

HUELLA DE DNA, CARACTERISTICAS
MORFOLOGICAS Y VIABILIDAD DE POLEN EN
GIRASOL CULTIVADO Y POBLACIONES SILVESTRES
DE *Helianthus annuus* y *Tithonia tubaeformis*

ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

TESIS

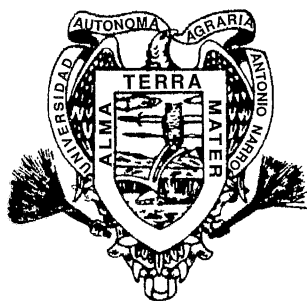
Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"

*Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:*



BIBLIOTECA

DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Septiembre del 2003

14253

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

HUELLA DE DNA, CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y VIABILIDAD DE
POLEN EN GIRASOL CULTIVADO Y POBLACIONES SILVESTRES DE
Helianthus annuus y *Tithonia tubaeformis*

TESIS

POR

ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

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

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal :




Dr. M. Humbertaeyes Valdés

Asesor: Asesor:




Dr. Froylá Rincón Sánchez

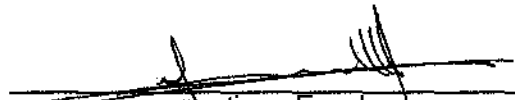
Asesor: Asesor:



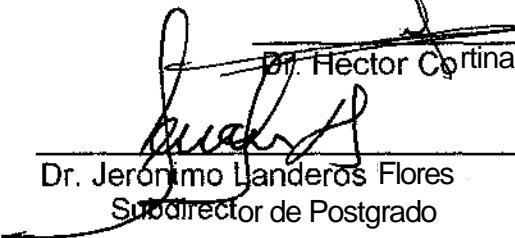
Dr. Jorge R. González Domínguez



Dr. Juan Pablo Mañez Soria



Dr. Héctor Cortinas Escobar



Dr. Jerónimo Llanderos Flores
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Septiembre del 2003

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Humberto Reyes Valdés por aceptarme como su asesora, por sus conocimientos, amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. Froylán Rincón Sánchez y el Dr. Jorge R. González Domínguez por sus conocimientos, sugerencias y por la revisión de tesis.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano por la capacitación sobre PCR y RAPD en el Laboratorio de Patología y Biología Molecular en el CINVESTAV, Irapuato, Gto., y sus aportaciones en la revisión de tesis.

Al Dr. Héctor Cortinas Escobar por las sugerencias al trabajo de tesis, por sus sabios consejos.

Al Dr. Juan Florencio por el entrenamiento recibido durante la estancia en el CINVESTAV y su gran amistad.

A mis maestros de Doctorado durante la estancia en el Departamento de Fitomejoramiento, mi más sincero agradecimiento.

A la LCN Martha Gómez quien colaboró en el análisis de PCR y por su amistad.

A Ma. de Jesús Sánchez por su colaboración en el análisis químico de polen en el laboratorio de apoyo a la investigación en el Departamento de Ciencias Básicas.

A mis compañeros de estudio.

A mis compañeros de trabajo Gustavo Villarreal y Diana Isela Durón por su disposición desinteresada al atender mis grupos durante mi estancia en el doctorado.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado y el desarrollo de la investigación al aprobar el proyecto 26499-B.

A Demetrio por su colaboración en el estudio de polen y caracteres morfológicos, además de su amistad.

Al personal de campo Toño y Miguel quienes con su gran ayuda hicieron posible el trabajo experimental.

DEDICATORIA

A mi esposo Lorenzo(+): por su comprensión, ayuda, cariño y sacrificio

A mis hijas: Quienes son la energía que me impulsa para continuar con los retos de la
Vida.

Rosalinda y Brianda

A mis padres : Yitha y Luis

A mis hermanos: Magda Elda, Luis Manuel, Javier Armando, y Gustavo Adolfo.

A Dios quien me fortalece día con día

COMPENDIO

**HUELLA DE DNA, CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y VIABILIDAD DE POLEN
EN GIRASOL CULTIVADO Y POBLACIONES SILVESTRES DE *Helianthus annuus* y
*Tithonia tubaeformis***

POR

ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

DOCTORADO

EN FITOMEJORAMIENTO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, SEPTIEMBRE DEL 2003**

Dr. M. Humberto Reyes Valdés -Asesor-

**Palabras clave: Girasol, *Helianthus annuus*, *Tithonia tubaeformis*, colectas
silvestres, hibridación, germinación de polen, tinción, diversidad
genética, RAPD.**

El mejoramiento genético del girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) depende en gran medida del aporte de genes que le pueden proporcionar los girasoles silvestres. Este trabajo tuvo como objetivos: (i) estudiar la distribución

de poblaciones silvestres de *H. annuus* y *T. tubaeformis* en Saltillo, Ramos Arizpe y Arteaga Coahuila; (ii) realizar cruzas entre girasol cultivado y poblaciones silvestres de *H. annuus*; (iii) caracterizar morfológicamente las poblaciones silvestres, una línea de girasol cultivado y su descendencia híbrida; (iv) desarrollar un método de germinación de polen para *Helianthus annuus*; (v) comparar la viabilidad de polen entre una línea cultivada de *H. annuus*, poblaciones silvestres de la misma especie y su descendencia híbrida; y (vi) evaluar la variación genética entre las poblaciones de *H. annuus* y *T. tubaeformis* con el uso de huella de DNA a través del DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).

Se recolectaron aqueníos maduros distribuidos desde 1250 hasta 1673 m de altitud en ocho sitios con *H. annuus* ssp. *texanus*, y siete sitios con *T. tubaeformis* distribuidos de 1494 hasta 2500 m de altitud. Las colectas de *H. annuus* ssp. *texanus* se cruzaron con la línea CMS-AN-3 de girasol cultivado.

Se estudió la viabilidad de polen a través de la germinación y tinción en los materiales de *H. annuus* silvestres, cultivado e híbridos. Se desarrolló un nuevo método de germinación basado en el uso de extracto de pistilos, sacarosa al 12 por ciento y los minerales calcio (280 ppm) y boro (100 ppm). A través del método de extracto de pistilos se detectaron diferencias en porcentaje entre el girasol cultivado (19.45) y silvestres (28.92), y entre híbridos (20.52) y colectas silvestres (28.92). Por el método de tinción con Buffalo Black los progenitores silvestres y girasol cultivado produjeron mayor porcentaje de polen viable (95.24

y 94.60, respectivamente) y tuvieron diferencias significativas con los híbridos (91.54).

Las colectas silvestres de *H. annuus*, la línea AN-3 y los híbridos se evaluaron en la etapa de floración para trece caracteres morfológicos y fenológicos prerreproductivos. Los híbridos y *H. annuus* silvestre fueron significativamente diferentes al girasol cultivado para las variables diámetro de capítulo, longitud, ancho y número de lígulas y brácteas, y número de capítulos. El análisis de componentes principales reveló por medio de la distancia euclidiana como medida de disimilitud y con el método de la media aritmética, un mayor parecido de los híbridos con el girasol cultivado, con los híbridos en posición intermedia respecto a sus progenitores.

Para el análisis de huella genética se agruparon las colectas silvestres en tres poblaciones por afinidad geográfica. Dicho análisis incluyó la colecta de hojas jóvenes; el aislamiento de DNA; determinación de su pureza, calidad y concentración (12 ng ml^{-1}); y amplificación en un termociclador en 45 ciclos para llevar al cabo la reacción de PCR con los dos iniciadores para RAPDs A02 y B01. Los patrones electroforéticos se codificaron en una matriz de ceros y unos. El análisis jerárquico indicó que las poblaciones silvestres presentan variación y son diferentes genéticamente al girasol cultivado, pero sin subdivisión poblacional. En el análisis jerárquico de huella genética de siete poblaciones de *T. tubaeformis* colectadas desde 1494 a 2500 m de altitud, se

observó una separación entre *T. tubaeformis* y el girasol cultivado, con diversidad genética entre plantas silvestres sin subdivisión poblacional.

Se concluye que en la región estudiada *H. annuus* ssp. *texanus* se distribuye desde 1250 a 1673 m y *Tithonia tubaeformis* desde 1494 a 2500 m de altitud. El cruzamiento entre la línea AN-3 y *H. annuus* ssp. *texanus* produjo híbridos fértiles y con una madurez de polen alta (91.54 por ciento) revelada por el análisis de tinción. Por su parte, el método propuesto para germinar polen permitió la emergencia del tubo polínico, pero en este punto su utilidad es mas bien cualitativa que cuantitativa. La evaluación de caracteres morfológicos y fenológicos reveló marcadores que diferencian claramente a *H. annuus* ssp. *texanus* y a la línea cultivada. En relación al análisis de huella genética de DNA con RAPDs en las poblaciones silvestres de *H. annuus* y *T. tubaeformis* y girasol cultivado se demuestra que existe diversidad genética en los materiales silvestres sin subdivisión poblacional. Asimismo, se reveló una marcada diferencia genética de los materiales silvestres con la línea cultivada.

ABSTRACT

DNA fingerprinting, morphological traits and pollen viability in cultivated sunflower and wild populations of *Helianthus. annuus* and *Tithonia tubaeformis*.

By

ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

DOCTOR' s DEGREE

IN PLANT BREEDING

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, SEPTEMBER 2003**

M. Humberto Reyes Valdés , Ph.D.— Major Advisor-

Key words: Sunflower, *Helianthus annuus*, *Tithonía tubaeformis*, wild accessions, hybridization, pollen germination, staining, genetic diversity, RAPD.

The cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding greatly depends on wild sunflower genes. This research was conducted with the following objectives: (i) to study the distribution of wild populations of *H. annuus* and *T. tubaeformis* in Saltillo, Ramos Arizpe and Arteaga, Coahuila; (ii) to cross cultivated sunflowers with wild populations of *H. annuus*; (iii) to morphologically characterize the wild populations, a cultivated sunflower line and their hybrid progeny; (iv) to develop a method to germinate *H. annuus* pollen; (y) to compare pollen viability between an *H. annuus* cultivated line, wild populations of the same species and their hybrid progeny and (vi) to evaluate genetic variation among *H. annuus* and *T. tubaeformis* populations through DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA (RAPD).

Mature achenes were recollected in the altitude range from 1250 to 1673 m in eight sites with *H. annuus* ssp, *texanus* and fifteen sites with *T. tubaeformis* distributed from an altitud of 1494 m to 2500 m. The *H. annuus* ssp. *texanus* accessions were crossed with the line CMS-AN-3 of cultivated sunflower.

Pollen viability was studied in cultivated and wild *H. annuus* as well as in the hybrid plants through germination and staining. A new pollen germination method was developed based on pistil extract, 12 per cent sucrose and the minerals calcium (280 ppm) and boron (100 ppm). Through this pistil extract method, significant differences in per cent were found between the cultivated sunflower (19.45) and the wild sunflowers (28.92), and between the hybrids (20.52) and the wild accessions (28.96). By Buffalo Black staining, the wild and

cultivated sunflowers showed a greater viability in per cent (95.28 and 94.60, respectively), and exhibited significant differences with the hybrid materials (91.54).

The wild accessions of *H. annuus*, the AN-3 inbred and the hybrids were evaluated during flowering for thirteen morphological and phenological prerproductive traits. The hybrid materials and wild *H. annuus* were significantly different to the cultivated sunflower for head diameter, length, width and number of ligules and bracts, and number of heads. Principal component analysis indicated, through euclidean distance as a dissimilarity measure and the average method, a greater resemblance of the hybrids with cultivated sunflower, with the hybrids in an intermediates position relative to the parents.

For DNA fingerprinting analysis, the wild accessions were grouped into three populations by geographic affinity. Such analysis included recollection of young leaves; DNA isolation; DNA purity, quality and concentration (12 ng m^{-1}) determination; and amplification in a thermal cycier with 45 cycles to perform PCR reactions with two RAPD primers: A02 and B01. The electrophoresis patterns were binarily (0 and 1) coded in matrices. The hierarchical analysis indicated variation in the wild populations without subdivision, and differences with the cultivated sunflower. In the hierarchical analysis by DNA fingerprinting in seven populations of *T. tubaeformis* recollected from 1494 m to 2500 m of altitude. The cultivated sunflower and *T. tubaeformis* showed genetic

differences, with genetic diversity among wild plants without population subdivision.

It was concluded that, in the target region, *H. annuus* ssp. *texanus* has a range distribution between 1250 m to 1673 m, and *T. tubaeformis* from 1494 m to 2500 m of altitude. The cross between the AN-3 inbred line and *H. annuus* ssp. *texanus* produced fertile hybrids with a high pollen maturity in percent (91.54) according to the staining analysis. On the other hand, the herein proposed method to germinate pollen gave rise to pollen tube development initiation, but at this point its usefulness is qualitative rather than quantitative. For the DNA RAPD- based fingerprinting in wild populations of *H. annuus* and *T. tubaeformis*, and the cultivated sunflower, it was demonstrated the presence of genetic diversity in the wild materials without subdivision. Furthermore, a marked genetic difference between the wild accessions and the cultivated line were found.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

Índice de cuadros xvi

Índice de figuras xvii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE LITERATURA 5

Origen del girasol cultivado 5

Taxonomía 6

Caracteres morfológicos prerreproductivos 7

Esterilidad citoplásmica 10

Hibridación 11

Viabilidad de polen 12

Marcadores moleculares 16

Estudio de la variación de DNA en *H. annuus* 19

I. MATERIALES Y MÉTODOS 21

Distribución de poblaciones silvestres 21

Material genético 21

Ubicación geográfica 23

Cruzas amplias 24

Evaluación morfológica de *H. annuus* 25

Recolección y estudio de polen 29

Análisis de huella genética 34

Desarrollo de plántulas 36

Reactivos utilizados para el estudio de huella genética 36

Aislamiento de DNA 38

Electroforesis para determinar peso molecular y pureza del DNA 40

Concentración de DNA 41

Preparación del coctel y PCR 42

Electroforesis para los productos de amplificación 44

Diseño experimental y análisis estadístico 45

Análisis de componentes principales 47

Análisis de agrupamiento 47

I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48

Análisis de polen 49

Caracteres morfológicos 54

Huella de DNA 60

V. CONCLUSIONES	65
I. RESUMEN	68
II. LITERATURA CITADA	70

ÍNDICE DE CUADROS

Página

- 3.1 Colectas silvestres de *Helianthus annuus* ssp. *texanus* de Saltillo, Coahuila y sus alrededores 22
- 3.2 Colectas de *Tithonia tubaeformis* de Saltillo y la Sierra de Arteaga, Coahuila 23
- 3.3 Símbolos y significado de los caracteres morfológicos y prerreproductivos 31
- 4.1 Cuadros medios del análisis de varianza para germinación de polen por el método de extracto de pistilos 50
 - 4.2 Valores promedio para viabilidad de polen con los métodos de germinación con extracto de pistilos y tinción con Buffalo Black NBR 51
- 4.3 Cuadros medios del análisis de varianza de viabilidad de polen por tinción con Buffalo Black NBR 52
- 4.4 Cuadros medios del análisis de varianza de 13 caracteres morfológicos en línea AN-3, colectas silvestres e híbridos 57
- 4.5 Comparación múltiple de medias en taxa para 13 caracteres morfológicos en girasol cultivado, silvestre e híbridos 57
 - 4.6 Valores y vectores característicos de 13 caracteres morfológicos y prerreproductivos, de los dos primeros componentes principales en la línea AN-3 de girasol cultivado tres poblaciones de girasol silvestre, y sus híbridos 58

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- 3.1 Aqueños de girasol cultivado, silvestre, cruza entre ambos progenitores (F₁) y F₂ 25
- 3.2 Plantas de girasol. A) Línea AN-3; B) Girasol silvestre; C) Híbrido derivado de los anteriores (F₁) 27
- 3.3 Morfología de girasol silvestre. A) Antocianinas en el pecíolo; B) Botón floral 30
- 3.4 Tinción de polen en girasol. A) Polen recolectado; B) Mezclado de polen y colorante; C) Disposición de cubreobjetos; D) Preparación para observar al microscopio; E) Granos de polen teñidos con Buffalo Black 33
- 3.5 Germinación de polen con el método de extracto de pistilos. A) Colecta de polen; B) Distribución de polen; C) Polen con acetocarmín; D) Preparación de polen para observación al microscopio; E) Polen germinado 35
- 4.1 Dispersión del girasol cultivado, poblaciones silvestres, e híbridos en 13 caracteres morfológicos y prerreproductivos, en base a los dos primeros componentes principales 59
- 4.2 Patrón electroforético de RAPDs en plantas de girasol cultivado, silvestre el híbrido 61
- 4.3 Análisis de agrupamiento jerárquico de RAPDs en plantas de girasol silvestre y cultivado 62
- 4.4 Análisis de agrupamiento jerárquico en RAPDs en plantas de poblaciones silvestres de *Tithonia tubaeformis* y la línea AN-3 de girasol cultivado 64

I. INTRODUCCIÓN

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) tuvo su origen en la región central de E.U.A. de acuerdo a la evidencia arqueológica con que se cuenta. El cultivo es importante a nivel mundial para consumo humano, principalmente por su alto contenido y calidad de aceite, también por la calidad proteica de la semilla, además la planta tiene uso forrajero en la alimentación animal y ornamental por la belleza de sus flores.

