final de 8ng/µl.

6.2.2.2 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 3, 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.

Se trabajó con 59 marcadores tipo SSR previamente mapeados (Yu, *et al.* 2003) y suficientemente distribuidos a lo largo de todo el genoma de girasol (ver Figura 5, Anexo 1).

Tabla 3. Nombre del marcador microsatélite, secuencia de los cebadores directos (D) y reversos (R), temperatura de apareamiento y grupo de ligamiento (GL).

NOMBRE DEL MARCADOR MICROSATELITE	SECUENCIAS DE LOS PARES CEBADORES	TEMPERATURA DE APAREAMIENTO (°C)	GRUPO DE LIGAMIENTO (GL)
ORS 1128	D TCTGTGCCATACCACTTTATTCG R GGCGATAATAGATGCGACACTC	59	1
ORS 229	D TCCGACCCGAATCTTATGAACC R GACCCGAATGAGACCCAAACTG	52	2
ORS 342	D TGTTTCATCAGGTTTGTCTCCA R CACCAGCATAGCCATTCAA	58	2
ORS 653	D CACCACCAAGAACCCTAGA R CCGATACATACCATAGCCGATT	60	2
ORS 925	D ATGATTCTAAGTTGCGGTAGTGC R GTTGGGTTTAAGTTGTTGCTTCC	59	2
ORS 1045	D GGTGACAAGAGGGGTGTTCCAG R GGACAAATGAGTGTGGGAGTTT	59	2
ORS 13	D GAATAACCTTGTGGAGTTTGCC R CCTCATTCTCATTCTCTCCACC	52	3
ORS 66	D TCAAAGGAAAAAGAAGGCGA R GTCATCTTCACCACCTTCTGG	55	3
ORS 432	D TGGACCAGTCGTAATCTTTGC R AAACGCATGCAAATGAGGAT	58	3
ORS 235	D AAGCAACTGCCGCTCCCAC R AGCGACAGCTGTGACAATGC	52	4
ORS 309	D CATTGGATGGAGCCACTTT R GATGAAGATGGGGAATTTGTG	58	4
ORS 334	D TTGGCACAATCTGAAACAAGA R AATCAAACCGAAAGCCAAACT	58	4
ORS 620	D TCATGGCGGTTAGAGACGAT R CACTTCTTTCATCAACCCCTCT	58	4
ORS 546	D CATGAACATCGCCAATTCAG R TGCAAGGAACCATCAGAATC	58	5
ORS 1024	D GGGAAAGTGGGCTTGTCTATGTAT R AACACACCGAAATCACCTATGAA	59	5
ORS 1120	D TAACGTGTGCAGGTCTGTCTAAA R TGCAAATAATAAGATAATGACCGATT	59	5
ORS 349	D CCCTAACCAATATGCTCCCATT R TGGATAAACGAGTGAATGGTGT	58	6
ORS 1256	D GATGTTGATGTTGGTGAAGTTGC R CTCCGTACACCTTAAGCACTTGTA	59	6
ORS 16	D GAG GAA ATA AAT CTC CGA TTC A R GCA AGG ACT GCA ATT TAG GG	52	7
ORS 1041	D AAACAAACCTTAATGGGGTCGTA R ATATTGGCTGGTTGATGCTGAT	59	7
ORS 166	D CAGCCACATGCCCTCTGAC	55	8

	R TGTTAAGAACCGCGACAACACTGC		
ORS 299	D TCGGCATCTCGTAAACATCA	55	8
	R CACGCTAGTTTGATTCCGGTTT		
ORS 830	D CAAGTGCATTAGGTGGTTCTAACA	59	8
	R GCCCTCTGACTGTTGTATGACTG		
ORS 1013	D GTCACCAAGTCCCTGTCCTAAA	59	8
	R TGTGTCCGGATGAAAGAAGAAATG		
ORS 1043	D CCAAACCGTCATGTTCTATGTTT	59	8
	R AGTGTGATTGCGAATTGTAGTGC		
ORS 1161	D CAACTACGTCACGATACTCGCC	59	8
	R GGAGCTGAAGCTGAAGACAAATC		
ORS 428	D TGCATTCATGATCAAAGGTTG	58	9
	R CATCACATCATTATCATCTCATCATG		
ORS 1181	D AGCTTGAAGTCGAGAGAAAAGATAGA	59	9
	R CCTCCCTAAACTCAAAGGCTAGA		
ORS 1265	D GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	59	9
	R ACCCTTGGAGTTTAGGGATCA		
ORS 887	D TCGAAAACGACTAATCCAACCTTTC	59	9
	R GAGCATGAACAAGAATTGACACA		
ORS 1183	D TAGCATATTGGGTTTGATGGTTT	59	9
	R AACAGCTAGAAAGATCCGCTTGT		
ORS 3	D AGA ACT GGC AGC TTG GAA AA	52	10
	R GTC CAA ATG GTG GAA AAC TAC C		
ORS 595	D TGATGGTAATGCATCGGGTA	58	10
	R CACACCATCCCTTGTA AAAATCA		
ORS 749	D GGTTATCCCTTCCTTACA ACTTCA	59	10
	R ACTCCGACGCTCAAGTCAGT		
ORS 1048	D TTAACCCACCTCACCTCCATTTA	59	10
	R TCTGTTTATGGTAGTTTCACCCACT		
ORS 1067	D CGTCAACTAATGCTGTCCTGATG	59	10
	R TCGGATATGATGCTGCTAAAGGT		
ORS 889	D ATCAACTACGTCACGATACTCC	59	10
	R GTTCTCATGGATTCTCACA ACTC		
ORS 1095	D AAGTTGCACCATGTTATTTACAG	59	10
	R TGTTTGATTCTCATGCACATATTGA		
ORS 733	D TATGAGTTGGCAAGGGCTTC	58	11
	R GGACTCCAACGAGAGAATCAGT		
ORS 502	D ATCCCAACAGACGCCATTAT	58	12
	R AACATTGGAGGGAGCCAATA		
ORS 817	D CATGTCAAGTTCGGGTTGAGTT	59	12
	R CGATTTGTGATACCCTCGTTCT		
ORS 224	D AACCAAAGCGCTGAAGAAATC	54	13
	R TGGACTAACTACCAGAAGCTAC		
ORS 799	D TCCAGCAAGTCAGCAACAAC	58	13
	R ACTCCCTCCCATTCTCGTCT		
ORS 879	D GAACCTCCCTTTGTCTGCATATC	59	13
	R CTCCGGTTGCTGTTGATGTCT		
ORS 694	D CCTGGA ACTGAACCGAGAAC	58	14

	R GCCGTGAAACAGAGAGAGGA		
ORS 8	D TTG GAT CGA TTG ATG ATT GTT G R GAA TCC GTC ATG TAT AAA ACG A	52	15
ORS 687	D ACCGTTACTTATTGGTTATTTTCATT R GGGGTTTGTGTTCTGTTTTG	58	15
ORS 825	D GTTTGTGTGCAAGACAAGGAAAC R TGAGAATAAGCCTGTTTCTACTCACAC	59	15
ORS 857	D ACATCCGAACGAAGGACAATC R CAAGAAAGTATGTCACCCAATAGCA	59	15
ORS 1242	D GCAATCGTTTTCACTCTTCCATTC R TGGTCGTAGAATTGTCGGTCAT	59	15
ORS 378	D GTGAAACCTTCGGACCTCTG R GTACAAAACCTTATAAATAAAACAATA	58	16
ORS 495	D CCAGGATTAGGTAGCTTAGTTTCG R GCGATCTGAGGTTGACTCGT	54	16
ORS 656	D TCGTGGTAAGGGAAGACAACA R ACGGACGTAGAGTGGTGGAG	58	16
ORS 386	D TCCAGTTATCCAAAGGTGTGC R GTGCTAGAAGAACCTGTAACCATT	58	17
ORS 513	D AGTCAAATCGCTGCCACCTC R ATTGTCACTGGCTTCCTTGG	58	17
ORS 565	D TGGTCAACGGATTTAGAGTCAA R TCCAGTTTGGTCTTGATTTGG	54	17
ORS 727	D GGTGGCAAGTGGTGGTTAGA R AAAGCTGGTCATCTCAAGGGTA	58	17
ORS 811	D CCTTCTCCTCAATCTTTGGCTA R AGGAATGAAATGGGTGTGTGT	58	17
ORS 1097	D GACCAAGTGGACTGACACG378AG R GACCAAGTGGACTGACACGAG	59	17

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

efectuado 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 las 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.

