

**OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS *HELIANTHUS*
ANNUUS X TITHONIA ROTUNDIFOLIA Y SU ANÁLISIS
MORFOLÓGICO Y MOLECULAR**

MIRIAM PAULINA LUEVANOS ESCAREÑO

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Grado en:

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Noviembre de 2008

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIRECCION DE POSTGRADO

OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS *Helianthus annuus X Tithonia rotundifolia* Y SU ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR

TESIS

POR

MIRIAM PAULINA LUEVANOS ESCAREÑO

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

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:

Dr. M. Humberto Reyes Valdés

Asesor:

Dr. Juan Manuel Martínez Reyna

Asesor:

Dr. Valentín Robledo Torres.

Asesor:

Dr. Octavio Martínez de la Vega

Asesor:

Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor:

Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Director de Postgrado
Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. M. Humberto Reyes Valdés, por brindarme la confianza y la oportunidad de participar en este interesante e innovador proyecto de investigación. Además, por sus observaciones, sugerencias, consejos, su amistad y gran apoyo.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Reyna, por sus consejos, su apoyo, amistad y sugerencias aportadas durante la realización y revisión de tesis.

Al Dr. Valentín Robledo Torres, por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo. Por sus consejos y sugerencias durante la revisión de tesis.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega, por su apoyo en la realización de este trabajo de tesis. Por sus observaciones y consejos.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera, por su gran apoyo y capacitación en el desarrollo de la parte molecular de este trabajo, que fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Coahuila. Por su paciencia, sugerencias y consejos durante la realización y revisión de tesis.

Al Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla, por su colaboración en este trabajo, por sus consejos y sugerencias durante la revisión de tesis.

A CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado.

A SAGARPA-CONACYT por el financiamiento de este proyecto de investigación.

Al técnico de laboratorio Alma Patricia García Villanueva, por su apoyo en la fase inicial del trabajo de laboratorio, por su amistad y consejos.

Al Sr. Miguel Ángel Rodríguez, por su colaboración en la realización de este trabajo de tesis, por su enseñanza y amistad.

A todos mis compañeros y amigos, a quienes conocí al ingresar a esta universidad, y que formaron parte de esta etapa de mi vida de crecimiento intelectual, a nivel personal y espiritual. Gracias por sus consejos, paciencia, disponibilidad y amistad.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

José y Ma. Dolores, quienes son mi apoyo incondicional en todo.

A DIOS:

Mi fortaleza día a día, el motor de mi vida, pues sin el nada soy.

A MIS HERMANOS Y HERMANA:

Gabriel, Daniel y Wendy, quienes siempre están apoyándome y me dan ánimos para seguir adelante.

COMPENDIO

OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS *Helianthus annuus* X *Tithonia rotundifolia* Y SU ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR

POR

MIRIAM PAULINA LUÉVANOS ESCAREÑO

DOCTORADO EN

FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, NOVIEMBRE DE 2008

Manuel Humberto Reyes Valdés – Asesor-

Palabras claves: *Helianthus annuus*, *Tithonia rotundifolia*, ornamental, híbridos intergenéricos, esterilidad, AFLP.

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de obtener plantas híbridas a partir del cruzamiento intergenérico de *Helianthus annuus* X *Tithonia rotundifolia*, con el interés de lograr una nueva especie con fines ornamentales. Los objetivos principales fueron: (i) evaluar el potencial de hibridación a partir de la cruce de *Helianthus annuus* con *Tithonia rotundifolia*, (ii) realizar una caracterización molecular con los padres

verdaderos y los híbridos obtenidos de las cruzas y (iii) probar o refutar el fenómeno de hibridación parcial.

Se efectuó el cruzamiento entre la línea androestéril CMS HA 89 como progenitor femenino, y *T. rotundifolia* (Ac26) utilizada como progenitor masculino. Se cosecharon los aquenios y se determinó el porcentaje de semillas híbridas completamente desarrolladas por cada cruzamiento. Se produjeron un total 826 semillas completamente desarrolladas, es decir con una tasa de éxito de cuatro en 1000 aquenios potenciales.

