

**Construcción de un Mapa Genético de Girasol *Helianthus annuus* L. basado en marcadores AFLP's.**

FRANCISCO CASTILLO REYES

**T E S I S**

Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de:  
**Maestro en Ciencias**  
en Fitomejoramiento



**Universidad Autónoma Agraria  
"Antonio Narro"**

Programa de Graduados  
Buenavista, Saltillo, Coah.,  
Abril de 2005.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**Construcción de un Mapa Genético de Girasol *Helianthus annuus* L.  
basado en marcadores AFLP.**

**TESIS**

POR  
FRANCISCO CASTILLO REYES

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada  
como requisito parcial, para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**

COMITE PARTICULAR

Asesor principal: \_\_\_\_\_  
Dr. M. Humberto Reyes Valdés.

Asesor: \_\_\_\_\_  
Dr. Juan Manuel Martínez Reyna.

Asesor: \_\_\_\_\_  
Dr. Octavio Martínez de la Vega.

\_\_\_\_\_  
Dr. Jerónimo Landeros  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Abril 2005.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. M. Humberto Reyes Valdés, por sus consejos, comentarios, comprensión, paciencia y amistad.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Reyna, por sus consejos, comentarios y amistad.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega, por sus consejos, comentarios y amistad.

Al M.C. A. Patricia García V., LCN Martha Gómez y al Sr. Miguel A. Rodríguez por su colaboración y por su amistad.

Al Biol. Fernando Hernández (el güero) y Emigdia Alfaro (Laboratorio de Genética CINVESTAV, Gto) por su colaboración intensa en la realización de este trabajo y por su amistad.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera (Facultad de C. Químicas de U. A. de C) por su amistad y acertadas sugerencias.

A mis compañeros y amigos del programa de graduados en Fitomejoramiento coincidentes en el periodo 2002-2003.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de CONACYT (Proyecto clave 39035-B correspondiente a la convocatoria 2002).

## **DEDICATORIA**

### ***A MI FAMILIA***

A mi esposa Claudia Adriana, por su impulso y comprensión. A mi Hija Valeria Rubi por todo lo que representan en mi vida y por todo el tiempo que les debo.

### ***A MIS PADRES***

Don Horacio y Doña Carmen, a quien debo lo que soy, por su amor, consejos, cuidados y sacrificios.

### ***A MIS HERMANOS***

Maria Elena, Mirtha Arely, José Soriel y Víctor Ramón.

### ***A MIS MAESTROS DE TODA LA VIDA***

Por tenderme la mano y sus conocimientos.

## COMPENDIO

**CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) BASADO EN MARCADORES AFLP's.**

**POR**

**FRANCISCO CASTILLO REYES**

**MAESTRIA EN CIENCIAS  
FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. ABRIL 2005.**

**Dr. M. Humberto Reyes Valdés -Asesor-**

**Palabras clave: Girasol, AFLP, Mapa genético, Cruza inter-subespecífica.**

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de construir un mapa genético en girasol basado en marcadores AFLP. El material biológico fue la población de mapeo, "Correcaminos F<sub>2:3</sub>", constituida por 149 líneas F<sub>2</sub> en F<sub>3</sub> derivadas de una cruce entre *H. annuus* L. var. *macrocarpus* (HA 89) y *H. annuus* L spp. *texanus* (Ac-8-2).

Se hizo la extracción del ADN de cada línea por la metodología de Doyle y Doyle (1990), en el Laboratorio de Análisis de Genomas de la Universidad

Autónoma Agraria Antonio Narro. Los marcadores AFLP se efectuaron en el CINVESTAV-Irapuato, bajo el protocolo de Vos *et al.* (1995).

La base de datos consistió de 295 loci marcadores obtenidos de 11 combinaciones con iniciadores selectivos en 145 líneas. Esta se analizó en Matemática 5.0 (Wolfram, 2003) para conocer el tipo de segregación, origen de banda y distorsión. Finalmente se seleccionaron 208 loci y 133 líneas para análisis de mapeo.

El análisis de mapeo efectuado en Joinmap 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001), arrojó como resultado 17 grupos de ligamiento con un LOD score de 3.0 y una frecuencia de recombinación máxima de 0.45. El mapa obtenido cubre 581.452 cM Kosambi y de acuerdo con los diferentes mapas publicados, equivale aproximadamente al 43.37por ciento del promedio del genoma de *H. annuus*. Las longitudes de los 17 grupos de ligamiento variaron entre 21 y 65 cM;

En este trabajo se obtuvo el primer mapa de girasol a partir del cruzamiento entre girasol cultivado y silvestre (*H. annuus* var. *macrocarpus* x *H. annuus* ssp. *texanus*). Es un mapa genético de baja densidad, con una distancia promedio entre loci marcadores de 14.65 cM. Esta densidad es apta para realizar estudios de detección de QTL's.

El mapa generado contribuirá al conocimiento del genoma del girasol cultivado y será útil en programas de mejoramiento de girasol dirigidos a la introgresión de material silvestre.

## ABSTRACT

**Construction of an AFLP's based Genetic map of sunflower (*Helianthus annuus* L.).**

**BY**

**FRANCISCO CASTILLO REYES**

**MASTER OF SCIENCES  
PLANT BREEDING**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. APRIL 2005.**

**Dr. M. Humberto Reyes Valdés - Advisor -**

**Key words: Sunflower, AFLP, inter-subspecific cross.**

This work was developed to construct a sunflower genetic map based on AFLP markers. The mapping population was "Correcaminos F<sub>2:3</sub>", composed by 149 lines F<sub>2</sub> on F<sub>3</sub> inbred lines, derived from a cross *H. annuus* L. var. *macrocarpus* (HA 89) and *H. annuus* L spp. *texanus* (Ac-8-2).

DNA was isolated from each line with method of Doyle and Doyle (1990), in the Laboratory of Genomes Analysis of Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. The AFLP protocol was carried out in CINVESTAV-Irapuato, with the method outlined by Vos *et al.* (1995).



The database was composed by 295 marker loci obtained with 11 combinations of selective primer in 145 lines. The data was initially analyzed with Mathematica 5.0 (Wolfram, 2003) to check segregation type, band origin and distortion. Finally, 208 loci and 133 lines were selected for mapping.

The map construction was carried out in Joinmap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001). A total of 17 linkage groups were obtained with a LOD score of 3.0 and maximum recombination rate to 0.45. This map, covers 581.452 Kosambi centimorgans and according to different published maps, it represents approximately 43.37percent of the average *H. annuus* genome. The lengths of the 17 groups were in the range 21-65 cM.

This work produced the first sunflower map obtained from a cross between cultivated and wild sunflower (*H. annuus* var *macrocarpus* x *H. annuus* ssp. *texanus*). It is a low-density map, with an average distance between loci of 14.65 cM. This density is enough to detect putative QTLs.

This map will contribute to the knowledge of the sunflower genome, and it will be useful in sunflower breeding programs aimed to wild genome introgression.