6.2.2.3 Diversidad molecular

Se construyó como primer paso, una Matriz Básica de Datos (MBD), $M \times A$, 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, $M \times A$, 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.

Se obtuvo una matriz de similitud utilizando el coeficiente llamado SMC (“Simple Match Coeficient”) y a partir de ella se confeccionó una matriz de disimilitud. Se determinó la media de las distancias entre líneas originales y se comparó con la media resultante de las líneas obtenidas luego del proceso de introgresión utilizando una prueba T.

El coeficiente SMC se describe a continuación:

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

dónde:

m: representa el número de alelos idénticos

n: representa el número de alelos diferentes.

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:

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

dónde:

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 convencionales y CLPlus 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 convencionales y de las CLPlus.

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula): $\mu_C = \mu_{CL}$. No existen diferencias entre los promedios poblacionales de líneas convencionales y CLPlus para la variable PIC.

H_1 (Hipótesis alternativa): $\mu_C \neq \mu_{CL}$. Existen diferencias entre los promedios poblacionales entre líneas convencionales y CLPlus para la variable PIC.

6.2.2.4 Análisis multivariado

6.2.2.4.1 Cálculo de las distancias moleculares

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

El objetivo era determinar si la similitud promedio entre genotipos pertenecientes a un mismo grupo de líneas era estadísticamente mayor, igual o menor que la similitud entre genotipos de diferentes grupos.

Se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 (Hipótesis nula): El promedio poblacional de la similitud entre las líneas convencionales es igual o menor al promedio poblacional de la similitud entre las líneas CLPlus.

H_1 (Hipótesis alternativa): El promedio poblacional de la similitud entre las líneas convencionales es mayor al promedio poblacional de la similitud entre las líneas CLPlus.

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

$$t_c = (\bar{X}_C - \bar{X}_{CXCL}) - (\mu_C - \mu_{CXCL}) / \sqrt{((S^2_C / (n_{CL}-1)) + (S^2_{CXCL} / (n_{CXCL}-1))};$$

donde:

t_c es el valor del estadístico "t" calculado, a comparar con el valor de Tablas con $n_{CXCL} + n_C - 1$ grados de libertad y $\alpha=0,1$;

X_{CxCL} y X_C son las medias muestrales de la similitud de cada una de las líneas convencionales con cada una de las líneas CLPlus; y cada una de las líneas convencionales con cada una de las líneas convencionales restantes, respectivamente;

μ_{CxCL} y μ_c son las medias poblacionales de la similitud de cada una de las líneas convencionales con cada una de las líneas CLPlus; y cada una de las líneas convencionales con cada una de las líneas convencionales restantes, respectivamente;

S^2_{CxCL} y S^2_C son las varianzas muestrales de la similitud de cada una de las líneas convencionales con cada una de las líneas CLPlus; y cada una de las líneas convencionales con cada una de las líneas convencionales restantes, respectivamente; y

n_{CxCL} y n_C son el número de líneas que representan las líneas convencionales y CLPlus evaluadas conjuntamente y las líneas convencionales, 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.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

La introgresión de genes responsables de caracteres agronómicos de interés en líneas de germoplasma elite de girasol, es una necesidad que crece en sintonía con el descubrimiento de los mismos. Diversas estrategias de introgresión han sido utilizadas en otros cultivos dependiendo en gran parte de las herramientas disponibles en cada uno, y los objetivos finales perseguidos. La introgresión por retrocruzas (Brennan y Butler, 1992) ha sido ampliamente adoptada con el fin de minimizar la contribución de genoma del material dador en las nuevas líneas desarrolladas, manteniendo así el potencial y el patrón adaptativo del germoplasma elite original. Esta estrategia fue luego mejorada haciendo uso de marcadores moleculares para la recuperación del trasfondo genético (Ribaut *et al.*, 2002).

La introgresión de genes en líneas elite de girasol utilizando la recuperación del trasfondo con marcadores tendrá su mayor impacto en el corto plazo, aunque a largo plazo su impacto se encuentra limitado ya que su producto final puede “sólo” generar una versión con una mejora específica del genotipo elite original (Ribaut y Ragot, 2007).

El uso de una estrategia intermedia, basada en retrocruzas, pero utilizando para la recuperación del trasfondo genético marcadores multipunto, permitió obtener una serie de líneas, portadoras del carácter CLPlus que fueron evaluadas posteriormente por su desempeño agronómico. Las líneas obtenidas presentaban aún un nivel de diversidad sobre el cual fue posible realizar selección para obtener líneas superiores agronómicamente a las utilizadas como recurrentes (Bulos y Sala, resultados no publicados).

El análisis de las líneas originales y sus versiones CLPlus a través de variables morfológicas y marcadores moleculares se describe a continuación.

7.1 Análisis morfológico

7.1.1 Análisis de las variables morfológicas cuantitativas

Al realizar la comparación entre las líneas convencionales y las líneas CLPlus, a través de las 9 variables morfológicas cuantitativas que pudieron ser evaluadas con repetición (Tabla 4), se encontraron diferencias significativas para 2 o 3 de las variables analizadas en los 5 pares de líneas comparados (Ver Anexo 2). Los 5 pares de líneas analizados presentaron diferencias significativas para la variable Diámetro del capítulo, siendo las líneas CLPlus las que presentaron mayor diámetro en todos los casos. Otras variables que presentaron diferencias significativas entre algunos de los pares fueron: Relación largo de bráctea/radio de capítulo (para 3 de los 5 pares de líneas); N° de aquenios por capítulo (para 2 de los 5 pares de líneas); y Largo promedio de los aquenios, Ancho promedio de los aquenios y Peso de 1000 aquenios (para 1 de los 5 pares de líneas). No se encontraron diferencias significativas entre las líneas convencionales y las líneas convertidas por el carácter CLPlus para los siguientes caracteres: Espesor promedio de los aquenios (mm), Porcentaje de pepita y Porcentaje de aceite.

La no modificación de una de estas variables, Porcentaje de aceite, para materiales CLPlus ya había sido observada y descrita por Weston *et al.* (2012) en materiales híbridos CLPlus. Esto ha sido descrito también como uno de los beneficios de este carácter, ya que previamente los materiales que portaban resistencia a imidazolinonas otorgadas por el carácter Imisun llevaban consigo, por arrastre por ligamiento, material genómico silvestre el cual incluía QTLs que afectaban el rendimiento de aceite (Trucillo Silva *et al.*, 2010).

En todos los casos las líneas CLPlus presentaron mayor tamaño del capítulo. Esto puede deberse a una selección visual durante el proceso de introgresión o bien que

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para los 9 caracteres cuantitativos con repetición, número de variables comparadas, número de variables con diferencias significativas y detalle de las variables con diferencias significativas.

PARES DE LINEAS	NUMERO DE VARIABLES	NÚMERO DE VARIABLES CON DIFERENCIAS SIGNIFIVATIVAS	VARIABLES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
R39/R739	9	3	Diámetro del capitulo Relación largo de bráctea/radio de capítulo Número aquenios x capitulo
R55/R755	9	2	Diámetro del capitulo Número aquenios x capitulo
R21/R721	9	3	Diámetro del capitulo Relación largo de bráctea/radio de capítulo Largo promedio de los aquenios (mm)
B76/B776	9	2	Diámetro del capitulo Relación largo de bráctea/radio de capítulo
B84/B784	9	3	Diámetro del capitulo Ancho promedio de los aquenios (mm) Peso 1000 aquenios (gr)

existan factores que contribuyen a esta característica ligados al gen que fue introgresado. El resto de las variables presentó diferencias significativas solo en algunos de los pares de líneas evaluados (Ver Anexo 2) y no se observa ningún patrón discernible en el tipo de modificación.