En la etapa evaluación de híbridos 49 plantas híbridas llegaron hasta la etapa de madurez. Claramente se pudieron observar dos clases de fenotipos diferentes: a) Híbrido 1, Inflorescencia de varias cabezuelas pequeñas), y b) Híbrido 2, Inflorescencia de cabezuela solitaria grande. Ambos tipos fueron caracterizados taxonómicamente y presentaron una morfología claramente híbrida. Todas las plantas híbridas fueron estériles.

Para el análisis de huella genética con AFLPs se muestrearon diez tríos familiares. El progenitor femenino *H. annuus* (CMS HA 89) presentó un promedio de 15.5 bandas únicas, mientras que *T. rotundifolia* (Ac26) exhibió un promedio de 12.25, es decir, se tuvo un promedio de 28 bandas polimórficas totales. Los híbridos compartieron el 100% de las bandas de los progenitores, tanto para *H. annuus* como para *T. rotundifolia*. Los resultados son consistentes con lo que se esperaría para híbridos verdaderos de ambos progenitores. El análisis de huella genética de las plantas complementó al estudio morfológico, permitió constatar la naturaleza híbrida de las progenies y descartar el fenómeno de hibridación parcial.

ABSTRACT

OBTENTION OF INTERGENERIC HYBRIDS *Helianthus annuus* X *Tithonia rotundifolia* AND THEIR MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS

BY

MIRIAM PAULINA LUÉVANOS ESCAREÑO

DOCTOR'S DEGREE

IN PLANT BREEDING

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, NOVEMBER DE 2008

Manuel Humberto Reyes Valdés – Adviser-

Key words: *Helianthus annuus*, *Tithonia rotundifolia*, ornamental, intergeneric hybrids, sterility, AFLP.

This work was performed to obtain hybrids plants from intergeneric crosses between *Helianthus annuus* and *Tithonia rotundifolia*, with the goal of developing a new ornamental species. The main objectives were: (i) to evaluate the potential of hybridization between *Helianthus annuus* and *Tithonia rotundifolia*, (ii) to perform a

molecular characterization with the true parents and hybrids derived from the crosses, and (iii) to prove or to reject the phenomenon of partial hybridization. The cross was made between the male sterile line CMS HA 89 as the female parent, and *T. rotundifolia* (Ac26) as the male parent. The achenes were harvested and the percentage of well developed hybrid seeds was determined. A total of 826 well developed hybrid achenes were produced, with a rate of success of four in 1000 potential achenes.

In the evaluation of hybrid plants, 49 plants reached their maturity. Two different phenotypes were observed: *a)* plants with many small inflorescences, and *b)* plants with a single big head and a few or none axillary inflorescences. Both types were taxonomically characterized and showed clear hybrid morphology. All the hybrid plants showed sterility and did not produce seed.

The AFLP-based DNA fingerprints were analyzed in a sample of ten familial trios. The female parent (*H. annuus*) presented an average of 15.5 unique bands, while *T. rotundifolia* showed an average of 12.25, with an overall average of 28 polymorphic bands. Hybrids shared 100 % of the bands with their parents *H. annuus* and *T. rotundifolia*. The results are consistent with what would be expected for true hybrids of both parents. The analysis of AFLP-based DNA fingerprints complemented the morphological study, allowed to test the hybrid nature of the progenies and to reject the phenomenon of partial hybridization.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCION.....	1
Meta.....	3
Objetivos.....	3
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
Origen del girasol cultivado.....	4
Distribución geográfica del girasol.....	5
Taxonomía y filogenia.....	6
a) Clasificación taxonómica de <i>Helianthus annuus</i>	6
b) Clasificación taxonómica de <i>Tithonia rotundifolia</i>	7
c) Relación filogenética entre los géneros <i>Helianthus</i> y <i>Tithonia</i> ...	8
Mejoramiento del girasol.....	9
Hibridación Interespecífica.....	10
Hibridación intergenérica.....	12
Marcadores Genéticos.....	15
Marcadores Moleculares.....	16
Aplicaciones y usos importantes de los marcadores moleculares.....	17
Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados (AFLP).....	18
a) Ventajas de los AFLP.....	18
b) Desventajas de los AFLP.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Material Genético.....	20
Cruzamientos verano-otoño 2005.....	20
Cruzamientos verano-otoño 2006.....	21
Estudio Morfológico.....	23
Prueba t de Student.....	24
Extracción de ADN.....	25
a) Procedimiento de extracción de ADN.....	25
b) Electroforesis para determinar la calidad del ADN.....	28
Marcadores Moleculares.....	29
Preparación de ADN.....	30
1) Etapa de digestión-restricción de ADN genómico.....	30
2) Etapa de adaptación- ligación.....	31
3) Etapa de pre-amplificación selectiva.....	32
4) Amplificación selectiva.....	34
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	36
Preparación del gel de poliacrilamida.....	37