## INDICE DE CONTENIDO

	PAGINAS
<b>INDICE DE CUADROS.....</b>	xi
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	1
<b>II. REVISION DE LITERATURA.....</b>	3
Origen del girasol cultivado.....	3
Taxonomía.....	4
Marcadores genéticos moleculares.....	5
Mapas genéticos.....	6
Generalidades.....	6
Construcción de un mapa genético.....	8
Distancia mapa.....	9
Tipos de poblaciones de mapeo.....	9
Mapas genéticos en girasol.....	10
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Población de mapeo.....	15
Caracterización molecular.....	15
Extracción de ADN.....	15
Marcadores genéticos moleculares.....	18
Digestión- Ligación.....	18
Primera amplificación.....	20
Segunda amplificación.....	22
Electroforesis.....	24
Construcción del mapa genético.....	25
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	27
Análisis genético de marcadores.....	28
Análisis de ligamiento.....	29
Tamaño del mapa y cubrimiento del genoma.....	37
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	38
<b>VI. RESUMEN.....</b>	39
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	41

## INDICE DE CUADROS.

<b>Cuadro No.</b>		<b>PAGINAS</b>
2.1	Integración y expansión del genoma de girasol por Yu <i>et al.</i> (2003).....	13
2.2	Mapas genéticos en girasol.....	14
3.1	Mezcla para digestión.....	19
3.2	Mezcla para ligación.....	20
3.3	Mezcla de amplificación.....	21
3.4	Programa para la primera amplificación.....	21
3.5	Combinaciones de primer.....	22
3.6	Mezcla para la amplificación selectiva.....	23
3.7	Programa para la amplificación selectiva.....	23
4.1	Bandas obtenidas por combinación AFLP.....	27
4.2	Grupos de ligamiento y posición de locus dentro de cada grupo en cM para el mapa genético.....	29
4.3	Número y densidad de loci marcadores por grupo de ligamiento.....	32
4.4	Loci polimórficos totales y número de loci mapeados en cada combinación.....	35

## INDICE DE FIGURAS.

Figura No.		PAGINAS
1	Mapa genético de girasol de 133 líneas F3:F2 de derivadas de la cruza de HA89 x Ac-8-2 con marcadores AFLP. El agrupamiento fue con base a un lod de 3.0, la distancia mapa fue estimada por la función Kosambi.....	33

## INTRODUCCION

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus* Ckll), especie diploide anual ( $2n = 2X = 34$ ), es una de las principales fuentes para extracción de aceite de alta calidad en el mundo, ya que es un cultivo ampliamente adaptado a diversas áreas geográficas, desde subtropicales hasta subárticas (Jan *et al.*, 1998; Lawson *et al.*, 1998).

México cuenta con un gran reservorio de material genético silvestre relacionado con el girasol cultivado. Este puede aprovecharse con fines de mejoramiento genético para conferir a los cultivares características de resistencia a plagas, tolerancia a sequía, esterilidad citoplásmica, calidad de aceite y proteína, etc. Entre dicho material se encuentran las especies *H. ciliaris*, *H. laciniatus*, *H. maximiliani*, *H. niveus*, *H. petiolaris* y *H. annuus*, con predominancia de *H. annuus*. Además, están presentes los géneros *Tithonia* y *Viguiera*, ambos emparentados con *Helianthus*. (Gómez y González, 1994; Reyes-Valdés, 2000). Para el área de Saltillo, Coahuila se ha colectado girasol silvestre identificado como *H. annuus* L. ssp. *texanus* (Reyes-Valdés *et al.*, 2000).

Una de las herramientas más poderosas en el aprovechamiento de los recursos genéticos silvestres son los mapas genéticos basados en marcadores

de ADN. Estos marcadores tienen múltiples aplicaciones: localizar y analizar el efecto de loci de caracteres cuantitativos (QTL), utilizar loci marcadores para selección, comparar genomas de especies diferentes y aislar y clonar genes con fines de transformación.

Esta investigación se realizó con el objetivo de construir un mapa genético de girasol con marcadores basados en el polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP) a partir de una población  $F_2$  derivada de una cruce entre *H. annuus* L. var. *macrocarpus* y *H. annuus* L spp. *texanus*

La construcción de un mapa genético basado en una cruce de girasol cultivado con silvestre, contribuirá al conocimiento del genoma del girasol cultivado al permitir la localización y análisis de loci que controlan características relacionadas con la domesticación. Además de la contribución básica al conocimiento genético del girasol, la generación de loci marcadores ayudará a su mejoramiento genético a través de la introducción de características silvestres a los cultivares auxiliada por técnicas moleculares.

## REVISIÓN DE LITERATURA.

### Origen del girasol cultivado.

Antes de la colonización humana en Norte América, *Helianthus annuus* estaba restringido en forma silvestre a lo que hoy es el sureste de los Estados Unidos (Heiser, 1978). En lo que respecta al girasol cultivado, se han encontrado aquenios en investigaciones arqueológicas realizadas en la parte central de Estados Unidos (Seiler y Rieseberg, 1997). Por otro lado, las nuevas evidencias reportadas por Lentz *et al.* (2001) sugieren que el girasol fue domesticado antes en México, aunque se postula que puede ser un origen separado al de los Estados Unidos (Piperno 2001; Burke, *et al.* 2002). Esta idea del origen de domesticación múltiple entra en conflicto con los resultados del análisis de aloenzimas y ADN de cloroplastos, que indica un virtual monomorfismo en las líneas cultivadas y sugieren un origen simple del girasol domesticado a partir de *Helianthus annuus* silvestre (Riesberg y Seiler, 1990).

Una solución a este conflicto es el postulado por Harter *et al.* (2004) de que las variedades actuales de girasol tienen un origen único en Estados Unidos.

## Taxonomía

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica de EAU (NCBI) 2004, el girasol se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera;

Reino: Methaphyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Tribu: Heliantheae

Genero: *Helianthus*

Especie: *annuus*.

Los girasoles silvestres y cultivados (*Helianthus annuus*) exhiben un gran número de diferencias fenotípicas. Los silvestres tienen ramificaciones múltiples a lo largo del tallo, con numerosas cabezuelas y aquenios relativamente pequeños. En contraste, el girasol cultivado no tiene ramificaciones y presenta una gran cabezuela (monocefálico), con aquenios mucho más grandes (Burke *et al.*, 2002).



## **Marcadores genéticos moleculares**

Durante la primera mitad del siglo pasado, los análisis genéticos se hicieron a través de la observación morfológica, anatómica o de diferenciación de comportamiento, con la ayuda de mutantes. Subsecuentemente, entre 1950 y 1960, fue posible observar la variación en la estructura de polipéptidos y desde 1980 fue posible la exploración de la variación a nivel del ADN. De esta manera el polimorfismo genético puede ser localizado y usado como marcador para identificar una región cromosómica particular y su efecto en el fenotipo (Kearsey y Pooni, 1996).

Los marcadores genéticos moleculares se pueden definir como polimorfismos genéticos en proteínas (antígenos y aloenzimas) o ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida acoplados a sistemas de detección). Por lo que respecta a los marcadores de ADN, el polimorfismo detectado resulta de cambios o re-arreglos entre los pares de bases que conforman a la molécula, tales como translocaciones, inversiones, duplicaciones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Este tipo de marcadores son dominantes o codominantes, con grados variables de repetibilidad, abundancia y polimorfismo, y no están sujetos a efectos ambientales. Son extremadamente eficientes comparados con los análisis a nivel morfológico o de proteínas (Valdez-Moctezuma y Kahl, 2000).

Los marcadores moleculares pueden ser usados en análisis de diversidad genética y organización de germoplasma, en estimación de similaridad genética, en construcción de mapas genéticos, en la localización de loci que afectan caracteres cualitativos (qtl) o cuantitativos (QTL). También proveen el potencial para la clonación de genes específicos basados en mapas, además del mejoramiento con la aplicación de la selección asistida por marcadores (MAS) (Staub and Serquen, 1996; Reyes-Valdés, 2000).

Existen diferentes tipos de marcadores de ADN que se pueden agrupar de manera convencional en tres categorías (Valdez-Moctezuma y Kahl, 2000):

- 1) Uso de enzimas de restricción. Ejemplo: RFLP, VNTR
- 2) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ejemplo: RAPD, SPARs, DAFs, AP-PCR
- 3) Ambas metodologías. Ejemplo: AFLP.

## **Mapas Genéticos.**

### Generalidades

El mapa genético de una especie es el agrupamiento y el ordenamiento lineal de loci marcadores, según sus relaciones de ligamiento genético. A su vez, el análisis de ligamiento consiste en deducir la posición relativa de los genes en el cromosoma tomando como base la distribución de frecuencias

conjuntas de sus alelos en una progenie segregante. En otras palabras, un mapa genético representa el orden relativo de los marcadores genéticos y su distancia relativa de uno a otro, a lo largo de cada cromosoma de un organismo con distancias basadas en frecuencias de recombinación. Se realiza en tres etapas: (Paterson *et al.*, 1991; Stam, 1993; Crawford *et al.*, 2000; Cornide 2002).