Al realizar la comparación entre el grupo de las líneas convencionales y el de las líneas CLPlus, a través de las 10 variables morfológicas cuantitativas que pudieron ser evaluadas solo una vez por material (Tabla 5), no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las variables analizadas: Altura, Diámetro del tallo, N° de hojas, Largo de la lámina, Ancho de la lámina, Relación ancho/largo de la lámina, Longitud del peciolo, Cantidad de flores liguladas, Ancho de lígula y Largo de lígula.

Tabla 5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para los 10 caracteres cuantitativos sin repetición. Promedio de las líneas convencionales, promedio de las líneas CLPlus, valor calculado para la comparación entre los promedios de las líneas convencionales y las líneas CLPlus, y significancia.

CARÁCTER	PROMEDIO LINEAS CONVENCIONALES	PROMEDIO LINEAS CLPlus	Fc	SIGNIFICANCIA
Altura				
Líneas R	116,33	139	4,08	NS
Líneas B	132	162,5	1,55	NS
Diámetro de tallo				
Líneas R	1,87	2,02	0,16	NS
Líneas B	2,65	2,75	0,05	NS
Número de hojas				
Líneas R	22,67	23,67	0,24	NS
Líneas B	32,5	38	2,28	NS
Largo de lámina				
Líneas R	19,6	21,93	3,37	NS
Líneas B	21,3	24	0,44	NS
Ancho de lámina				
Líneas R	23,43	26	1,40	NS
Líneas B	24	27,5	0,68	NS
Relación ancho/largo de lámina				
Líneas R	1,1	1,19	0,96	NS
Líneas B	1,13	1,2	0,03	NS
Longitud del peciolo (cm)				
Líneas R	10,3	11,9	3,34	NS
Líneas B	12,5	13,25	0,04	NS
Cantidad flores liguladas				
Líneas R	34,33	39	0,66	NS
Líneas B	52,5	37	5,19	NS
Ancho de la lígula (cm)				
Líneas R	1,4	1,83	7,68	NS
Líneas B	2,05	2,2	0,36	NS
Largo de la lígula (cm)				
Líneas R	6,7	7,53	0,38	NS
Líneas B	7,2	7,2	0,00	NS

Fc: Valor calculado, para la comparación entre los promedios de las líneas convencionales y las líneas CLPlus.

NS= No significativa

7.1.2 Análisis de las variables Morfológicas Cualitativas

En el análisis de estados realizado para el caso de las variables cualitativas (Tabla 6), se utilizó como criterio el empleado por las Oficinas de registro. Las variables cualitativas que se usan en las oficinas de registro son caracteres fenotípicos no medibles (basados en observaciones y un rating asociado a la observación) por eso consideran que para que dos estados sean diferentes, estos deben ser no contiguos, es decir, deben ser valores de rating que difieran en más de un valor de la escala para ser considerados diferentes. En base a este criterio se pudo observar diferencias en 6 de las 21 variables analizadas para los 5 pares de líneas.

Las variables que presentaron diferencias son: Superficie de la lámina (para 2 de los 5 pares de líneas comparados), Antocianinas del estigma, Posición del capítulo a la madurez, Espesor del receptáculo, Estrías y Color de las estrías, mostrándose estas últimas 5 variables diferentes solo para 1 de los pares de líneas comparados. Para quince variables no se observaron diferencias entre pares de líneas convencionales y CLPlus, estas son: Pilosidad del tallo, Forma de las hojas, Color de las hojas, Aserrado del borde foliar, Inclinación de la lámina, Color de la lígula, Color de la corola, Color de las anteras, Color de los granos de polen, Color del papus, Forma del capítulo, Pubescencia, Moteado, Color principal del pericarpio y Posición de las estrías.

A pesar de no coincidir con el criterio utilizado en este análisis de estados, se observó en el caso del espesor del receptáculo que presento diferencias para 4 de los 5 pares de líneas analizados, observándose una tendencia de los materiales CLPlus a incrementar esta variable del capítulo, y en 3 de los 5 pares existió diferencia para el Aserrado del borde foliar. El aserrado del borde foliar mostró solo modificaciones entre pares de líneas R, mientras que la posición del capítulo a madurez se modificó solo entre pares de líneas B. El resto de las variables no presentó ningún tipo de patrón discernible.

Tabla 6. Estado para cada una de las 21 variables cualitativas analizadas para los cinco pares de líneas.

CARÁCTER	ESTADOS R21/R721	ESTADOS R39/R739	ESTADOS R55/R755	ESTADOS B76/B776	ESTADOS B84/B784
Pilosidad del tallo	6/4 *	4/4	4/4	6/6	6/6
Forma de las hojas	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
Color de las hojas	5/5	5/5	7/5	5/7	5/5
Superficie de la lámina	9/5	5/5	9/5	5/5	5/5
Aserrado del borde foliar	4/6	4/6	6/8	6/6	6/6
Inclinación de la lámina	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
Color de la lígula	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Color de la corola	2/2	2/2	2/4	2/2	2/2
Color de las anteras	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Color de los granos de polen	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
Color del papus	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Antocianinas del estigma	1/1	1/1	1/1	1/1	1/9
Forma del capítulo	6/6	6/6	6/6	6/6	6/4
Posición a la madurez	7/7	7/7	7/7	3/7	7/5
Espesor del receptáculo	3/5	3/3	3/5	3/7	5/7
Pubescencia	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
Moteado	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Color principal del pericarpio	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Estrías	9/9	9/9	9/9	9/9	9/1
Color de las estrías	3/9	9/9	3/3	3/3	3/3
Posición de las estrías	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Estados: Se entiende por estado a los diferentes valores que puede adoptar una variable cualitativa.

*: Ver codificación de estados para cada variable cualitativa en Tabla 2.

7.1.3 Análisis de Similitud Morfológico

El análisis de similitud realizado muestra que, para los materiales convencionales, las diferencias entre los materiales del mismo grupo reproductivo son generalmente menores que las diferencias entre materiales de distinto grupo reproductivo (Tabla 7a). Lo mismo se observa para los materiales CLPus (Tabla 7b). Una excepción a esto es la distancia entre B784 y R739.

Cabodevilla (2011), mostró que las distancias entre líneas mantenedoras y entre líneas restauradoras es menor que la distancia entre materiales del otro grupo reproductivo. En nuestro trabajo se observaron los mismos resultados.

Tabla 7a. Distancias euclidianas promedio entre todas las líneas convencionales entre sí, mantenedoras (B) y restauradoras (R), para el conjunto de datos morfológicos.

	B84	B76	R21	R55	R39
B84	0				
B76	5,15	0			
R21	7,71	6,84	0		
R55	9,31	7,59	4,75	0	
R39	7,84	7,05	2,57	4,82	0

Tabla 7b. Distancias euclidianas promedio entre todas las líneas CLPlus entre sí, mantenedoras (B) y restauradoras (R), para el conjunto de datos morfológicos.

	B784	B776	R721	R755	R739
B784	0				
B776	7,72	0			
R721	8,04	7,92	0		
R755	8,89	8,86	5,87	0	
R739	7,31	7,96	5,92	5,59	0

Prueba T: 0,1320592

El cálculo de las distancias entre los pares de líneas convencionales y sus contrapartes CLPlus muestra que la distancia entre estos pares va desde 3,91 a 5,35 (Tabla 8). Este rango es menor que la distancia que separa materiales de distintos grupo reproductivo. Sin embargo estas distancias en algunos casos son algo mayores que entre algunos pares de líneas convencionales como el caso de R39 y R21 (líneas altamente emparentadas por pedigree). Esto se debe a que durante la introgresión de los genes responsables del carácter CLPlus se realizaron selecciones a favor de caracteres que provenían de la línea donante del carácter, como por ejemplo el gen de resistencia a downy mildew *PI6*, y algunos caracteres morfológicos importantes, como por ejemplo el tamaño del capítulo. El mayor valor de distancia obtenido fue para el par B84 y B784.

