

Selección por resistencia a imazapir en etapas tempranas del desarrollo



Breccia, G.*; Vega, T.; Nestares, G.; Zorzoli, R.¹; Picardi, L.¹

Cátedra de Genética, Fac. Cs. Agrarias, *CIUNR, Universidad Nacional de Rosario. CC14 (S2125ZAA) Zavalla, Santa Fe. *gabrielabreccia@yahoo.com

Un factor limitante para la obtención de mayores rendimientos en el cultivo de girasol es un eficiente control de malezas, con especial énfasis en aquellas de hoja ancha. Los herbicidas del grupo de las imidazolinonas controlan efectivamente un amplio espectro de malezas. Si bien el girasol es sensible a todos los herbicidas de este grupo, recientemente se encontró resistencia en plantas de girasol silvestre la cual fue incorporada al girasol cultivado. La selección de genotipos resistentes se realiza actualmente a campo por lo que disponer de una metodología de laboratorio para la identificación de fenotipos que porten los genes de resistencia se traduciría en un ahorro de tiempo y recursos dentro de los programas de mejoramiento. El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión de la resistencia a imidazolinonas durante la germinación y el desarrollo de plántulas de girasol. Se utilizaron como material vegetal las líneas endocriadas HA89B, 1058-1 y HA425B de genotipos susceptible (S), intermedio (I) y resistente (R) respectivamente. Se evaluaron dos metodologías: a) germinación *in vitro* en medio de cultivo solidificado con agar y germinación en multimacetas con perlita. El herbicida utilizado fue el *Clearsol*[®] cuyo ingrediente activo es el imazapir (ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico). Las dosis evaluadas para este agente selectivo fueron: 1,25-2,5-5-7,5-10 μM . En el caso de la metodología *in vitro* el herbicida se

incorporó al medio de cultivo previa esterilización mediante microfiltración (Nalgene, Milipore 0,2 μm). En el caso de la metodología de multimacetas con perlita el herbicida se agregó a la solución nutritiva de riego (MS 25 % - Murashige y Skoog, 1962). Las multimacetas se acondicionaron sobre bandejas y el riego se efectuó por capilaridad. Como control se utilizaron el medio basal y la solución nutritiva sin agregado de herbicida en cada caso. En ambas metodologías el diseño experimental fue un completamente aleatorizado con 2 repeticiones de 30 aqueños cada una para cada combinación de genotipo y dosis. La incubación se realizó en cámara de ambiente regulado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 12 horas durante 8 días. Cumplido ese período se evaluó: longitud de raíz principal (LR), longitud de hipocótilo (LH), peso fresco aéreo (PFA), peso fresco radical (PFR), peso seco aéreo (PSA) y peso seco radical (PSR). Se efectuaron las pruebas de normalidad para todas las variables y los datos se analizaron a través de la variancia (ANOVA). Los valores promedio se compararon a través de la prueba de Tukey (Sokal & Rohlf, 1969). Con el objeto de comparar las metodologías de cultivo *in vitro* y la germinación en multimacetas se efectuó el análisis de correlación de *Pearson* entre los valores promedio de las variables estudiadas. En los dos ensayos los embriones germinaron a los 2-3 días para todas las combinaciones de tratamientos. Para el genotipo S indepen-

dientemente de la dosis de herbicida aplicada se observó un menor desarrollo de biomasa aérea y radicular. Las plántulas del genotipo S obtenidas en presencia de herbicida mostraron raíces principales no elongadas y necrosadas, y manchas violáceas en hipocótilos. Por el contrario, genotipos R e I germinados en presencia de herbicida no mostraron valores promedio significativamente diferentes con respecto a su control para todas las variables. La raíz principal de la línea I elongó pero se observó un escaso desarrollo de raíces secundarias para las dosis de 7,5 y 10 μM de imazapir. El desarrollo radicular para el genotipo R fue similar en las distintas dosis respecto a su control. Las correlaciones entre las variables evaluadas en las condiciones *in vitro* y en multimacetas fueron altas, positivas y significativas en todos los casos:

Se concluye que ambas metodologías presentan potencial para ser utilizadas como método de selección temprana a imidazolinonas en girasol, ya que los tres grados de resistencia pueden ser identificados en forma rápida y sencilla a través de la observación del desarrollo radicular. A su vez, de acuerdo a la alta correlación observada entre las variables estudiadas bajo las dos condiciones, se concluye que las dos metodologías son igualmente eficientes. Sin embargo, la metodología de multimacetas presentaría las ventajas de tener menor costo, requerir menor equipamiento y ser más sencillo de implementar.

Bibliografía:

- Murashige T. & Skoog F. (1962) *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Sokal RR & Rohlf FS (1969) *Biometry*. San Francisco, WH, Freeman & Co.

	Variable					
	LH	LR	PFA	PSA	PFR	PSR
Coefficiente correlación	0,97	0,93	0,86	0,56	0,60	0,63
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0152$	$p < 0,0080$	$p < 0,0054$



Valoración agronómica de poblaciones argentinas de *Helianthus annuus* y *H. petiolaris*

Cantamutto, M.^{1,2}; Presotto, A.^{1,3}; Poverene, M.^{1,3}; Alvarez, D.⁴; Rodríguez, R.⁵; Lenardón, S.⁶; Giolitti, F.⁶ y Martín Sánchez, J.²

¹Dpto. Agronomía UNS ²Centro UdL-IRTA, Lleida, España ³CERZOS-CONICET ⁴EAA Manfredi (INTA) ⁵EAA Balcarce (INTA) ⁶IFFIVE-INTA

Algunos destacados avances en la mejora del girasol provienen de especies silvestres del género *Helianthus*. Tal es el caso de la resistencia a *Puccinia helianthi* (Putt y Sackston Can. J. Plant Sci. 37:1957), el CMS PET1 (Leclercq Ann. Amélior. Plantes 19:1969), tolerancia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas (Al-Khatib et al. Weed Sci 46:1998). Se informa sobre la búsqueda de caracteres de interés agronómico en poblaciones de *H. annuus* (ANN) y *H. petiolaris* (PET) naturalizadas en Argentina (Poverene et al. RIA 31:2002). a) Ninguna de las cruizas con plantas de 7 poblaciones de ANN puras, F1 y F2 de cruizas con líneas endocriadas androestériles (ME) ni F1 y

F2 de cruizas con PET restauraron la fertilidad en la F1 de cruizas con la línea ME CMS RES1 HA 89 de citoplasma *H. resinosus*. b) Plantas ME de una población ANN Argentina (LM) fueron polinizadas por hermanas, líneas mantenedoras (B) y restauradoras (R) del CMS PET1. Una planta actuó como restauradora (R) en forma parcial. Las líneas R432 (con germoplasma de *H. niveus*) y R307 produjeron sólo descendientes ME mientras que B10, B09, HA89B y R049 restauraron en forma total o parcial la fertilidad masculina de la F1. Plantas ME de una población de EE.UU. (NEV) halladas en el jardín de la UNS respondieron de un modo diferente (**Tabla 1**). En algunas plantas ME se observaron gra-

Tabla 1 Plantas androestériles (ME) de dos posibles nuevas fuentes de *H. annuus* silvestre de Argentina (LM) y EEUU (NEV) encontradas en el Departamento de Agronomía (UNS) polinizadas por hermanas y líneas endocriadas mantenedoras (B) y restauradoras (R) del citoplasma PET1

Hembra	Polinizador	Total	Androestériles		Restauración
			(n)	(%)	
Procedencia Argentina					
LM2 ME	LM2 Planta 1	36	11	31	parcial
	LM2 Planta 2	48	2	4	si
	LM2 Planta 3	20	8	0	parcial
	LM2 Planta 4	50	22	44	parcial
	B09	36	0	0	si
	B10	5	0	0	si
	HA89B	6	0	0	si
	R307	64	60	94	no
	R432	45	41	91	no
	R49	4	1	25	parcial
LM2 Planta 1	LM2 Planta 1	7	2	29	parcial
Procedencia EEUU					
NEV ME	NEV Planta 2	2	1	50	parcial
	NEV Planta 4	4	3	75	parcial
	B09	13	10	77	no
	B10	5	4	80	parcial
	R307	17	2	12	si
	R432	7	0	0	si
	R49	7	0	0	no

nos de polen pero la ausencia de autofecundación se constató fenotípicamente en los descendientes de cruza con dos líneas endocriadas monocéfalas. c) Utilizando un índice de crecimiento y desarrollo se infiere la existencia de tolerancia a bajas temperaturas en poblaciones de ANN naturalizadas que mostraron diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$) cuando fueron cultivadas 20 días a 15 °C/ 5 °C, día neutro. d) Mediante inoculación mecánica se detectaron posibles fuentes de resistencia al *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV) en poblaciones de ANN. La F1 del cruzamiento de plantas resistentes de dos poblaciones (resistente x resisten-

te) produjo 45 % de individuos sin síntomas visibles de la enfermedad (**Tabla 2**). Esta fuente de resistencia superaría a la informada por Lenardón et al. (Crop Sci. 45:2005). e) Nueve poblaciones de ANN fueron cruzadas con las líneas ME HA89, A09, A10. Se realizó la evaluación fenotípica de las F1, F2 y BC1 buscando material de interés para el mejoramiento del cultivo. El fenotipo cultivado se recuperó notoriamente en BC1. Estos resultados permitirían inferir que las poblaciones argentinas de ANN poseen rasgos de interés para la mejora del cultivo y animan que se continúe la transferencia de sus genes al germoplasma cultivado.