1. La determinación de los grupos de ligamiento
2. El ordenamiento de los genes dentro de cada grupo de ligamiento.
3. La estimación de las distancias entre estos basándose en las frecuencias de recombinación observadas.

El principio de mapeo genético se propuso desde hace un siglo. Sutton (1903) fue el primero que propuso la relación entre los factores mendelianos y los cromosomas y también indicó que probablemente el número de cromosomas de todos los organismos era considerablemente inferior al número de genes. Posteriormente Morgan en 1911, descubrió el ligamiento en *Drosophila*, expresando una posible relación entre la frecuencia de recombinación de los genes ligados y su distancia lineal a lo largo del cromosoma (Strickberger, 1978). El reciente desarrollo de las técnicas moleculares para encontrar un gran número de marcadores genéticos en forma rápida ha estimulado la construcción y uso de los mapas genéticos en una gran variedad de plantas y otros organismos (Botstein *et al.*, 1980). Los mapas se usan en análisis de caracteres tanto simples como complejos, en comparación

de genomas, en análisis de genomas y en clonación basada en mapas (Paterson *et al.*, 1991).

Construcción de un mapa genético.

La construcción de mapas genéticos es posible por el hecho de que el genoma nuclear en organismos superiores está organizado y es transmitido como unidades lineales, llamadas cromosomas. El ligamiento genético, o co-transmisión de alelos de padres a la progenie provee de un medio para determinar el orden de los marcadores de ADN a lo largo del cromosoma (Paterson, 1996).

Para construir un mapa de genético se requiere: a) Una población genéticamente variable y en desequilibrio de ligamiento y b) una gran cantidad de loci marcadores genéticos.

La base fundamental para la construcción de un mapa genético es la recombinación homóloga entre cromátidas no hermanas durante la meiosis. El intercambio o entrecruzamiento genético se efectúa durante la profase de la primera división meiótica; las 4 cromátidas de un bivalente se asocian en pares y se llevan a cabo eventos de intercambio (Kearsey y Pooni, 1996).

Para la construcción de mapas genéticos se ha desarrollado una gran cantidad de software tal como: LINKAGE1 (Suiter *et al.*, 1983), MAPMAKER

(Lander *et al.*, 1987), G-MENDEL (Echt *et al.*, 1992) y JOINMAP (citados por Stam, 1993).

Distancia mapa.

Las distancias en un mapa genético se basan en términos de la frecuencia de recombinación entre loci. La distancia genética mapa es el número promedio de entrecruzamientos por evento meiotico entre dos loci a nivel cromátida y se expresa en unidades Morgan, (Stam, 1993; Paterson, 1996; Reyes-Valdés, 2003).

La relación entre distancia mapa y frecuencia de recombinación es expresada por funciones mapa. Diferentes funciones mapa corresponden a diferentes grados de interferencia de quiasma, es decir, la no independencia de eventos de recombinación en intervalos. Las funciones mapas más comúnmente usadas son las de Haldane (1919) y Kosambi (1944). La función de Haldane asume no interferencia, mientras la de Kosambi asume interferencia positiva, es decir es menor el número de dobles recombinantes observados que los esperados (Stam, 1993).

Tipos de poblaciones de mapeo.

Los mapas genéticos de las plantas son construidos a partir de diferentes tipos de poblaciones. Los cuatro tipos de poblaciones más comúnmente usadas

en la construcción de mapas son: poblaciones  $F_2$  de intercrucía, de retrocrucía (BC), dobles haploides (DH) y líneas endogámicas recombinantes (RIL's) (Paterson, 1996).

Con fines de construcción de mapas genéticos, la selección apropiada de la población es una etapa crucial en la construcción de mapas. El cruzamiento de especies silvestres con líneas cultivadas es generalmente útil para la generación de mapas genéticos (Winter and Kahl, 1995).

### **Mapas genéticos en Girasol**

La construcción de mapas genéticos del girasol, *H. annuus* ( $2n = 2x = 34$ ) se ha acelerado recientemente. Los primeros fueron desarrollados por medio de marcadores RFLP en el girasol cultivado, pero posteriormente se han usado otros tipos de marcadores.

El mapa construido por Berry *et al.* (1995) consta de 234 loci RFLP en 289 individuos de una población  $F_2$  derivados de un cruzamiento entre las líneas cultivadas HA89 y ZENB8. Se usaron 213 sondas, que detectaron polimorfismo distribuidos en 17 grupos de ligamiento, con una densidad de 10 a 19 marcadores por grupo. Este mapa cubre 1380 cM del genoma del girasol, con un 10 por ciento de distorsión en la segregación.

Gentzbittel *et al.* (1995) examinaron tres poblaciones  $F_2$  y dos poblaciones de retrocruza con un rango 80 hasta 150 individuos. Los progenitores fueron las líneas HA89, CX, RHA266 y PAC2 (en donde RHA266 y PAC2 provienen de la cruce de cultivado y silvestre) con origen en USA y Francia. Cada una de las poblaciones fue mapeada separadamente. Con 180 combinaciones sonda-enzima se mapearon 237 loci sin distorsión en la segregación. Estos cubrieron 1150 cM del genoma del girasol en 23 grupos de ligamiento. La distancia media entre marcadores fue de 7 cM

Por otro lado, Jan *et al.* (1998) construyeron un mapa genético con una población  $F_2$  entre las líneas restauradora y mantenedora RHA 271 X HA 234. Se usaron 615 sondas de cADN, de las cuales solamente se mapearon 232 que detectaron 271 loci distribuidos en 20 grupos de ligamiento con una densidad de 2 a 27 marcadores por grupo, con una cobertura de 1164 cM y una distancia promedio entre marcadores de 4.6 cM

En adición a estos mapas basados en RFLPs, se han construido otros subsecuentemente por medio de polimorfismo de DNA amplificado al azar (RAPD's), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) y secuencias repetidas simples (SSR).

Seung-Chul y Rieseberg (1999) usaron una población de retrocruza de 226 individuos empleando 27 combinaciones de iniciadores AFLP. El estudio preliminar con 84 individuos y 261 loci marcadores, agruparon el genoma en

15 grupos de ligamiento. La población remanente (142) fue genotipificada para 133 marcadores que revelaron los mismos grupos de ligamiento. De esta manera la distancia cubierta por los 15 grupos de ligamiento es de 954.9 cM con una distancia promedio entre marcadores de 7.18 cM.

Tang *et al.* (2002), con el objetivo de construir un mapa denso en girasol, identificaron 879 secuencias repetidas simples (SSR) de 2,033 clones de una biblioteca de ADN genómico enriquecido para  $(AC)_n$  o  $(AG)_n$  probadas con 1000 pares de iniciadores SSR. El mapa genético de alta densidad fue construido con 94 líneas recombinantes  $F_7$  de la cruce RHA280 x RHA801 y 408 marcadores SSR polimorficos que segregaron para 462 loci en la población mapeada. De estos, 459 se unieron en 17 grupos; representando un mapa de 1 368.3 cM de largo con una densidad media de 3.1 cM. En general el número de SSR por grupo con ligamiento varió de 12 a 47.

Con la finalidad de incrementar la densidad del mapa basado en marcadores SSR efectuado por Tang *et al.* (2002), y adicionar nuevos loci por la construcción de un nuevo mapa mediante la cruce de las líneas PHA y PHB e integrar el mapa con el de RFLP Gedil *et al.* (2001b), Yu *et al.* (2003) usaron 94 individuos  $F_2$  de la cruce HA370 x HA732, 94 RIL's del cruzamiento PHA x PHB y 94 RIL's del cruzamiento RHA280 x RH801. De esta manera se integró y expandió el mapa en girasol (Cuadro 2.1).