Tabla 8. Distancias euclidianas entre pares de líneas convencionales y CLPlus, para las variables morfológicas.

PARES DE LÍNEAS	DISTANCIA EUCLIDIANA
B84 - B784	5,35
B76 - B776	4,99
R21 - R721	3,91
R55 - R755	4,48
R39 - R739	4,07

Para evaluar si existió una reducción en la diversidad en esta porción del germoplasma luego del proceso de introgresión se realizó una comparación de las medias de las distancias euclidianas del grupo de líneas previo y posterior a la introgresión. En este caso los materiales CLPlus presentaron una media de distancia entre ellos de 7,41, significativamente mayor ($p < 0,05$), que los materiales convencionales que fue de 6,37. Esto se debe a que a pesar de la existencia de selección durante las dos generaciones de retrocruzas hacia el trasfondo genético del material recurrente en todas las líneas, existió también selección hacia caracteres favorables del material donante (como por ejemplo el tamaño del capítulo). Por lo tanto en lugar de reobtener el nivel de diversidad original fue posible incluso realizar un incremento en este nivel.

7.2 Análisis molecular

Al realizar el análisis de los 59 *loci* de microsatélites, se pudo determinar la existencia de un total de 95 alelos entre todos los genotipos estudiados (10 líneas) (Ver Tabla 9). El número total de alelos dentro de las líneas convencionales fue de 90 y dentro de las líneas CLPlus fue de 91. Dado el parentesco existente entre los materiales analizados el número de alelos encontrados (por locus) a lo largo de todos los marcadores microsatélites analizados fue bajo (1 a 3). Sin embargo existe una mayor cantidad promedio de alelos en las líneas CLPlus que en las convencionales. En el caso de Yu *et al.*, 2002, utilizando 16 líneas de girasol y 74 SSRs, el rango de alelos varió entre 2 y 15 por microsatelite. El número de alelos promedio por *locus* fue de 3,99.

Los marcadores ORS1095 y ORS595, pertenecientes ambos al GL10 presentan un alelo común en todas las líneas mantenedoras analizadas y un alelo distinto a éste en todas las líneas restauradoras analizadas, tanto dentro del germoplasma convencional como dentro de las líneas CLPlus. Estos marcadores, el ORS595 y ORS1095, fueron ubicados a

Tabla 9. Número total de alelos y número de alelos encontrados para cada uno de los 59 loci de microsatelites tanto para las 5 líneas convencionales, como para las 5 líneas CLPlus.

LOCUS	GRUPO DE LIGAMIENTO	Nº DE ALELOS TOTALES	Nº DE ALELOS LINEAS CONVENCIONALES	Nº DE ALELOS LINEAS CLPlus
ORS 1128	1	2	2	1
ORS 229	2	2	2	2
ORS 342	2	1	1	1
ORS 653	2	2	2	2
ORS 925	2	1	1	1
ORS 1045	2	2	2	2
ORS 13	3	1	1	1
ORS 66	3	2	2	2
ORS 432	3	1	1	1
ORS 235	4	2	1	2
ORS 309	4	1	1	1
ORS 334	4	2	2	2
ORS 620	4	1	1	1
ORS 546	5	3	3	2
ORS 1024	5	1	1	1
ORS 1120	5	1	1	1
ORS 349	6	2	2	2
ORS 1256	6	2	2	2
ORS 16	7	2	2	2
ORS 1041	7	2	2	2
ORS 166	8	1	1	1
ORS 299	8	1	1	1
ORS 830	8	1	1	1
ORS 1013	8	1	1	1
ORS 1043	8	2	2	2
ORS 1161	8	1	1	1
ORS 428	9	1	1	1
ORS 1181	9	1	1	1
ORS 1265	9	1	1	1
ORS 887	9	2	2	2
ORS 1183	9	2	2	1
ORS 3	10	2	2	2
ORS 595	10	2	2	2
ORS 749	10	2	2	2
ORS 1048	10	2	1	2
ORS 1067	10	3	3	3
ORS 1095	10	2	2	2
ORS 733	11	1	1	1
ORS 502	12	1	1	1

LOCUS	GRUPO DE LIGAMIENTO	N° DE ALELOS TOTALES	N° DE ALELOS PARA LINEAS CONVENC.	N° DE ALELOS PARA LINEAS CLPlus
ORS 817	12	1	1	1
ORS 224	13	2	2	2
ORS 799	13	2	2	2
ORS 879	13	1	1	1
ORS 694	14	2	2	2
ORS 8	15	2	2	2
ORS 687	15	1	1	1
ORS 825	15	1	1	1
ORS 857	15	2	2	1
ORS 1242	15	2	2	2
ORS 378	16	1	1	1
ORS 495	16	2	2	2
ORS 656	16	1	1	1
ORS 889	10	2	2	2
ORS 386	17	2	1	2
ORS 513	17	1	1	1
ORS 565	17	1	1	1
ORS 727	17	2	2	2
ORS 811	17	2	2	2
ORS 1097	17	2	2	2
Σ		94	90	91
Promedio		1,59	1,52	1,54
Rango		1 a 3	1 a 3	1 a 3

10,7cM y 19,3 cM respectivamente según el mapa de Rojas-Barros *et al.* (2008) del gen de ramificaciones (*b1*), responsable de las ramificaciones y presente solo en las líneas restauradoras ubicado en el grupo de ligamiento 10.

Algo equivalente sucede con el marcador ORS799 localizado en el GL13, ya que presenta el mismo patrón que los dos marcadores anteriores. Este marcador está cercano al gen de restauración *Rf1* (Yu *et al.*, 2003), y está solamente presente en las líneas restauradoras. Por lo tanto es de esperar que las líneas restauradoras presenten un alelo distinto al de las líneas mantenedoras para este marcador ligado a *Rf1*.

El marcador ORS1183, ubicado en el GL9, presenta un alelo único dentro de las líneas restauradoras convencionales, distinto al alelo presente tanto en las líneas restauradoras CLPlus como en todas las líneas mantenedoras analizadas. Este patrón diferencial se explica debido a que el gen responsable de la resistencia a imidazolinonas, *Ahas1*, se encuentra en el GL9 a 15,8 cM del ORS1183 y que el alelo *Ahas1-3*, que determina el carácter CLPlus, fue obtenido sobre una línea mantenedora convencional. Por lo tanto, es de prever que las líneas mantenedoras convencionales y las líneas mantenedoras y restauradoras convertidas a CLPlus hayan mantenido el alelo de la fuente original por un efecto de arrastre por ligamiento. Así, las líneas restauradoras ahora poseen el alelo de la línea dadora original en ese locus.

7.2.1 Análisis de Similitudes Moleculares

Al igual que para el análisis basado en variables morfológicas, las distancias euclidianas entre los materiales mantenedores (B84 y B76) y entre materiales restauradores (R21, R55 y R39) convencionales, es menor que entre materiales de distinto grupo reproductivo (Tabla 10a). Lo mismo se observa para los materiales CLPus (Tabla 10b).

Según trabajos donde se utilizaron diferentes tipos de marcadores moleculares, en girasol la distancia entre materiales de diferentes grupos reproductivos es superior a la

Tabla 10a. Distancias euclidianas promedio entre todas las líneas mantenedoras (B) y restauradoras (R) convencionales, para los datos moleculares.

	B84	B76	R21	R55	R39
B84	0				
B76	0,13	0			
R21	0,57	0,55	0		
R55	0,53	0,49	0,11	0	
R39	0,53	0,51	0,19	0,15	0

Tabla 10b. Distancias euclidianas promedio entre todas las líneas mantenedoras (B) y restauradoras (R) CLPlus, para los datos moleculares.