Tabla 2 Efecto de la inoculación mecánica con SuCMoV sobre la F1 de plantas silvestres resistentes (R) y la línea A10. A los 27 días los individuos inoculados (N) se clasificaron en; susceptibles; síntomas severos (S); tolerantes, síntomas atenuados (T); inmunes, sin síntomas (I)

Madre	Padre	N	Número de plantas			Inmunidad % (I/N*100)
			S	T	I	
4802 R	@	0				
	4802 R	3	0	3	0	0
	4802	41	28	7	6	15
	libre	25	19	2	4	16
	6402 R	33	13	2	18	55
A10	4802 R	53	33	13	7	13
Control Cf17		18	18	0	0	0



Proyecto PICTO-ASAGIR 08-13169 Conservación y evaluación de especies silvestres de girasol de importancia para el mejoramiento genético

Grupo Responsable: Castaño, F.D.¹; Poverene, M.M.² y Rodríguez, R.H.³.
Participantes: Cantamutto, M.A.²; Carrera, A.D.²; Clausen, A.M.³; Echeverría, M.M.⁴;
Rídao, A.C.⁴; Salaberry, M.T.⁴; Cáceres, C.⁴; Diuorno, R.S.⁵; Ureta, M.S.⁶

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP., ² Departamento de Agronomía, UNS., ³ EEA INTA Balcarce
⁴ Becaria proyecto PICTO ASAGIR 08:13169. ⁵ Becaria (UNMdP.), ⁶ Becaria doctoral CONICET, UNS

Las especies silvestres de girasol constituyen una fuente muy rica de variabilidad genética para ser utilizada en el mejoramiento genético del girasol cultivado. Dado que el fenómeno de erosión génica está presente en forma permanente, se considera necesario y estratégico que la Argentina conserve recursos genéticos del girasol silvestre como un seguro para poder afrontar en el futuro situaciones no predecibles y con ello poder lograr nuevos avances genéticos en los cultivares que se vayan produciendo. El objetivo general de este proyecto es la creación de un banco activo de especies silvestres naturalizadas e introducidas de girasol y evaluar el germoplasma disponible. Se han realizado viajes de colección durante los años 2005 al 2007 y se han obtenido muestras de semillas de diferentes poblaciones de *Helianthus petiolaris* y *H. annuus* silvestre que crecen en forma natural en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa, San Juan, San Luis y Mendoza. También se han colectado plantas clasificadas como *H. x laetiflorus* del sur bonaerense. Se han introducido de otros países diferentes especies anuales de girasol: *H. anomalus*, *H. annuus*, *H. argophyllus*, *H. bolanderi*, *H. debilis*, *H. deserticola*, *H. neglectus*, *H. praecox* y *H. petiolaris*, la mayoría de las cuales se han multiplicado en forma controlada. Se introdujeron más de 30 diferentes citoplasmas que

condicionan androesterilidad (CMS) y han sido multiplicados mediante cruzamientos con una línea endocriada. Se multiplicaron asexual y sexualmente diferentes entradas correspondientes a las especies perennes *H. decapetalus*, *H. x laetiflorus*, *H. maximiliani*, *H. resinosus*, *H. rigidus* y *H. uberosus*. Se han realizado estudios relacionados con la evaluación del germoplasma silvestre de manera especial con el naturalizado en la Argentina. Respecto a *H. annuus* silvestre, se identificaron dos probables nuevas fuentes CMS y sus correspondientes fuentes restauradores de la fertilidad del polen, se han seleccionado plantas tolerantes a bajas temperaturas y al virus SUCMoV.

Por otro lado, se han realizado un análisis de la variabilidad molecular en varias poblaciones argentinas de *H. annuus* silvestre mediante el uso de marcadores ISSR y se ha determinado que los mismos permiten: 1) estimar la variabilidad genética en *H. annuus* cultivado y silvestre y diferenciar las líneas endocriadas. 2) Las poblaciones marginales de *H. annuus* silvestres mantienen considerables niveles de variabilidad, que puede atribuirse a múltiples introducciones y que descartaría un efecto fundador marcado durante el proceso de dispersión. 3) La similitud entre poblaciones silvestres colectadas en sitios de cultivo y líneas puras de uso frecuente, pone en evidencia el efecto del flujo

de genes desde el cultivo. 4) Los genomas silvestres y cultivados han conservado para los marcadores analizados, una alta homología durante el proceso de domesticación. Se está estudiando la transferencia del carácter resistencia a imazapyr a *H. annuus* silvestre y evaluando su efecto sobre la supervivencia y la fecundidad. Se encontró tolerancia natural en un bajo número de individuos de las poblaciones silvestres y la misma aumentó significativamente en la F1 (silvestre x IMI). La tolerancia a imidazolinonas fue fácilmente transferida en las poblaciones de *H. annuus* silvestre. Se evaluaron varias poblaciones de *H. petiolaris* naturalizadas en la Argentina por su comportamiento frente a las infecciones en hoja y tallos con *Sclerotinia sclerotiorum*. Se han caracterizado desde el punto de vista fenotípico algunas poblaciones de *H. petiolaris* y los híbridos (F1 y retrocruzas) entre esta especie y el girasol. Mediante el uso de marcadores RAPDs se ha concluido que los híbridos interespecíficos *H. petiolaris* x *H. annuus* cultivado pueden ser identificados mediante marcadores moleculares. De especial interés resultan los marcadores de *H. annuus*, dado

que permiten cuantificar el flujo génico desde el cultivo hacia las poblaciones silvestres, receptoras de genes con potencial impacto ambiental. Los marcadores descriptos pueden aplicarse al estudio de procesos de hibridación e introgressión, ya que en sucesivas retrocruzas con la especie silvestre los caracteres morfológicos intermedios no son evidentes. Se han evaluado poblaciones de *H. x laetiflorus* por su comportamiento a las infecciones en tallo y hojas de *S. sclerotiorum* y se están realizando estudios de reproducción y variabilidad genética en las poblaciones argentinas. Algunos de los resultados de los estudios descriptos anteriormente se presentan en varias comunicaciones del Congreso ASAGIR 2007.

Respecto a la formación de recursos humanos, las Ing. Agr. Ureta y Cáceres continúan de manera normal sus estudios de posgrado. Cáceres, ha completado el cursado de asignaturas y el trabajo experimental por lo cual se estima que en el año 2007 obtendrá la Maestría. A su vez, la Ing. Diuorno obtuvo la Maestría en el 2006. La Lic. Echeverría obtuvo su Doctorado a fines del 2005.



Caracterización de híbridos provenientes de *Helianthus petiolaris* y el girasol cultivado (*H. annuus*)

Diuorno, R.S.; Salaberry, M.T.; Echeverría, M.M.; Alonso, S.I. y Rodríguez, R.H.

Unidad Integrada de Balcarce (UIB, Estación Experimental INTA-Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP). C.C. 276 (7620) Balcarce, BA.

H *elianthus petiolaris* ($2n=2x=34$), especie que se ha naturalizado en la Argentina, constituye una valiosa fuente de variabilidad genética para el mejoramiento genético del girasol. La caracterización morfológica y reproductiva de los híbridos que se producen entre ambas especies debe brindar información en cuanto a si es posible que algunos caracteres de interés agronómico puedan ser transferidos de *H. petiolaris* a *H. annuus* ($2n=2x=34$). Por otro lado, no se han detectado estudios en la progenie producida por el retrocruzamiento del híbrido interespecífico con *H. petiolaris*, el cual podría darse en la región donde ambas especies son simpáticas. El desarrollo de plantas transgénicas ha aumentado la preocupación sobre el posible escape de genes del girasol cultivado a especies silvestres relacionadas. Es por ello que se considera necesario obtener información acerca de la hibridación e introgresión en forma recíproca, entre ambas especies. El objetivo del trabajo fue caracterizar las progenies híbridas, F_1 y retrocruzas, provenientes del cruzamiento entre *H. annuus* y *H. petiolaris*, desde el punto de vista fenotípico en los estadios vegetativo y reproductivo. Se realizaron cruzamientos recíprocos entre plantas de un híbrido simple de girasol y de *H. petiolaris*, provenientes de semillas colectadas en la Argentina. Luego, estas dos progenies híbridas (F_1) fueron cruzadas con ambas especies progenitoras, de lo cual resultaron cuatro progenies

(RC_1F_1). En el campo, se tomaron datos de distintos caracteres morfológicos a través del ciclo biológico de 98 plantas de *H. petiolaris*, 28 de *H. annuus* y 338 de las seis progenies híbridas. Además, se estudió la meiosis de los híbridos interespecíficos.

Luego, se realizó un análisis de componentes principales, con el fin de detectar gradientes de variabilidad de los caracteres y visualizar las relaciones entre las especies y sus progenies. Los dos primeros componentes principales explican un 67,5 % de la variabilidad y establecen el agrupamiento de las plantas de *H. petiolaris* y las de las progenies F_1 y RC_1F_1 , cuyo progenitor recurrente es esta especie, que no se detecten diferencias entre progenies de cruzamientos recíprocos, que se produzca una gran dispersión de las plantas de la progenie RC_1F_1 , cuyo padre recurrente es el girasol cultivado y que las plantas de esta especie se diferencien del resto. Los caracteres de mayor influencia en el ordenamiento dado por el componente 1 son aquellos relacionados con los tamaños del capítulo (el diámetro del capítulo, el diámetro del disco y el ancho de filaria) y de la hoja (el largo y el ancho) y el tipo de ramificación. Se considera que los genes que determinan el tipo de ramificación tienen un rol decisivo en la distribución de las plantas evaluadas. El componente 2 separa a las progenies de las especies progenitoras por los caracteres que resultaron transgresi-

vos, la altura de la planta y el largo del pecíolo. De lo anterior se deduce que las características de las plantas de las poblaciones de *H. petiolaris* y de las RC_1F_1 , que tiene a esta especie como progenitor recurrente, hace que sea difícil detectar a simple vista, diferencias entre ellas. Por otro lado, se deduce también que existe una gran variabilidad en las plantas RC_1F_1 , que tienen a *H. annuus* como progenitor recurrente, debida probablemente por un lado, a genes que gobiernan el tipo de ramificación y que están segregando y por el otro, a genes de ambas especies que en combinación, codifican caracteres transgresivos. En las progenies F_1 , que tienen un alto grado de esterilidad (más de 95 %), se observó un mínimo de 10 bivalentes en la diacinesis de la meiosis, lo cual indicaría que al menos siete cromosomas es-

tán involucrados en las translocaciones cromosómicas que diferencian las poblaciones argentinas de *H. petiolaris* y el girasol cultivado. Un decavalente es la máxima configuración cromosómica observada en estas progenies. En las anafases y telofases I y II se observaron puentes y fragmentos cromosómicos y micronúcleos. Un dodecavalente fue la máxima configuración cromosómica y once bivalentes fue el mínimo número de bivalentes observados en una planta RC_1F_1 . Ello explica el grado elevado de esterilidad del polen que se detecta en algunas plantas RC_1F_1 (entre 30 y 90 % de granos de polen abortados) y da indicios de que aún en estas progenies existen barreras reproductivas importantes que dificultan el flujo génico entre ambas especies.