**Cuadro 2.1.** Integración y expansión del genoma de girasol por Yu *et al.* (2003)

Autor	Población	Número Loci	Población de mapeo	Cobertura genoma	Expansión genoma
Gedil <i>et al.</i> (2001b)	HA370 x HA732	120	F <sub>2</sub>		1275.4 cM
Tang <i>et al.</i> (2002),	RHA280 x RH801	118	RILs	1368.3 cM	1423.0 cM
Yu <i>et al.</i> (2003)	PHA x PHB	264	RILs	1199.4 cM	1199.4 cM

Langar *et al.* (2003), construyeron un nuevo mapa genético en girasol, usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica, amplificación directa de fragmento polimorfo (DALP) y polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) empleando 171 RILs F<sub>9</sub>, provenientes del cruzamiento entre las líneas cultivadas HA89 y LR4. Un total de 305 marcadores fueron localizados: 7 en PCR, 64 en DALP y 301 en AFLP; el 96.5 por ciento segregó en la proporción de 1:1. Los marcadores mapeados se agruparon en 18 grupos de ligamiento que cubren 2,168.6 cM. El 71 por ciento de las distancias entre los pares de marcadores fue menor que 10 cM, el 94.7 por ciento fue menor que 20 cM, y el 5 por ciento mayores que 20 cM. La distribución de los marcadores DALP y AFLP revela que ambos marcadores cubren la mayoría del genoma del girasol, lo que conduce a que éste sea el mapa más largo publicado hasta ahora para girasol.

En resumen, de la construcción del primer mapa genético (Berry *et al.*, 1995) a la fecha se tienen 7 mapas genéticos en girasol cultivado, desarrollados con aloenzimas, RFLP's, RAPD's, AFLP's y microsatélites, usando diferentes poblaciones segregantes (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, BC y RIL's), (Cuadro 2.2).

**Cuadro 2.2** Mapas genéticos en girasol.

Autor	Tipo de Marcadores	Número de Loci	Población de mapeo	Origen de la población	Grupos de Ligamiento	Cobertura del genoma
Berry <i>et al.</i> (1995)	RFLP	234	F <sub>2</sub>	Cultivado	17	1380 cM
Gentzbittel <i>et al.</i> (1995)	RFLP	237	F <sub>2</sub> y BC	Cultivado y silvestre	23	1150 cM
Jan <i>et al.</i> (1998)	RFLP	271	F <sub>2</sub>	Cultivado	20	1164 cM
Seung-Chul y Rieseberg (1999)	AFLP	261	BC	Cultivado	15	954.9
Tang <i>et al.</i> (2002)	SSR	459	RIL	Cultivado	17	1368.3 cM
Langar <i>et al.</i> (2003)	PCR, DALP y AFLP	305	RIL	Cultivado	18	2168.6cM
Yu <i>et al.</i> (2003)	SSR	264	RIL	Cultivado	17	1199.4 cM

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Población de mapeo

El presente trabajo se desarrolló con la población de mapeo “Correcaminos F<sub>2:3</sub>” conformada por 149 líneas derivadas de F<sub>2</sub> en F<sub>3</sub> provenientes de un cruzamiento entre la línea cultivada HA89 (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*) y una planta silvestre identificada como Ac-8-2 (*H. annuus* L. ssp. *texanus* Heiser). La planta silvestre procedió de una población colectada en Saltillo, Coah. La población de mapeo se desarrolló en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el periodo de 1996 al 2002. La línea HA89 fue la hembra en este cruzamiento obtenido con la ayuda de emasculación física. Las plantas F<sub>1</sub> así obtenidas se cruzaron fraternalmente y las plantas F<sub>2</sub> fueron autofecundadas para formar las 149 líneas. La selección de estas líneas se hizo únicamente para que cumplieran la restricción de contener al menos 50 aquenios

### Caracterización Molecular.

Extracción de ADN.

Soluciones

- Buffer de extracción (2 por ciento de CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2 por ciento de 2-mercaptoetanol, 20 mM de EDTA, 100 mM Tris-HCl, con pH de 8.0)

- Cloroformo – alcohol isoamílico a una concentración de 24:1 (V/V)
- Etanol frío a -20°C
- Solución de lavado (76 por ciento de etanol, 10 mM acetato de amonio)
- Etanol al 70 por ciento
- Buffer TE 1X [(10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA)].

### **Procedimiento**

El ADN fue aislado de hojas meristemáticas de una mezcla balanceada compuesta por 10 plantas de cada línea, por medio de la técnica propuesta por Doyle y Doyle (1990) con modificaciones menores. El procedimiento consistió en los siguientes pasos:

Se sembraron 15 plantas por línea en vasos de polipropileno. Cuando las plántulas tuvieron las primeras hojas verdaderas se muestreó cada una de las 10 plantas por línea. Para ello se tomaron las hojas meristemáticas y se colocaron en papel aluminio. Se trasladaron en hielo al Laboratorio de Análisis de Genomas del Departamento de Fitomejoramiento para la extracción de ADN.

De cada línea se tomaron de 0.2 a 0.3 gramos de tejido, para posteriormente lavarlo con una solución de alcohol al 70 por ciento por 1.5 min., y una solución de alcohol-hipoclorito de sodio por 1.5 min. Después se

enjuagó con agua destilada estéril por un minuto, y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se molió el tejido a polvo fino congelándolo con Nitrógeno líquido o por 15 minutos en el ultracongelador a  $-75^{\circ}\text{C}$ ; se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 800  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción calentado a  $65^{\circ}\text{C}$  y se mezcló por inversiones suaves. Posteriormente se colocó en baño María a  $65^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, con inversiones ocasionales. Después del tiempo de incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos. En seguida se separó la fase superior a un tubo nuevo estéril y se le adicionó un volumen igual de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 24:1. Se mezcló por inversiones, y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones.

Se separó nuevamente la fase superior a un tubo nuevo estéril, y se le adicionó un volumen de RNAsa a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se colocó en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos. Posteriormente se le adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se colocó en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una hora para precipitar el ADN. Después de este tiempo se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos para formar la pastilla. Se decantó y lavó con 400  $\mu\text{l}$  de una solución de lavado por dos ocasiones y 400  $\mu\text{l}$  de alcohol al 70 por ciento de la misma manera. Después se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Por último se le adicionó un volumen igual al de la pastilla de ADN de buffer TE 1X para su dilución y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La calidad de ADN se efectuó en geles de agarosa al 1 por ciento, detección con bromuro de etidio y visualización por fluorescencia UV.

### **Marcadores Genéticos Moleculares.**

La detección de polimorfismos fue a través del sistema AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) propuesto por Vos *et al.* (1995). Se empleó el protocolo “IRDye Flourecent AFLP<sup>®</sup> Kit for Large Plant Genome Analysis LI-COR (Biosciences)” mismos que se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética del CINVESTAV, IPN (Centro de investigación y de Estudios Avanzados) en Irapuato, Gto, México. Bajo los siguientes pasos:

De cada muestra de ADN concentrado se tomó una alícuota de 5 $\mu$ l+995 $\mu$ l de agua desionizada estéril (dilución 1:200) esto con el fin de determinar la concentración de ADN de doble cadena, usando un espectrofotómetro Beckman DU-600 bajo una longitud de onda de absorbancia de 260 y 280. Previo a la lectura de la primera muestra se leyó un blanco (agua), paso que se repitió cada 20 muestras.

### **Digestión- ligación del ADN.**

La digestión se efectuó con muestras de ADN a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l. Después de verificar su calidad en geles de agarosa al 1 por ciento, se colocó 1  $\mu$ l de ADN diluido de cada muestra en una placa para PCR bajo un

arreglo previamente determinado, y se le agregaron 8  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril (inyectable) y 3.5  $\mu\text{l}$  de la mezcla compuesta con los reactivos (Cuadro 3.1) a cada reacción. Para efectuar la digestión se incubó a 37°C por dos horas y 15 min. a 70°C para inactivar la enzima en un termociclador GeneAmp® PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). Después de este tiempo se almacenó a 4°C.

**Cuadro 3.1** Mezcla para digestión

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
ADN (100 ng/ $\mu\text{l}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
Eco RI (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
Truq 1 (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
Buffer RL	2.5 $\mu\text{l}$
Agua destilada desionizada estéril	8.0 $\mu\text{l}$
Total 12.5 $\mu\text{l}$ por reacción.	