Las especies de girasol silvestre sirven en el mejoramiento de girasol cultivado, debido a la variación genética que presentan. Aportan genes útiles para resistencia a insectos y enfermedades, tolerancia a sequía, calidad de aceite y proteínas, esterilidad citoplásmica masculina (CMS) y restauración de la fertilidad.

El girasol cultivado en Norte América se distribuye desde el sur de Canadá, gran parte de E.U.A. y el norte de México. En América del sur se encuentra en Argentina, Uruguay, Chile y Brasil. Se cultiva en Rusia y África, además de Australia. En la República Mexicana el girasol silvestre (*H. annuus*) tiene amplia distribución en los estados de Baja California norte y sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango y Veracruz. Un pariente silvestre del girasol cultivado, también ampliamente distribuido en la República Mexicana en las

Sierras Madre Oriental y Occidental, pertenece al género *Tithonia* cuya especie de mayor abundancia es *tubaefornis*.

La hibridación interespecífica entre especies diploides anuales de *Helianthus* produce generalmente híbridos con baja fertilidad, los cuáles presentan diferentes porcentajes de polen viable. Aunque se dificulta el cruzamiento del girasol cultivado con especies perennes poliploides, también se ha logrado. Una forma de evaluar la fertilidad de los híbridos amplios es a través de la viabilidad del polen con diferentes métodos de tinción. El estudio del polen es importante por su aplicación en mejoramiento de frutales en producción, identificación de alelos autoincompatibles además de la hibridación de plantas cultivadas en diferente región geográfica que no presentan sincronía floral.

Ya que los parientes silvestres de girasol cultivado son importantes como fuente de germoplasma, es conveniente conocer su variación genómica, la que puede determinarse por medio de marcadores moleculares. Los marcadores de DNA pueden usarse para investigar el origen y las relaciones genéticas que existen entre plantas, poblaciones, variedades, etc.

En virtud de la existencia de germoplasma silvestre de girasol en Saltillo, Coahuila y sus alrededores, y de la necesidad de estudiar este recurso, se plantearon los siguientes objetivos:

Estudiar la distribución de poblaciones silvestres de *H. annuus* en el municipio de Saltillo, Coahuila y sus alrededores.

Estudiar la distribución de poblaciones de *Tithonia tubaeformis* en los municipios de Saltillo y Arteaga, Coahuila.

Realizar cruza amplias entre el girasol cultivado y poblaciones silvestres de *H. annuus*.

Caracterizar morfológicamente las poblaciones silvestres, una línea de girasol cultivado y su descendencia híbrida.

Desarrollar un método de germinación de polen para *Helianthus annuus*.

Comparar la viabilidad de polen entre una línea cultivada de *H. annuus*, poblaciones silvestres de la misma especie, y su descendencia híbrida.

Evaluar la variación genética de las poblaciones locales de *H. annuus* y *T. tubaeformis* con el uso de huella de DNA a través del método de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).

HIPÓTESIS

Existe variación genética en las poblaciones silvestres locales de *H. annuus* y *Tithonia tubaeformis*.

Es posible utilizar las poblaciones locales de *H. annuus* en programas de cruzamientos amplios con girasol cultivado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Origen del girasol cultivado

Heiser (1978) ha sugerido que antes de la colonización de humanos en Norte América, *H. annuus* estaba restringido en forma silvestre, a lo que hoy es el sureste de E.U.A. Por otro lado se han encontrado aquenios en el registro arqueológico, que corresponden al girasol domesticado en la parte central de E.U.A. (Seiler y Rieseberg, 1997). Las nuevas evidencias sugieren que el girasol fue domesticado en México, pero se postula que aun es posible un origen separado en Norte América (Piperno, 2001). Sin embargo, el análisis de isoenzimas y DNA de cloroplastos indica un virtual monomorfismo en las líneas cultivadas que sugiere un origen simple de girasol doméstico a partir de *H. annuus* silvestre (Rieseberg y Seiler, 1990).

Distribución de *H. annuus* y *Tithonía*

El girasol silvestre *H. annuus* L es geográficamente el mas ampliamente distribuido de Norte América y presenta la mayor variación morfológica y de hábitat (Arias y Rieseberg, 1995). En México se encuentra en los estados de Zacatecas, Durango, Coahuila, Jalisco, Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí (Gómez-Sánchez y González-Elizondo, 1994). Un género relacionado

con *Helianthus* es *Thunbergia* que tiene su máxima distribución en la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental de la República Mexicana. La especie más común del género la representa *T. tubaeformis* que produce capítulos de color amarillo. Otra especie representativa del género es la *T. rotundifolia*, con capítulos amarillos y anaranjados.

Taxonomía

La clasificación Botánica del girasol que incluye desde el reino hasta la especie, la realizó Cronquist en 1981, como se describe a continuación:

Reino Eukaryota

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Asteridae

Orden Asterales

Familia Asteraceae

Tribu Heliantheae

Género *Helianthus*

Especie *annuus*

Las plantas de girasol cultivado son diploides ($2n = 2x = 34$), crecen anualmente, producen hojas grandes en su mayoría, y son monocéfalas. Las

plantas de girasol silvestre pueden medir hasta 4.0 m de altura, presentan múltiples ramificaciones, hojas pequeñas y alternas, los capítulos miden de 1.5 a 2.0 cm de diámetro, el color del disco puede ser rojizo, púrpura o amarillo, las brácteas florales son ovalo- lanceoladas de 3-5 mm de ancho, producen mas de 17 flores liguladas y la longitud de los aquenios es de 3 a 5 mm (Seiler y Rieseberg, 1997).

Caracteres morfológicos prerreproductivos

Los caracteres morfológicos de la inflorescencia de girasol se estudiaron por Seiler (1984) en 90 poblaciones de girasol silvestre (*H. annuus*) y el híbrido comercial 894 (*H. annuus*). Se observaron valores medios para poblaciones silvestres de 3.1 cm para el diámetro de capítulo; 21 lígulas; 3.4 y 1.1 cm para la longitud y ancho de lígulas respectivamente; 30 brácteas; 2 y 0.9 cm para longitud y ancho de brácteas, respectivamente. Los valores medios reportados para los caracteres morfológicos del híbrido 894 de girasol cultivado, incluyen un diámetro de capítulo de 14.5 cm; 45 lígulas; 7.4 y 1.9 cm para longitud y ancho de lígulas; 66 brácteas; 5.6 y 2.6 cm para longitud y ancho de brácteas.

Uno de los caracteres morfológicos que está influenciado grandemente por efectos ambientales, especialmente la humedad y la fertilidad del suelo, es el diámetro de capítulo. La inflorescencia tiene gran interés agronómico debido a que existe una relación entre la fertilidad y el diámetro del capítulo, en

consecuencia una buena fertilidad repercute en el incremento del capítulo lo que influye en el rendimiento (Fick, 1989). Domínguez y Miller (1988), establecieron que la heredabilidad del diámetro de capítulo es relativamente baja (20 por ciento). Al respecto Secerov *et al*, (1997) cruzaron 5 líneas endogámicas de girasol ornamental (*H. annuus*) con especies silvestres de *H. argophyllus*, encontrando que el diámetro de capítulo y la cabezuela presentan herencia intermedia, además existe dominancia parcial de las especies silvestres en relación a la herencia del número de flores liguladas.

De acuerdo a Luczkiewicz (1975), la longitud de lígulas se controla por dos genes dominantes complementarios independientes y lígulas cortas muestran epistasis recesiva en relación con el largo de lígulas. También se descubrió que al reflejarse el color de las lígulas por la absorción de luz ultravioleta, se llama la atención de las abejas, aunque existe diferencia entre genotipos por la variación de tonos desde el amarillo claro hasta el naranja (Sammataro *et al*, 1983).

La longitud de brácteas proporciona resistencia al ataque de pájaros en el capítulo de girasol según Gross y Hanzel (1991), los cuáles utilizaron líneas mejoradas resistentes y susceptibles al ataque de pájaros y evaluaron la longitud de brácteas en diferentes ambientes. Estos autores encontraron que dicha variable es afectada por el ambiente, y que el carácter es altamente heredable. En dicha investigación la longitud de brácteas en genotipos

resistentes varió de 59 a 67 mm y en las líneas susceptibles el rango fue de 43 a 53 mm. Además, Seiler (1997) reportó que la forma de las brácteas es útil en la diferenciación de los híbridos, especialmente en las cruzas de girasol silvestre con el cultivado y silvestre por silvestre.

Los caracteres morfológicos y agronómicos junto con la producción y los componentes de producción fueron evaluados en 196 colectas silvestres de girasol por Mogali y Virupakshappa (1994). La variación fue significativa para todos los caracteres. La mayoría de las colectas tuvieron hojas de forma cordada, mostraron pecíolo de longitud media, fuerte vigor, alta ramificación. La mayor altura fue 234.5 cm, el tallo mas grueso de 2.79 cm, el capítulo mas ancho de 20.7 cm, el mas precoz 47 días, y el mayor número de hojas de 43.7. En otro estudio con nueve híbridos derivados de líneas endogámicas, los cuáles se distinguieron por características morfológicas, bioquímicas y genéticas, la altura de planta varió entre 131 y 158 cm (Andrei y Eva, 1997).

Para estudiar el carácter de ramificación, se cruzaron nueve líneas endogámicas de girasol con diferentes tipos de ramificación. El análisis de las F_1 y F_2 reveló que la ramificación fue controlada por genes recesivos y el ambiente. Las progenies mostraron carácter intermedio y segregación en la F_2 de acuerdo a los resultados obtenidos por Sandu et al. (1997).

Esterilidad citoplásmica

La esterilidad masculina se caracteriza por la inhabilidad de una planta para producir polen viable. El fenotipo de esterilidad masculina es heredado como un carácter Mendeliano o citoplásmico. El citoplasma con esterilidad masculina ha tenido gran interés por su utilidad en la producción de semilla híbrida en cultivos como maíz, sorgo y girasol (Hahn y Friedt, 1994). En girasol el primer sistema real de esterilidad citoplásmica es PETI, el cuál proviene de la cruce entre *Hellanthus petiolaris* nutt y el girasol cultivado, y se usa comercialmente para la producción de híbridos a nivel mundial (Friedt, 1992).

La esterilidad citoplásmica masculina (CMS) se utiliza para la formación de híbridos comerciales en girasol, sin embargo ésta presenta una estrecha base genética derivada del citoplasma de *H. petiolaris* (Rieseberg *et al.*, 1994). Se sabe que las líneas CMS llevan en el DNA de cloroplastos el genotipo de *H. annuus*. Aunque se han identificado 40 citoplasmas diferentes de cruces inter e intraespecíficas (Serieys y Vincourt, 1987), se requiere de nuevas fuentes de CMS para ampliar la base genética del girasol cultivado. Existe evidencia de que la CMS se codifica por genes mitocondriales y se controla por genes nucleares dominantes restauradores de la fertilidad (Hanson, 1991; Horn *et al.*, 1993).

Hibridación

Por métodos de mejoramiento tradicional se han producido híbridos interespecíficos entre girasol cultivado y especies silvestres de *Helianthus*, especialmente las diploides de crecimiento anual (Georgieva-Todorova 1984). La hibridación es común en el girasol anual *Helianthus* secc. *Helianthus* y la integridad de especies se mantiene por barreras de esterilidad cromosómica, la cual produce híbridos semiestériles, de acuerdo con Rieseberg *et al.* (1995). En el girasol ocurre introgresión diferencial entre el citoplasma y el núcleo, ya que el *H. annuus* es el progenitor femenino en la mayoría de los híbridos interespecíficos formados con girasol anual, pues este sirve como el donador citoplásmico (Rieseberg *et al.*, 1991). En un estudio de hibridación se obtuvieron híbridos interespecíficos con baja fertilidad o esterilidad total al cruzar *H. tuberosus* (hexaploide) con girasol cultivado (Atlagic *et al.*, 1993). Por otro lado, también se cruzaron tres especies perennes diploides *H. mollis* (hojas sésiles), *H. salicifolius* (alto contenido de aceite), *H. maximilianí* (resistencia a Sclerotina) y se produjeron plantas F_1 con el fenotipo dominante de las especies silvestres (Atlagic *et al.*, 1995). Además, Atlagic (1996) cruzó especies hexaploides (fuente de genes para resistencia a patógenos) de *H. rigidus*, *H. resinosus* y *H. eggertii* con girasol cultivado y encontró que los híbridos presentaron el fenotipo dominante de las especies silvestres y la esterilidad de la F_1 fue de 0-87.5 por ciento. También se han realizado cruces entre *H. annuus* cultivado y silvestre para la transferencia de

genes de resistencia al moho veloso que aporta el girasol silvestre (Tan *et al.*, 1992), aunque también se han detectado fuentes de resistencia contra la roya, verticilium, alternaria y rhizopus entre otros (Seiler, 1992).

Viabilidad de polen

Las características del polen son fundamentales en el proceso de fertilización. Dada la importancia de dicho proceso, el estudio de polen se lleva al cabo en programas de mejoramiento genético para la formación de híbridos. Sin embargo, la germinación no satisfactoria del polen *in vitro*, es un factor que obstaculiza las investigaciones al respecto (Roberts *et al.*, 1983). Asimismo, Shivanna y Rangaswamy (1992), aseguran que no existe un método de viabilidad de polen universal que sea rápido, simple y confiable.

En relación a los azúcares requeridos para la germinación *in vitro* se ha encontrado que normalmente los granos de polen no germinan en agua, aunque en solución de sacarosa sí lo hacen. La presencia de azúcar es esencial para crear condiciones osmóticas favorables para la germinación y crecimiento del tubo polínico. En petunia (*Petunia parviflora* Juss) se ha mostrado que medios que contienen sacarosa o glucosa como fuente de carbono y energía producen buen crecimiento del tubo polínico, aunque también se ha demostrado que existe en la pared celular del tubo polínico una invertasa que hidroliza la sacarosa produciendo hexosas como glucosa y

fructosa, las cuales son transportadas con residuos de aminoácidos junto con proteínas de membrana (Bush, 1999) a las puntas (tejido meristemático) de crecimiento del tubo polínico.

Respecto a los minerales, en la mayoría de las especies vegetales, la presencia de calcio es indispensable para la germinación normal del grano de polen. La cantidad de calcio liberado en la superficie del estigma puede constituir un mecanismo importante que regula la germinación del grano de polen y la síntesis de calosa (Bednarska, 1989). También se ha demostrado que el calcio interviene como segundo mensajero en la inhibición del crecimiento del tubo polínico en respuesta a la autoincompatibilidad, e interactúa con la proteína calmodulina (Franklin-Tong, 1999). Además, la falta de calcio y boro afectan marcadamente el crecimiento del tubo polínico, en tanto que la ausencia de estos causa anomalías como hinchazón y enrollamiento del tubo (Capková-Balatková et al., 1980). Sin embargo, el boro actúa sobre la elongación del tubo polínico por que estabiliza la membrana celular, y también está involucrado en el transporte de iones hidrógeno, ATPasa y potasio (Benderdour *et al.*, 1998).