	Página
Análisis Molecular.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Cruzamientos Intergénicos.....	40
1) Etapa 1. Primer híbrido intergenérico.....	40
2) Etapa 2. Cruzamientos Intergénicos 2006.....	44
3) Etapa 3. Evaluación de semilla híbrida.....	45
Prueba t de Student para comparación de medias.....	52
Análisis Molecular con AFLP.....	53
Distancias euclidianas.....	58
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RESUMEN.....	60
VII. LITERATURA CITADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
3.1	Mezcla para la digestión enzimática.....	31
3.2	Mezcla para la etapa de adaptación-ligación.....	32
3.3	Mezcla para la pre-amplificación selectiva.....	33
3.4	Programa de PCR para la pre-amplificación selectiva.....	33
3.5	Reactivos para la mezcla de amplificación selectiva I.....	34
3.6	Mezcla de amplificación selectiva II.....	35
3.7	Programa de PCR para la amplificación selectiva.....	36
4.1	Semilla obtenida en los distintos cruzamientos realizados entre <i>Helianthus annuus</i> (CMS HA 89), codificada como CMSHA89 y <i>Tithonia rotundifolia</i> (Ac26), codificada como TR. En la codificación de las genealogías se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.....	45
4.2	Valores Medios de los híbridos correspondientes a plantas con inflorescencias de varias cabezuelas pequeñas (Híbrido 1). En la codificación de los híbridos se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.....	49
4.3	Valores Medios de los híbridos correspondientes a plantas con inflorescencias de varias cabezuelas pequeñas (Híbrido 2). En la codificación de los híbridos se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.....	50
4.4	Comparación de medias de altura y diámetro de capítulo en plantas híbridas procedentes de los cruzamientos realizados entre <i>Helianthus annuus</i> (CMS HA 89) y <i>Tithonia rotundifolia</i> (Ac 26).....	52
4.5	Resultados del análisis de paternidad con huella genética en tríos familiares de hibridación <i>H. annuus</i> (CMS HA 89) X <i>T. rotundifolia</i> (Ac26). Los cuadrados de distancias euclidianas están en el orden: <i>H. annuus</i> – híbrido, <i>H. annuus</i> – <i>T. rotundifolia</i> y <i>T. rotundifolia</i> – híbrido. En la codificación de las familias se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
<p>4.1. Características sobresalientes de la planta híbrida: A. Planta híbrida, presenta un capitulo pequeño y pétalos amarillos; B. Vista lateral de la inflorescencia del híbrido; C. Tipo de pubescencia suave aterciopelada (pilosa), y la forma del cáliz es convexa; D. Forma de las hojas.....</p>	41
<p>4.2 AFLP Huella genética de girasol. EcoR1 ACAM/Mse1-CAG. M = marcador de peso molecular 50-700 pb. 1 = <i>Tithonia rotundifolia</i> 1; 2 = <i>Tithonia rotundifolia</i> 2; 3 = <i>Tithonia rotundifolia</i> 3; 4 = Híbrido [CMSHA89 (6)*TRC (7)]; 5 = HA89 (5); 6 = CMSHA89 (6); 7 = CMSHA89 (4); 8 = HA89* <i>Tithonia rotundifolia</i> (9); 9 = frijol.....</p>	43
<p>4.3 A. Planta híbrida con inflorescencia de varias pequeñas (Híbrido 1). B. Planta híbrida con inflorescencia de una cabezuela grande (Híbrido 2). C. Detalle de inflorescencia híbrida.....</p>	51
<p>4.4 Gel de poliacrilamida con bandas AFLP (700nm).....</p>	55
<p>4.5 Gel de poliacrilamida con bandas AFLP (800nm).....</p>	56
<p>4.6 Huella genética híbridos de girasol. M = marcador de peso molecular 800 pb, A = macho <i>T. rotundifolia</i> (TRA), B = híbrido (CMSHA89(36)*TRA); C = hembra CMSHA89(36), D = macho <i>T. rotundifolia</i> (TRG), E = híbrido (CMSHA89(24)*TRG) F = hembra CMSHA89(24).....</p>	58

I. INTRODUCCIÓN

El género *Helianthus* es un taxón de importancia económica y evolutiva, que incluye una de las plantas domésticas más importantes en el mundo por su contenido de aceite en las semillas, el girasol cultivado (*Helianthus annuus* L).