Evaluación de la variabilidad de algunos caracteres entre y dentro de algunas poblaciones argentinas de *Helianthus petiolaris*

Diuorno, R.S.; Salaberry, M.T.; Echeverría, M.M.; Monterubbianesi, M.G. y Rodríguez, R.H.

Unidad Integrada de Balcarce (UIB, Estación Experimental INTA-Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP). C.C. 276 (7620) Balcarce, BA.

H *elianthus petiolaris* se encuentra principalmente al este de La Pampa, al oeste de Buenos Aires y al sur de San Luis y Córdoba. Las plantas crecen en caminos vecinales y banquinas, ocasionalmente invadiendo lotes sin cultivar (Poverene *et al.*, 2002). Esta especie silvestre constituye una valiosa fuente de variabilidad genética para la incorporación de caracteres de importancia para el mejoramiento genético del girasol cultivado como son: la resistencia a diversos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos y la eficiencia en la utilización del agua. Además, es una fuente de citoplasmas que producen androesterilidad y genes restauradores de la androfertilidad (Seiler, 1992). Hasta el momento, no se cuenta con la información necesaria para saber si hay mayor variabilidad de caracteres morfológicos entre o dentro de las poblaciones de *H. petiolaris* que se encuentran en la Argentina.

La evaluación de dicha variabilidad con respecto a algunos caracteres permite por un lado, determinar dónde se encuentra la principal fuente de variabilidad y por el otro, identificar genotipos valiosos con el fin de que sean utilizados en planes de mejoramiento genético del girasol. Por otro lado, Heiser (1961) determinó que existen tres grupos citológicos en las poblaciones de *H. petiolaris* que se encuentran en Estados Unidos. Los tres grupos difieren en una o más translocaciones cromosómicas, de tal modo que las F₁ prove-

nientes de individuos de distintos grupos son semiestériles por presentar translocaciones heterocigóticas. Una evaluación de la fertilidad de algunas poblaciones argentinas de *H. petiolaris* contribuirían con información para detectar la presencia de más de un grupo citológico en nuestro país y para explicar la variabilidad existente. Se planteó como hipótesis que hay mayor variabilidad dentro de estas poblaciones que entre ellas.

El objetivo del trabajo fue determinar la variabilidad de algunos caracteres, en los estadios vegetativos y reproductivos, entre y dentro de algunas poblaciones argentinas de esta especie. En el Banco de Germoplasma del género *Helianthus* de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA de Balcarce se conservan colecciones de especies silvestres con la finalidad de detectar genes de interés agronómico para el cultivo de girasol. De acuerdo a los estudios realizados en las poblaciones coleccionadas y a lo observado en los viajes de colección por el país, se considera que las poblaciones que se encuentran en la Argentina pertenecen a la subespecie *petiolaris*. Se realizó un ensayo en el campo cuyo diseño fue el de bloques completos aleatorizados en dos fechas de siembra, cada una con dos repeticiones, y en el que se incluyeron siete poblaciones argentinas de *H. petiolaris*. Cada parcela constó de tres surcos de 5 m de largo, distanciados entre sí a 1,50 m.

Las semillas se habían colectado en poblaciones que se encontraban distantes entre sí, en la provincia de La Pampa. Se tomaron datos por planta de distintos caracteres, la mayoría de tipo cuantitativo, a través del ciclo biológico, ya sea durante el estadio vegetativo como el reproductivo. Además, con el fin de determinar si existen más de un grupo citológico en las poblaciones, se analizó el nivel de viabilidad del polen de las plantas, mediante la técnica de tinción de Alexander (1980).

Debido a que todas las plantas presentaron un alto grado de viabilidad del polen, se deduce que no se encuentran diferentes grupos citológicos en las poblaciones muestreadas. Los caracteres evaluados presentan una gran variabilidad entre plantas dentro de cada una de las poblaciones argentinas evaluadas. Se detectaron mínimas diferencias entre poblaciones. Estas mínimas diferencias podrían ser debidas a diferencias en las frecuencias génicas. El número de capítulos por planta y por lo tanto, el

de ramificaciones es el carácter más variable entre plantas. Dado que solamente se encuentran plantas de *H. petiolaris* de la subespecie *petiolaris*, de un solo grupo citológico y que prácticamente no hay diferencias en los caracteres entre poblaciones, se concluye que las poblaciones argentinas de esta especie deben haber tenido un origen común y que por lo tanto, al menos en la región evaluada, no es necesario buscar variabilidad genética en diversas poblaciones.

Bibliografía:

- Alexander, M.P. 1980. *Stain Technology*. 55:13-18.
- Heiser, C.B. Jr. 1961. *Evolution*. 15:247-258.
- Poverene, M.M.; Cantamuto, M.A.; Carrera, A.D.; Ureta, M.S.; Salaberry, M.T.; Echeverría, M.M. y Rodríguez, R.H. 2002. *Revista de Investigación Agropecuaria*. 31:97-116.
- Seiler, G.J. 1992. *Field Crops Research*. 30:195-230.



Caracterización genética y agronómica de la androesterilidad citoplásmica RES1 en el girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.)

Echeverría, M.M; Salaberry, M.T; Castaño, F.D y Rodríguez, R.H.

UIB: FCA, UNMdP - EEA Balcarce, INTA C.C. 276 (7620) Balcarce, BA.

Actualmente, más del 90 % de la producción mundial de girasol proviene de híbridos que poseen la fuente de androesterilidad citoplásmica (CMS) PET1, lo que determina que el cultivo presente vulnerabilidad genética. En la UIB se identificó la fuente CMS RES1 proveniente de la especie silvestre *H. resinosus*. Se planteó la hipótesis de que esta fuente presenta características agronómicas y genéticas favorables para ser utilizada en la producción de híbridos.

Los objetivos del trabajo fueron: 1) conocer la expresión fenotípica y la estabilidad de CMS RES1, 2) conocer en qué estadio de la microgametogénesis se producen los sucesos que llevan a la androesterilidad de las plantas CMS RES1, 3) identificar genotipos con capacidad de restaurar la fertilidad masculina de las plantas CMS RES1 y en el caso de identificarlos, estudiar el modo de herencia del o los genes restauradores de la fertilidad (*Rf*), 4) caracterizar el citoplasma RES1 por sus efectos sobre determinados caracteres agronómicos en líneas endocriadas y sobre la aptitud combinatoria de los mismos caracteres y 5) determinar si existen cambios moleculares en la región *atp6-coxIII* del ADNmt de las plantas CMS RES1. El citoplasma RES1 se incorporó a las líneas endocriadas HA89, RHA271, RHA274 y RHA801. Las plantas CMS RES1 presentaron escasa producción de granos de

polen inviábiles y anteras deformadas, más cortas que las anteras de las plantas fértiles y que generalmente permanecieron retenidas dentro de la corola. El proceso meiótico fue normal en las líneas endocriadas CMS RES1. La androesterilidad se mantuvo en las diferentes generaciones de retrocruzas y ambientes. Se confirmó que el origen de esta fuente de androesterilidad es citoplásmico, que su expresión fenotípica es completa y estable en distintos ambientes y que las alteraciones se producen en estadios postmeióticos. Para identificar genes *Rf* se evaluaron: a) genotipos diploides: 19 líneas endocriadas de girasol cultivado, 19 poblaciones originadas a partir de germoplasma de origen interespecífico (siendo *H. annuus* uno de los progenitores) y dos especies silvestres (*H. petiolaris* y *H. argophyllus*) y b) genotipos hexaploides: las especies silvestres perennes *H. resinosus*, *H. xlaetiflorus*, *H. tuberosus* y *H. pauciflorus*. Todos los genotipos diploides evaluados se comportan como mantenedores de la androesterilidad de las plantas CMS RES1, mientras que las especies hexaploides como restauradores. Uno o dos genes *Rf*, con dominancia, estarían localizados en los cromosomas de *H. resinosus*, homólogos con los de *H. annuus*, por lo cual sería factible la transferencia al girasol cultivado. Se evaluaron las líneas endocriadas HA89, RHA271, RHA274 y RHA801, en sus versiones androfértil y androestéril, a fin de caracterizar el citoplasma RES1 por

sus efectos sobre algunos caracteres de relevancia agronómica. Además se evaluó la línea endocriada HA89 en ocho versiones isoplásmicas, B, RES1, PET1, PET2, PEF1, RIG1, MAX1 y GIG1, y los híbridos producidos entre estas siete líneas HA89 androestériles y otras tantas líneas endocriadas probadoras, HA338, HA369, HA821, HA850, RHA271, RHA274 y LB598, para determinar si CMS RES1 produce algún efecto diferente al de otros citoplasmas sobre la aptitud combinatoria, con respecto a algunos caracteres agronómicos, incluyendo el comportamiento frente a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los resultados indican que las plantas androestériles con el citoplasma RES1 sólo se diferencian de las plantas CMS PET1 en el menor tamaño del capítulo. La producción de semillas y, por lo tanto, la fertilidad femenina no se afectan en las plantas portadoras del citoplasma RES1. Se realizó el análisis molecular de la re-

gión *atp6-coxIII* del ADNmt de las líneas endocriadas HA89, RHA271 y RHA801 con los citoplasmas B, RES1, PET1 y MAX1, mediante la amplificación con cebadores universales y específicos y la hibridación tipo *Southern*. Se determinó que el citoplasma RES1 se diferencia de los citoplasmas PET1 y MAX1 por la ausencia del *orfH522* y presenta diferencias estructurales con respecto al citoplasma B, en las áreas circundantes a los genes *atp9* y *coxIII*.