Existen diferentes medios para la germinación y el crecimiento del tubo polínico, como el utilizado en *Hevea brasiliensis* con sacarosa al 20 por ciento, 100 ppm de calcio, boro, magnesio y potasio para el cual la germinación encontrada fue de 68.41 por ciento y la longitud del tubo polínico fue de 35 a 45

mm (Saraswathyamma y Panikkar, 1990). En el cultivo de chile se determinó el porcentaje de germinación de polen *in vitro* en un medio líquido con H_3BO_3 al 0.1 mM, $CaCl_2$ 1 mM y sacarosa a dos concentraciones 1 y 5 por ciento, resultando una germinación del 40 por ciento (Mercado *et al.*, 1994).

Aunque cada especie requiere al menos de diferente concentración de azúcar o mineral, uno de los métodos mas utilizados es el de Brewbaker y Kwack (1963) para 86 especies y el de Roberts *et al.* (1983) para *Brassica oleracea*. En este último trabajo se preparó una solución de sacarosa al 20 por ciento, con nitrato de potasio (100 ppm); el pH se ajustó con tris-hidróxido de sodio o metilamina. El mejor resultado de germinación lo encontraron al añadir de 1 a 2 mg de tris. Se analizaron de 400 a 600 granos de polen en cada tratamiento con 2 a 5 repeticiones, también se utilizó un extracto de estigmas (2 estigmas por 10 pl) macerando por 30 minutos. El extracto obtenido se enriqueció con sacarosa al 20 por ciento, cloruro de calcio (362 ppm), nitrato de potasio (100 ppm) y ácido bórico (100 ppm), en proporción 1:1 de extracto y nutrientes. Los resultados fueron de 70 a 100 por ciento en la germinación del polen.

También se ha evaluado la viabilidad de polen en *Brassica rapa* con el medio líquido de Kwack modificado con sacarosa al 20 por ciento, el cuál se probó con diferentes pHs y humedades relativas. La mayor germinación se obtuvo a pH 8 y fue 70 por ciento en 200 granos de polen. Cuando se pretrató el polen a

diferentes humedades relativas (HR) se obtuvo el 90 por ciento de germinación a 70 por ciento de HR (Sato *et al.*, 1998). En una investigación con *Nicotiana tabacum* se trabajó con humedad relativa de 95 por ciento, estrés de temperatura (38° C) y almacenamiento. Se encontró que estos factores afectan el vigor del polen. La viabilidad del polen se comprobó con la prueba de la reacción fluorocromática y el vigor híbrido se evaluó con el tiempo en el que germinaron los granos de polen (Shivanna *et al.*, 1991).

La tinción de polen en diferentes poblaciones de una especie es variable, lo que indica variación en su potencial de fertilidad (Seiler, 1984). En un estudio con especies diploides de *H. annuus* y *H. petiolaris* sobre viabilidad de polen y análisis meiótico se reportó que los híbridos presentaron una viabilidad menor del 10 por ciento. El análisis meiótico indicó que ambas especies tienen el mismo número de cromosomas ($n=17$), pero con diferente estructura, variando en las configuraciones multivalentes como inversiones y traslocaciones (Chandler *et al.*, 1986).

En especies hexaploides de *H. tuberosus* resistentes a patógenos que fueron cruzadas con girasol cultivado, se determinó la viabilidad de polen y se encontraron diferencias significativas entre poblaciones de *H. tuberosus* con porcentajes de tinción de 47.1 hasta 98.8 y en su descendencia (Fi) de 12.4 a 57.1 (Atlagic *et al.*, 1993). Atiagic (1994) cruzó líneas de girasol cultivado con *H. occidentalis*, una especie perenne diploide, y determinó la viabilidad de polen.

Los resultados para *H. occidentalis* fueron de 90.81 a 97.68 por ciento y el híbrido varió de 3.72 hasta 52.94 por ciento. Aunque ambas especies presentan el mismo número de cromosomas, tienen diferencias en la estructura de estos, ya que se encontraron irregularidades en la meiosis. En otras cruzas con tres especies perennes diploides y el girasol cultivado, se cuantificó la viabilidad del polen en la F_1 y varió desde 32.1 a 69.9 por ciento, además de que la meiosis fue irregular (Atlgic et al., 1995). En cruzas entre *H. rigidus*, *H. resinusus* y *H. eggertii* con girasol cultivado se obtuvo de 43 a 70.2 por ciento de polen viable en la F_1 (Atlgic, 1996).

La viabilidad de polen en algodón (*Gossypium hirsutum* L.) se comparó por dos métodos, el de Alexander (1969), que identifica al polen como abortivo y no abortivo, y tinción vital con rojo de tetrazolio (Barrow, 1983). El polen se incubó a temperaturas desde 30 a 43° C para la tinción del citoplasma y a 43° C se inhibió su germinación. En *Hevea brasiliensis* se estudió el polen con una mezcla de glicerol-acetocarmín y se obtuvo el 97 por ciento de polen teñido (Saraswathyamma y Panikkar, 1990).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son indicadores de variación en el DNA. Existen dos tipos de marcadores moleculares; los proteicos que incluyen las isoenzimas y los de DNA como RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente),

RFLP (polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción), AFLP (polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados) y SSLP (polimorfismo en longitud de secuencias simples repetidas) también llamados microsatélites. Los marcadores que se basan en geles tienen aplicación en ciencia forense, pruebas de paternidad, identificación de genes responsables de enfermedades, evolución, construcción de mapas genéticos.

En la agricultura se utilizan en el aislamiento de genes que controlan o segregan para un carácter determinado, localización en los cromosomas, pleiotrofia, sensibilidad ambiental, epistasia, detección de variabilidad genética y cambios en el genoma o para determinar la estructura de poblaciones en animales, plantas y microorganismos, facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos.

Los RAPD se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y consisten en la amplificación aleatoria de secuencias de DNA genómico. Estos marcadores utilizan oligonucleótidos iniciadores simples (primers) de secuencias arbitrarias de 9 a 10 nucleótidos. Dichos nucleótidos deben contener entre 50 y 80 por ciento de guanina y citosina. Los polimorfismos se detectan por electroforesis en gel de agarosa y se miden comparando la presencia de bandas de DNA amplificado entre individuos (Williams, 1990).

Los marcadores de DNA son una herramienta útil para estudios de taxonomía y variación intra e interespecífica, de variación patogénica en microorganismos, epidemiología y genética de poblaciones, además de la construcción de mapas genéticos. También se usan para la detección de marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades y el monitoreo de los niveles de diversidad detectados dentro y entre poblaciones (Waugh y Powell, 1992). Entre las ventajas que presentan los RAPDs se encuentra el uso de iniciadores universales, requiere de pequeña cantidad de DNA, se pueden analizar muchas especies, no requiere radioactividad, ni sondas donadas, ni secuenciación.

Los marcadores RFLP son polimorfismos en longitud de fragmentos de DNA cortados con enzimas de restricción. Dichas enzimas reconocen y cortan el DNA en secuencias muy específicas de 4 a 6 pares de bases (sitios de restricción) a intervalos variables generando fragmentos diferentes, que son separados electroforéticamente. Después son transferidos a un soporte sólido, se hibridizan con una sonda radioactiva y se detectan fragmentos específicos reconocidos por dicha sonda. Estos marcadores son codominantes. En la agricultura los RFLP sirven para distinguir genotipos y caracterizar poblaciones, ya que generan un gran número de marcadores genéticos pues prácticamente cualquier segmento de DNA puede usarse como una sonda (Botstein *et al.*, 1980).

La técnica molecular de los AFLP amplifica, mediante PCR, en forma selectiva fragmentos de DNA genómico, obtenidos con enzimas de restricción. Con dicha técnica puede emplearse DNA de cualquier origen y complejidad sin necesidad de conocer su secuencia. Los AFLP pueden aplicarse en el mapeo genético y en la detección de la variación patogénica (Vos *et al.*, 1995).

Los SSLP se basan en la variación de la longitud de secuencias simples repetidas (SSR) llamadas microsatélites, que se amplifican por medio de la PCR con iniciadores complementarios a las secuencias únicas localizadas en sus flancos. El tamaño de los productos se determina por electroforesis (Weber y Moy, 1989).

Estudio de la variación de DNA en *H. annuus*

Se analizaron 30 materiales que incluyeron colectas silvestres y girasol cultivado por medio de RAPDs para investigar el origen y las relaciones genéticas que existen entre ellos. La evidencia de RAPDs indica que las variedades americanas nativas y las razas antiguas se agrupan cohesivamente, debido probablemente a que se originaron antes del uso de la hibridación interespecífica en el desarrollo de cultivares de girasol, a diferencia de los cultivares modernos en donde no existe cohesión quizá debido al uso de hibridación intra e interespecífica en el desarrollo de variedades modernas de

girasol. Los datos se analizaron por el método de unión de vecinos (Arias y Rieseberg, 1995).

Dry y Burdon (1986), encontraron diversidad entre loci con isoenzimas dentro y entre poblaciones en 11 colectas silvestres de girasol en Australia, por lo que ellos sugieren que dichas poblaciones son una fuente de germoplasma para el mejoramiento genético del girasol cultivado. En otro estudio con aloenzimas se encontró variación genética—geográfica entre especies silvestres de girasol del centro, sur y oeste de E.U.A., además de la variabilidad genética entre el girasol silvestre y el cultivado (Cronn et *al.*, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución de poblaciones silvestres

Se llevó a cabo un recorrido en los alrededores de la Ciudad de Saltillo y la Sierra de Arteaga para identificar y localizar poblaciones de girasol silvestre y *Tithonia*, para realizar la recolección de aquenios. Cada lugar se identificó por medio de las coordenadas geográficas. Los girasoles silvestres se encontraron a la orilla de las carreteras o en lugares dónde hay escurrimiento del agua de lluvia, y las plantas del género *Tithonia* en Buenavista, y la Sierra de Arteaga.

Material genético

En la presente investigación se utilizó la línea androestéril CMS-AN-3 de girasol cultivado (*H. annuus* var. *macrocarpus*) y su análoga restauradora (AN-3), originadas en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Se realizaron colectas de girasol silvestre de *H. annuus* (Cuadro 3.1), las cuáles fueron clasificadas taxonómicamente en el herbario del Departamento de Botánica de la UAAAN como *H. annuus* ssp. *texanus*. Asimismo, se hicieron colectas de *Tithonia tubaeformis* (Cuadro 3.2) otro pariente silvestre del girasol cultivado.

Cuadro 3.1. Colectas silvestres de *Helianthus annuus* ssp. *texanus* de Saltillo, Coahuila y sus alrededores, en 1996.

Población ³²	Colecta ϕ	Lugar de recolección	Latitud (N)	Ubicación Longitud (W)	Altitud (m)
1	1	N. O. Garza y V. Carranza	25° 29'	100° 59'	1525
1	2	L L. Zertuche y N.O. Garza	25° 30'	100° 59'	1550
1	3	N. O. Garza y L. Echeverría A.	25° 26'	100° 58'	1564
2	4	Carr. Saltillo-Monclova Km 22	25° 34'	101° 03'	1441
2	5	Carr. Saltillo-Monclova Km 32	25° 38'	101° 06'	1250
3	6	Otilio González	25° 24'	100° 58'	1653
3	7	L.Echeverría A. y J. V. Sánchez	25° 26'	100° 58'	1586
3	8	L. Echeverría A. y F. J. Mery	25° 24'	100° 59'	1673

ti Incluye dos o tres colectas de girasol silvestre distribuidas por afinidad geográfica Está formada por 20 plantas

Los materiales silvestres fueron recolectados después de que se localizaron en los alrededores del Municipio de Saltillo los meses de agosto a diciembre de 1996, cuando la mayoría de la semilla estaba madura. Se recolectaron 10 capítulos por planta de cada lugar de muestreo en un mínimo de 20 plantas lo que constituyó una colecta. Las colectas se realizaron con una distancia mínima de 100 m. Los capítulos fueron desgranados y se hicieron mezclas de aquenios por colecta, para posteriormente almacenarse en el Laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales en el Departamento de Fitomejoramiento en la UAAAN.

Cuadro 3.2. Colectas de *Tithonia tubaeformis* de Saltillo y la Sierra de Arteaga, Coahuila., en 1996.

Población 32	Colecta ϕ	Lugar de recolección	Ubicación		
			Latitud (N)	Longitud (W)	Altitud (m)
1	1	La Carbonera, Arteaga, Coahuila	25° 28'	100° 40'	2118
2	2	Carr. Saltillo- Zacatecas	25° 21'	111° 01'	1817
2	3	Buenavista, Coahuila	25° 22'	101° 00'	1754
2	4	Carr. Saltillo-Zacatecas km 3.7	25° 22'	101° 00'	1754
2	5	Carr. Saltillo-UAAAN km 4.5	25° 22'	101° 02'	1727
3	6	Aguanueva, Coahuila	25° 11'	101° 05'	1968
3	7	Carr. Saltillo-Zacatecas, Fosa el Mamut	25° 18'	101° 04'	1887
4	8	Carr. Saltillo, La Aurora, Coahuila km 2	25° 27'	100° 55'	1564
4	9	Carr. Arteaga, La Aurora km 5	25° 27'	100° 53'	1629
4	10	Carr. Los González	25° 29'	100° 58'	1494
4	11	CIQA, Saltillo	25° 27'	100° 58'	1541
4	12	I. López Zertuche y L. Echeverría	25° 27'	100° 60'	1558
5	13	Los lirios, Arteaga, Coahuila	25° 24'	100° 33'	2499
6	14	La Efigenia, Arteaga, Coahuila	25° 15'	100° 32'	2328
7	15	El Cristal, Arteaga, Coahuila	25° 20'	100° 40'	2088

rt Incluye desde una a cinco colectas de *Tithonia* : ϕ está representada por 20 plantas en cada sitio de muestreo.

Ubicación geográfica

En los Cuadros 3.1 y 3.2 se anotan las localizaciones originales de las colectas. Las siembras se realizaron en el campo experimental de Buenavista, Saltillo, Coahuila. ubicado en la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" cuyas coordenadas geográficas son 25° 22' de latitud **N** y 101° 00' de longitud

W, con altitud de 1754 m. El clima que prevalece es seco con precipitación anual de 490 mm. La temperatura media anual es de 13.3° C. Los meses cálidos son de junio hasta agosto con temperaturas máximas de 37° C, los meses que registran temperaturas bajas son diciembre y enero, alcanzando —10° C, con heladas regulares de diciembre a febrero.

Cruzas amplias

El experimento se inició en el verano de 1997 en el campo experimental de Buenavista en la UAAAN, con la siembra de las colectas silvestres en vasos de polipropileno dentro del invernadero. En estado de plántula fueron trasplantadas al campo siete plantas de cada material silvestre, utilizando un surco por cada material, a una distancia de 1.5 m entre plantas y 80 cm entre surcos. La línea androestéril de girasol cultivado CMS-AN-3, se sembró directamente al suelo a 25 cm de distancia entre plantas.

Se realizaron cruzas amplias entre el girasol cultivado (línea CMS-AN-3) y las ocho colectas silvestres (*H. annuus* ssp. *texanus*). En la etapa de floración se cubrieron botones florales con bolsas de papel, previa identificación del material genético en las siete plantas de cada colecta silvestre. Después se recolectó el polen de cada planta en cajas de Petri para fecundar los capítulos androestériles de girasol cultivado previamente cubiertos. Fueron necesarias tres polinizaciones para fecundar el capítulo androestéril. La polinización se realizó con un aplicador de franela por planta de girasol cultivado androestéril,

para evitar la contaminación por polen y asegurar la cruce. Finalmente se cosecharon 70 capítulos híbridos en bolsas separadas por colecta de girasol silvestre. La semilla derivada de cada cruce se sembró al año siguiente (Figura 3.1).