Las especies silvestres de *Helianthus* además de ser útiles como modelos de estudio en los fenómenos evolutivos, poseen una gran diversidad genética, que puede ser aprovechada para el mejoramiento del girasol cultivado. Se han adaptado a un amplio rango de hábitats y poseen gran variabilidad en características agronómicas de importancia, ya que tienen una fuente abundante de alelos para permitir su mejoramiento genético.

El girasol cultivado (*H. annuus*) es una especie de gran importancia a nivel mundial por su alto contenido de aceite; sus semillas son utilizadas en confitería y además, es bien conocida como planta ornamental. Otras razones por las cuales se ha sembrado el girasol son, su utilidad como materia prima, forraje, alimento para aves y ganado, propiedades medicinales. Puede aprovecharse en caso de ser necesario como abono verde, por su alta producción de materia orgánica. Además presenta adaptabilidad a diversos ambientes, por ejemplo: a las zonas áridas y semiáridas; posee una buena resistencia a sequía, resistencia a bajas temperaturas, rusticidad, etc.

La especie *H. annuus* fue sembrada como ornamental en Europa hace casi dos siglos, tiempo después de que los españoles la introdujeron a ese continente, debido a al porte de la planta y sobre todo a la belleza de sus inflorescencias (capítulos), de aspecto solar que llamaron la atención de los horticultores y jardineros españoles.

Existe además un género relacionado con *Helianthus*, que tiene representantes silvestres en México: *Tithonia*. Dentro de este género, *T. rotundifolia* es una especie nativa de América central (Cristov y Panayotov, 1991). Las flores anaranjadas de esta planta son relativamente grandes y atractivas. Existe una relación cercana entre los géneros *Helianthus*, *Tithonia* y *Viguiera*. Sin embargo, son pocos los reportes de hibridación al respecto.

En girasol como en muchas otras especies cultivadas, los marcadores moleculares han jugado un papel importante para realizar estudios de diversidad genética, conocer el origen y evolución de las especies, obtener huella genética, así como la construcción de mapas genéticos para la identificación de los genes que controlan algunas de las características agronómicas de interés, entre otros.

Los marcadores moleculares conocidos como AFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados) han sido muy utilizados para realizar algunos de los análisis mencionados anteriormente. Esta técnica se considera una de las más rápidas y de menor costo.

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de obtener plantas híbridas a partir del cruzamiento intergénérico de *H. annuus* y *T. rotundifolia*, con el interés de lograr una nueva planta con fines ornamentales.

META

Contribuir al conocimiento del comportamiento genómico en asteráceas y abrir la posibilidad de desarrollar una nueva especie ornamental, así como permitir la transferencia de genes entre *H. annuus* y *T. rotundifolia*.

OBJETIVOS

1. Evaluar el potencial de hibridación a partir de la cruce de *H. annuus* y *T. rotundifolia*.
2. Realizar una caracterización molecular con los padres verdaderos y los híbridos obtenidos de las cruces.
3. Probar o refutar el fenómeno de hibridación parcial entre *H. annuus* y *T. rotundifolia*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

Origen del girasol cultivado

Hace algunos años se creía que la domesticación del girasol cultivado tenía su origen único al este de los Estados Unidos (Rieseberg y Seiler, 1990), pero Lentz *et al.*, (2001) citado por Burke *et al.*, (2002), reportó el descubrimiento de restos de semillas del girasol cultivado con una antigüedad de 4000 años en San Andrés, Tabasco. Lo anterior originó una gran controversia respecto a la posibilidad de la domesticación del girasol con un origen independiente en México, estimulando una reexaminación del origen geográfico de éste (Harter *et al.*, 2004).

Recientemente Lentz *et al.*, (2008) reporta la realización de un estudio arqueológico, apoyado con alguna evidencia lingüística, etnográfica, y etnohistórica, y gracias al cual se logró demostrar que la domesticación del girasol cultivado tuvo su origen en México 2600 años A. C.