Posteriormente se le agregó a cada reacción un volumen de 12.5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de ligación (Cuadro 3.2) y se incubó a 20°C por 2 horas, en el termociclador.

**Cuadro 3.2.** Mezcla para ligación.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Adaptador Eco RI/ Eco RI (5 pmol)	1.0 $\mu$ l
Adaptador Mse I/Mse I (50 pmol)	1.0 $\mu$ l
ATP (10 mM) pH 7	1.0 $\mu$ l
Buffer RL (5X)	9.0 $\mu$ l
T4 ADN ligasa	0.5 $\mu$ l
Total 12.5 $\mu$ l por reacción.	

Después del proceso de digestión – ligación total, se hizo una dilución de 1:60 (2  $\mu$ l ADN + 118 de agua) y se almacenó a -20°C.

**Primera amplificación.**

Para la primera amplificación se utilizaron los iniciadores 5-GACTGCGTACCAATTC/A-1 (Eco RI) y 5-GATGAGTCCTGAGTAA/C-1 (MseI). Se colocaron 2.5  $\mu$ l de ADN digerido - ligado (diluido 1:60) en la placa de PCR, más 23  $\mu$ l de la mezcla para la reacción de amplificación (Cuadro 3.3).



**Cuadro 3.3.** Mezcla de amplificación.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
ADN templete (Dil 1:60)	2.5 $\mu$ l
E + A (50 ng/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
M + C (50 ng/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Buffer 10X (Mg)	2.5 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
DNTPs (10 mM)	2.5 $\mu$ l
Agua estéril	14.5 $\mu$ l
Total 25.5 $\mu$ l por reacción.	

La amplificación se efectuó en el termociclador bajo el siguiente programa (Cuadro 3.4).

**Cuadro 3.4.** Programa para la primera amplificación.

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo (min.)</b>
	95	5.0 min.
1	94	0.5 min.
	56	1.0 min.
	72	1.0 min.
	94	0.5 min.
20	56	1.0 min.
	72	1.0 min.
	94	0.5 min.
1	4	$\infty$

Al término de la amplificación se hizo una dilución de 1:60 (2  $\mu$ l ADN + 118  $\mu$ l de agua) de esta reacción de pre-amplificación, se almacenó a 4°C y a -20°C una vez que se confirmó positiva la corrida del gel desnaturalizante.

### Segunda amplificación.

Para las amplificaciones selectivas se utilizaron 11 combinaciones de iniciadores (IRDye Fluorecent AFLP®) cuadro 3.5. Se preparó una mezcla para cada combinación a utilizar (Cuadro 3.6).

**Cuadro 3.5.** Combinaciones de primer.

<b>Combinaciones</b>		
1.	E-AAG	M-CAA
2.	E-AGC	M-CAA
3.	E-ACC	M-CAA
4.	E-ACG	M-CAA
5.	E-ACC	M-CAC
6.	E-AGG	M-CAC
7.	E-ACC	M-CTT
8.	E-AGC	M-CTT
9.	E-ACC	M-CAT
10.	E-AGC	M-CAT
11.	E-ACA	M-CAG

**Cuadro 3.6.** Mezcla para la amplificación selectiva.

Reactivo	Volumen
ADN templete 1ª amplificación (Dil 1:60)	2.0 µl
M + NNN (50 ng/µl)	2.0 µl
E + NNN 700 (50 ng/µl)	0.5 µl
E + NNN 800 (50 ng/µl)	0.5 µl
Buffer 10X	1.2 µl
Taq ADN polimerasa (5U/µl)	0.1 µl
Agua estéril	4.8 µl
Total 11.1 µl por reacción.	

La reacción de amplificación se efectuó en el termociclador bajo el siguiente programa (Cuadro 3.7).

**Cuadro 3.7.** Programa para la segunda amplificación.

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo (min.)
Hot Star	94	5.0
12	94	0.5
Disminuyendo 0.7°C por ciclo para Temperatura de alineación.	65	0.5
	72	1.0
23	94	0.5
a °T de alineación constante	56	0.5
	72	1.0
1	4	∞

## Electroforesis

Los productos obtenidos en la amplificación selectiva se corrieron en un gel de poliacrilamida para desnaturalización al 6.5 por ciento, utilizando un secuenciador automático para AFLP (LI-COR SAGA MX software versión 2.1)

Se mezclaron 20 ml de buffer KB<sup>plus</sup> al 6.5 por ciento (Acrilamida al 40 por ciento y Urea 8 M y TBE) con 150 µl de una solución de persulfato de amonio (APS) al 10 por ciento y 15 µl TEMED (N,N,N,N,-Tetrametiletildiamina), que se colocó inmediatamente entre las placas del cristal con la ayuda de una jeringa, teniendo cuidado de evitar la formación de burbujas. Se insertó un peine tipo tiburón e inmediatamente se colocó las placas de presión afianzando con las abrazaderas. Por último se dejó polimerizar por 1 hora.

Previo a la carga de las muestras, el gel se corrió por 25 minutos en el secuenciador automático Li-cor usando buffer TBE 0.8X. Después de este tiempo se cargaron 0.4 µl de ADN desnaturalizado (5 min. a 94°C) mezclado con colorante azul (buffer de carga 6 X). Se usó un marcador de peso molecular de 50-700 bp y 50-800 pb. La electroforesis se efectuó por 2 horas bajo las condiciones especificadas del equipo.

Las imágenes de los geles fueron analizadas usando el software LI-COR SAGA MX versión 2.1 para lectura de geles. Primeramente se fijaron las bandas que indican los pesos moleculares de los marcadores, las cuales sirven de

referencia para la lectura de las bandas polimórficas en cada uno de los carriles.

### **Construcción del Mapa Genético**

Para la construcción del mapa de ligamiento, se empleó el software JoinMap® versión 3.0 ((Van y Voorrips, 2001; Piet Stam, 1993), desarrollado para poblaciones experimentales en especies diploides, que maneja poblaciones con padres no homocigotos.

La nomenclatura de los marcadores polimórficos es la siguiente:

**M<PESO>P<PROGENITOR>E<BASES 1>/M<BASES 2>**,

Donde:

PESO = Peso estimado de la banda en número de bases,

PROGENITOR = Progenitor en el que se presenta la banda; 1 para HA89 y 2 para Ac-8-2.

BASES 1 = Bases restrictivas del oligonucleótido con sitio Eco R1,

BASES 2 = Bases restrictivas del oligonucleótido con sitio Mse 1.

Por ejemplo: M170P1E-ACC/M-CTT, denota la banda de 170 bases en el progenitor 1 (HA89) obtenida con la combinación Eco RI ACC / Mse I CTT.

Para la construcción del mapa de ligamiento de marcadores se realizó el registro de bandas polimórficas, codificando con el número 1 la presencia y 0 la ausencia de la banda. Después se probó la segregación de los marcadores en la población F2 mediante una prueba de  $X^2$  con un nivel de probabilidad de 0.002. Posteriormente esta codificación se adecuó a lo que demanda el programa JoinMap 3.0.

Para la construcción del mapa los marcadores se agruparon en grupos de ligamiento con un LOD de 3.0 (*LOD score* o logaritmo de los momios, es el logaritmo base 10 de la verosimilitud de que dos loci estén ligados sobre la verosimilitud de que estén segregando independientemente). Un valor de LOD de 3, indica que hay 1000 veces más verosimilitud que los loci estén ligados a que estén segregando independientemente, LOD de 4 es 10,000 veces, etc. La distancia máxima para declarar ligamiento fue 45 cM. La conversión de recombinación a distancia se hizo mediante la función de mapeo de Kosambi.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Marcadores moleculares por combinación.

De las 11 combinaciones de AFLP se encontraron 295 bandas polimórficas. De todas las bandas polimórficas encontradas, 194 procedieron del progenitor HA89 y 101 del progenitor Ac-8-2, obteniendo un promedio de 26.8 bandas polimórficas por combinación con peso molecular entre 64 y 506 bases. (Cuadro 4.1). Dicho promedio de bandas polimórficas es superior al promedio de 21.5 con un peso molecular entre 200 y 1000 bases reportado por Langar *et al.* (2003) en girasol.