H. annuus var. macrocarpus *H. annuus ssp. texanus*

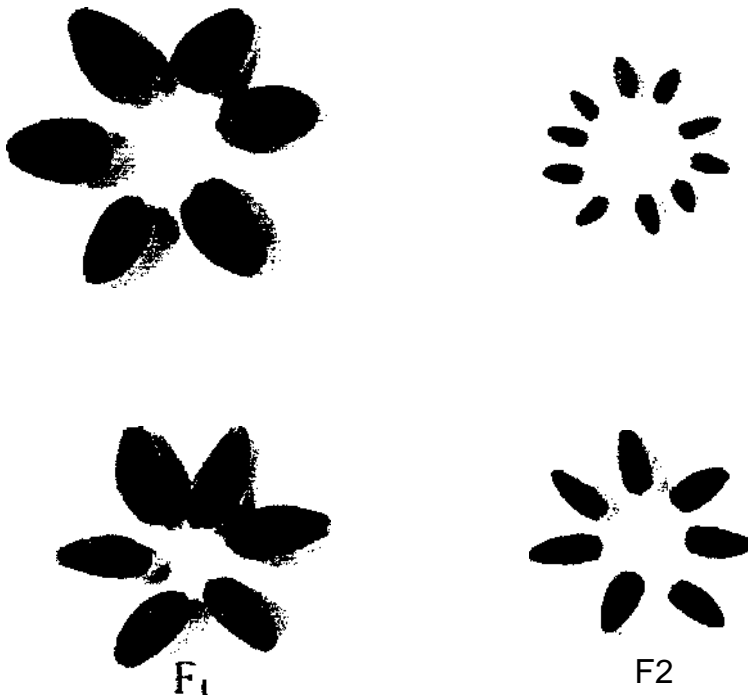


Figura 3.1. Achenios de girasol cultivado, silvestre, cruce entre ambos progenitores (F1) y F2.

Evaluación de *H. annuus*

En 1998 se continuó la investigación en campo. Igual que para las cruces amplias, los achenios fueron sembrados en vasos de polipropileno en el

invernadero para su trasplante posterior. Por otro lado, se preparó el terreno el cual se dividió en dos lotes. Un lote se utilizó para las colectas y el otro para la F_1 , trasplantándose los materiales en surcos alternos, la distancia entre plantas fue de 1.5 m y entre surcos de 80 cm. Para cada colecta se utilizó un surco, el cuál se constituyó de siete plantas, que fueron trasplantadas 15 días después de la siembra, se utilizaron ocho surcos para cada una de las colectas y la misma cantidad para las F_1 . La semilla de girasol cultivado fue sembrada en un lote contiguo a una distancia entre plantas de 25 cm.

Los fertilizantes que se aplicaron al girasol cultivado fueron urea como fertilizante nitrogenado y superfosfato triple como fuente de fósforo en dosis de 60-40-00. Se aplicaron cinco riegos durante el desarrollo del cultivo a todos los materiales. Las plagas que se detectaron durante el desarrollo de las plantas híbridas en algunas colectas fueron mayates verdes (*Cotinis nítida* L.) y pulgón del follaje (*Schízaphis graminum*), a los cuáles se les controló con paratión metílico a dosis de 1 L ha⁻¹. Las malas hierbas fueron controladas manualmente.

En la etapa de floración se evaluaron tres inflorescencias de tres plantas por colecta y F_1 . En el girasol cultivado se evaluó una inflorescencia por planta en 20 plantas (Figura 3.2). La evaluación incluyó ocho caracteres morfológicos de la inflorescencia de girasol y cinco vegetativos prerreproductivos. Para cada carácter se evaluaron tres plantas de cada colecta y cruza (F_i).



Figura 3.2. Plantas de girasol. A) Línea CMS-AN-3; B) Girasol silvestre; C) Híbrido (F₁)

El diámetro de capítulo se basó en dos mediciones perpendiculares. Los caracteres florales evaluados fueron: el diámetro de capítulo (DC), número de lígulas (NL), número de brácteas (NB), longitud de lígulas (LL), longitud de brácteas (LB), ancho de lígulas (AL), ancho de brácteas (AB), número de hileras de brácteas (NHB) y días a floración (DF). La longitud de lígulas y brácteas se midieron desde la base del capítulo hasta dónde termina la lígula y bráctea. El ancho de lígulas y brácteas, se midieron en la parte central de las lígulas y brácteas respectivamente. Para longitud de lígulas y bráctea ancho de lígulas y brácteas se hicieron cuatro mediciones de las cuales se obtuvo el promedio. La toma de datos de los caracteres se realizó con cinta métrica en cm. El número de hileras de brácteas se contó desde la base de la cabezuela hasta la hilera que cubría las lígulas. Los días a floración, se cuantificaron desde la siembra hasta que las flores tenían el 50 por ciento de las flores abiertas.

La evaluación de los caracteres vegetativos se realizó cuando las plantas tenían el 50 por ciento de floración. Igual que para los caracteres prerreproductivos se evaluaron tres plantas de cada colecta y cruza (F_i) en cada surco. Se evaluaron visualmente las antocianinas (A) por medio de una escala arbitraria, la altura de planta (AP), el área foliar (AF), los días a floración (DF), y el número de capítulos (NC). La escala de evaluación para antocianinas fue 0, 1, 2. El 0 para plantas que no tenían pigmento, el 1 para plantas con pigmentación intermedia y el 2 para plantas con pigmentación total en el tallo. Esta escala se eligió ya que el girasol cultivado no presentaba dicho pigmento y la mayoría de las plantas de girasol silvestre tenían antocianinas en

el tallo (Figura 3.3). La altura de planta se midió con cinta métrica, utilizando como unidad de medida el metro, desde la base de la planta hasta la punta de crecimiento. Para el área foliar se midieron el largo y ancho en cm, de tres hojas por planta, se obtuvo en promedio en cada planta y este valor se multiplicó por 0.67 para la cuantificación del área foliar por planta en cm^2 (Trehan *et al.*, 1976). El número de capítulos se cuantificó en tres plantas de cada colecta silvestre y materiales híbridos. En el Cuadro 3.3 se anotan las características evaluadas con sus respectivas abreviaturas.

Recolección y estudio de polen

En el campo experimental de Buenavista, Saltillo, durante el ciclo primavera-verano de 1999 se estableció la siembra del girasol cultivado, silvestres e híbridos para llevar al cabo la recolección de polen, con la diferencia de que en lugar de la línea CMS-AN-3, se sembró su mantenedor. Se cubrieron con bolsas de papel un total de quince botones, en tres plantas de cada material silvestre e híbrido. Para el girasol cultivado se utilizaron 15 capítulos, uno por planta. Cada bolsa se marcó con la clave correspondiente y después de tres días se recolectó a primera hora de la mañana el polen en cajas Petri, procurando tener condiciones uniformes en la colecta. El polen se trasladó al Laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales (Departamento de Fitomejoramiento, UAAAN) para estimar el porcentaje de polen viable por la técnica de tinción con Buffalo Black NBR (Jackson, 1988) y el porcentaje de germinación por medio de un nuevo método basado en extracto de pistilos de

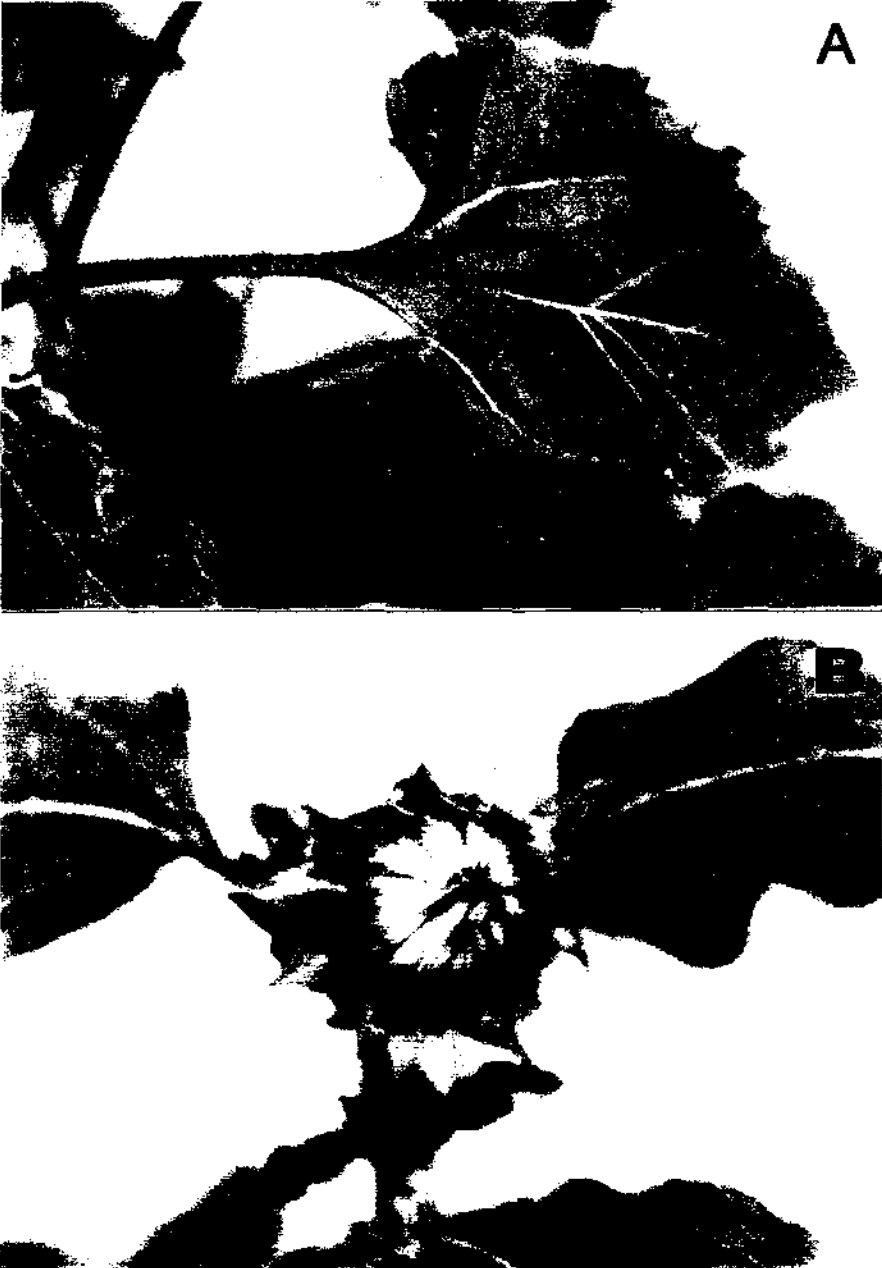


Figura 3.3. Morfología de girasol silvestre. A) Antocianinas en el pecíolo; B) Botón floral.

de girasol androestéril, que se propone en este trabajo.

Cuadro 3.3. Símbolos y significado de los caracteres morfológicos y prerreproductivos.

Abreviatura	Característica
DC (cm)	Diámetro de capítulo
LL (cm)	Longitud de lígulas
AL (cm)	Ancho de lígulas
NL	Número de lígulas
NB	Número de brácteas
NHB	Número de hileras de brácteas
LB (cm)	Longitud de brácteas
AB (cm)	Ancho de brácteas
DF	Días a floración
AP (m)	Altura de planta
AF (cm ²)	Área foliar
AN	Antocianinas
NC	Número de capítulos

El polen recolectado de cada capítulo se mezcló para su homogenización y se analizó por duplicado. Para cada repetición se colocó una gota de Buffalo Black 0.01 indicador y ácido acético al 45 por ciento) en un portaobjetos, sobre la cual se aplicó con la punta de unas pinzas una pequeña cantidad de polen, el cual se dispersó con un cubreobjetos y se dejó reposar 20 segundos.

Se realizaron recuentos al microscopio en diferentes campos hasta completar 100 granos de polen, para posteriormente obtener una estimación del porcentaje de polen viable. Se tomó como polen viable el grano teñido de color azul intenso y como no viable el que sólo se tiñó ligeramente (Figura 3.4).

Debido a que los métodos de germinación de polen como el de Kwack modificado (1964), Roberts *et al.* (1983) y Kato (1989) que existen en la literatura para otras especies no funcionaron en girasol, se ideó un método basado en el uso de extracto de pistilos, y su combinación con diferentes concentraciones de sacarosa y minerales como calcio y boro. Dicho método consistió en lo siguiente: se cortaron con una navaja ocho hileras de flores femeninas de un capítulo de la línea CMS-AN-3, se pesaron 1.5 g y se maceraron con 50 ml de agua destilada durante 1 h. El extracto se obtuvo filtrando con papel # 40, y se utilizó para impregnar tiras de papel filtro de 5 x 1 cm. Por otro lado, se utilizaron tubos de vidrio de fondo plano a los cuales se les añadió 1 ml de solución preparada con ácido bórico (100 ppm), nitrato de calcio (280 ppm) y sacarosa (12 por ciento). El papel antes impregnado se dobló formando un puente y se deslizó dentro del tubo para que la solución humedeciera el papel. Posteriormente con la punta de una pinza se dejaron caer los granos de polen en el puente formado con el papel filtro. Cada tubo se llevó a la incubadora a $28 \pm 0.1^\circ \text{C}$ por siete horas en oscuridad. Pasado este tiempo en un portaobjeto se colocó el polen con una gota de acetocarmín (1 g disuelto en ácido acético al 45 por ciento) y se observó en el microscopio con el objetivo de 10x, contándose varios campos hasta completar 100 granos

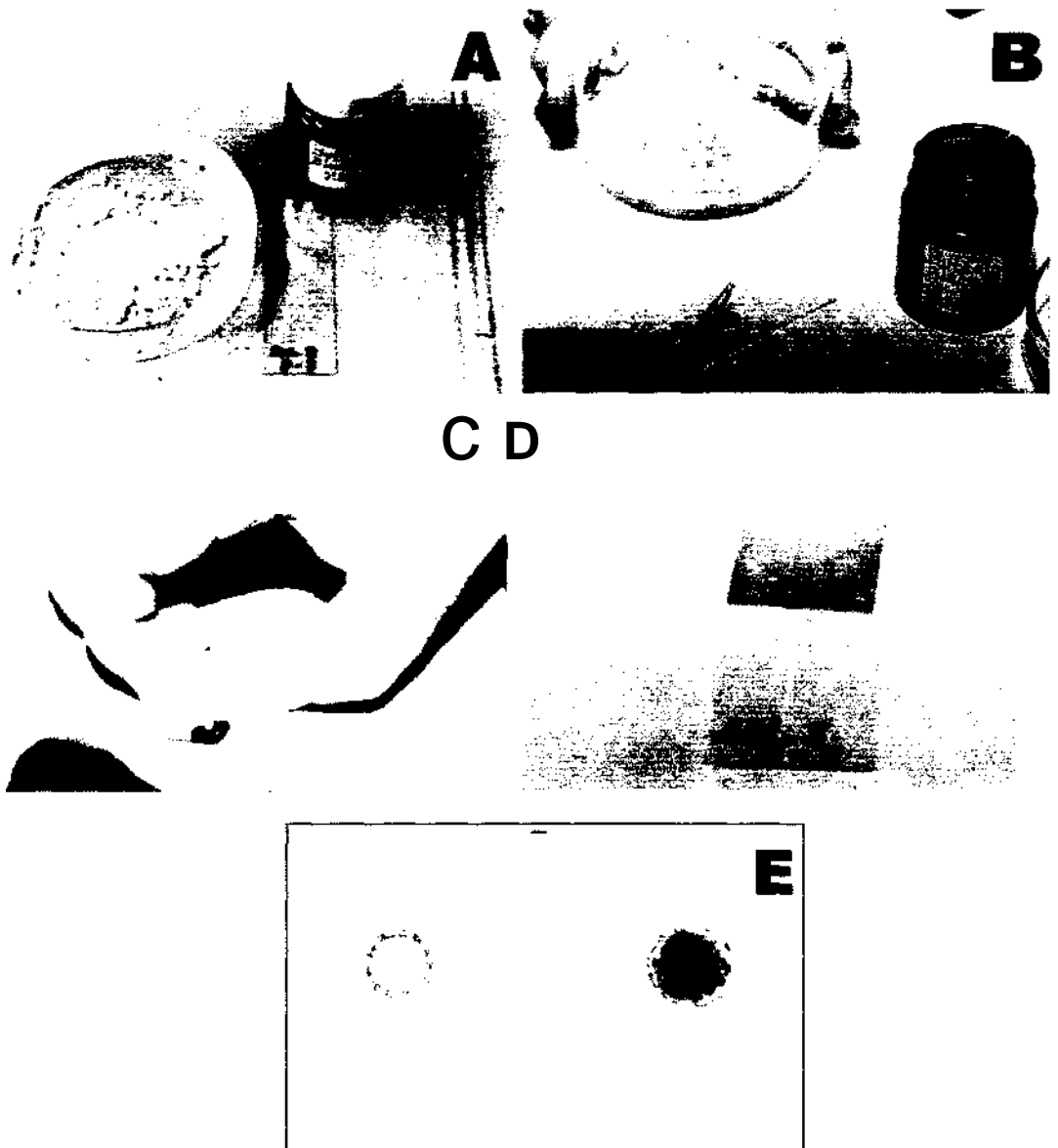


Figura 3.4. Tinción de polen en girasol. A) Representación de polen recolectado; B) Mezclado de polen y colorante; C) Disposición de cubreobjetos; D) Preparación para observar al microscopio; E) Granos de polen teñidos con Buffalo Black.

de polen, con lo cuál se obtuvo el porcentaje de polen germinado (Figura 3.5). En este método se consideró como grano germinado el que presentó una longitud de tubo polínico mayor a la del grano de polen (Roberts et al.,1983).