El citoplasma RES1 es apropiado para ser utilizado en programas de producción de híbridos de girasol si se logra transferir el o los genes responsables de la restauración de la fertilidad del polen en el girasol cultivado (*H. annuus*). De todas maneras, dicho citoplasma puede ser usado con éxito en programas de mejoramiento genético de girasoles ornamentales en los que la finalidad no es la producción de semilla.



Interferencia del girasol silvestre sobre un híbrido *Clearfield*[®] de girasol cultivado

Errazu, P.J.¹; Presotto, A.D.^{1,2} y Cantamutto, M.A.^{1,3}

¹Dpto. Agronomía UNS; ²CERZOS-CONICET; ³Centro UdL-IRTA, Lleida, España.

El girasol silvestre ha mostrado alta capacidad de interferencia en cultivos de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Rosales-Robles *et al.*, Cereal Res. Com. 30:2002); en soja (*Glycine max* Merr.) (Geier *et al.*, Weed Technol. 10:1996), en remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Schweizer y Bridge Weed Sci. 30:1982), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Rosales-Robles *et al.*, Agrociencia (Méx.). 39:2005), maíz (*Zea mays* L.) (Deines *et al.*, Weed Sci. 52:2004). La nueva tecnología para el control de malezas en girasol se basa en la incorporación de genes de tolerancia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas, hallados en una población de Kansas (USA) sometida a siete años de aplicación con esos herbicidas. La tecnología ha sido liberada en nuestro país bajo la denominación *CL*[®]. Esta nueva tecnología no serviría para el control de girasol silvestre en cultivos de girasol, pues existen riesgos que las poblaciones contengan en baja frecuencia los genes de tolerancia o que sean incorporados por flujo génico desde los cultivos *CL*.

El objetivo del trabajo fue evaluar la interferencia del girasol silvestre *Helianthus annuus* L. sobre plantas del cultivo (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus*) empleando un híbrido tolerante al herbicida imazapir. El ensayo se realizó en la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca Latitud 38°41'46.18"S longitud 62°14'55.18"W, utilizando el híbrido *DK3880CL*. Se sembró a chorrillo a principios de diciembre y se raleó poste-

riormente para ajustar la densidad a 5,5 pl/m². Plantas de *H. annuus* silvestres de Colonia Barón (La Pampa) se obtuvieron en invernáculo utilizando bandejas para plantines. Ocho días después de la siembra, en simultáneo con el raleo, se dispusieron esas plantas como maleza, en un estado de desarrollo similar al del híbrido comercial, en la posición correspondiente a una planta del cultivo. Se realizó el seguimiento del desarrollo del cultivo y la maleza, incluyendo altura de planta (cm), número de hojas, área foliar (cm²), diámetro de tallo (cm), número y diámetro de capítulos (cm), peso de 1.000 (g), peso de granos por capítulo (g). Los parámetros medidos sobre las malezas fueron contrastados con los de plantas de la misma población (Colonia Barón) cultivada a baja densidad (1,66 pl/m²) en el mismo campo experimental. El diseño empleado fue completamente al azar, con cinco repeticiones.

Se realizó un ANOVA y comparación de medias considerando grupos de plantas dispuestas en círculos concéntricos desde las malezas, con el paquete estadístico Infostat. No se encontraron diferencias en el número de hojas entre la maleza y el híbrido comercial, mientras que la altura fue significativamente mayor en la primera. Ambos parámetros fueron superiores cuando la maleza creció a baja densidad. El número de ramificaciones y capítulos fue menor en las plantas silvestres dentro del cultivo, mientras que no se encontraron diferencias en el diámetro de disco entre ambos grupos de plantas silvestres

Tabla 1 Efecto de la competencia sobre el crecimiento y desarrollo de *Helianthus annuus spp. annuus* (ANN CBAR) y del híbrido comercial *Dekalb 388oCL*. Medias seguidas de la misma letra no difieren según Tukey para $p < 0,05$. AD: cultivo y maleza a alta densidad ($5,5 \text{ pl/m}^2$); BD: maleza a baja densidad ($1,66 \text{ pl/m}^2$)

Genotipo	Altura (cm)	Hojas (nº) ¹	Días a R5	Capítulos		Ramificaciones	
				Nº	Ø (cm)	Nº	tipo
DK 388o CL AD	156,95 A	17 AB	54,00 A	1,00 A	21,76 B	0 A	sin
ANN CBAR AD	223,00 B	15 A	63,60 C	22,80 B	3,40 A	10 B	apical
ANN CBAR BD	251,00 C	19 B	57,00 B	166,20 C	3,86 A	17 C	total

¹ Hoja sobre el tallo principal.

(Tabla 1). Las variables evaluadas indicaron un crecimiento indeterminado en las plantas silvestres, a diferencia del híbrido, observándose un aumento en la altura aún luego de iniciada la floración (Figura 1). Las plantas del cultivo inmediatamente vecinas a las malezas y las ubicadas a distancias crecientes no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros considerados. Estos resultados indicarían que las plantas de girasol silvestre ejercerían una interferencia similar a las del híbrido cultivado. En situaciones similares a la evaluada podría esperarse que la merma en el rendimiento del cultivo sea proporcional a las plantas de cultivo que hayan sido reemplazadas por la de la maleza.

Figura 1 Crecimiento de la maleza *Helianthus annuus spp. annuus* (ANN CBAR) y del híbrido comercial *Dekalb 388o CL* en una densidad de $5,5 \text{ pl/m}^2$



Respuesta a estreses abióticos caracterizada mediante chip de ADNc



Fernández, P.^{1*}; Di Rienzo, J.²; Fernández, L.¹; Hopp, H.E.¹; Paniego, N.¹ y Heinz, R.A.¹

¹ Unidad Integrada de Investigación y Docencia FCEyN-UBA-CNIA-INTA, Instituto de Biotecnología, CC 25 (B1712WAA) Villa Udaondo, Pcia. de Buenos Aires, Argentina ² Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
*pfernandez@cnia.inta.gov.ar

Palabras clave: *Helianthus annuus*; girasol; EST; micromatrices de ADNc; estrés por frío, estrés salino.

Diferentes herramientas moleculares fueron desarrolladas localmente con anterioridad para abordar el análisis genómico del girasol cultivado, las cuales incluyen 550 micro-satélites altamente polimórficos (SSR) (Paniego y col., 2002), 64 unigenes derivados de secuencias relacionadas con análogos a genes de resistencia (RGAs) y 319 unigenes provenientes de etiquetas de secuencias que se expresan (ESTs) (Fernández y col., 2003). Considerando la importancia del cultivo de girasol para el país y atendiendo al progresivo desplazamiento del área de cultivo hacia regiones marginales en los últimos años, surgen como factores limitantes crecientes los estreses ambientales como sequía, frío y salinidad

El objetivo general de este trabajo es la identificación de genes candidatos relacionados con tolerancia a frío y salinidad siendo el objetivo específico la utilización de micromatrices de ADNc generadas a partir del banco local de ESTs debidamente anotados según vocabulario normalizado (GOA: Camon y col., 2003), y su posterior validación mediante la técnica de qRT-PCR. Para la impresión de micromatrices de ADNc sobre soporte de vidrio, se amplificaron por PCR los fragmentos representativos de los unigenes anotados en las bibliotecas previa-

mente caracterizadas, mediante el servicio ofrecido por Gentron Genomic Services (Gentron, Suc Argentina), utilizando el equipo *VersArray Chip Writer* (BioRad). Se evaluaron los ARNs extraídos de 3 muestras biológicas tanto para el tratamiento control, frío (tratamiento de 24 hs. a 10 °C) y salinidad (tratamiento de riego con 150 mM NaCl durante 3 días). Se utilizó el sistema «*SuperScript Indirect RNA Amplification System*» (Invitrogen, L1016-02) para amplificar el ARN partiendo de 800 ng RNA extraído de cada muestra basado en el método de síntesis de ADN complementario *in situ* y amplificación del ARN (Eberwine y col., 1992).

El ARN amplificado fue marcado fluorescentemente con Cy3 o Cy5 por incubación en medio alcalino con ésteres de Cy3 o Cy5 respectivamente. Los vidrios impresos fueron escaneados usando el lector de fluorescencia *VersArray Chip Reader* (BioRad) y las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando software Spotfinder (www.tm4.org/spotfinder.html). La normalización se realizó a través de programas generados bajo el Paquete R (University of Auckland, USA), mientras que el análisis de expresión global se realizó utilizando Infostat 2006® (Grupo Infostat 2006, FCA, Córdoba, Argentina). A partir del análisis de la

matriz de expresión mediante la integración de métodos estadísticos basados en análisis de varianza y componentes principales se identificaron 80 genes candidatos para respuesta a frío y/o salinidad.

Del análisis de perfiles individuales de los 80 genes candidatos, se detectaron 50 sobre o sub expresados frente a uno u otro estrés, indicando la implicancia de mecanismos regulatorios comunes a ambos estreses. Asimismo, se detectaron 15 y 12 genes sobre o sub expresados respectiva y específicamente frente a un estrés y no frente al otro, mientras que los 3 restantes presentaron un perfil transcripcional contrastante siendo inducidos en un estrés y reprimidos en otro. Para cada uno de los 80 genes seleccionados como genes candidatos se graficó el perfil de expresión según su comportamiento en cada tratamiento y se construyó el gráfico de colores («*heatmap*») asociado a ese patrón diferencial de modo de analizar cualitativamente el gradiente diferencial por tratamiento y por gen (Romero y col., 2005).