En México, los Aztecas utilizaban el girasol cultivado en ceremonias religiosas. En la Época colonial en las iglesias y en los funerales se empleaba casi siempre como ornamental. También era utilizado en rituales y como medicina (Lentz *et al.*, 2008). Las semillas de girasol son una rica fuente de aceite e históricamente es una importante

fuelle de alimento que fue utilizado para la elaboraci3n de pigmentos por los nativos Americanos (Tang *et al.*, 2006).

Bot3nicamente el fruto del girasol es un aquenio, que es un fruto seco, indehiscente y se compone por el pericarpio y la semilla. Com3nmente se le denomina “semilla” o “grano” (Orteg3n, 1993).

Distribuci3n geogr3fica del girasol

Helianthus annuus es una especie que tiene un rango excepcional y diverso de h3bitats; se encuentra distribuido en Estados Unidos, Canad3 y M3xico, expandi3ndose hacia ambas costas (Kane y Rieseberg, 2007). Particularmente es m3s abundante en el Centro y Oeste de los Estados Unidos.

En M3xico, *H. annuus L.* se encuentra particularmente en los estados de Zacatecas, Durango, Coahuila, Chihuahua, Jalisco, Nuevo Le3n, Tamaulipas, San Luis Potos3 y otros, (Alba y Llanos, 1990; Lentz *et al.*, 2008).

La producci3n de de girasol se expande hasta las regiones 3ridas del Mediterr3neo y el norte de 3frica, donde las especies de importancia agron3mica son las resistentes a condiciones de moderada tolerancia a la sequ3a y la salinidad (Lui y Vance, 2003).

Taxonomía y filogenia

a) Clasificación taxonómica de *H. annuus*.

La clasificación botánica del girasol es la siguiente (PLANTS USDA, 2008):

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribus	Heliantheae
Género	<i>Helianthus</i>
Especie	<i>Helianthus annuus</i>

El género *Helianthus* se encuentra en la tribu Heliantheae dentro de la familia *Asteraceae*. Este género consta de 49 especies, de las cuales 13 son anuales y 36 perennes (Shilling y Heiser, 1981). El número básico de cromosomas es $x = 17$ y contiene especies diploides ($2n = 34$), tetraploides ($2n = 68$), y hexaploides ($2n = 102$) (Heiser, 1978; Geisler, 1931). Todas las especies anuales son diploides (Georgieva-Todorova, 1983).

b) Clasificación taxonómica de *T. rotundifolia*.

La clasificación botánica de *Tithonia* es la siguiente (PLANTS USDA, 2008):

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribus	Heliantheae
Género	<i>Tithonia</i>
Especie	<i>Tithonia rotundifolia</i>

El número de cromosomas de las especies de *Tithonia* es igual al de *H. annuus*, $2n = 34$ (Cristov y Panayotov, 1991). La especie *T. rotundifolia* es nativa de América Central. Las flores anaranjadas de esta planta son relativamente grandes y atractivas. Se le ha considerado una buena candidata para domesticación (Upfold y Van Staden, 1990).

Las características del género *Tithonia* dan una idea de sus posibilidades como un donador de características diferentes para girasol, por ejemplo una completa resistencia a enfermedades básicas como mildiu, *Phomopsis* y *Sclerotinia* (Cristov y Panayotov, 1991).

c) Relación filogenética entre los géneros *Helianthus* y *Tithonia*.

Existe una cercana relación entre los géneros *Helianthus*, *Tithonia* y *Viguiera*. Todo parece indicar que *Helianthus* se desarrolló de *Viguiera* o de un antecesor parecido a *Viguiera*.

El género *Viguiera* pertenece a la familia *Asteraceae* (Cristov y Panayotov, 1991) que comparte entre otros rasgos, el número básico de cromosomas $x = 17$ con *Helianthus* y *Tithonia* (Seiler y Rieseberg, 1997). Sin embargo, son pocos los reportes de hibridación al respecto (Heiser *et al.*, 1969; Schilling y Cansen, 1989), debido a que existe entre estas considerables diferencias morfológicas y genéticas (Cristov y Panayotov, 1991).