El extracto de pistilos se analizó en el laboratorio con un aparato de absorción atómica (Perkin Elmer) para obtener la concentración de los minerales como calcio, magnesio, manganeso, fierro, sodio, y boro. También se determinó la concentración de glucosa por el método de azúcares reductores de Felhing (AOAC, 1980).

Análisis de huella genética

Por razones de economía, para el estudio de huella genética fue necesario agrupar las colectas de girasol silvestre *H. annuus ssp. texanus* (Cuadro 3.1) y las colectas de *T. tubaeformis* en poblaciones por afinidad geográfica como se muestra en el Cuadro 3.2, para el análisis molecular por el método de PCR y RAPDs.

El análisis de huella genética se realizó en el año 2000. Para ello se establecieron plántulas de cada población para el aislamiento del DNA, preparación del coctel y PCR, preparación del gel para electroforesis y visualización del DNA.

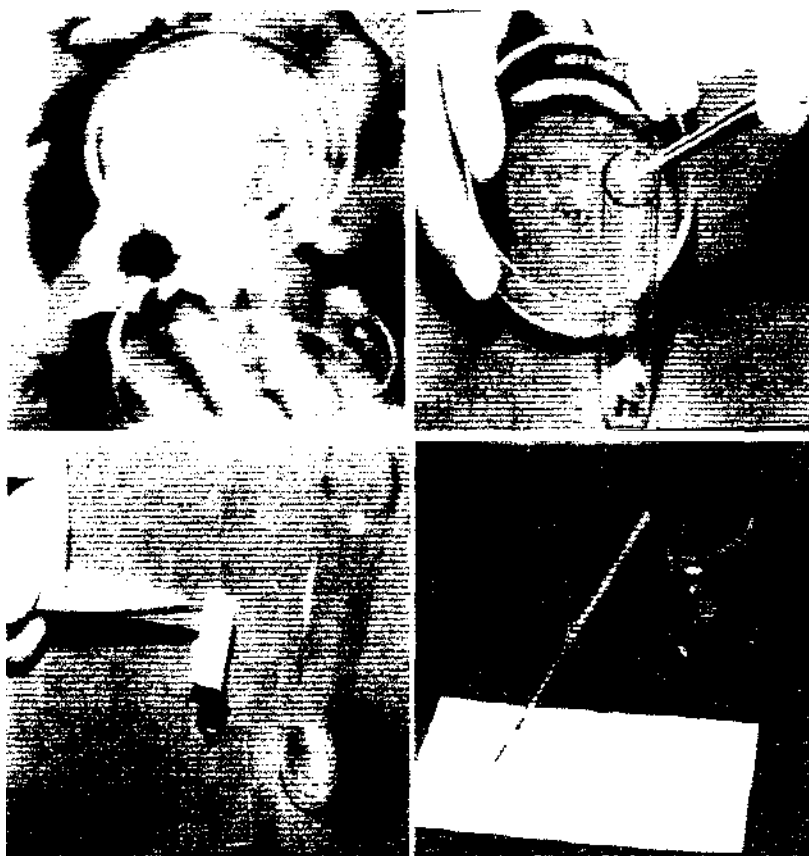


Figura 3.5, Germinación de polen con el método de extracto de pistilos. A) Colecta de polen; **B)** Distribución de polen; C) Polen con acetocarmín; D) Preparación de polen para observación; E) Polen germinado.

Desarrollo de plántulas

La siembra en el invernadero de cada colecta de girasol silvestre (*H. annuus* ssp *texanus*), *Thitonia tubaeformis* y línea AN-3 de girasol cultivado se realizó con semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.1 porciento, después de 20 minutos, se enjuagaron con agua destilada, y se colocaron sobre papel secante. Se colocaron cinco semillas de cada material en vasos de polipropileno que contenían suelo de bosque, previamente tamizado con malla de 2 mm y esterilizado en estufa a 110° C por 3 h. En la emergencia se llevó a cabo el desahije dejando sólo una planta por vaso de cada material genético. En estado de plántula se cortaron hojas, de preferencia las mas jóvenes, con una navaja desinfectada con alcohol de 96°, se utilizaron para los cortes, guantes de látex para evitar la contaminación de las hojas. Estas se envolvieron en papel aluminio esterilizado y etiquetado con la clave de cada material, se depositaron en hielo dentro de una hielera y se trasladaron al Laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento para la extracción del DNA.

Reactivos utilizados para el estudio de huella genética

- Etanol al 70 porciento.
- Hipoclorito de sodio 0.06 porciento. Medir 1 ml de hipoclorito de sodio al 6 porciento y añadir 99 ml de agua.

- Buffer de extracción. Contiene las siguientes soluciones:

Tris-HCl 100 mM.

EDTA (Acido etiléndiamino tetracético) 20 mM.

NaCl (cloruro de sodio) 1.4 M.

Mezclar las soluciones y esterilizar, añadir CTAB (cetiltrimetil bromuro de amonio) para obtener una solución al 2 por ciento y mercaptoetanol al 0.2 por ciento.

- Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
- RNAsa de 50 pg m¹. Pesar 1 mg de RNAsa y disolver en 20 ml de agua destilada estéril, hervir en un baño de temperatura constante por 15 minutos.
- Isopropanol grado reactivo.
- Solución de lavado. Pesar 1.36 g de acetato de sodio y disolver en etanol al 76 por ciento hasta completar un volumen de 50 ml.
- TE 10X . Mezclar 10 ml de Tris-HCl 1 M y 8 ml de EDTA 0.5 M, completar a 100 ml con agua.
- TE1X. Medir 10 ml de la solución TE 10X y 90 ml de agua, ajustar a pH 8.
- Buffer de electroforesis (TBE 10X). tris-base, ácido bórico y EDTA.
- TBE 0.5X. Mezclar 5 ml de TBE 10X y 95 ml de agua.
- TBE IX Mezclar 10 ml de TBE 10X y 90 ml de agua.
- Agarosa al 1 por ciento. Pesar 1 g de agarosa y disolver en 100 ml de TBE IX, en horno de microondas.

- Buffer de carga. Contiene azul de bromofenol, xileno-cianol y glicerol en por ciento, 0.25:0.25:30 respectivamente.
- Bromuro de etidio 1 mg .
- DNA lambda.
- Marcador de peso molecular (250 pg m⁻¹) de 3000 pb. Disolver en proporción 2:3 en TE 1X .
- Perlita de la marca Amersham Pharmacia Biotech. Contiene 10 mM de tris HCl de pH 9, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200 pM de dNTPs, estabilizadores de BSA y 1.5 unidades de taq polimerasa de DNA.
- Primer (iniciador). Operón A02, con 70 por ciento de C + G contiene la secuencia 5' a 3' TGCCGAGCTG y el B01 con 60 por ciento de C + G y la secuencia GTTTGGCTCC.
- Buffer 10X para coctel (Roche). Contiene 50 pM de cloruro de magnesio
- Taq polimerasa (Roche) de 5 unidades.

Aislamiento de DNA (Método Doyle y Doyle, 1990).

1. Cortar hojas jóvenes a primera hora de la mañana, colocar dentro de papel aluminio, y depositarlas sobre hielo dentro de una hielera.
2. Pesar de 0.2 a 0.3 g de hojas en una balanza analítica, lavarlas con alcohol al 70 por ciento por 2 minutos y desinfectarlas con hipoclorito al 0.6 por ciento. Enjuagar con agua destilada y secar sobre un papel.

3. Depositar las hojas en un mortero y después en el ultracongelador por 30 minutos a -57°C .

1. Retirar del ultracongelador y moler las muestras rápidamente para depositarlas con una microespátula dentro de tubos ependorf de 1.5 ml, añadir 600 μl de Buffer de extracción caliente (65°C).

2. Colocar las muestras en un baño de agua a temperatura constante por 30 minutos con agitación ocasional.

3. Enfriar la muestra a temperatura del laboratorio y agregar 600 μl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), invertir el tubo para formar una emulsión.

4. Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos para separar las fases.

5. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir el volumen de RNAsa apropiado para tener una solución de 10 pg m^{-1} e incubar por 30 minutos a 37°C .

6. Añadir 0.7 volúmenes de isopropanol frío (-20°C) dependiendo del volumen de la muestra y dejar precipitar el DNA a temperatura ambiente.

10. Transferir el DNA precipitado a un tubo nuevo que contenga solución de lavado (alcohol 76 % y acetato de sodio 0.2 M)

1. Liberar la solución de lavado y añadir 400 μ l de etanol al 70 por ciento (-20° C), desechar el etanol y repetir el proceso 2 a 3 veces hasta que el precipitado este blanquecino.

2. Diluir el DNA extraído con un volumen de TE 1X.

3. Guardar en el refrigerador a 4° C.

Electroforesis para determinar peso molecular y pureza del DNA

1. Preparar un gel de agarosa al 1 por ciento en TBE 0.5 X.

2. Nivelar la cámara de electroforesis.

3. Colocar el peine en la cámara de llenado.

4. Depositar en la cámara de llenado el gel disuelto, cuando la temperatura esté entre 40 y 45° C, dejar solidificar el gel y quitar el peine.

5. Cubrir el gel con buffer de electroforesis (TBE 0.5X).

6. Diluir el DNA obtenido con la técnica de Doyle y Doyle (1990), con TE 1X en proporción 1:5.

7. Cargar con una micropipeta 6 μ l de muestra; en el primer pozo colocar

el marcador de peso molecular y en los siguientes pozos las muestras de DNA, (5 μ l de DNA y 1 μ l de buffer de carga).

8. Conectar los electrodos en el electroforador y la fuente de poder.

1. Correr las muestras a 70 volts por 1.5 h en un electroforador horizontal.

2. Depositar el gel en un recipiente que contenga solución de bromuro de etidio (2 μ g m^{-1}) por 2 minutos.

11. Enjuagar el gel con agua destilada por 20 minutos, o más si es necesario para eliminar el exceso de bromuro de etidio.

Observar las bandas en un transiluminador (sí estas corresponden a pesos moleculares entre 10-12000 pb y no existe RNA, el DNA puede utilizarse en la amplificación con PCR).

Concentración de DNA

1. Preparar 3 concentraciones (100, 50, y 25 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) de DNA estándar Lambda y cuatro diluciones del DNA de plantas con TE 1X (1/2, 1/4, 1/8, 1/16).

2. Preparar un minigel con agarosa al 1 por ciento en TBE IX, vaciar en una caja de Petri y antes de la solidificación del gel, agregar 10 μ l de bromuro de etidio (2 μ g m^{-1}) y mezclar para uniformizar el colorante.

3. Depositar 1 μ l de cada estándar y dilución de DNA en el minigel de agarosa.

4. Observar en el transiluminador con luz ultravioleta la fluorescencia del DNA y comparar el DNA lambda con el DNA de las diluciones, para Conocer aproximadamente la concentración del DNA extraído.

Preparación del coctel y PCR

Después de detectar el peso molecular y la concentración del DNA en las plantas de las poblaciones de girasol silvestre y las plantas de la línea AN-3 de girasol cultivado, se procedió a preparar el coctel para la reacción de amplificación del DNA (tres diluciones por planta) por medio de la PCR, de la siguiente forma:

1. Etiquetar tubos de 250 μ l con la mezcla de coctel en forma de perlita (liofilizado) de la marca Amersham Pharmacia Biotech.
2. Añadir con micropipeta 1 μ l de primer (iniciador A02 y B01, Biociencia), 5 μ l de DNA diluido y 19 μ l de agua destilada ultrapura (mq) para obtener 25 μ l de volumen total,
3. Agregar 20 μ l de aceite mineral esterilizado, para evitar la pérdida de sustancias y el desequilibrio estequiométrico de la reacción de amplificación de la PCR.

Para las plantas de las poblaciones de *Tithonia tubaeformis* y girasol cultivado se varió el procedimiento anterior y se preparó el coctel con 14 pl de agua ultrapura, 4 pl de buffer 10X (Roche), que incluye cloruro de magnesio, 0.5 pl de dNTPs 10 mM, 1 pl de primer 40 mM específico para girasol A02 y B01 (Whitton et al., 1997), 0.5 pl de taq polimerasa (Roche) y 5 pl de DNA diluido, a excepción del punto 3 que fue igual en la adición del aceite mineral.

El coctel se llevó a un termociclador (Minicycler™ M. J. Research Inc. Mod. PTC-150) para tubos de 250 pl, en dónde se amplificó el DNA por medio de la PCR, que se basa en lo siguiente:

1. Desnaturalizar la doble hélice a 92° C.
2. Alinear el DNA complementario con los primers a 36° C.
3. Extender el DNA por la taq-polimerasa a 72° C.

La reacción de amplificación en el termociclador se programó en 45 ciclos distribuidos en 7 pasos, como se muestra a continuación:

1. Calentar por 2 minutos a 94° C.
2. Calentar por 1 minuto a 92° C.
3. Enfriar el coctel a 36° C y mantener por 1 minuto a esta temperatura.
4. Elevar la temperatura a 72° C y mantenerla por 2 minutos.
5. Regresar 44 veces a los pasos 2, 3 y 4.
6. Mantener a 72° C por 7 minutos.

7. Enfriara 4° C.

Electroforesis para los productos de amplificación

Después de efectuada la PCR se retiraron los tubos de 250 μ l, se centrifugaron para separar el coctel del aceite mineral y se mantuvieron en hielo para continuar con la electroforesis de acuerdo a los primeros 6 pasos de la electroforesis para peso molecular del DNA. En el paso 7 en lugar de añadir 5 μ l de DNA diluido, se utilizó DNA amplificado mezclado con 1 μ l de buffer de carga y en el paso 9, la electroforesis se dejó correr por 2.5 h. Después se observó el DNA en un transiluminador.

Visualización

1. Llevar el gel al transiluminador para observar con luz ultravioleta, las bandas obtenidas en el proceso de amplificación de la PCR.
2. Tomar una fotografía instantánea con una cámara polaroid.

Las bandas obtenidas de cada planta en los materiales genéticos analizados durante la reacción de amplificación se codificaron en una matriz de ceros y unos. El 0 para ausencia de banda el 1 para presencia de banda, y el 2 para banda dudosa, eligiéndose las bandas más representativas en un rango de 2750 a 300 pares de bases (pb).

Diseño experimental y análisis estadístico

En el estudio de viabilidad de polen se utilizó un diseño completamente al azar con efectos anidados. Los factores incluyeron taxa, colectas y plantas y se aplicó el siguiente modelo lineal.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_{(i)j} + P_{k(ij)} + E_{ijkl}$$

Donde:

μ = media general.

$i = 1, 2, 3$ (taxa).

$j = 1, 2, \dots, 8$ colectas dentro de taxa.

$k = 1, 2, \dots, p$ plantas dentro de colectas dentro de taxa.

$I = 1, 2, \dots, r$ repeticiones dentro de tratamientos

T_i = efecto del i -ésimo taxón; $C_{(i)j}$ = efecto de la j -ésima colecta dentro del i -ésimo taxón; $P_{k(ij)}$ = efecto de la k -ésima planta dentro de la j -ésima colecta del i -ésimo taxón

E_{ijkl} = error experimental

Y_{ijkl} = observación en la l -ésima muestra, de la k -ésima planta, dentro de la j -ésima colecta del i -ésimo taxón

Después del el análisis de varianza se realizó la prueba de medias de Tukey para comparar los taxa (colectas silvestres, el girasol cultivado y los híbridos).