De estos resultados surgieron genes candidatos de interés para su análisis de expresión diferencial, de los cuales 15 fueron seleccionados para validar mediante la técnica de PCR cuantitativa (qRT-PCR). Se confirmó el perfil transcripcional de 10 genes candidatos. De los restantes cinco genes, tres no amplificaron y los otros dos presentaron un perfil transcripcional contrastante con los resultados obtenidos en la micromatriz de ADNc analizada.

De acuerdo al análisis funcional predicho por comparación de secuencias con bases públicas, los genes candidatos especifi-

camente regulados en situaciones de estrés formarían parte de mecanismos de regulación involucrando factores de transcripción y traducción, proteínas relacionadas con procesos de degradación/plegado o interacción entre proteínas y enzimas asociadas a la síntesis de metabolitos secundarios y generación y procesamiento de especies reactivas de oxígeno. Como conclusión, se generó la primera micromatriz de ADNc para girasol a partir de la base de ESTs local con un diseño de tres réplicas biológicas para la evaluación de respuestas a dos estreses abióticos relevantes para el cultivo de girasol. Este es el primer trabajo reportado para estudios de expresión concertados en respuesta a salinidad en girasol, existiendo en la actualidad un solo trabajo publicado en girasol sobre respuesta a frío en condiciones de ensayo diferentes a las descritas en este trabajo (Hewezi y col., 2006).

Bibliografía:

- Camon y col. Comp. and Funct. Genom. 2003, 4:71-74.
- Di Rienzo y col. Infostat 2006® (www.infostat.com.ar).
- Eberwine y col. Methods Enzymol. 1992, 216:80-100
- Fernández y col. BMC Genomics 2003, 4:40.
- Hewezi y col. Journal of Experimental Botany 2006, doi:10.1093/jxb/erl080
- Paniego y col. Genome 2002, 45: 34-43.
- R-Project, [<http://www.r-project.org>]. Version 1.9.0(University of Auckland).
- Romero y col. Análisis de perfiles genéticos: elección de atributos. IV Congreso Latinoamericano de Biología Matemática, Tandil, Bs. As., Noviembre 2005.



Caracterización de genes candidatos para resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo de girasol

Lia, V.V.; Peluffo, L.; Hopp, E.; Vázquez Rovere, C.; Paniego, N. y Heinz, R.A.

Instituto de Biotecnología (IB), INTA, Castelar.

La podredumbre húmeda del capítulo de girasol (PHC) es la forma más devastadora de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, con una incidencia anual sobre la producción de la pampa húmeda del 10-20 %. Debido a la complejidad de la base genética de la resistencia a este patógeno, han cobrado relevancia estrategias centradas en el estudio de los factores determinantes de la patogénesis y de las respuestas de defensa del hospedante. Las germinas (GP) y proteínas de tipo germinas (GLPs) han sido frecuentemente vinculadas con el funcionamiento de la pared celular y con los mecanismos de defensa frente a patógenos. En el caso de la podredumbre de tallo (PHT), la expresión constitutiva de una germina, el gen de oxalato oxidasa de trigo, en plantas de girasol transgénicas fue utilizada con éxito como aproximación para conferir resistencia a la invasión del hongo (Hu y col. 2003).

Por otro lado, se ha descrito que la respuesta a PHT también estaría relacionada con la inducción de la síntesis de proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIPs) y defensinas (Regente y col. 1997; Urdangarín y col. 2000; Regente y de la Canal, 2000 y 2003; Hu y col. 2003). A partir del análisis de las colecciones, de ESTs desarrolladas en el IB (Fernandez y col. 2003) se identificaron secuencias con similitud a genes de otras

especies cuya función ha sido asociada con respuestas a estreses bióticos y/o abióticos. Entre estos candidatos se seleccionaron los transcriptos correspondientes a un gen de una proteína de tipo germina (HaGLP1) y a un inhibidor de poligalacturonasa (HaPGIP1) para validar experimentalmente su función biológica y evaluar su contribución a la tolerancia a PHC. En un estudio previo se detectaron diferencias en los niveles basales de expresión de HaGLP1 en capítulos de plantas susceptibles y resistentes inoculadas con el patógeno, siendo además la inducción de este gen más tardía en las primeras (Peluffo y col. 2004).

Como primera etapa en la caracterización estructural de los genes HaGLP1 y HaPGIP1 se utilizaron técnicas de RACE con el objeto de obtener la secuencia completa de los transcriptos correspondientes a líneas tolerantes (RHA801) y susceptibles (HA89) a PHC. La comparación de los datos de secuencia reveló la ausencia de sustituciones aminoacídicas entre líneas para HaGLP1 (220 aa) y una divergencia del 0,6 % para HaPGIP1 (331 aa). Ambos genes candidatos presentaron un intrón al ser amplificados a partir de ADN genómico y exhibieron una población de transcriptos de longitud variable (HaGLP1: 712-886 pb; HaPGIP1: 1116-1157pb), estando la totalidad de las diferencias de tamaño restringidas a la región 3' no codificante. El análisis de la

secuencia de aminoácidos correspondiente a HaGLP1 permitió verificar la presencia de los motivos conservados característicos de las GPs y GLPs. A fin de establecer la posición filogenética de la secuencia obtenida dentro de la familia de las GLPs se realizó un análisis de parsimonia incluyendo 98 representantes del grupo provenientes de diversas especies vegetales.

La topología resultante confirmó la asignación de HaGLP1 como GLP y dio lugar a la identificación de tres nuevos miembros de esta familia en girasol. Los cuatro GLPs de girasol presentan una similitud nucleotídica promedio del 51,6 % para la región codificante, mientras que al considerar la secuencia de aminoácidos esta cifra desciende a 44 %. En concordancia con lo esperado para proteínas de secreción al apoplasto, las predicciones *in silico* indican la existencia de un péptido señal en todas ellas.

El estudio de la abundancia de transcritos mediante la técnica de Northern Blot

reveló la existencia de diferencias temporales y finales en los niveles de expresión de materiales resistentes (RHA801, RHA275, HA853) y susceptibles (HA89). Actualmente se están realizando construcciones en vectores de transformación para evaluar la funcionalidad de estos genes candidatos en respuesta a *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas modelo como parte de la estrategia para explorar las bases de la resistencia al patógeno en el germoplasma de girasol.

Bibliografía:

- Fernández y col. (2003). BMC Genomics 4: 40.
- Hu y col. (2003) Plant Physiol. 133:170-81.
- Peluffo y col (2004). Congreso Argentino de Girasol. ASAGIR 2005. 31 de mayo y 1º de Junio de 2005, Buenos Aires Argentina.
- Regente y col. (1997). Physiol. Plantarum 100: 178-182.
- Regente y col. Physiol. Plantarum 110: 158-163.
- Urdangarin y col. (2000). Plant Physiol. Biochem. 38: 253-258.



Variabilidad en líneas de girasol de EEA Pergamino

Mancuso, N. y González, J.

INTA - EEA Pergamino. pergira@pergamino.inta.gov.ar

La variabilidad del germoplasma es una condición necesaria para el desarrollo de un programa de mejoramiento, y la evaluación de las líneas obtenidas permite estimar la orientación del mismo y hacer la re-orientación en caso necesario. La utilización del método de componentes principales permite determinar la contribución de los caracteres y su importancia relativa para ser usado como criterio de selección. El objetivo del presente trabajo fue estimar la variabilidad y/o divergencia de las líneas a través del método de componentes principales. Se sembraron 126 líneas (93 mantenedoras y 33 restauradoras de fertilidad) en la EEA Pergamino en las campañas 2001/2002, 2003/2004 y 2004/2005.

Los caracteres evaluados, utilizados para la descripción morfológica de las líneas, fueron: número de hojas, ancho, largo y relación ancho /largo de la lámina, largo del pecíolo, días a floración, diámetro del tallo y capítulo, días a floración, posición y forma de capítulo, largo de brácteas, relación largo brácteas/diámetro de capítulo, espesor del receptáculo, número de flores liguladas, largo y ancho de lígula, peso, ancho y largo de aquenio, porcentaje de aceite y pepita. Las observaciones se realizaron sobre 4 plantas en competencia completa. La ecuación de componentes principales para todas las líneas incluyendo altura, días a floración,

peso y número de aquenio, porcentaje de aceite y pepita explican el 40 % para CP 1 y el 24,6 % para CP 2. No observó patrón de agrupamiento en las líneas del programa de diferentes orígenes; excepto para las líneas Alto Oleico que se concentran alrededor de los caracteres porcentaje de aceite y pepita.

Cuando la ecuación restringe a los caracteres del aquenio (número, largo y ancho) y porcentaje de aceite y pepita, hay una mayor explicación de la CP 1 llegando al 53,4 % y CP 2 a 17,5 %, concentrando aún más las líneas de Alto Oleico en el cuadrante con los caracteres de aquenio. Se explicaría este comportamiento por el origen común de estas líneas siendo necesario la recurrencia a germoplasma de origen diferente para incrementar la variabilidad de las mismas.