	B784	B776	R721	R755	R739
B784	0				
B776	0,15	0			
R721	0,39	0,34	0		
R755	0,3	0,32	0,28	0	
R739	0,45	0,45	0,21	0,19	0

Prueba T : 0,02234746

encontrada para materiales del mismo grupo reproductivo (Berry *et al.*, 1994; Gentzbittel *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995 Cabodevila, 2011) En nuestro trabajo también puede observarse que las distancias, tanto dentro de líneas convencionales como de líneas CLPlus, es mayor para genotipos de distinto grupo reproductivo que del mismo grupo.

La distancia observada entre líneas que forman el par de materiales convencionales y sus contrapartes CLPlus, va desde 0,11 a 0,24 (Tabla 11). Este rango, al igual que lo observado para el análisis basado en variables morfológicas, es menor que la distancia que separa materiales de distintos grupo reproductivo. Sin embargo, nuevamente, estas distancias en algunos casos son inclusive mayores que entre algunos pares de líneas convencionales como es el caso de las líneas R21, R55 y R39 con cierto grado de parentesco. Esto refleja en parte lo observado para el análisis de las características morfológicas, donde sin dudas, dada la selección practicada durante el proceso de conversión es factible que algunas regiones genómicas de la línea dadora original hayan permanecido dentro de los materiales convertidos. Nuevamente, el mayor valor de distancia obtenido fue para el par B84 y B784.

Tabla 11. Distancias euclidianas entre pares de líneas convencionales y CLPlus, para los datos moleculares.

PARES DE LINEAS	DISTANCIA EUCLIDIANA
B84 - B784	0,24
B76 - B776	0,13
R21 - R721	0,21
R55 - R755	0,23
R39 - R739	0,11

Con el fin de comparar las distancias euclidianas promedio existentes entre las líneas convencionales previas a la introgresión y entre las líneas CLPlus luego de la introgresión, se calcularon las medias de las distancias euclidianas para cada grupo. Los valores obtenidos no presentaron diferencias significativas ($p=0,13$), siendo de 0,31 para los materiales CLPlus y 0,38 para los materiales convencionales.

Por otro lado si se compara la diversidad de ambos grupos a través del promedio de PIC para cada grupo, se observa nuevamente que no existen diferencias significativas ($p=0,18$) entre ambos valores, siendo de 0,23 para los materiales CLPlus y de 0,21 para los materiales convencionales ($p=0,18$) (Tabla 12).

En el trabajo realizado por Yu *et al.* (2002) se 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. Para Cabodevila (2011) el rango de PIC para 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. Los bajos valores de PIC observados en nuestro trabajo para ambos grupos y para la media a través de todos los genotipos (0,22) se explican por la escasa diversidad existente previamente entre las líneas B y las líneas R utilizadas, y su posterior conversión a materiales CLPlus.

Tabla 12. Valores de PIC promedio para la totalidad de las líneas, para las líneas convencionales, y para las líneas CLPlus.

LOCUS	GRUPO DE LIGAMIENTO	PIC CONVENCIONALES	PIC CL-PLUS
ORS 1128	1	0,28	0,00
ORS 229	2	0,49	0,32
ORS 342	2	0,00	0,00
ORS 653	2	0,35	0,32
ORS 925	2	0,00	0,00
ORS 1045	2	0,49	0,48
ORS 13	3	0,00	0,00
ORS 66	3	0,50	0,48
ORS 432	3	0,00	0,00
ORS 235	4	0,00	0,18
ORS 309	4	0,00	0,00
ORS 334	4	0,48	0,42
ORS 620	4	0,00	0,00
ORS 546	5	0,49	0,50
ORS 1024	5	0,00	0,00
ORS 1120	5	0,00	0,00
ORS 349	6	0,35	0,48
ORS 1256	6	0,50	0,50
ORS 16	7	0,49	0,32
ORS 1041	7	0,40	0,50
ORS 166	8	0,00	0,00
ORS 299	8	0,00	0,00
ORS 830	8	0,00	0,00
ORS 1013	8	0,00	0,00
ORS 1043	8	0,44	0,48
ORS 1161	8	0,00	0,00
ORS 428	9	0,00	0,00
ORS 1181	9	0,00	0,00
ORS 1265	9	0,00	0,00
ORS 887	9	0,28	0,48
ORS 1183	9	0,00	0,48
ORS 3	10	0,49	0,50
ORS 595	10	0,49	0,48
ORS 749	10	0,44	0,32
ORS 1048	10	0,00	0,48
ORS 1067	10	0,55	0,64
ORS 1095	10	0,49	0,48
ORS 889	10	0,49	0,48
ORS 733	11	0,00	0,00
ORS 502	12	0,00	0,00
ORS 817	12	0,00	0,00

LOCUS	GRUPO DE LIGAMIENTO	PIC	PIC CL-PLUS
		CONVENCIONALES	
ORS 224	13	0,20	0,32
ORS 799	13	0,49	0,48
ORS 879	13	0,00	0,00
ORS 694	14	0,40	0,48
ORS 8	15	0,28	0,42
ORS 687	15	0,00	0,00
ORS 825	15	0,00	0,00
ORS 857	15	0,20	0,00
ORS 1242	15	0,48	0,50
ORS 378	16	0,00	0,00
ORS 495	16	0,49	0,48
ORS 656	16	0,00	0,00
ORS 386	17	0,00	0,32
ORS 513	17	0,00	0,00
ORS 565	17	0,00	0,00
ORS 727	17	0,49	0,48
ORS 811	17	0,49	0,48
ORS 1097	17	0,49	0,48
Promedio		0,21	0,23
Desvío estándar		0,23	0,23

$p = 0,18$

8. CONCLUSIONES

Las líneas obtenidas luego de la introgresión de los genes responsables del carácter CLPlus, utilizando una estrategia de retrocruzas asistida por marcadores moleculares multipunto y posterior selección por aptitud agronómica, presentaron diferencias con respecto a las líneas recurrentes evaluadas, tanto a nivel morfológico como a nivel molecular.

Esta estrategia de incorporación del carácter CLPlus a un grupo de líneas de girasol provocó un aumento de la diversidad morfológica y un mantenimiento de la diversidad molecular en las líneas obtenidas con respecto al conjunto de líneas originales. A nivel morfológico se produjo un aumento en la diversidad observada para el grupo de materiales obtenidos luego de la introgresión, probablemente debido a la selección a favor de algunos caracteres agronómicamente útiles que provenían de la línea dadora del carácter a incorporar.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Akkaya, M. S., 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., Zorreguizar, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**: 181-186.
3. 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.
4. Becerra, V. y Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*. Vol **60** N° 3: 270-281.
5. Bernardo, R., Romero-Severson J., Ziegler J., Hauser J., Joe L., Hookstra G., Doerge R.W. 2000. Parental contribution and coefficient of coancestry among maize inbreds: pedigree, RFLP, and SSR data. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 552-556.
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. Brennan P.S. y Butler D.G. 1992. The influence of crossing strategy on the potential for breeding new crop varieties. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **32** (1): 65 – 70.
8. Broun, P. y Tanksley, S.D. 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 39–49.
9. Bruniard, J.M. y Miller J.F. 2001. Inheritance of imidazolinone herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24:11–16

10. Bruniard, J.M., 2001. Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of crossresistance pattern, and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Ph.D. Dissertation, North Dakota State University, Fargo, ND. p. 1-78
11. Cabodevilla, V. 2011. Diversidad morfológica y molecular entre líneas endocriadas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis de grado. UNNOBA.
12. Chao, L. L. 1993. Estadística para las ciencias administrativas. McGraw-Hill Interamericana, SA. Santafé de Bogotá, Colombia. 3° edición. Pp: 60-61.
13. Community Plant Variety Office (CPVO). 2002. Protocol for distinctness, uniformity and stability tests. *Helianthus annuus* L. Sunflower (UPOV Species Code: HLNTS_ANN). Unión Europea.
14. 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.
15. Dahlberg, J.A. 2000. Classification and characterization of Sorghum. *In: Sorghum: Origin, History, Technology and Production.* 99-130.
16. Dellaporta, S. 1994. Plant DNA miniprep and microprep: versions 2.1-2.3. *The Maize Handbook.* P: 522
17. Diwan, N. y 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.
18. Fehr, W.R. 1987. Principles of cultivar development. Volume 1. Theory and Technique. Macmillan Publishing Company. A division of Macmillan, Inc. Nueva York.
19. 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.