El diseño para evaluar los caracteres morfológicos y prerreproductivos, también fue anidado y completamente al azar. Se incluyeron taxa, colectas y plantas como factores, con el siguiente modelo lineal.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_{j(i)} + E_{ijk}$$

Donde:

μ = media general

$i = 1, 2, 3$ (taxa)

$j = 1, 2, \dots, 8$ colectas dentro de taxa

$k = 1, 2, \dots, p$ plantas dentro de colectas dentro de taxa

T_i = efecto del i -ésimo taxón ; $C_{j(i)}$ = efecto de la j -ésima colecta dentro del i -ésimo taxón.

E_{ijk} = error experimental

Y_{ijk} = observación de la k -ésima planta, dentro de la j -ésima colecta del i -ésimo taxón.

Análisis de componentes principales.

Es una de las técnicas estadísticas más usadas para el análisis de datos multivariados (Manly, 1990). En el análisis de componentes principales (ACP) las variables observadas se expresan en un número reducido de combinaciones lineales, con el propósito de resumir la mayor parte de la varianza acumulada en las variables originales. Los objetivos del ACP son generar nuevas variables con propiedades independientes y de varianza máxima que expresen la información contenida en un conjunto de datos, además de reducir la dimensión del problema bajo estudio, disminuyendo el número de nuevas variables en relación al número de variables originales. El primer componente es la combinación lineal con varianza máxima; el segundo es la combinación lineal con varianza máxima, pero independiente del primero; el tercero también maximiza la varianza pero es independiente de los dos primeros, y así sucesivamente. Sin embargo se espera que los primeros componentes expliquen la mayor parte de la variabilidad presente en los datos originales. Por medio del análisis de componentes principales serán analizados los caracteres morfológicos, prerreproductivos y huella genética de DNA.

Análisis de agrupamiento (Cluster).

El análisis de agrupamiento es el nombre que reciben una gran cantidad de procedimientos que se pueden utilizar para clasificar o agrupar objetos o individuos. En él se agrupan los n individuos de la muestra en grupos en base

a las k variables medidas. Además es necesario agrupar el parecido de los individuos en base al coeficiente de similitud, por medio de la distancia euclidiana para comparar plantas entre poblaciones con base en los datos moleculares. La función de distancia euclidiana es:

$$D_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Donde:

D_{ij} = es la distancia que existe entre la planta i y la planta j; i = plantas diferentes; k = 1,..., p plantas diferentes; $x_{ik} = 1$ presencia de banda; $x_{ik} = 0$ ausencia de banda.

El método de agrupamiento jerárquico utilizado es agrupamiento de pares de individuos por la media aritmética (UPGMA), el cuál necesita para su análisis una matriz de ceros y unos. El análisis de agrupamiento y el de componentes principales se realizará con el programa S-Plus, versión 4.5.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de polen

Los resultados mostrados en el Cuadro 4.1, para el porcentaje de germinación de polen mediante el método de extracto de pistilos, revelaron por medio del análisis de varianza que los taxa (las colectas silvestres, el girasol cultivado y Fi) produjeron diferente germinación de polen. Similares resultados se obtuvieron para colectas dentro de cada taxa, dentro de silvestres y cruzamientos dentro de híbridos derivados de la cruce de AN-3 con ocho colectas silvestres. La comparación entre plantas dentro de colectas silvestres, y para plantas dentro de híbridos mostró diferencias significativas ($F' \dots 0.01$), no así para plantas dentro de la línea AN-3.

Al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la germinación de polen entre el girasol silvestre y su pariente cultivado así como entre el silvestre y la descendencia híbrida. La mayor germinación de polen se produjo en las colectas silvestres (Cuadro 4.2). Aunque Atlagic *et al.* (1995) obtuvieron con especies perennes diploides en las Fi una viabilidad de polen menor a la de los progenitores, la respuesta obtenida en la germinación de polen en este trabajo pudo deberse a compuestos químicos relacionados con autoincompatibilidad esporofítica en

los estigmas y que ocasiona fallas en la germinación del polen emparentado con la línea AN-3, lo que condujo a la inhibición del crecimiento del tubo

Cuadro 4.1. Cuadrados medios del análisis de varianza para germinación de polen por el método de extracto de pistilos.

Fuente	GL	CM	
TaxacD	2	2568.83	**
Colectas/taxa	14	541.26	
Colectas/ silvestres	7	268.30	
Colectas/híbridos	7	814.22	
Pla/colectas/taxa	46	168.80	
Pla/colectas/silvestres	16	135.46	
Pla/colectas/híbridos	16	338.78	
Pla/AN-3	14	12.64	NS

Error 218 32.20

CV = 20.21 °A

** Significativo al 0.01 de probabilidad; NS = No significativo; CV = coeficiente de variación; cD = incluye tres materiales; girasol cultivado, girasol silvestre y los híbridos (F_i); = representada por ocho sitios de muestreo.

polínico (Schopfer *et al.*, 1999) en el girasol cultivado y los híbridos a diferencia de las colectas silvestres. Cabe aclarar que el progenitor femenino androestéril pudo tener efecto sobre la viabilidad de polen en la descendencia (Rieseberg *et al.*, 1991), sí bien la mayoría de las plantas híbridas presentaron polen y sólo éstas fueron analizadas. Por otro lado, pudieron ocurrir fenómenos meióticos

debido a translocaciones o inversiones, y provocan fallas en el apareamiento meiótico y una disminución en la viabilidad del polen en el híbrido (Chandier *et al.*, 1986). En todo caso, queda abierta la posibilidad de usar extracto de pistilos en estudios de autoincompatibilidad.

Cuadro 4.2. Valores promedio para viabilidad de polen con los métodos de germinación con extracto de pistilos y tinción con Buffalo Black NBR.

Método	AN-3	Híbrido	Silvestre	Media general	Tukey
Germinación	19.45 a¶	20.52 a	28.92 b	24.48	2.64
Tinción	94.60 a	91.54 b	92.54 a	93.50	3.41

¶Cantidades con letra diferente en el mismo renglón son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En relación a los resultados mostrados en el análisis de varianza de tinción de polen, por el método de tinción con Buffalo Black NBR, plasmados en el Cuadro 4.3, se establece que existen diferencias significativas (0.01) entre taxa (colectas silvestres, híbridos, y girasol cultivado) entre colectas dentro de taxa (silvestres e híbridos), y también entre plantas dentro de colectas y dentro de taxas.

Al realizar la prueba de medias de rango múltiple de Tukey se encontró en dicho análisis (Cuadro 4.2), que existe diferencia entre el girasol cultivado y los híbridos, y entre los híbridos y colectas silvestres. Sin embargo, los progenitores silvestres y el girasol cultivado produjeron mayor porcentaje de polen calificado

como viable (95.24 y 94.60), a diferencia de los híbridos que tuvieron un 91.54 por ciento, los cuales a su vez produjeron plantas con poco polen. La disminución de polen teñido en los híbridos concuerda con lo reportado por Jackson (1988), quien obtuvo el 97 por ciento de polen viable para *H. annuus*, mientras que para la cruce entre *H. petiolaris* x *H. annuus* la tinción fue de 5 por ciento.

Cuadro 4.3. Cuadrados medios del análisis de varianza de viabilidad de polen por tinción con Buffalo Black NBR.

Fuente	GL	CM	
Taxa .1)	2	824.62	**
o Colectas/taxa	14	2254.68	...«
Colectas/silvestre	7	455.20	**
Cruzamientos/híbrido	7	4054.16	**
Pla/colectas/taxa	46	796.83
Pla/colectas/silvestre	16	216.40	**
Pla/Cruzamientos/híbrido	16	2008.60	**
Pla/AN-3	14	23.87	**
Error	439	24.16	
CV = 5.25 %			

** Significativo al 0.01 de probabilidad; CV = coeficiente de variación; cl) = incluye tres materiales; girasol cultivado, silvestre y los híbridos (Fi); o = representada por ocho sitios de muestreo.

Por otro lado Atlagic (1990) reportó en el híbrido *H. annuus x H. pauciflorus* un 49.8 por ciento de polen viable y con *H. tuberosus* 40.9 por ciento. Cabe señalar que el método de tinción puede no ser un indicador preciso de viabilidad, sino de la madurez del polen.

En general, la variación en el material biológico en cuanto a tinción y germinación de polen, fue resultado de la gran variación genética que existe entre los progenitores y su descendencia, además de posibles efectos ambientales.

Al analizar el extracto de pistilos por medio de un aparato de absorción atómica, se encontró que contiene 13.5 ppm de Cu, 56 ppm de Fe, 143.5 ppm de Zn, 2.5 ppm de Mn, 0.22 ppm de Ca, 0.87 ppm de Mg, 45 ppm de Na, así como cantidades traza de boro. Asimismo, se determinó una concentración de 0.1 ppm de glucosa. De los resultados se explica que el extracto no tiene la cantidad suficiente de calcio y boro para la germinación del tubo polínico, y es necesario añadir mayor cantidad de calcio, boro y sacarosa; esta última como fuente de energía en forma de carbono (Bush, 1999). Los minerales son los inductores de la respuesta al crecimiento del tubo polínico, ya que la ausencia o cambios en la concentración del calcio y el boro causan anomalías en el mismo (Capková-Balatková *et al.*, 1980). Además, el calcio puede inhibir el crecimiento del tubo polínico como respuesta a la autoincompatibilidad e interactúa con la proteína calmodulina (Franklin-Tong, 1999). El extracto de pistilos puede contener sustancias que combinadas

con minerales y azúcar inducen el alargamiento del tubo polínico y la germinación satisfactoria del grano de polen.

Caracteres morfológicos

Los análisis de varianza de los caracteres morfológicos prerreproductivos del girasol cultivado (línea AN-3), colectas silvestres e híbridos (Cuadro 4.4), detectaron diferencias significativas ($P < 0.01$) para las variables diámetro de capítulo, longitud de lígulas, ancho de lígulas, número de lígulas, número de brácteas, longitud de brácteas, ancho de brácteas, antocianinas y número de capítulos. La excepciones fueron área foliar y número de hileras de brácteas. Por otra parte, las colectas dentro de taxa tuvieron diferencias significativas ($P < 0.01$) para número de hileras de brácteas, días a floración, altura de plantas, antocianinas y número de capítulos. En relación a colectas dentro de silvestres el diámetro de capítulo, número de brácteas, número de hileras de brácteas, altura de plantas, antocianinas y número de capítulos presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$), en tanto que en el carácter número de lígulas se encontró diferencia significativa ($P < 0.01$). Sin embargo, no todos los caracteres evaluados fueron diferentes, quizá por que las colectas silvestres presentan caracteres semejantes y en su hábitat natural la reproducción se realiza por medio de insectos que transportan el polen a diferentes lugares además de que la semilla puede ser dispersada por los pájaros a otro lugar. Para cruzamientos dentro de híbridos solo se detectaron diferencias

significativas (PS 0.05) para longitud de brácteas y días a floración.

La prueba de comparación de medias de Tukey 5(9.01) para taxa (Cuadro 4.5) reveló en las variables diámetro de capítulo, longitud de lígulas, número de lígulas, número de brácteas, longitud y ancho de brácteas, antocianinas y número de capítulo, que el girasol cultivado es muy diferente a los híbridos y girasol silvestre. Sin embargo, los híbridos tienen mayor parecido con los silvestres en relación a diámetro de capítulo, longitud, ancho y número de lígulas, número y longitud de brácteas, quizás por una prevalencia de alelos dominantes del progenitor silvestre.

Seiler (1984) reportó para el híbrido comercial 894, un diámetro de capítulo de 14.5 cm muy cercano al valor medio (13.14 cm) que se obtuvo en la presente investigación para la línea AN-3. Por otro lado, la longitud de lígulas proporciona resistencia al ataque de los pájaros, al respecto Seiler (1997) reportó en girasol cultivado resistente al ataque de pájaros, valores entre 5.9 y 6.7 cm, el primer valor muy parecido al que se observó en éste trabajo para la línea AN-3 (5.6 cm).

Para el número de hileras de brácteas y área foliar no existe diferencia estadística entre los materiales, quizá por la poca variación que hubo entre los taxa en relación al número de hileras de brácteas y para el área foliar los híbridos presentaron en general hojas pequeñas muy parecidas al progenitor

silvestre que a diferencia del cultivado, éste tubo hojas grandes y por ello la cobertura de las hojas en los taxa analizados no muestra diferencia estadística.

En la variable días a floración (Cuadro 4.5) no hubo diferencia entre los progenitores, aunque sí para los híbridos cuyo comportamiento fue mas precoz debido a la segregación transgresiva. En altura de planta el híbrido se parece al cultivado quizá por la presencia de alelos dominantes para altura en este progenitor. Las variables antocianinas y número de capítulos indicaron que predominaron en los híbridos la pigmentación en los tallos y una ramificación parecida al girasol silvestre. En relación a la altura de planta, Mogali y Virupakshappa (1994) reportaron para girasol silvestre una altura de planta de 2.35 m semejante a la mostrada en el Cuadro 4.5.

De acuerdo a los presentes resultados, los caracteres prerreproductivos sobre los que pudo haber actuado la domesticación fueron el diámetro de capítulo, longitud de lígulas, ancho de lígulas, número de lígulas, número de brácteas, longitud y ancho de brácteas, altura de planta, antocianinas y número de capítulos. En especial la domesticación actuó sobre el número y tamaño de los capítulos, generando plantas monocefálicas de inflorescencia grande.

El análisis de componentes principales para los caracteres morfológicos y prerreproductivos reveló en el Cuadro 4.6, que el primer componente principal, explica el 57.97 por ciento de la variación y de acuerdo a los vectores

Cuadro 4.4. Cuadros medios del análisis de varianza de 13 caracteres morfológicos en línea AN-3, colectas silvestres e híbridos, en 1998.

Fuente	GL	CM												
		DC	LL	AL	NL	NB	NHB	LB	AB	DF	AP	AF	AN	NC
Taxa	2	639.53**	80.28**	4.83**	4601.81**	8907.84**	0.03 NS	37.25**	34.22**	2353.00**	5.03**	21990.09 NS	14.59**	306895.10**
Col/tax	14	0.55 NS	00.73NS	0.04 NS	14.60 NS	34.95 NS	0.07**	1.90 NS	0.03 NS	104.61**	0.21**	10575.16 NS	0.23**	1755.60**
Col/sil	7	0.24*	00.36 NS	0.02 NS	16.35**	30.76*	0.13*	3.56 NS	0.03 NS	106.85 NS	0.27*	9789.29 NS	0.42*	2894.19*
Col/hib	7	0.86 NS	1.10 NS	0.06 NS	12.85 NS	39.15 NS	0.01 NS	0.25*	0.04 NS	102.38*	0.15 NS	11361.03 NS	0.04 NS	616.93 NS
Error	51	3.57	0.70	0.06	33.52	91.71	0.02	1.56	0.12	32.71	0.06	8532.22	0.065	433.30
CV (%)	27.74	17.03	14.66	18.86	22.38	4.76	6.77	15.50	21.65	45.57	28.64	22.04		

Col = colectas; tax = taxa; sil = silvestres; hib= híbridos

DC = diámetro de capitulo; LL = longitud de ligulas; AL = ancho de ligulas; NL = número de ligulas; NHB = número de hileras de brácteas; LB = longitud de brácteas; AB = ancho de brácteas; DF = días a floración; AP = altura de planta; AF = área foliar; AN = antocianinas; NC = número de capítulos.

Cuadro 4.5. Comparación múltiple de medias en taxa, para 13 caracteres morfológicos en girasol cultivado, silvestre e híbridos.