Aptitud combinatoria de 4 líneas de girasol a *Verticillium dahliae*

Maranesi, D.¹ y Mancuso, N.²

¹UNR; ²INTA EEA Pergamino

En girasol, el secado anticipado y quebrado del tallo provocado por *Verticillium dahliae* Kleb (*Verticillium Wilt*) es la enfermedad más importante en Argentina. Fue reconocida por primera vez en nuestro país en 1965 y causa pérdidas de rendimiento de hasta 73 % en campos altamente infestados. Los microesclerocios sobreviven varios años en el suelo. Se estimó los efectos de Aptitud Combinatoria General y Específica entre cuatro líneas endocriadas de girasol (*Helianthus annuus* L.) para conocer su potencial utilización en la síntesis de híbridos y como progenitoras en programas de mejoramiento en relación al carácter en estudio. Se realizó un cruzamiento dialélico entre las cuatro líneas de girasol seleccionadas por su comportamiento a *V. dahliae*: 2 líneas resistentes de diferente origen: **KLM-214-b (4)** seleccionada del compuesto KLM (variedad Klein y locales Manfredi) desarrollada en la EEA Pergamino; y **V-112/E-1-1-2-1-1-3 (5)**: proveniente del cruzamiento entre la línea **V-112** (derivada de cruza intraespecíficas) con una línea de INIA La Estanzuela (Uruguay); y 2 líneas susceptibles derivadas del compuesto PGRK (pozo genético Ruso x Klein) desarrolladas en la EEA Pergamino: **RK-416/RK-456-1-5-2 (1)** y **RK-426-11-b (2)**. Las evaluaciones fueron realizadas a los estados fenológicos R4 y R6. Las líneas y los híbridos testigos mostraron similar comportamiento en los ensayos realizados en el infectario natural de la Chacra Experimental Bellocq y en el ensayo en condiciones de invernáculo e inocula-

ción artificial siguiendo el método de inyección de hipocótilo a la altura del primer entrenudo con una suspensión de conidios. No se identificó la raza del inoculo utilizado; se infiere que el inoculo presente en el infectario natural y el utilizado en la inoculación artificial pertenecen a la misma raza por el similar comportamiento de las líneas e híbridos testigos; asumiendo que pertenece a la raza Varg 1, la más abundante en Argentina. Se llevó a cabo un ensayo con tres repeticiones sembrado el 11 de Octubre de 2000 en el infectario natural de la Chacra Experimental Bellocq (partido de Carlos Casares), usando como testigos resistentes VDH-96 y P-64A41 y como susceptibles TRITON y MG2. La elección de las líneas se basó en evaluaciones previas. La escala utilizada para evaluar grado de severidad fue de 0 a 4. El cruzamiento entre líneas susceptibles se comportó como susceptible y entre líneas resistentes como resistente. Los cruzamientos entre progenitores resistentes y susceptibles se comportaron como susceptibles con excepción del cruzamiento 4x1 que se comportó como resistente. Este cruzamiento con un valor en su ACE negativo e importante que ratifica este comportamiento y corrobora el aporte de la línea 4 a la resistencia. Los efectos principales para Aptitud Combinatoria General (ACG) y Aptitud Combinatoria Específica (ACE) resultaron significativamente diferentes para los distintos genotipos. Dentro de las líneas susceptibles, la línea 2 muestra un efecto mayor de ACG que la línea 1, y dentro de las resistentes la línea 4 muestra un efecto de ACG mayor que la línea 5.



Podredumbre del capítulo de girasol. Identificación de QTL asociados a la resistencia a *Sclerotinia sclerotiorum*

Maríngolo, C.^{1,2*}; Troglia, C.¹; Nishinakamasu, V.³; Quiroz, F.¹;
Cervigni, G.⁴; Heinz, R.³; Paniego, N.³ y Escande, A.¹

¹Unidad Integrada Balcarce INTA-UNMDP, Ruta 226, Km 73,5, 7620. Balcarce.
²PICTO Asagir-Agencia, ³INTA-Castelar, ⁴UNS. *cmaringolo@balcarce.inta.gov.ar

La Podredumbre Húmeda del Capítulo del Girasol (PHC) causada por *Sclerotinia sclerotiorum* es la segunda enfermedad más importante del cultivo en la Argentina. Debido a que las formas de control químico, mediante agentes biológicos y rotaciones no es eficaz, es necesario intensificar la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia a PHC a través del uso de herramientas moleculares, ya que además presenta una base genética compleja y una alta interacción con factores ambientales. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar fenotípicamente la resistencia de una población de girasol y detectar regiones cromosómicas asociados a PHC en girasol (QTL) empleando marcadores moleculares microsátélites (SSRs) informativos. Se evaluó en ensayos de campo la incidencia y la intensidad de la enfermedad, en las líneas parentales con moderada resistencia (MR) y susceptibilidad (S), los híbridos F₁ y las familias F_{2,3}, mediante la inoculación de capítulos en estadio R 5.2 con una suspensión de ascosporas de *S. sclerotiorum*. Se trabajó en dos ambientes (secano-tapado post-inoculación y riego-sin tapar) con un diseño en Bloques Incompletos Aleatorizados con tres repeticiones. En una primera etapa de la caracterización genotípica se analizó la existencia de polimorfismos en las líneas parentales para un conjunto de 365 SSRs (Tang y col., 2003; Yu y col., 2003; Paniego y col., 2002; Poormohammad y col., 2006; 2007; Talía y col., comunicación perso-

nal). El 78 % de los pares de oligonucleótidos evaluados fue funcional en las condiciones ensayadas; de estos el 86 % amplificó un único producto de tamaño molecular esperado (283 SSRs). El 46 % fueron monomórficos para las líneas parentales analizadas y un 55 % fueron polimórficos; de estos el 6 % fue polimórfico dominante, detectándose un 48 % de SSRs codominantes informativos de los cuales 87 están confirmados y se genotipificaron en 96 individuos F₂ (**Tabla 1**). A partir de estos resultados se prosiguió el análisis con 63 SSRs. Los resultados indican que el nivel de polimorfismo observado es alto, si se compara con los niveles esperados dentro del germoplasma cultivado de girasol, que es de aproximadamente 30 %. Del conjunto de 63 marcadores informativos identificados, la mayoría de los cuales estaban previamente localizados en un mapa público de girasol (Tang y col., 2003; Yu y col., 2003), segregaron en los mismos grupos de ligamiento, permitiendo estandarizar la nomenclatura a partir de los SSRs comunes a ambos mapas y están representados 16 de los 17 grupos de ligamiento descritos para girasol. En la segunda etapa del análisis genotípico se generó un mapa genético parcial utilizando sólo los SSRs que se ajustaron a la segregación mendeliana esperada (24 SSRs). Este mapa consta de seis grupos de ligamiento (GL) que pueden ser asociados al mapa consenso recientemente reportado (Poormohammad K S y col., 2007). La asociación de

Tabla 1. Número total y porcentajes de SSR correspondientes a cada una de las categorías identificadas

	Total de SSR	% de SSR
SSR que no amplificaron	82	
SSR que amplificaron	283	
monomórficos	129	45,6
polimórficos dominantes	18	6,4
polimórficos codominantes	136	48,1
codominantes dudoso	50	
codominantes informativos	86	30,4
codominantes informativos altamente complejos	23	
codominantes informativos	63	100
codominantes informativos segregación distorsionada	39	62
codominantes informativos segregación 1:2:1 esperada	24	38

estos marcadores con la caracterización fenotípica en el campo (Trogliá y col., 2005; Maringolo y col., 2005) permitió la identificación de tres QTL inéditos de resistencia, con valores altamente significativos (LOD de 2,56; 3,4 y 4,4), los cuales se hallan asociados al GL 10 del mapa consenso. Estos resultados profundizan el conocimiento sobre la variabilidad de la resistencia a la podredumbre del capítulo en los materiales de cultivo, identifican marcadores moleculares neutros para las distintas fuentes de resistencia al patógeno y generan así herramientas que (junto con los estudios desarrollados por este grupo interdisciplinario) permitirán en el futuro desarrollar estrategias moleculares para asistir en la selección por este carácter.

Financiamiento: ANPCYT/PICTO ASAGIR-Agencia 13165, INTA y UNMdP

Bibliografía:

- Maringolo C, Trogliá C (ex-aequo) y Escande A. 2005. Identificación de resistencia a Podredumbre Húmeda del Capítulo de girasol por *Sclerotinia sclerotiorum* mediante marcadores moleculares. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. 19-22 de Abril de 2005. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. Pág. 294.
- Maringolo C, Trogliá C, Quiroz F, Escande A. 2005. Identificación de fuentes diversas de resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo (*Sclerotinia sclerotiorum*): desarrollo

y evaluación de poblaciones para el mapeo de QTLs. III Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Junio de 2005. www.asagir.org.ar

- Paniego N, Echaide M, Muñoz M, Fernández L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Carrera M, Zandomeni R, Suárez E Y, and Hopp H E. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus L.*) Genome 45: 34–43.
- Poormohammad Kiani S, Grieco P, Maury P, Hewezi T, Gentsbittel L, Sarrafi A. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus L.*). Theor Appl Genet 114:193–207.
- Tang, S., Kishore, V. K. and Knapp S. J. 2003. PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower. Theor Appl Genet 107:6–19.
- Trogliá C, Maringolo C (ex-aequo) y Escande A. 2005. Caracterización fenotípica de podredumbre húmeda del capítulo por *Sclerotinia sclerotiorum* en dos poblaciones de girasol. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. 19-22 de Abril de 2005. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. Pág. 328.
- Yu J, Tang S, Slabaugh, M, Heesacker, A, Cole G, Herring, M, Soper, J, Han, F, Webb, D Thompson, L, Edwards, K, Berry, S, Leon, A, Grondona, M, Olungu, G, Maes, N and Knapp, S. 2003. Towards a Saturated Molecular Genetic Linkage Map for Cultivated Sunflower. Crop Sci.: 43:367–387.



Metodologías no convencionales para la selección por resistencia a imidazolinonas

Nestares, G.*; Vega, T.; Breccia, G.; Cravero, V.; Zorzoli, R.¹ y Picardi, L.¹

Cátedra de Genética, Fac. Cs. Agrarias, ¹CIUNR, Universidad Nacional de Rosario. CC14 (S2125ZAA) Zavalla, Santa Fe. * gnestare@fcagr.unr.edu.ar

Proyecto financiado por: ANPCyT-ASAGIR. PICTO 08-13163: «Selección de genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.) resistentes a imidazolinonas por metodologías no convencionales» Director: Dra. Liliana Picardi.