**Cuadro 4.1** Bandas obtenidas por combinación AFLP.

	Combinación Eco RI	Combinación Mse I	Bandas polimórficas
1.	E-AAG	M-CAA	18
2.	E-AGC	M-CAA	30
3.	E-ACC	M-CAA	27
4.	E-ACG	M-CAA	20
5.	E-ACC	M-CAC	27
6.	E-AGG	M-CAC	25
7.	E-ACC	M-CTT	33
8.	E-AGC	M-CTT	22
9.	E-ACC	M-CAT	25

**Cuadro 4.1** Continuación...

	<b>Combinación Eco RI</b>	<b>Combinación Mse I</b>	<b>Bandas polimórficas</b>
10.	E-AGC	M-CAT	28
11.	E-ACA	M-CAG	40
		TOTAL	295

### **Análisis genético de marcadores.**

En el análisis genético de los marcadores efectuado en Mathematica 5.0 (Wolfram, 2003), se detectaron 87 bandas con una distorsión en la segregación, lo que representa un 29.4 por ciento, de las bandas. La eliminación de estas bandas dio un total de 208 bandas polimórficas para realizar el análisis de ligamiento. De estas 144, o sea el 69.23 por ciento, segregaron 3:1 y 64 bandas, es decir el 30.76 por ciento, segregaron 1:1.

La alta tasa de distorsión observada puede obedecer a su correlación con la diversidad genética entre los progenitores (Seung-Chul y Riesberg, 1999). Este es el caso en los materiales utilizados en el presente trabajo, ya que pertenecen a diferentes subespecies de *H. annuus*.

### **Análisis de las líneas.**

El análisis de las líneas respecto al número de bandas seleccionadas dio como resultado una media de frecuencia de bandas por línea de 0.65, lo cual



podría esperarse dado error de muestreo en la segregación de bandas de las 10 plantas por línea. Del total de 145 líneas se eliminaron todas aquellas con una frecuencia de bandas inferior a 0.45, lo que dio como resultado la eliminación de 12 líneas.

### **Análisis de ligamiento.**

De los 208 loci utilizados para obtener el mapa de ligamiento, 40 (es decir el 19.23 por ciento) se agruparon en 17 grupos de ligamiento con un LOD score mínimo de 3.0 y una frecuencia de recombinación máxima de 0.45.

En el Cuadro 4.2 se presentan los loci ligados en el mapa. Se anotan las claves para los loci, el grupo de ligamiento al que fueron asignados y su posición en cada grupo.

**Cuadro 4.2** Grupos de ligamiento y posición de locus dentro de cada grupo en cM para el mapa genético.

<b>Locus</b>	<b>Grupo</b>	<b>Posición cM</b>
M170P1E-ACC/M-CTT	1	0.000
M383P1E-AGC/M-CAT	1	19.311
M220P1E-ACC/M-CTT	1	20.502
M258P1E-ACC/M-CAC	1	33.845
M114P1E-ACC/M-CAC	1	56.122

**Cuadro 4.2** Continuación...

<b>Locus</b>	<b>Grupo</b>	<b>Posición cM</b>
M138P1E-ACC/M-CTT	1	65.122
M243P1E-AGC/M-CAT	2	0.000
M84P1E-AGC/M-CAT	2	30.538
M84P2E-ACC/M-CAT	2	62.196
M263P1E-ACC/M-CAT	3	0.000
M186P2E-ACC/M-CAT	3	28.524
M297P1E-ACC/M-CTT	3	57.497
M434P1E-ACG/M-CAA	4	0.000
M205P2E-ACC/M-CAA	4	30.215
M129P1E-ACC/M-CAA	5	0.000
M197P2E-AGC/M-CAA	5	32.865
M123P1E-ACC/M-CTT	6	0.000
M181P1E-ACC/M-CTT	6	33.923
M181P1E-ACC/M-CAC	7	0.000
M98P1E-ACC/M-CAC	7	22.082
M64P2E-ACA/M-CAG	8	0.000
M77P2E-ACA/M-CAG	8	30.793
M82P1E-ACA/M-CAG	9	0.000
M170P1E-ACA/M-CAG	9	30.625
M376P1E-ACG/M-CAA	10	0.000
M166P1E-ACG/M-CAA	10	25.712

**Cuadro 4.2** Continuación...

<b>Locus</b>	<b>Grupo</b>	<b>Posición cM</b>
M208P1E-ACC/M-CAC	11	0.000
M169P1E-ACC/M-CAC	11	30.506
M323P1E-AGG/M-CAC	12	0.000
M320P1E-ACC/M-CAT	12	30.543
M320P1E-AGC/M-CAA	13	0.000
M86P2E-AGG/M-CAC	13	24.067
M111P1E-ACC/M-CTT	14	0.000
M235P1E-ACC/M-CTT	14	32.682
M175P1E-ACC/M-CAT	15	0.000
M198P1E-ACC/M-CTT	15	21.182
M155P1E-ACC/M-CAT	16	0.000
M226P2E-AGC/M-CAT	16	28.918
M311P1E-AGC/M-CAA	17	0.000
M307P1E-AGC/M-CAT	17	22.524

En este mapa se observa un bajo porcentaje de loci ligados (40 de 208), lo que hace que sea un mapa de baja densidad (Cuadro 4.2 y 4.3). El poder estadístico del experimento no fue suficiente para detectar ligamiento entre un número considerable de loci. Esto se puede remediar obteniendo más marcadores polimórficos y una población más grande y así tener más cobertura

del genoma del girasol. Sin embargo, los marcadores no ligados también son útiles para de detectar de QTLs.

El número de loci mapeados por cada grupo de ligamiento varió de 2 a 6 (Cuadro 4.3) con tamaño de grupo de 21 a 65 cM (Cuadro 4.2). De esta manera se obtuvo una distancia promedio entre loci de 14.65 cM.

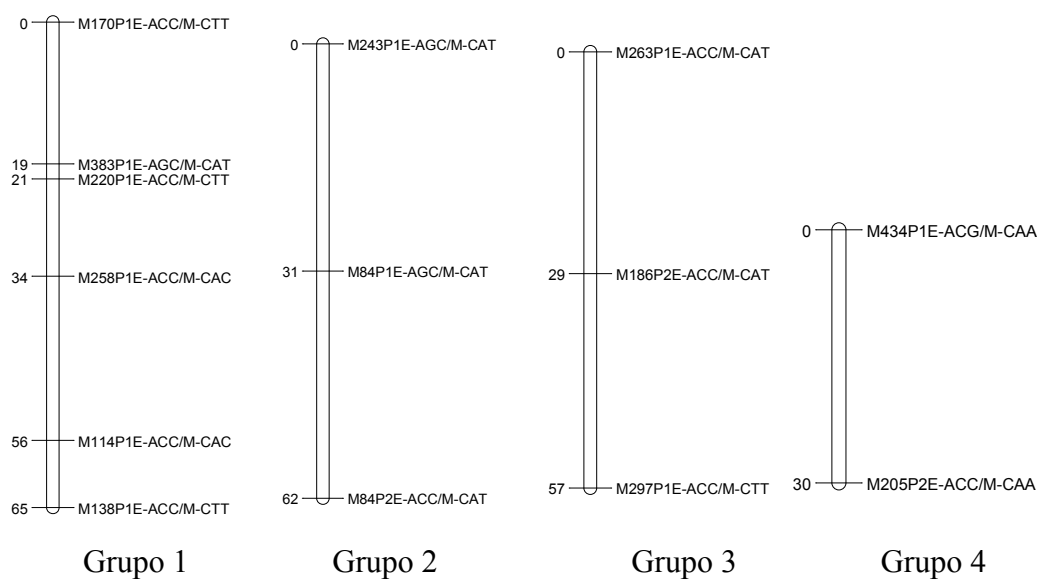
**Cuadro 4.3.** Número y densidad de loci marcadores por grupo de ligamiento.