Taxa	DC	CM												
		LL	AL	NL	NB	NHB	LB	AB	DF	AP	AF	AN	NC	
Cultivado	13.142†a	7.097 a	2.195 a	47.400 a	66.350 a	3.000 a	4.571 a	3.050 a	91.550 a	1.356 b	239.860 a	0.000 c	1.000 c	
Silvestre	3.225 b	3.387 b	1.265 b	19.679 b	29.052 b	2.932 a	2.135 b	0.690 c	88.792 a	2.114 a	182.610 a	1.625 a	224.870 a	
Híbrido	4.089 b	4.254 b	1.561 b	25.011 b	32.968 b	2.972 a	2.449 b	1.059 b	72.792 b	1.273 b	185.600 a	1.042 b	57.417 b	
Tukey	1.95	0.865	0.248	5.978	9.88	0.138	1.290	0.358	5.91	0.247	95.36	0.264	21.49	
(0.05)														
Tukey	2.47	0.090	0.314	7.570	12.52	0.164	1.633	0.454	7.48	0.313	120.78	0.333	27.21	
(0.01)														

† Valores con la misma letra en una columna son iguales entre sí.

DC= diámetro de capitulo; LL= longitud de ligulas; AL= ancho de ligulas; NL= número de ligulas; NB= número de brácteas; NHB= número de hileras de brácteas; LB= longitud de brácteas; AB= ancho de brácteas; DF= días a floración; AP = altura de planta; AF= área foliar; AN= antocianinas; NC= número de capítulos.

característicos, dicho componente se explica por el carácter antocianinas y número de capítulos y negativamente por el diámetro de capítulo, longitud, ancho y número de lígulas, y número y ancho de brácteas, el segundo componente principal, explica el 16.54 por ciento de la variación, siendo una función de los caracteres días a floración, altura de planta y número de capítulos.

Cuadro 4.6. Valores y vectores característicos de 13 caracteres morfológicos y prerreproductivos, de los dos primeros componentes principales en la línea AN-3 de poblaciones de girasol silvestre, y sus híbridos. girasol cultivado, tres

Característica	CP1	CP2
Diámetro de capítulo	-0.3357	0.2287
Longitud de lígulas	-0.3411	0.0261
Ancho de lígulas	-0.3330	-0.0943
Número de lígulas	-0.3435	0.1301
Número de brácteas	-0.3276	0.2086
Número de hileras de brácteas	-0.0690	-0.0113
Longitud de brácteas	-0.2545	0.1485
Ancho de brácteas	-0.3497	0.1390
Días a floración	0.0794	0.6154
Altura de planta	0.2112	0.5043
Área foliar	-0.1183	0.2467
Antocianinas	0.3099	0.0658
Número de capítulos	0.2862	0.3714
Valor característico	7.5416	2.1503
Proporción de la varianza explicada	0.5797	0.1654

Con las medias de la línea AN-3, colectas silvestres e híbridos, se obtuvo una gráfica de dispersión representada en la Figura 4.1, en esta el primer componente principal indica que el girasol cultivado se diferencia grandemente de las poblaciones silvestres y los híbridos, a su vez estos últimos son

intermedios en relación a sus progenitores. En general las tres poblaciones silvestres presentan el mayor número de capítulos y antocianinas, a diferencia del girasol cultivado. También se observa que los híbridos son más precoces que sus progenitores.

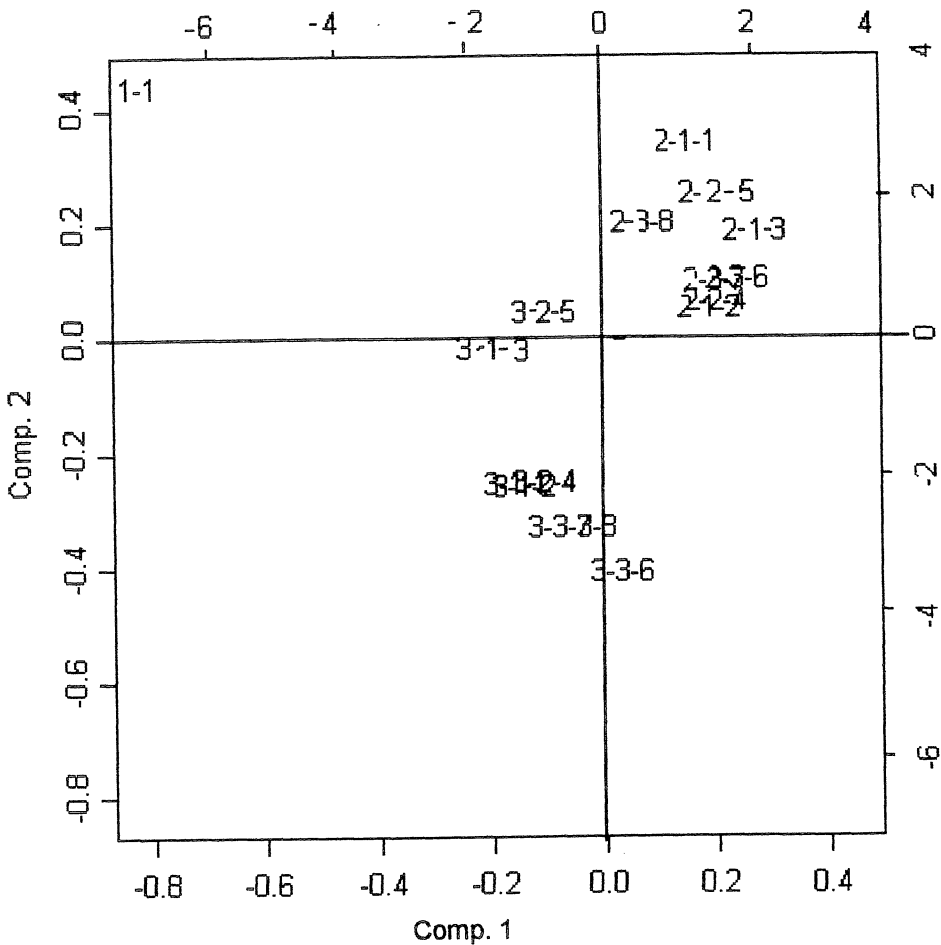


Figura 4.1 Dispersión del girasol cultivado, poblaciones de girasol silvestre, e híbridos en 13 caracteres morfológicos y prerreproductivos, en base a los dos primeros componentes principales. La clave de dos números corresponde al girasol cultivado, el de la izquierda es la taxa (1) y el de la derecha la planta. La clave de tres números es para las poblaciones silvestres e híbridos el número a la izquierda es la taxa; 3 para híbrido y 2 para silvestre, el del centro a la población (1, 2, 3) y el de la derecha a la colecta (1-8).

Por otro lado el segundo componente principal indica que las poblaciones de girasol silvestre son tardías, de mayor altura y con mayor número de capítulos.

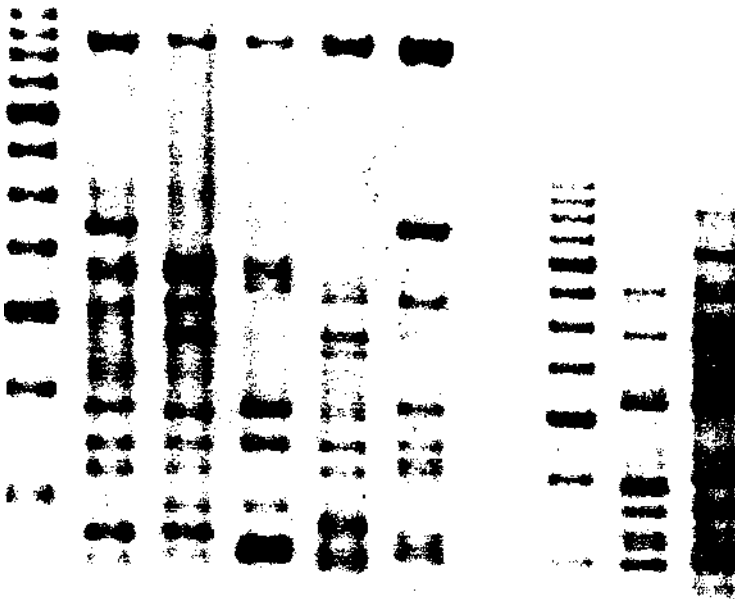
Huella de DNA.

La huella de DNA del girasol cultivado y plantas de la población 1 (colecta 3) de girasol silvestre representada en la Figura 4.2, mostró en la amplificación del DNA que existen bandas polimórficas con los primer A02 y B01. Cabe mencionar que las plantas analizadas no son los progenitores del híbrido. Sin embargo, la banda de 1375 pb la presentan el híbrido y el cultivado a diferencia de las plantas de girasol silvestre, con el primer A02. Con el primer B01 el híbrido produjo una banda a 1125 pb igual que el girasol cultivado y diferente al girasol silvestre. Lo anterior sirve para explicar la naturaleza híbrida entre sus progenitores.

También se realizó el análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 4.3) en plantas de tres poblaciones de girasol silvestre y el girasol cultivado (línea AN-3) en RAPDs. Las claves para el girasol silvestre incluyen tres números para representar en primer término, la taxa, después la población y por último la planta (2-1-1 2-3-10), sin embargo para el girasol cultivado solo se representa la taxa y la planta (1-1 1-6). El dendograma indica dos grupos principales, las poblaciones silvestres y el girasol cultivado, por lo tanto existe diversidad genética entre los progenitores, como se ha reportado por Arias y

Rieseberg (1995). No se detectó subdivisión genética entre las poblaciones, sin embargo entre plantas de girasol silvestre sí hubo en dos grupos y a su vez el segundo grupo en otros dos, por lo que existe interacción entre plantas de la población uno y dos, entre la población dos y tres y entre plantas de la población uno y tres quizá por que la distancia geográfica entre las poblaciones no sea suficiente para actuar como una barrera reproductiva, pudiéndose considerar como una población la de Saltillo, Coahuila.

M C 3-1 3-2 3-3 H M C 3-1 3-2 3-3 H



A02 B01

Figura 4.2. Patrón electroforético de RAPDs, en plantas de girasol cultivado, silvestre, e híbrido. La clave M = marcador de peso molecular en pares de bases C = planta de girasol cultivado línea AN-3; 3-1 a 3-3 = plantas de la población 1 (colecta tres); H = híbrido derivado de la cruce entre girasol cultivado y colecta tres de girasol silvestre.

Al respecto, Dry y Burdon (1986), encontraron diversidad entre loci con isoenzimas dentro y entre poblaciones, en 11 poblaciones silvestres de girasol en Australia. En otro estudio con aloenzimas se encontró variación genética-geográfica entre especies silvestres de girasol del centro, sur y oeste de E.U.A. (Cronn *et al.*, 1997). Sin embargo, el área cubierta en el presente trabajo es muy pequeña para esperar una subdivisión poblacional.

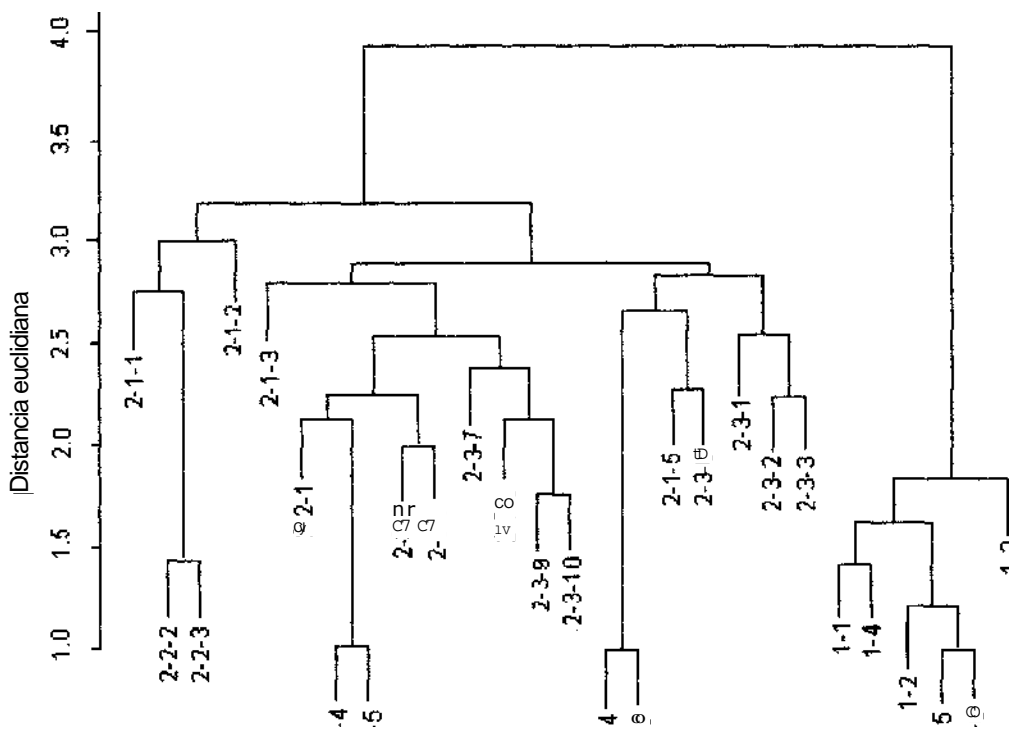


Figura 4.3. Análisis de agrupamiento jerárquico de RAPDs en plantas de girasol silvestre y cultivado. La clave de tres números es para el girasol silvestre, el número de la parte inferior indica taxa, el del centro la población (1 a 3) y el de la parte superior, la planta (1 a 10) y en el cultivado, el número inferior corresponde al taxa y el superior a la planta (1 a 6).

En el análisis jerárquico de RAPDs representado en el dendograma de la Figura 4.4 se incluyen claves de tres números para *Tithonia tubaeformis*, en donde el número de la parte inferior representa el taxa (*Tithonia*), el del centro la población (uno a siete) y el superior la planta (uno a seis) y para la línea AN-3 de girasol cultivado solo dos números, el inferior indica el taxa y el segundo la planta (uno a tres), en dicha figura se observan dos grandes grupos, uno incluye las poblaciones silvestres de *Tithonia* y el otro al girasol cultivado. Sin embargo, dentro del grupo de poblaciones de *Tithonia* existen nueve subgrupos, y en el noveno doble subdivisión. Tampoco existe agrupación entre las poblaciones por su ubicación geográfica, ni se detectó subdivisión poblacional, aunque sí hubo entre plantas de *Tithonia*

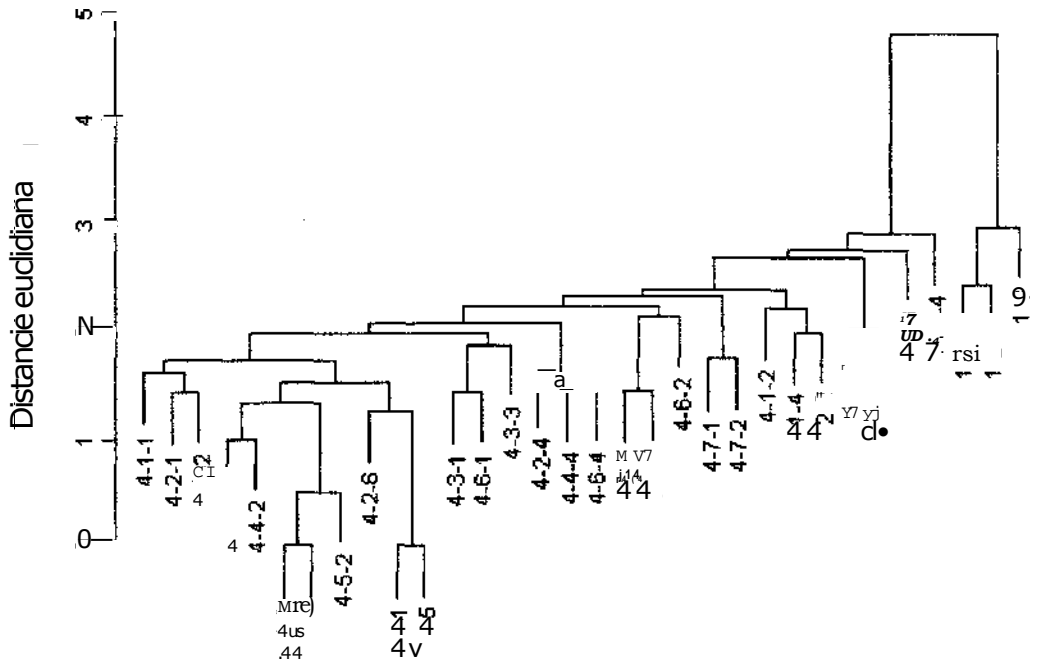


Figura 4.4. Análisis de agrupamiento jerárquico en RAPDs en plantas de poblaciones silvestres de *Tithonia tubaeformis* y de la línea AN-3 de girasol cultivado. La *Tithonia* se representa con tres números, el inferior indica la taxa (4), el del centro la población (1-7) y el superior la planta (1-6). El girasol cultivado se representa con dos números, el inferior indica la taxa (1) y el superior la planta (1-3)

V. CONCLUSIONES

El *H. annuus* ssp. *texanus* en Saltillo, Coahuila y alrededores se distribuye en altitudes desde 1250 hasta 1673 m y *Tithonia tubaeformis* entre 1494 hasta 2500 m de altitud.