Las imidazolinonas son un grupo de herbicidas que permiten el control de un amplio espectro de malezas y son efectivos a bajas dosis de aplicación dada su alta potencia biológica. Esta familia de herbicidas actúa interrumpiendo la biosíntesis de un tipo de aminoácidos que producen sólo las plantas, los animales deben obtenerlos de la dieta. A su vez, como esta vía no se encuentra en mamíferos, estos herbicidas son de baja toxicidad para el hombre. El girasol es sensible a imidazolinonas. Sin embargo, en el año 1998, en Kansas (EE.UU.) se descubrieron plantas de girasol resistentes a estos herbicidas. Se trataba de plantas silvestres que convivían como malezas en lotes de otros cultivos. La resistencia a imidazolinonas proviene de una fuente que existe en la naturaleza, es decir no transgénica, ya que los genes de resistencia de estas plantas fueron transferidos por cruzamientos convencionales a la especie cultivada. Estos nuevos materiales con resistencia se encuentran disponibles para el desarrollo de cultivares híbridos. Para lograr un híbrido resistente se deben incorporar los genes de resistencia a las dos líneas proge-

nitoras de este híbrido, lo cual demanda una gran cantidad de esfuerzos en lo que se refiere a identificación y selección de individuos. El objetivo del presente proyecto es el desarrollo de bioensayos para la selección de materiales élite de girasol resistente a imidazolinonas que complementen los programas de mejoramiento convencional. Se dispone de líneas con distinto grado de resistencia (resistente, intermedio y sensible) las cuales se evaluarán bajo distintos sistemas *in vitro* en presencia del herbicida. Acerca de la metodología implementada, cabe aclarar que el término «*in vitro*» significa en condiciones de ambiente controlado. Se han puesto a punto dos tipos de test germinativos, que implican la incubación de las semillas por un lapso de ocho días, utilizando como soporte medio de cultivo solidificado con agar o germinadores multimaceta con perlita. Se estableció la dosis de herbicida que permite discriminar entre plantas resistentes, intermedias y sensibles por simple inspección visual de las raíces durante la primera semana de incubación. Por otra parte se están estudiando otros sistemas de selección *in vitro* en los que se utilizan pequeñas muestras de tejidos vegetales. Estas metodologías permitirían seleccionar en forma rápida y sencilla un gran número de plantas en etapas tempranas del desarrollo, lo cual reduciría el tiempo y la cantidad de material a evaluar en los programas de mejoramiento.

Transformación genética de girasol con genes antifúngicos

Radonic, L.M.; Zimmermann, J.M.; Zavallo, D.; López, N. y López-Bilbao, M*

Instituto de Biotecnología, INTA Castelar. *mlopezbilbao@cniia.inta.gov.ar.
Los autores Radonic y Zimmermann colaboraron por igual en este trabajo.

Argentina es el primer exportador mundial de aceite de girasol y se siembran en promedio 2.400.000 ha produciendo un total de 4.000.000 t de grano y 1.600.000 t de aceites. Una importante limitación en este cultivo son las enfermedades provocadas por hongos, fundamentalmente la podredumbre del capítulo y la verticilosis, causadas por los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae*, respectivamente, las que además de disminuir el rendimiento, afectan la calidad de los productos.

El mejoramiento genético convencional no ha sido eficiente para incorporar resistencia a estas enfermedades, en parte por las limitadas fuentes efectivas de resistencia genética a los principales patógenos y además por el carácter poligénico de la resistencia frente a patógenos. Existe desde hace más de una década, la sólida evidencia de que la sobre-expresión de transgenes codificantes para proteínas antifúngicas pueden conferir protección frente al ataque de patógenos y que esta protección se ve aumentada debido al efecto sinérgico de la expresión de dos o más genes (Brogie y col., 1991; Melchers y col., 1993). El objetivo final de este trabajo es obtener plantas de girasol que expresen al menos dos genes antifúngicos y luego evaluar el comportamiento de las líneas obtenidas. Se utilizó el método de transformación desarrollado en el Instituto de Biotecnología (Radonic y col., 2006) y se trans-

formaron explantos del genotipo público HA89.

Los genes utilizados codifican para dos enzimas que degradan la pared fúngica (glucanasa y quitinasa), una osmotina y una proteína inhibidora del ensamblado de los ribosomas del patógeno. Se utilizaron dos estrategias diferentes basadas en la utilización de distintos vectores de transformación para la introducción de los genes antifúngicos. En el primer esquema el vector posee dos cassettes de expresión de los genes de interés, que por lo tanto se expresan de a pares, además de expresar el gen marcador *nptII*, esta estrategia ya fue utilizada con éxito en otras especies vegetales (Vellicce y col., 2005) En la segunda estrategia, el vector se basa en la capacidad de la proteasa codificada por el gen N1a de un potyvirus de autoclirse y reconocer secuencias específicas de clivado.

En este sistema los cuatro genes de interés se traducen en una única poliproteína bajo la regulación de un único promotor flanqueado por la secuencia de reconocimiento de dicha proteasa, esperando obtener niveles de expresión equimolares de los mismos (Ceriani y col., 1998).

En este trabajo se observó una alta dependencia con el ADN que se quiere introducir y una considerable inestabilidad genética, donde plantas T1 que expresan el transgen lo pierden en la siguiente generación (características ya descritas no sólo en la especie girasol sino también dentro



del grupo taxonómico de las Compuestas al que pertenece esta especie).

El volumen del trabajo realizado corroboró la eficiencia del método de transformación y selección en presencia de kanamicina donde no se obtuvieron escapes, ya que todos los brotes capaces de enraizar *in vitro* en presencia del antibiótico resultaron portadores del transgen. La construcción doble capaz de expresar los genes de glucanasa y quitinasa mostró una eficiencia del 1,05% en la producción de brotes transgénicos. La T1 y T2 de estas líneas están siendo caracterizadas molecularmente y permitirán analizar la respuesta frente a patógenos en ensayos de desafío en condiciones controladas.

Bibliografía:

- Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ and Broglie R (1991) *Rhizoctonia Solani Sci* 254: 1194–1997.
- Ceriani MF, Marcos JF, Hopp HE, Beachy RN. (1998). *Plant Mol Biol* 6[2]:239-48
- Melchers LS, Sela-Buurlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, Van Roekel JSC, Pen J, van den Elzen PJM and Cornelissen BJC (1993) *Plant Mol Biol* 21: 583–593.
- Radonic LM, Zimmermann JM, Zavallo D, López N, López Bilbao MG. (2006) *Electronic J. of Biotechnology* , Vol 9 (3): 315-319.
- Vellicce G, D'Yaz Ricci J, Hernández L, Castagnaro A. (2006) *Transgenic Research* 15:57–68.

Desarrollo de un mapa genético y físico de girasol integrando marcadores neutros y funcionales

Talia, P.¹; Díaz Quijano, C.²; Nishinakamasu, V.¹; Montenegro, A.¹; Hopp, H.E.¹; Greizertein, E.²; Heinz, R.¹; Poggio, L.² y Paniego, N.¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, CICVyA, Instituto de Biotecnología, CC 25 (B1712WAA) Villa Udaondo. Pcia. de Buenos Aires, Argentina.
²Laboratorio de Citogenética y Evolución, Dep. de Ecología, Genética y Evolución.

En este trabajo se presenta la búsqueda de marcadores funcionales, la construcción de un mapa genético de referencia sobre una población de líneas recombinantes endocriadas de girasol cultivado y el establecimiento de técnicas de citogenética molecular para definir la correlación cromosómica de los grupos de ligamiento de interés mediante la localización física de regiones codificantes y no codificantes por medio de técnicas de hibridación in situ como FISH (Fluorescent in situ hybridization) y/o Prins (Primed in situ labelling). Para la construcción del mapa genético se trabajó sobre el mapa público descrito por Al-Chaarani et al. (2004) sobre una población de 123 RILs obtenidas del cruzamiento de RHA266 x PAC2 sobre el cual se incorporaron 157 SSRs se obtuvo un mapa de AFLPs-SSRs (S. P. Kiani et al., 2007) que sirve de marco para el mapeo progresivo de marcadores codominantes (SSRs fundamentalmente), y la incorporación de marcadores funcionales como EST-SSRs, INDELS y SNPs.

La identificación de marcadores funcionales de tipo EST-SSRs se llevó a cabo mediante el análisis de 36.741 genes tentativos (TC) definidos en el Índice de Genes de girasol cultivado (HAGI; www.dana.farber) utilizando los programas de distribución pública «SSR Discovery» (La Trobe, University, Victoria, Australia)

y CUGI-SSR. Sobre un total de 1134 SSR identificados se seleccionaron 127 para los que se diseñaron indicadores para su amplificación por la técnica de PCR. Un 18 % de los EST-SSRs analizados resultaron funcionales e informativos para los parentales de la población en estudio. Los datos de genotipificación de 14 SSR-EST y 3 InDels sobre 94 RILs fueron incluidos en una matriz de datos general que contiene 410 AFLPs y 234 SSRs, obteniéndose un mapa que integra 511 marcadores (197 SSRs, 9 EST/SSR, 1 InDely 304 AFLPs) en 17 grupos de ligamiento. A partir de estos datos se estimó una densidad promedio de 3.7 cM por locus cubriendo 1824.6 cM del genoma de girasol. Este valor representa una cobertura de 96 % del genoma de girasol estimado según el método de Chakravarti et al. (1991).

La mayoría de los marcadores previamente localizados en el mapa público de girasol de Tang et al. (2002) segregaron en los mismos grupos de ligamiento permitiendo estandarizar la nomenclatura a partir de los SSRs comunes a ambos mapas.