20. 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.
21. Goldstein, D.B. y Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. *J. Hered.* **88**: 335–42.
22. 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.
23. Harter A. V., Gardner K. A, Falush D., Lentz D. L., Bye R. A., Rieseberg L. H. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature* **430**: 201-205
24. Hillis, D.M. y Moritz, C. 1990. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
25. Hospital, F. y Charcosset, A. 1992. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, **147**(3): 1469–1485.
26. Johnson, R. A. y Wichern, D. W. 1982. *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
27. Kolkman J. M., Slabaugh M. B., Bruniard J. M., Berry S., Bushman B. S., Olungu C., Maes N., Abratti G., Zambelli A., Miller J. F., Leon A., Knapp S. J.. 2004. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor Appl Genet* **109**:1147-1159
28. 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.

29. Kresovich, S., Szewc-McFadden, A.K., and Blick, S.M. 1995. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* 91: 206–211.
30. Lacombe, S., Leger S., Kaan F., Berville A. 2002. Genetic, molecular and expression features of the Pervenets mutant leading to high oleic acid content of seed oil in sunflower. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. Volume 9, N° 1: 17-23, Janvier - Février 2002, Dossier : Lipides des plantes. Monsanto SAS, Croix de Pardies, P 21, 40305 Peyrehorade Cedex, France.
31. Lawson, W.R., Goulter K.C., Henry R.J., Kong G.A., Kochman J.K. 1996. RAPD markers for a sunflower rust resistance gene. *Australian Journal of Agricultural Research* 47 (3): 395 – 401.
32. Lentz D. L., Bye R., Sánchez Cordero V. 2008. Ecological Niche Modeling and Distribution of Wild Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Mexico. *International Journal of Plant Sciences* 169: 541-549
33. 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.
34. Martinez, M.C., Helguera, M., Carrera, A. 2010. Marcadores moleculares. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte I. Cap. 5: 70-85.*
35. 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.
36. 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.

37. Morgante M. y Olivieri A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* **3**: 175-182.
38. Olufowote, J.O., Xu, Y., Chen, X., Park, W.D., Beachell, H.M., Dilday, R.H., Goto, M., McCouch, S.R. 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome*, **40**: 370–378.
39. Openshaw, S.J., Jarboe, S.G., Bevis, W.D. 1994. Marker assisted selection in backcross breeding. pp. 41–43. In *Proceedings of the Symposium Analysis of molecular data*. Corvallis, Oregon, USA, 5-6 August 1994. American Society for Horticulture Science and Crop Science Society.
40. Picca, A., Helguera, M., Salomón, N., Carrera, A. 2004. Marcadores moleculares. *Biología y Mejoramiento vegetal*. Ediciones INTA: Parte II Cap 4: 61- 68.
41. Plaschke, J., Ganai, M.W., Röder, M.S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 1001–1007.
42. Preston C. y Mallory-Smith C. A. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. In: Powles SB, Shaner DL (eds) *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC Press, Boca Raton, FL., pp 23-60
43. Radwan, O., Bouzidi, M.F., Nicolas, P., Mouzeyar, S. 2004. Development of PCR markers for the PI5/PI8 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. *TAG Theoretical and Applied Genetics* .Vol. **109**, N° 1:176-185.
44. Radwan, O. 2010. Isolation and Expression of an NBS-LRR Protein-encoding Resistance Gene Candidate that Segregates with a Rust Resistance Gene in Sunflower. *Journal of Phytopathology*, Vol. **158**, Issue 6: 433–443.

45. Ribaut J. M.; Jiang, C; Hoisington, D. 2002. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. *Crop Science* 42: 557-565.
46. Ribaut J. M, y Ragot M. 2007. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *Journal of Experimental Botany* 58: 351–360,
47. Röder M. S, Ganal M. W., Plaschke J. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers *Theor Appl Genet* 91: 1001-1007
48. Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D., and Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327–333.
49. Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023.
50. Rohlf, F. 2000. NTSYS-pc version 2.1. Exeter Software. USA.
51. 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
52. 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
53. Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R.W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5466–5470.
54. Sala, C., Bulos M., Echarte M., Whitt S., Budziszewski G., Howie W., Singh B. & Weston B. 2008. Development of CLHA-plus : a novel herbicide tolerance trait in sunflower conferring superior imidazolinone tolerance and easy breeding. *Compte*

rendu de la 17e conférence internationale du tournesol de Cordoba (Espagne), 8 au 12 juin 2008.

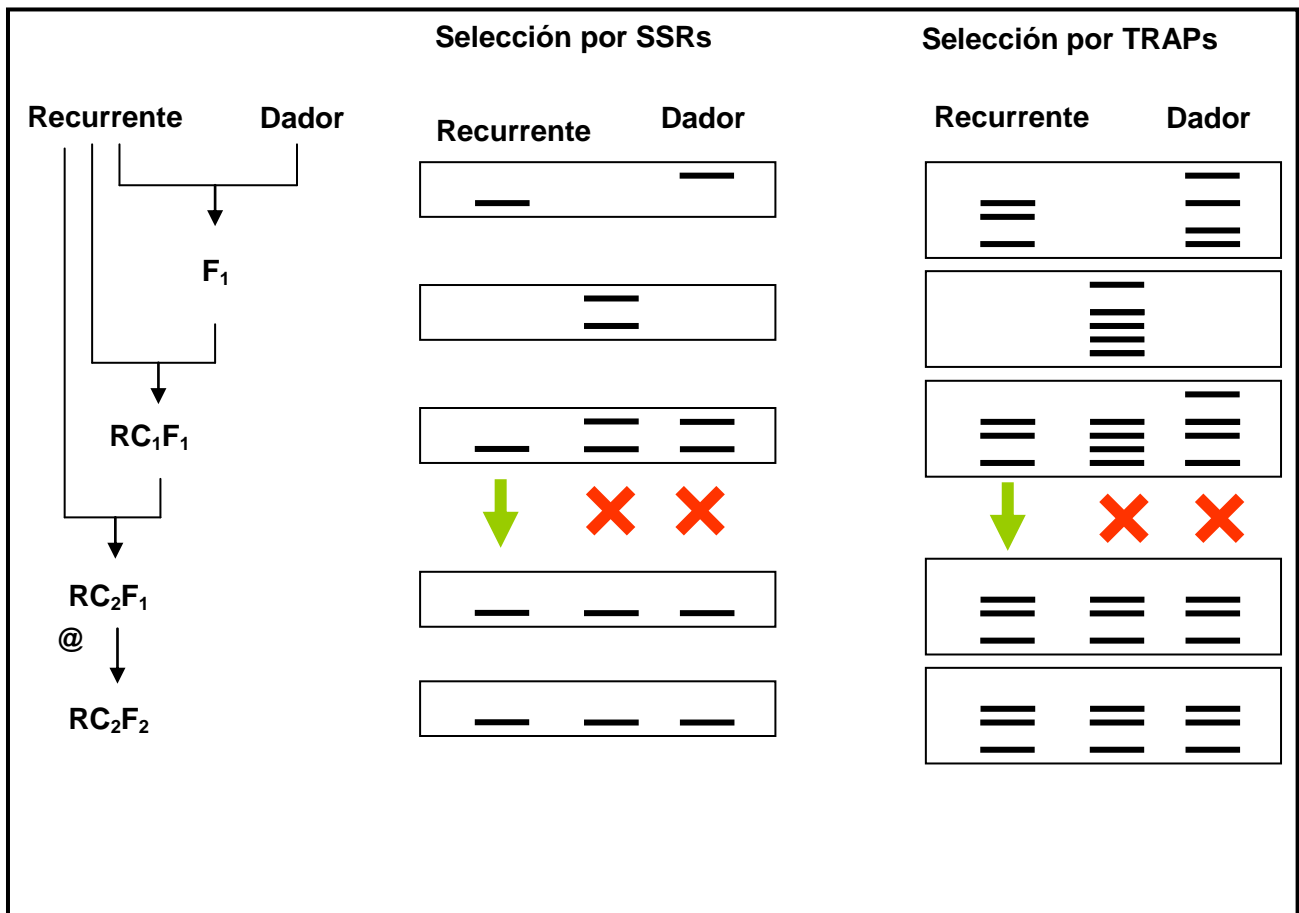
55. Sala C., Bulos M., Echarte A. M., Whitt SR, Ascenzi R. 2008b. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theor Appl Genet* 108:115-112
56. Sala, C., Bulos, M., Fresco, A., Altieri, E. 2010. Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte III. Cap. 3: 325- 337.*
57. 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.
58. Senior M., y Heun M. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome*, **36**(5): 884-889.
59. Singh B. K. 1999. Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine. In: Singh BK (eds) *Plant amino acids*. Marcel Dekker Inc, New York., pp 227-247
60. Slabaugh, M. B., Yu, J. K., Tang, S., Heesacker A., Hu X., Lu G., Bidney D., Han F., Knapp, S. 2003. Haplotyping and mapping a large cluster of downy mildew resistance gene candidates in sunflower using multilocus intron fragment length polymorphisms. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. **1**, Issue 3, pages 167–185.
61. Sokal, R. R, y Sneath, P. H. A. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*, Freeman, San Francisco.
62. Tan S., Evans R. R., Dahmer M. L., Singh B. K., Shaner D.L. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* 61:246-257

63. Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M., Shintani, D. K., Knapp, S. J. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* **105**, 1124D1136.
64. Tranel P. J., y Wright T. R. .2002. Resistance of weeds to AHAS inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci* 50:700–712
65. Trucillo Silva, I. Altieri E., Bulos M., Sala C. 2010. Actas V Congreso Nacional de Girasol, Buenos Aires, Argentina, pp.: 308-309.
66. Weising, K., Atkinson, R.G., Gardner, R.C. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Appl.* **4**: 249–255.
67. <http://www.siiia.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>. Estadísticas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Revisado Febrero 2012.
68. Weiss, E. A. 2000. Oil seed crops. Langman Group Ltd, London.
69. Weston, B. Pfenning M., Perez-Brea J., Tan S. , McNevin G., Carlson D., Bertero de Romano A., Romano C., Bulos M., Sala C.A. 2012. Yield and Oil Improvements in Clearfield Plus Sunflowers. Proc. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina.
70. 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.
71. Wu, K.S. y Tanksley, S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225–235
72. 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.

- 73.** Yu, J. K., Tang, S., Slabaugh, M. B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu W. C., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K. J., Berry, S., Leon, A. J., Olungu, C., Maes, N., Knapp, S.J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.* **43**, 367D387.
- 74.** 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

10. ANEXO 1: Figuras

Figura 1: Esquema de retrocruzas asistida por marcadores multipunto.



F₁: Filial 1

RC₁F₁: Retrocruza 1

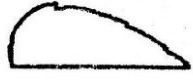
RC₂F₁: Retrocruza 2

RC₂F₂: Autofecundación de RC₂F₁

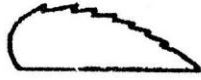
SSR: Repeticiones de Secuencia Simple.

TRAP: Polimorfismo en la Región Diana Amplificada.

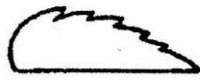
Figura 2. Aserrado del borde foliar.



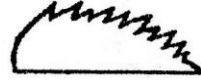
nulo (2)



medio(4)



fuerte(6)



muy fuerte (8)

Figura 3. Forma del capítulo.

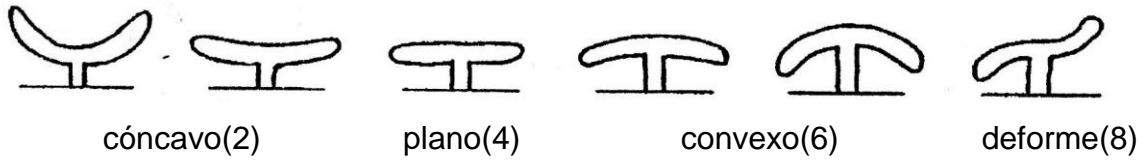
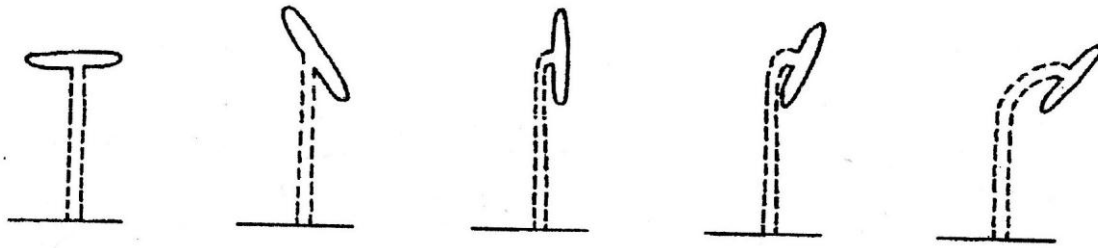


Figura 4. Posición del capítulo.

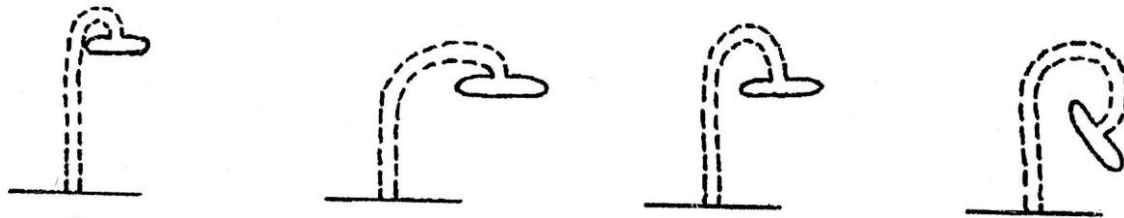


horizontal(1)

inclinado(3)