<b>HA89 x Ac82</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Loci/Grupo</b>	<b>Distancia promedio entre loci/grupo</b>
1	6	10.85
2	3	20.73
3	3	19.17
4	2	15.11
5	2	16.43
6	2	16.96
7	2	11.04
8	2	15.40
9	2	15.31
10	2	12.86
11	2	15.25
12	2	15.27
13	2	12.03

**Cuadro 4.3** Continuación.

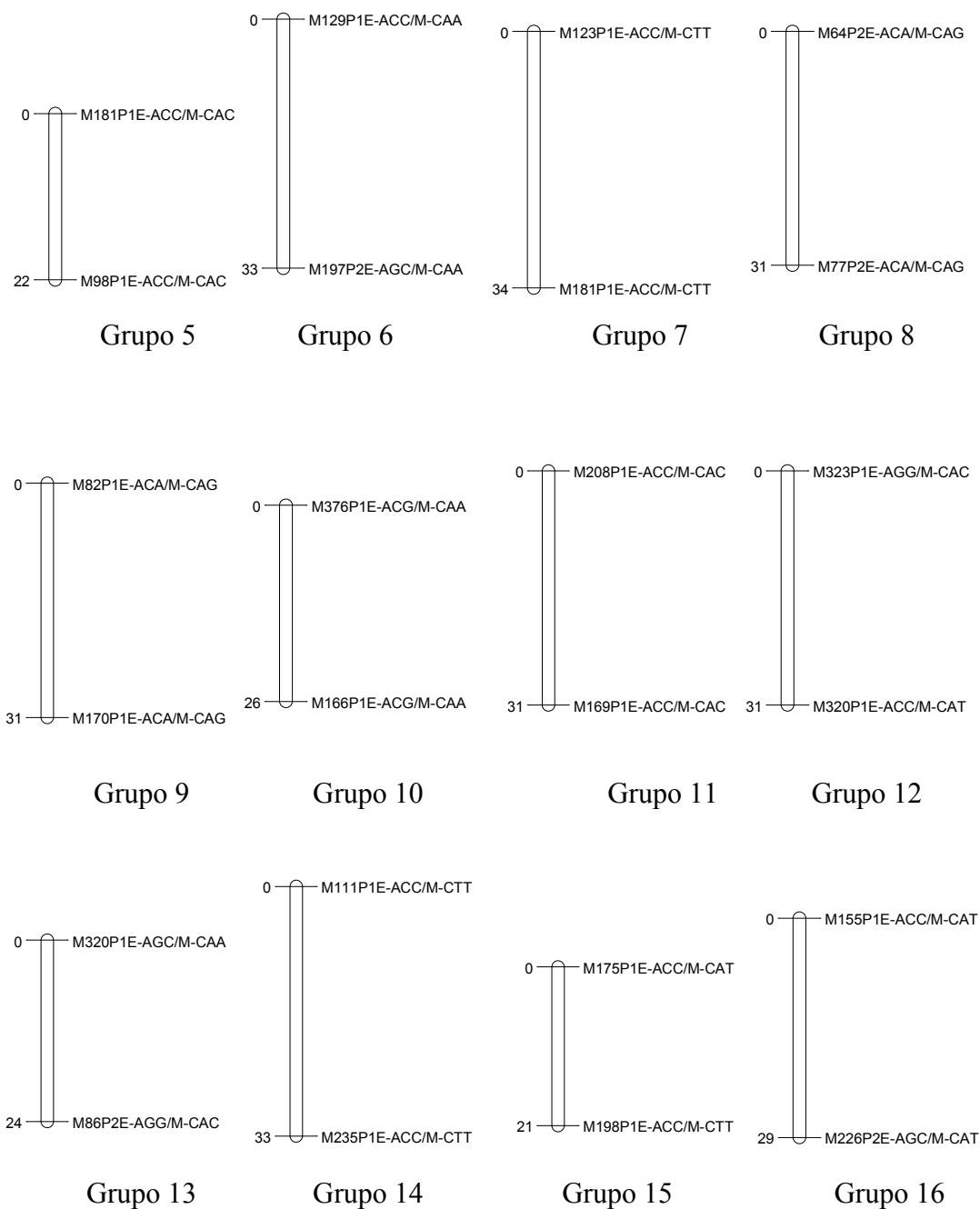
HA89 x Ac82		
Grupos	Loci/Grupo	Distancia promedio entre loci/grupo
14	2	16.34
15	2	10.59
16	2	14.46
17	2	11.26
Total	40	14.65

También se puede observar que el número de grupos de ligamiento estimados (17) es igual al número de cromosomas de *H. annuus* (Figura 1).

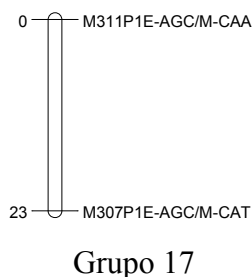


**Figura 1.** Mapa genético de girasol basado en 133 líneas  $F_{2:3}$  (Población correcaminos  $F_{2:3}$ ), derivadas de la cruce de *H. annuus* var.

*macrocarpus* (HA89) x *H. annuus* spp *texanus* (Ac-8-2) con marcadores AFLP. Las distancias mapa fueron obtenidas a través de la función Kosambi.



**Figura 1. Continuación...**



**Figura 1. Continuación...**

Los loci marcadores no agrupados (Cuadro 4.4), ya ha sido reportado previamente tanto en mapas de girasol como en otras especies. Gentzbittel *et al.* (1995) encontraron 7.5 por ciento y Jan *et al.* (1998) un 14.4 por ciento de marcadores RFLP's desagrupados. Flores Berrios *et al.* (2000) reportaron un 17.5 por ciento de marcadores AFLP no mapeados en su trabajo en girasol y Vuylsteke *et al.* (1999) encontraron un 46 por ciento de marcadores AFLP no ligados en maíz.

**Cuadro 4.4.** Loci polimórficos totales y número de loci mapeados en cada combinación.

	Combinaciones		Loci	Loci	Porcentaje de Loci
			polimórficos	mapeados	mapeados
1.	E-AAG	M-CAA	18	0	0
2.	E-AGC	M-CAA	30	3	10
3.	E-ACC	M-CAA	27	2	7.4
4.	E-ACG	M-CAA	20	3	15

**Cuadro 4.4** Continuación...

	<b>Combinaciones</b>		<b>Loci</b>	<b>Loci</b>	<b>Porcentaje de Loci</b>
			<b>Polimórficos</b>	<b>mapeados</b>	<b>mapeados</b>
<b>5.</b>	E-ACC	M-CAC	27	6	22.22
<b>6.</b>	E-AGG	M-CAC	25	2	8.0
<b>7.</b>	E-ACC	M-CTT	33	9	27.27
<b>8.</b>	E-AGC	M-CTT	22	0	0
<b>9.</b>	E-ACC	M-CAT	25	6	24.0
<b>10.</b>	E-AGC	M-CAT	28	5	17.85
<b>11.</b>	E-ACA	M-CAG	40	4	10

Los loci mapeados tuvieron un origen de banda de 20 por ciento para Ac-8-2 y 80 por ciento para HA89. Esto sugiere que una porción substancial del genoma del progenitor macho Ac-8-2 podría estar sub-representado en nuestro mapa. Langar *et al.* (2003), encontraron una ligera sub-representación del genoma de uno de los progenitores LR4, usado como macho. Señalan que tales diferencias pudiesen deberse al complejo pedigrí de LR4 incorporado de genotipos silvestres de diverso origen.

Otra causa de estas diferencias puede deberse a la alta heterosiguidad del progenitor silvestre. Muchas bandas procedentes de loci heterocigotos no



tendrían una segregación con un patrón normal. Por lo cual resultaron eliminadas en el análisis estadístico.

### **Tamaño del mapa y cobertura del genoma**

El mapa obtenido en este trabajo cubre 581.452 cM Kosambi. De acuerdo con los diferentes mapas publicados (Berry *et al.*, 1995; Gentzbittel *et al.*, 1995; Jan *et al.*, 1998; Seung-Chul y Rieseberg, 1999; Tang *et al.*, 2002; Langar *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003) el mapa obtenido aquí cubriría aproximadamente el 43.37 por ciento del promedio del genoma de *H. annuus*.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo el primer mapa de girasol a partir del cruzamiento entre girasol cultivado y silvestre (*H. annuus* var. *macrocarpus* y *H. annuus* subespecie *texanus*).