Con el fin de establecer la correlación del mapa genético con el mapa físico de girasol se seleccionaron un conjunto de 32 microsatélites distribuidos en 3 grupos de ligamiento para ser mapeados con la técnica de BAC-FISH en los cromosomas de girasol. La secuencia genómica de estos marcadores fue analizada con el



programa «overgo 1.021 program» (<http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu>) para diseñar sondas de tipo overgo («overlapping oligonucleotide»). Las mismas fueron marcadas con nucleótidos radiactivos y combinadas en grupos de hasta doce sondas para la búsqueda de clones de BACs usando una genoteca comercial (HA_HBa; CUGI BAC/EST Resource Center) que consta de 11 filtros y representa 8,3 veces el tamaño del genoma de girasol. Se identificaron seis clones de BAC que contienen cinco marcadores microsatélites respectivamente y que representan a los 3 grupos de ligamiento seleccionados inicialmente. De manera preliminar en el Laboratorio de Citogenética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA se realizó la técnica de BAC-FISH para uno de estos clones dando como resultado una

señal en la región satélite de un cromosoma submetacéntrico.

Bibliografía:

- S.P. Kiani et al., Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments, *Plant Sci* (2007), doi:10.1016/j.plantsci.2006.12.007.
- Tang et al., Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor Appl Genet* (2002), 105:1124–1136.
- Chakravarti et al., A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* (1991), 128:183-193.
- G. Rachid Al-Chaarani et al., Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* (2004), 109: 1353-1360.

Aptitud de plantas de girasol silvestre y de sus híbridos con girasol cultivado IMI resistente

Ureta, M.S.^{1,2}; Presotto, A.^{1,2}; Cantamutto, M.^{1,3}; Carrera, A. D.^{1,2} y Poverene, M.^{1,2}

¹Dpto. Agronomía UNS ²CERZOS-CONICET ³Centro UdL-IRTA, Lleida, España

La tecnología *Clearfield*®, que otorga tolerancia a principios activos de la familia imidazolinonas, proveniente de una mutación natural en plantas de girasol silvestre, ha sido incorporada recientemente en el cultivo comercial de girasol. *Helianthus annuus* silvestre es una invasora naturalizada en nuestro país que comparte grandes extensiones y el ciclo de floración con el cultivo. Se aplicó el herbicida imazapir en el estadio de cuatro hojas en una dosis de 160g p.a./ha a plantas de cinco poblaciones naturalizadas de *H. annuus* y a descendientes F1 de plantas de las mismas poblaciones polinizadas manualmente con un híbrido comercial tolerante.

En las poblaciones silvestres se registró un 2 % de sobrevivientes sobre un total de 307 plantas, mientras que la supervivencia de la F1 aumentó al 38 % en 350 plantas (Ureta et al. BAG 17, 2006).

El objetivo de este estudio fue comparar la aptitud biológica de plantas silvestres y sus descendientes F1 y R1. En 2005-06 se realizaron en el campo experimental del Depto. Agronomía UNS retrocruzas entre plantas F1 IMI-resistentes y su parental cultivado, *DK3880CL* (R1). En 2006-07 se evaluaron conjuntamente en el campo experimental, plantas F1, R1 y plantas silvestres de las respectivas poblaciones naturales, en un ensayo completa-

mente aleatorizado sin competencia. Las variables registradas fueron: número y diámetro de capítulos, número de semillas llenas y vanas. Las plantas silvestres de las cinco poblaciones se diferenciaron de las F1 por tener mayor número de capítulos, pero las F1 tuvieron en general un mayor tamaño de capítulo.

Se encontraron diferencias altamente significativas entre las poblaciones y las F1 con respecto al número de semillas llenas. Las poblaciones puras no difirieron en el porcentaje de semillas cuajadas, que fue significativamente mayor que en cuatro de las cinco F1.

La comparación de cada una de las poblaciones silvestres y sus correspondientes F1 mostró diferencias altamente significativas en el número de capítulos, número de semillas llenas y porcentaje de semilla cuajada, tres importantes componentes de la aptitud en estadio reproductivo (**Tabla 1**).

La regresión del número de semillas llenas respecto al diámetro de capítulo agrupando las poblaciones y sus híbridos mostró que la relación fue mucho mayor en las poblaciones puras.

En las F1 el aumento en diámetro del capítulo no fue acompañado de mayor número de semillas llenas (**Figura 1**).

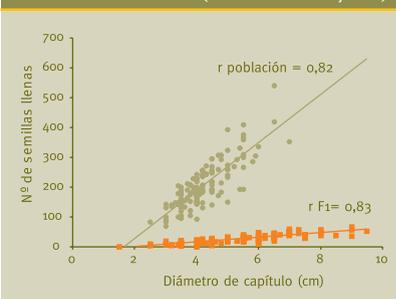


Tabla 1 Comparación de caracteres reproductivos entre poblaciones de *H. annuus* silvestre y sus respectivas F1 por cruzamiento con un híbrido comercial IMI resistente. Medias seguidas de distinta letra indican diferencias altamente significativas luego de la prueba de Kruskal-Wallis

Población/F1	Nº semillas llenas	% semillas cuajadas	Diámetro capítulo	Nº capítulos
Diamante	190,8 b	84,0 b	3,9 a	109,6 b
F1	30,2 a	65,1 a	5,6 b	26,5 a
Río Cuarto	186,6 b	84,6 b	4,0 a	152,9 b
F1	33,7 a	64,3 a	6,4 b	30,8 a
Las Malvinas	262,3 b	84,2 b	4,7	106,7 b
F1	23,6 a	61,0 a	5,0	31,7 a
Colonia Barón	200,0 b	85,6 b	4,1 a	127,0 b
F1	35,0 a	72,1 a	6,2 b	26,2 a
Adolfo Alsina	199,0 b	82,5 b	4,4	126,7 b
F1	20,5 a	61,0 a	4,8	28,3 a

La retrocruza con el parental cultivado IMI aumentó el número de semillas llenas con respecto a la F1, encontrándose diferencias altamente significativas entre las plantas silvestres, las F1 y las R1, en tanto no afectó el número ni el tamaño de los capítulos. El carácter IMI difundiría rápidamente en la población silvestre y las plantas F1 tendrían menor aptitud biológica aunque resta comprobar si esta se recupera en las siguientes generaciones como lo indicaría la R1.

Figura 1 Regresión del número de semillas y el diámetro del capítulo en plantas silvestres (símbolos grises) y F1 del cruzamiento con un híbrido comercial IMI resistente (símbolos anaranjados)



Búsqueda y caracterización de genes que se expresen en semilla de girasol

Zavallo, D.; Peluffo, L.; Hopp, H.E.; López Bilbao, M. y Heinz, R.*

Instituto de Biotecnología CNIA INTA CC25 Castelar, Buenos Aires, Argentina.
* rheinz@cnia.inta.gov.ar

La identificación de promotores, que definan un patrón de expresión espacio-temporal específico es fundamental para la generación de plantas transgénicas en la producción de compuestos farmacéuticos (*Molecular Farming*) y alimentos nutraceuticos, siendo las semillas un «embalaje» muy conveniente para este fin. Se propuso como objetivo de trabajo buscar regiones promotoras capaces de dirigir la expresión de transgenes en semillas de girasol. Los genes candidatos elegidos son el gen Ha-LTP5, que codifica para una proteína de transferencia de lípidos (Regente y de la Canal, 2003), el gen FAD2-1 que codifica para una oleato desaturasa (Martínez-Rivas y col., 2001) de girasol, y un gen correspondiente a una secuencia expresada parcial o «EST» (BU6711910) (Fernández y col., 2003) que por análisis comparativo de secuencias presenta similitud con una nsLTP. El cDNA completo de la nsLTP fue clonado por la técnica de 5'RACE. Se realizó un perfil de abundancia de transcritos basado en la técnica de RT-PCR con oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar cada secuencia candidato. Los perfiles de expresión fueron confirmados mediante experimentos de Northern blot, utilizando sondas radioactivas específicas de cada gen.

Para determinar la especificidad de la expresión de estos genes candidatos se analizaron distintos órganos de la línea HA89: hoja (H) y tallo (T) de planta adulta (3 meses de edad), botón floral en estadio

(R1), (R2) y (R3) y semilla seca (S). En los ensayos de RT-PCR y Northern blot no se observó amplificación o señal radioactiva, en los órganos vegetativos para ninguno de los tres genes. El gen Ha-LTP5 solo presenta expresión en semilla seca (S) mientras que los genes FAD2-1 y nsLTP también lo hacen en los estadios de botón floral. La expresión específica en semilla seca (S) del gen Ha-LTP5 lo posiciona como candidato para los objetivos del trabajo.

Sin embargo los otros genes, al expresarse durante el desarrollo floral y en semilla resultan interesantes para el aislamiento y caracterización de su región promotora ya que podrían estar involucrados en el periodo de llenado de grano.

Para determinar tanto el momento del desarrollo como la extensión de la etapa de expresión de estos genes y así poder establecer una asociación con el periodo de llenado de grano, es necesario evaluar un número mayor de estadios de desarrollo. Una vez determinados estos genes candidatos se relevará una genoteca de girasol construída en BACs (Gentzbittel y col., 2002; CUGI, Clemson University, USA <http://www.genome.clemson.edu/>).

Los clones BAC positivos se caracterizarán, subclonarán y secuenciarán para la identificación de las regiones promotoras, trabajo que se está realizando en paralelo con esta caracterización de genes. Luego de su obtención, se generará una serie de



deleciones por digestión con endonucleasas y se realizarán construcciones utilizando distintos fragmentos de la región promotora fusionados a genes indicadores con el fin de caracterizar cajas de regulación temporal/espacial en dichas regiones promotoras.

Bibliografía:

- Fernández P, Paniego N, Lew S, Hopp HE, Heinz R Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project. *BMC Genomics* 2003, 4:40 (2003).

- Gentzbittel L, Abbott A, Galaud J.P, Georgi L, A bacterial artificial chromosome (BAC) library for sunflower, and identification of clones containing genes for putative transmembrane receptors. *Mol. Genet. Genomics* 266: 979-987 (2002).
- Regente M, de la Canal L, A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *J. Plant Physiol.* 160. 201–203 (2003).
- Martínez-Rivas J, Sperling P, Lühs F and Heinz E, Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* 8: 159–168, (2001).