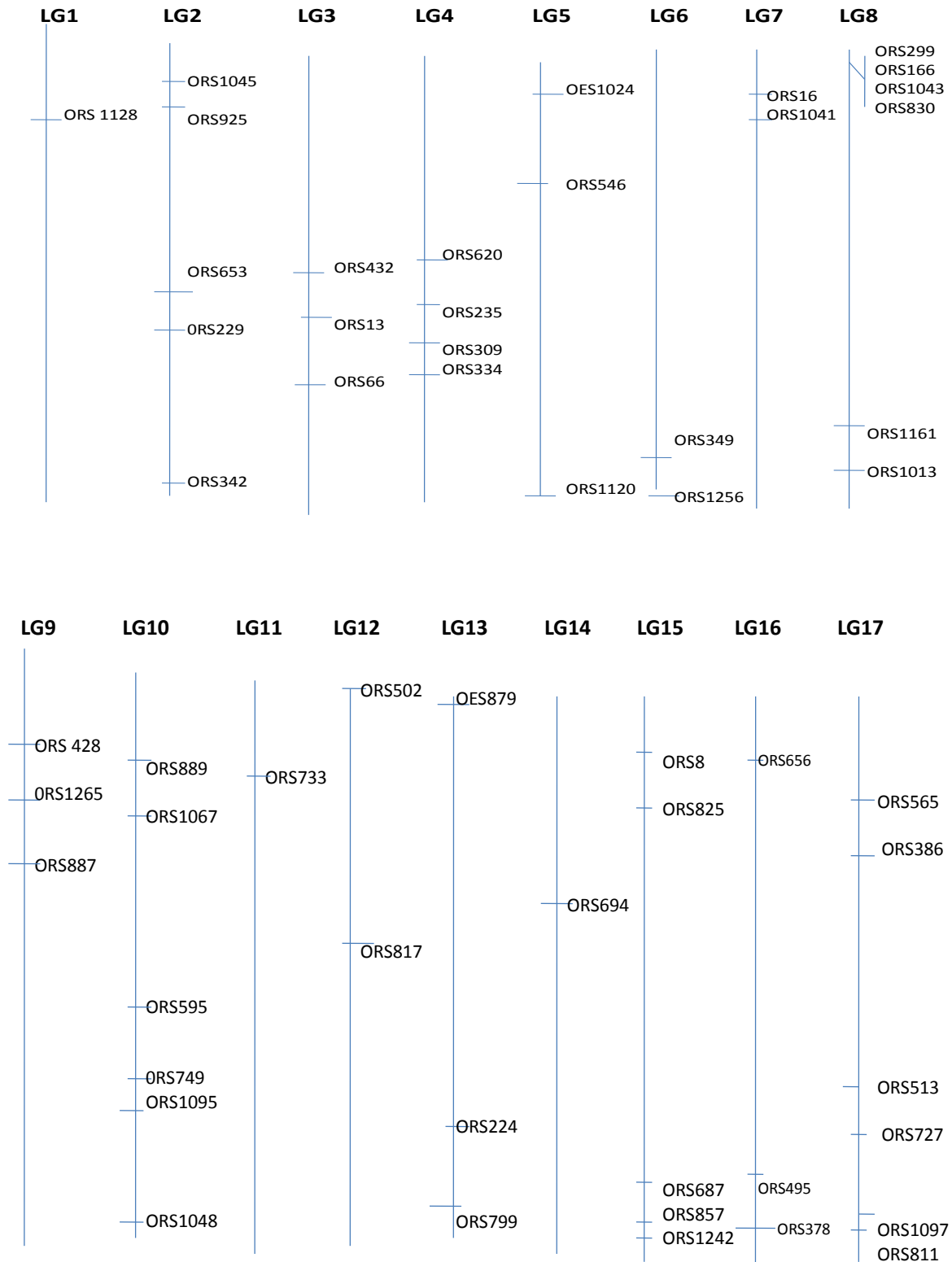
vertical(5)

medio, hacia abajo(7)



hacia abajo(9)

Figura 5. Localización genómica de los marcadores microsatelites utilizados.



LG: Grupo de ligamiento

ORS: Oregon State

ANEXO 2: Ampliación Tabla 4. Valores de las medias, desvíos estándares, valor calculado para la comparación de los promedios entre las líneas convencionales y las líneas CLPlus, valor de n, y significancia para los 5 pares de líneas analizados para las 9 variables cuantitativas con repetición..

CARÁCTER	LINEAS	PROMEDIO LINEAS ORIGINALES	VARIANZA LINEAS ORIGINALES	PROMEDIO LINEAS CLPlus	VARIANZA LINEAS CLPlus	Fc	n	SIGNIFICANCIA
Diámetro del capitulo	R39/R739	9,6	0,18	11,6	0,18	53,33	5	*
Relación largo de bráctea/radio de capítulo	R39/R739	0,99	0,00	0,78	0,01	35,61	5	*
Nº de aquenios por capítulo	R39/R739	456,33	229,33	851,67	2902,33	206,88	3	*
Ancho promedio (mm)	R39/R739	3,93	0,01	3,8	0,01	1,23	3	NS
Largo promedio (mm)	R39/R739	9	0,00	8,6	0,16	3	3	NS
Espesor promedio (mm)	R39/R739	2,97	0,07	2,81	0,08	0,29	3	NS
Peso 1000 aquenios (gr)	R39/R739	40,82	2,77	34,58	12,79	4,33	3	NS
Porcentaje de pepita	R39/R739	76,77	0,44	71,17	31,72	3,16	3	NS
Porcentaje de aceite	R39/R739	50,27	1,67	49,84	5,34	0,39	3	NS
Diámetro del capitulo	R55/R755	10	0,63	13,7	0,20	51,66	5	*
Relación largo de bráctea/radio de capítulo	R55/R755	0,83	0,01	0,77	0,01	0,75	5	NS
Nº de aquenios por capítulo	R55/R755	775,67	44961,33	1586,67	29257,33	22,98	3	*
Ancho promedio (mm)	R55/R755	3,77	0,01	3,5	0,07	4,92	3	NS
Largo promedio (mm)	R55/R755	9,4	0,01	9	0,07	12	3	NS
Espesor promedio (mm)	R55/R755	2,37	0,02	2,39	0,08	0,06	3	NS
Peso 1000aquenios (gr)	R55/R755	32,83	0,58	33,33	2,33	0,14	3	NS
Porcentaje de pepita	R55/R755	73,17	2,58	67	43,00	1,78	3	NS
Porcentaje de aceite	R55/R755	51,68	10,42	56,9	0,04	8,76	3	NS
Diámetro del capitulo	R21/R721	10,3	0,32	12,7	0,70	67,76	5	*
Relación largo de bráctea/radio de capítulo	R21/R721	1,02	0,03	0,75	0,01	20,46	5	*
Nº de aquenios por capítulo	R21/R721	812,33	19676,33	993,33	4294,33	4,7	3	NS

Ancho promedio (mm)	R21/R721	4,27	0,37	3,8	0,16	0,94	3	NS
Largo promedio (mm)	R21/R721	9,13	0,09	9,8	0,12	100	3	*
Espesor promedio (mm)	R21/R721	2,67	0,02	2,63	0,02	0,04	3	NS
Peso 1000 aquenios (gr)	R21/R721	32,67	7,85	43,1	29,43	5,84	3	NS
Porcentaje de pepita	R21/R721	70,83	11,92	77,67	72,82	1,89	3	NS
Porcentaje de aceite	R21/R721	51,93	1,30	52,98	1,05	0,84	3	NS
Diámetro del capitulo	B76/B776	14,3	6,57	19,9	3,68	31,05	5	*
Relación largo de bráctea/radio de capítulo	B76/B776	0,84	0,01	0,64	0,01	12,51	5	*
Nº de aquenios por capítulo	B76/B776	954	8869,00	749,67	5486,33	5,04	3	NS
Ancho promedio (mm)	B76/B776	5,57	0,10	5,9	0,13	0,79	3	NS
Largo promedio (mm)	B76/B776	12,07	0,00	12,07	0,06	0	3	NS
Espesor promedio (mm)	B76/B776	3,57	0,12	3,83	0,04	0,81	3	NS
Peso de 1000 aquenios (gr)	B76/B776	82,5	592,75	73,5	16,75	0,32	3	NS
Porcentaje de pepita	B76/B776	72,47	3,45	75,67	8,33	7,46	3	NS
Porcentaje de aceite	B76/B776	44,52	5,00	39,63	2,07	16,23	3	NS
Diámetro del capitulo	B84/B784	17,6	2,30	20,8	7,70	13,84	5	*
Relación largo de bráctea/radio de capítulo	B84/B784	0,59	0,05	0,49	0,00	1,01	5	NS
Nº de aquenios por capítulo	B84/B784	1242	4291,00	1461	47824,00	4,4	3	NS
Ancho promedio (mm)	B84/B784	4,67	0,09	4,1	0,07	289	3	*
Largo promedio (mm)	B84/B784	9,7	0,04	11,07	0,33	15,01	3	NS
Espesor promedio (mm)	B84/B784	3,34	0,07	3,67	0,01	2,6	3	NS
Peso 1000 aquenios (gr)	B84/B784	51	48,00	64,5	7,63	22,38	3	*
Porcentaje de pepita	B84/B784	78	84,00	69,53	0,44	2,94	3	NS
Porcentaje de aceite	B84/B784	44,23	11,27	40,07	1,10	2,68	3	NS

NS= No significativa.

*= Diferencia significativa 0,05.

Fc: Valor calculado, para la comparación de los promedios entre las líneas convencionales y las líneas CLPlus.

n: Número de repeticiones para cada variable involucradas en la comparación.