Es un mapa genético de baja densidad, con una distancia promedio entre marcadores de 14.65 cM. Sin embargo son distancias aptas para realizar estudios de detección de QTL's. El número de grupos de ligamiento coincide con el número haploide de cromosomas (n=17).

Este mapa permitirá el conocimiento del genoma del girasol cultivado y será aplicable a programas de mejoramiento de girasol a través de introgresión de material silvestre.

## RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de construir un mapa genético en girasol basado en marcadores AFLP. El material biológico utilizado como población de mapeo, "Correcaminos F<sub>2:3</sub>", estuvo constituido por 149 líneas F<sub>2</sub> en F<sub>3</sub> derivada de una cruce entre *H. annuus* L. var. *macrocarpus* (HA89) y *H. annuus* L spp. *texanus* (Ac-8-2).

Se hizo la extracción del ADN de cada línea por la metodología de Doyle y Doyle (1990), en el Laboratorio de Análisis Genomas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. La metodología AFLP se efectuó en CINVESTAV-Irapuato, bajo el protocolo de Vos *et al* (1995).

La base de datos original consistió en 295 loci marcadores obtenidos de 11 combinaciones con iniciadores selectivos en 145 líneas. Los datos se depuraron en Matemática 5.0 con base en comportamiento de la segregación. Finalmente se seleccionaron 208 loci y 133 líneas para el análisis de mapeo.

El análisis de mapeo efectuado en Joinmap 3.0, dio como resultado un total de 17 grupos de ligamiento con base en un LOD mínimo de 3.0 y una frecuencia de recombinación máxima de 0.45. El mapa obtenido, cubre

581.452 cM Kosambi y acuerdo con los diferentes mapas publicados el mapa obtenido aquí cubriría aproximadamente el 43.37 por ciento del promedio del genoma de *H. annuus*. Las longitudes genéticas de los 17 grupos de ligamiento variaron entre 21 y 65 cM;

En este trabajo se obtuvo el primer mapa de girasol a partir del cruzamiento entre girasol cultivado y silvestre (*H. annuus* var. *macrocarpus* y *H. annuus* subespecie *texanus*). Es un mapa genético de baja densidad, con una distancia promedio entre marcadores de 14.65 cM. Distancias aptas para realizar estudios de detección de QTL's.

Este mapa permitirá el conocimiento del genoma del girasol cultivado y será aplicable a programas de mejoramiento de girasol a través de introgresión de material silvestre.

## LITERATURA CITADA

- Berry ST, Leon AJ, Hanfrey CC, Challis P, Burkholz A, Barnes SR, Rufener GK, Lee M and Caligari PDS. 1995. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 91:195-199.
- Botstein, D., White, R.L., Skelnick, M., and Dvies, R.W. 1980. Construction of a genetic map in human using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Burke JM, Tang S, Knapp S and Rieseberg LH. 2002. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161: 1257-1267.
- Cornide MT. 2002. Marcadores moleculares nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas: Construcción de mapas genéticos en especies diploides. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba. pp. 230-270.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Flores-Berrios, E., Gentzbittel, L., Kayyal, H., Alibert, G. and Sarrafi, A. 2000. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using

recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Theor Appl Genet 101:1299-1306.

Gedil, M.A., C. Wye, S. Berry, B. Segers, J. Peleman, R. Jones, A. Leon, M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. 2001. An integrated restriction fragment length polymorphism-amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. Genome 44:213–221.

Gentzbittel L, Vear F, Zhang Y-X, Bervillé A and Nicolas P. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) Theor. Appl. Genet. 90:1079-1086.

Gómez-Sánchez, D. y S. González-Elizondo. 1994. Germoplasm collection of wild species of *Helianthus* in Mexico. In: FAO workind group: evaluation of wild *Helianthus* species. Seiler G.J. (ed). P. 126-133.

Heiser, C.B. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of the domesticated sunflower. Sunflowers Science and Technology ASA, CSSA and ASSA, Madison WI. Pages 31-53.

Harter, A. V., Gardnert, K.A., Falush, D., Lentz, D.L., Bye R.A. and Rieseberg, L.H. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. Nature 430:201-204.

Jan CC, Vick BA, Miller JF, Kahler AL and Butler ET. 1998. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. Theor. Appl. Genet. 96:15-22.

- Kearsey MJ, and Pooni HS. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. First edition, Chapman and Hall, Great Britain. P 381.
- Langar K, Lorieux M, Desmarais E, Griveau Y, Gentzbittel and Bervillé. 2003. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. Theor. Appl. Genet, 106:1068-1074.
- Lawson, W.R., K.C. Goulter, R.J. Henry, G.A. Kong, and J.K. Kochman. 1998. Marker-assisted selection for two rust resistance genes in sunflower. Mol. Breed. 4:227–234.
- Paterson, H. A., Tanksley, D. J., and Sorrells, E.M. 1991. Avances en Agronomy Vol 46. Academic Press. U.S.A. p. 39-90
- Piperno D R. 2001. ARCHAEOLOGY: On Maize and the Sunflower. Science 292: 2260-2261.
- Reyes-Valdés H.M. 2000. A model for Marker-Based Selection in gene Introgression Breeding Programs. Crop Sci 40: 91-98.
- Reyes-Valdés M.H., Mendoza-Villareal R., Gómez-Martínez M., Espinoza-Zapata C., Villareal-Quintanilla J.A., Martínez-Soriano J.P. 2000. Meiotic analysis of a cross between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant & Animal Genome VIII. San Diego CA. P. 62.

- Reyes-Valdés, MH. 2003. Mapping functions. In: handbook of formulas and software for geneticists and breeders. Kang Ms (ed). Haworth Press. Binghamton, NY. P 255-260.
- Rieseberg, H.L. and Seiler, G.J. 1990. Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Econ. Bot.* 44:79-91.
- Seiler, G.J. and Rieseberg, L.H. 1997. Systematic, origin and germoplasm resources of the wild and domesticated sunflower. American society of agronomy. Crop Science Society of American, Soil Science Society of America, 677 Sesoe Rd., Madison, WI 53711, USA. Sunflower Technology and Production, Agronomy Monograph no.35.
- Seung-Chul and Rieseberg LH. 1999. Genetic architecture of species differences in annual sunflowers: Implications for adaptive trait introgression. *Genetic* 153:965-977.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Joinmap. *The plant journal* 3(5):739-744.
- Staub, J.E. and Serquen, C.F. 1996 Genetic markers map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience* 31: 720-741.
- Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK and Knapp SJ. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105:1124-1136.



- Valdez, M. E. y Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. 1<sup>o</sup> edición. Ediciones mundi-prensa. México. 147 p.
- Van Ooijen, J.W. & R.E. Voorrips, 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414.
- Vuylsteke, M., Mank, R.A.R., Baastiaans, E., Senior M.L., Stuber, C.W., Melchinger, A.E., Lubbersted, T., Xia, X.C., Stam, P., Zabeau, M., and Kuiper, M. 1999. Two high density AFLP linkage maps of *Zea mays* L: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:921-935.
- Winter, P. And Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11, 438-448.
- Wolfram, S. 2003. Software Mathematica version 5.0. Wolfram Research, Inc.
- Yu, J. K., Tang, S., Slabaugh, MB., 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., Grondona, G., Olungu, C., Maes, N., and

Knapp, S.J. 2003. Towards a Saturated Molecular Genetic Linkage Map for Cultivated Sunflower. *Crop Science* 43:367-387.

**Paginas Web consultadas:**

<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851993257.asp>

Crawford, A M, Dodds, K G and McEwan J.C. 2000. DNA Markers, Genetic Maps and the Identification of QTL: General Principles (Revisado 12 mayo 2003).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. National center for biotechnology information. 2004. Entreztaxonomy. Rev. 10 de marzo del 2004.