Se produjeron híbridos fértiles en las cruzas amplias realizadas con el progenitor femenino línea CMS-AN-3 de girasol cultivado y las ocho colectas de *H. annuus* ssp. *texanus*.

El método de germinación de polen con extracto de pistilos permitió el desarrollo de tubos polínicos en los progenitores e híbridos, y puede ser útil en la determinación cualitativa de polen viable, en estudios del desarrollo del tubo polínico y de valor en el análisis de la autoincompatibilidad esporofítica. El extracto de pistilos puede contener sustancias como proteínas (Calmodulina) asociadas con el alargamiento del tubo polínico, que combinadas con los minerales y azúcar añadidos al medio líquido, indujeron la germinación del polen favoreciendo su cuantificación.

El método de tinción estimó una mayor madurez del polen en los progenitores y su disminución en los híbridos, lo que se puede deber a fenómenos meióticos.

Los resultados del siguiente trabajo sugieren que los caracteres morfológicos que actuaron en la domesticación fueron diámetro de capítulo, longitud de lígulas, ancho de lígulas, número de lígulas, número de brácteas, longitud de brácteas, ancho de brácteas, días a floración, altura de planta, antocianinas y número de capítulos.

El análisis de huella de DNA con RAPDs en las poblaciones silvestres de *H. annuus* y *T. tubaeformis* comparadas con el girasol cultivado se demuestra que existe, diversidad genética entre progenitores y entre plantas de colectas silvestres. Sin embargo, no se detectó subdivisión poblacional. Asimismo, se reveló una marcada diferencia genética de los materiales silvestres con la línea cultivada.

Vi RESUMEN

El mejoramiento genético del girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) depende en gran medida del aporte de genes que le pueden proporcionar los girasoles silvestres. Este trabajo tuvo como objetivos: (i) estudiar la distribución de poblaciones silvestres de *H. annuus* y *T. tubaeformis* en Saltillo, Ramos Arizpe y Arteaga Coahuila; (ii) realizar cruces entre girasol cultivado y poblaciones silvestres de *H. annuus*; (iii) caracterizar morfológicamente las poblaciones silvestres, una línea de girasol cultivado y su descendencia híbrida; (iv) desarrollar un método de germinación de polen para *Helianthus annuus*; (v) comparar la viabilidad de polen entre una línea cultivada de *H. annuus*, poblaciones silvestres de la misma especie y su descendencia híbrida; y (vi) evaluar la variación genética entre las poblaciones de *H. annuus* y *T. tubaeformis* con el uso de huella de DNA a través del DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).

Se recolectaron aquenios maduros distribuidos desde 1250 hasta 1673 m de altitud en ocho sitios con *H. annuus* ssp. *texanus*, y siete sitios con *T. tubaeformis* distribuidos de 1494 hasta 2500 m de altitud. Las colectas de *H. annuus* ssp. *texanus* se cruzaron con la línea CMS-AN-3 de girasol cultivado.

Se estudió la viabilidad de polen a través de la germinación y tinción en los materiales de *H. annuus* silvestres, cultivado e híbridos. Se desarrolló un nuevo método de germinación basado en el uso de extracto de pistilos, sacarosa al 12 por ciento y los minerales calcio (280 ppm) y boro (100 ppm). A través del método de extracto de pistilos se detectaron diferencias en porcentaje entre el girasol cultivado (19.45) y silvestres (28.92), y entre híbridos (20.52) y colectas silvestres (28.92). Por el método de tinción con Buffalo Black los progenitores silvestres y girasol cultivado produjeron mayor porcentaje de polen viable (95.24 y 94.60, respectivamente) y tuvieron diferencias significativas con los híbridos (91.54).

Las colectas silvestres de *H. annuus*, la línea AN-3 y los híbridos se evaluaron en la etapa de floración para trece caracteres morfológicos y fenológicos prerreproductivos. Los híbridos y *H. annuus* silvestre fueron significativamente diferentes al girasol cultivado para las variables diámetro de capítulo, longitud, ancho y número de lígulas y brácteas, y número de capítulos. El análisis de componentes principales reveló por medio de la distancia euclidiana como medida de disimilitud y con el método de la media aritmética, un mayor parecido de los híbridos con el girasol cultivado, con los híbridos en posición intermedia respecto a sus progenitores.

Para el análisis de huella genética se agruparon las colectas silvestres en tres poblaciones por afinidad geográfica. Dicho análisis incluyó la colecta de hojas jóvenes; el aislamiento de DNA; determinación de su pureza, calidad y

concentración (12 ng/ml); y amplificación en un termociclador en 45 ciclos para llevar al cabo la reacción de PCR con los dos iniciadores para RAPDs A02 y B01. Los patrones electroforéticos se codificaron en una matriz de ceros y unos. El análisis jerárquico indicó que las poblaciones silvestres presentan variación y son diferentes genéticamente al girasol cultivado, pero sin subdivisión poblacional. En el análisis jerárquico de huella genética de siete poblaciones de *T. tubaeformis* colectadas desde 1494 a 2500 m de altitud, se observó una separación entre *T. tubaeformis* y el girasol cultivado, con diversidad genética entre plantas silvestres sin subdivisión poblacional.

Se concluye que en la región estudiada *H. annuus* ssp. *texanus* se distribuye desde 1250 a 1673 m y *Tithonia tubaeformis* desde 1494 a 2500 m de altitud. El cruzamiento entre la línea AN-3 y *H. annuus* ssp. *texanus* produjo híbridos fértiles y con una madurez de polen alta (91.54 por ciento) revelada por el análisis de tinción. Por su parte, el método propuesto para germinar polen permitió la emergencia del tubo polínico, pero en este punto su utilidad es mas bien cualitativa que cuantitativa. La evaluación de caracteres morfológicos y fenológicos reveló marcadores que diferencian claramente a *H. annuus* ssp. *texanus* y a la línea cultivada. En relación al análisis de huella genética de DNA con RAPDs en las poblaciones silvestres de *H. annuus* y *T. tubaeformis* y girasol cultivado se demuestra que existe diversidad genética en los materiales silvestres sin subdivisión poblacional. Asimismo, se reveló una marcada diferencia genética de los materiales silvestres con la línea cultivada.

VII. LITERATURA CITADA

- Association of Official Analytical Chemists. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. W. Horwitz ed. 13th Washington, D.C. 1018 p.
- Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Technology* 44:117-122.
- Andrei, E. and B. Eva. 1997. Sunflower hybrids created under conditions of Moldova. *Cercetari Agronomice in Moldova* 30:91-105.
- Arias, M. D. and L. H. Rieseberg. 1995. Genetic relationships among domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Economic Botany* 49:239-248.
- Atlagic, J. 1990. Ponen fertility in some *Helianthus* L. species and their Fi hybrids with the cultivated sunflower. *Helia*. 13:47-54.
- Atlagic, J., B. Dozet, and D. Skoric. 1993. Meiosis and pollen viability in *Helianthus tuberosus* L. and its hybrids with cultivated sunflower. *Plant Breeding* 4:318-324.
- Atlagic, J. 1994. Cytogenetic study of interespecific sunflower hybrids (*Helianthus annuus* x *Helianthus occidentalis* Riddell). *Genetika* 3: 207-212.
- Atlagic, J., B. Dozet., and D. Skoric. 1995. Meiosis and pollen grain viability in *Helianthus mollis*, *Helianthus salicifolius*, *Helianthus maximiliani* and their F₁ hybrids with cultivated sunflower. *Euphytica*. 3:259-263.
- Atlagic, J. 1996. Cytogenetic study in hexaploid *Helianthus* species and their F₁ hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus*. *Plant Breeding*. 4: 257-260.
- Barrow, J. R. 1983. Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Sci.* 23:734-736.
- Bednarska, E. 1989. Localization of calcium on the stigma surface of *Ruscus aculeatus* L. *Planta* 179:11-16.
- Benderdour, M., T. Bui-Van, A. Dicko, and F. Belleville. 1998. *In vivo* and *in vitro* effects of boron and boronated compounds. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 12:2-7.

- Botstein, D., L. R. Withe, H. M. Skolnick, W. R. Davies. 1980. Construction of of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Brewbaker, J. L. and H. B. Kwack. 1963. Essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50:747-758.
- Bush, R. D. 1999. Sugar transporters in plant biology. *Current Opinion in Plant Biology* 2:187-191.
- Capková-Balatková, V., E. Hrabětová, and J. Tup9. 1980. Effect of some Mineral ions on pollen tube growth and release of proteins in culture. *Biol. Plant* 22:294-302.
- Chandler, J. M., C. Jan, and B. H. Beard. 1986. Chromosomal differentiation among the annual *Helianthus* species. *Systematic Botany.* 11:353-371.
- Cronn, R., M. Brothers, K. Klier, K. P. Bretting and F. J. Wendel. 1997. Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* 4:532-545.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. 1262 p.
- Domínguez, J. and J. F. Miller. 1988. Evaluation and genetic studies of F1 sunflower hybrids between sets of lines selected in USA and Spain. In: Proc. 12th mt. Sunflower Conf., Noví Sad, Yugoslavia. 25-29 July 1988. Int. Sunflower Assoc., Paris, France. pp: 424-428.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.
- Dry, P. J. and J. J. Burdon. 1986. Genetic structure of natural populations of Wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.* 39:255-270.
- Fick, G. N. 1989. Sunflower, In: [G. Robbelen. et al](#) (ed.) oil crops of the world. Mc Graw-Hill, New York. pp: 301-318.
- Franklin-Tong, E. V. 1999. Signaling in pollination. *Current Opinion in Plant Biology* 2:490-495.
- Friedt, W. 1992. Present state and uture prospect of biotechnology in sunflower breeding. *Field Crops Res.* 30:425-442.

- Georgieva-Todorova, J. 1984. Interspecific hybridization in the genus *Helianthus*. L.Z. Pflanzenzuchtg 93:265-279.
- Gómez-Sánchez, D. y S. González-Elizondo. 1994^a. Germplasm collection of wild species of *Helianthus* in Mexico. In: FAO working group: evaluation of wild *Helianthus* species. Seiler GJ (ed). pp 126 - 133.
- Gross, P. L. and J. J. Hanzel. 1991. Stability of morphological traits conferring bírd resistance to sunflower across different environments. Crop Sci. 31:997-1000.
- Hahn, V. and W. Friedt. 1994. Molecular analysis of the CMS - inducing MAX 1 cytoplasm in sunflower. Theor. Appl. Genet. 89:379-385.
- Hanson, M. R. 1991. Plant mitochondrial mutations and mate sterility. Annual Rev. Genet. 25:461-486.
- Heiser, C. B. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of the domesticated sunflowers. In: J. F. Cartes (ed). Sunflowers Science and Technology ASA, CSSA, and ASSA, Madison WI. pp:31-53.
- Horn. R., V. Hahn and W. Friedt. 1993. Recombination: Effects on structure and función of the mitochondrial genome. Prog. Bot. 55:219-235.
- Jackson, R. C. 1988. A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in *Helianthus* (Compositae). Am. J. Bot. 75:219-222.
- Kato, K. 1989. Flowering and fertility of forced green peppers at lower temperatures. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 58:113-121.
- Kwack, B. H. 1964. On the role of calcium and other cations in pollen germination and tube growth. Bot. Mag. 77:327-332.
- Luczkiewicz, T. 1975. Inheritance of some characters and properties in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Genet. Pol. 16:167-184.
- Manly, J. F. B. 1990. Multivariate Statistical methods. 4th reprinted. Chapman and Hall. New York, U.S.A. 159 p.
- Mercado, J. A., R. Fernández-Muñoz and A. M. Quezada. 1994. *in vitro* germination of pepper pollen in liquid medium. Scientia Horticultura 57:273-281.
- Mogali, S. C., and K. Virupakshappa. 1994. Characterization and evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L) germplasm. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 54:360-365.

Piperno, R. D. 2001. On maize and the sunflower. *Science*. 292:2260-2261.

Rieseberg, H. L. and G. J. Seiler. 1990. Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Econ. Bot.* 44:79S-91S.

Rieseberg, H. L., H. Choi, and D. Ham. 1991. Differential cytoplasmic versus nuclear gene flow in *Helianthus*. *J. Heredity* 82:489-493.

Rieseberg, H. L., C. Van Fossen, D. Arias, and R.L. Carter. 1994. Cytoplasmic male sterility in sunflower: origin, inheritance, and frequency in natural populations. *J. Hered.* 85:233-238.

Rieseberg, H. L., A. M. Desrochers, and S.J. Young. 1995. Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* 82:515-519.

Roberts, N. L., T. C. Gaude, G. Harrod and H. G. Dickinson. 1983. Pollen-Stigma interactions in *Brassica oleracea*; a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self incompatibility. *Theor. Appl. Genet* 65:231-238.

Sammataro, H. M., R. L. Dunstone, M. J. Long and J. E. Beeg. 1983. Canopy and seed production in sunflower as influenced by temperature and radiation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 11:255-265.

Sandu, I., A. V. Vranceanu, D. S. Craicio, and I. Balana. 1997. Inheritance of branching types in sunflower. *Genetika a Slechteni*. 33:197-202.

Saraswathyamma, C. K. and A. O. N. Panikkar. 1990. Anthesis and pollen germination in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Turrialba* 40:51-53.

Sato, S. N., K. S. Iwai, and M. Hagimon. 1998. Establishment of reliable methods of *in vitro* pollen germination and pollen preservation of *Brassica rapa* (Syn. *B. campestris*). *Euphytica* 103:29-33.

Schopfer, R. CH., M. E. Nasrallah, and J. B. Nasrallah. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*. 286:1697-1700.

Secerov, F. V., J. Atlagic, and R. Marinkovic. 1997. Inheritance traits in E1 interspecific sunflower hybrids. Review of research work at the Faculty of Agriculture, Belgrade. 2:105-110.

Seiler, G. J. 1984. Evaluation of self-compatibility and sibling of annual and perennial sunflowers. In: *Agronomy abstracts*. ASA, Madison, WI. p 87.

Seiler, G. J. 1992. Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. *Field Crops Res.* 30:195-230.

Seiler, G. J. 1997. Anatomy and morphology of sunflower. In: *Sunflower Technology and production*. Agron. Monogr. 35. ASA, CSSA y SSSA. Madison, WI USA. p 81.

Seiler, G. J. and L. H. Rieseberg. 1997. Systematics, origin, and germplasm resource of the wild and domesticated sunflower. In: J. F. Cartes (ed). *Sunflower technology and production*. Agron. Monogr. 35. ASA. CSSA and SSSA. Madison, WI. USA. pp: 29-65.

Serieys, H. and P. Vincourt. 1987. Characterization of some new CMS sources from *Helianthus* genus. *Helia* 10:9-13.

Shivanna, K. R., H. F. Linskens and M. Cresti. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theor. Appl. Genet.* 81:38-42.

Shivanna, K. R. and N. S. Rangaswamy. 1992. *Pollen biology a laboratory manual*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p.119.

Tan, A .S., C.C. Jan, and T. J. Gulya. 1992. Inheritance of resistance to race 4 of sunflower downy mildew in wild sunflower accesions. *Crop Sci.* 32:949-952.

Trehan, K. B., H. Chaní and S. K. Menta. 1976. Measurement of leaf area in sunflower. *Plant Breeding.* 46:305.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleker, 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. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.

Waugh, R. and W. Powell.1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Focus.* 10:187-191.

Weber, J. L., and P. E. Moy. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polimerase chaín reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396.

Whitton, J., D. E. Wolf, D. M. Arias, A. A. Snow and L. H. Rieseberg. 1997. The persistence of cultivar aléles in wild populations of sunflower five generations after hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 95:33-40.

Williams, J. G. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.