El género *Helianthus* presenta lígulas amarillas; hojas esparcidas sobre el tallo; vilano caduco; plantas herbáceas. La separación de los géneros *Helianthus* y *Viguiera* se basa en el pappus o vilano. El género *Viguiera* presenta un vilano con aristas, mientras que en *Helianthus*, el vilano es caduco. Existen pocas especies que están relacionadas con los dos géneros (Carter, 1978; Rodríguez y Porras, 1996).

El género *Tithonia* también está cercanamente relacionado con *Helianthus*. *Tithonia* tiene pedúnculos fistulosos y engrosados debajo de las cabezuelas; plantas herbáceas robustas; cabezuelas grandes; páleas rígidas puntiagudas; hojas todas en su mayoría alternas, se considera una maleza (Rodríguez y Porras, 1996).

Las especies de *Tithonia* se distinguen fácilmente de *Helianthus* por el vilano persistente. Otros géneros relacionados con *Helianthus* son *Phoebanthus* y *Heliomeris*, e igualmente la separación que existe entre estos géneros es solamente en la naturaleza del vilano (Carter, 1978; Rodríguez y Porras, 1996).

Mejoramiento del girasol

Los objetivos principales en el mejoramiento del girasol incluyen el rendimiento de la semilla, la madurez temprana, altura baja de planta, uniformidad del tipo de planta, y resistencia a insectos y enfermedades (Carter, 1978).

Las poblaciones silvestres constituyen una valiosa fuente de variación genética para la incorporación de caracteres de importancia para el mejoramiento genético del girasol cultivado, como la androesterilidad, la resistencia a patógenos y la tolerancia a herbicidas, lo que constituye un motivo para estudiar estas especies (Langar *et al.*, 2003).

La probabilidad de transferencia de genes desde el girasol cultivado hacia el silvestre es de interés debido al impacto ambiental que produciría la liberación de cultivares genéticamente modificados de girasol y el potencial riesgo de modificación genética de las especies silvestres (Langar *et al.*, 2003).

Hibridación interespecífica

Los experimentos en cruzamientos interespecíficos han contribuido al conocimiento de los mecanismos de evolución en las planta, especialmente en cuanto al rol de la hibridación (Rieseberg *et al.*, 1995). No ha sido difícil cruzar girasoles cultivados con algunas otras especies anuales de *Helianthus*. Sin embargo, hay muchas dificultades con los poliploides y perennes del mismo género (Laferriere, 1986; Georgieva-Todorova, 1983).

La hibridación interespecífica en la mejora del girasol ha figurado de manera importante en los años recientes. Como un primer ejemplo tenemos que se han identificado e introducido un gran número de genes de resistencia en girasol cultivado a partir de especies silvestres de *Helianthus* (Korell *et al.*, 1996).

La primera área en la cual los híbridos interespecíficos han tenido impactos en la mejora de girasol, fue en incrementar la resistencia de las plantas a los patógenos y otras plagas. Un ejemplo notable respecto a esto, ocurrió en Rusia al obtener resistencia a diferentes enfermedades en el girasol utilizando por ejemplo a *H. tuberosus* como una fuente de proveedora de genes. Un segundo ejemplo de importante avance con el uso de la hibridación interespecífica es la transferencia del genoma de *H. annuus* al citoplasma de *H. petiolaris* realizada por Leclercq para obtener girasoles androesteriles (Carter, 1978).

La androesterilidad es una condición en las plantas en la cual la función gametofítica masculina se evita, pero el potencial para reproducción femenina permanece. Hay dos tipos generales de androesterilidad: androesterilidad nuclear (NMS) y androesterilidad citoplásmica (CMS). Ambos tipos pueden ocurrir en el girasol (Pérez-Vich *et al.*, 2005).

La androesterilidad en el girasol es de particular importancia en lo que se refiere a dar métodos prácticos para hacer posible la producción de híbridos de girasol (Laferriere, 1986). Sin embargo, la utilización de una sola fuente de androesterilidad implica un riesgo potencial por la vulnerabilidad de tan estrecha base genética (Serieys, 1997).

El conocimiento de la relación genética en nuevos materiales de plantas derivados de cruces interespecíficas es esencial para el mejoramiento. Las técnicas moleculares recientemente desarrolladas son herramientas altamente específicas para diferenciar y clasificar genotipos. Adicionalmente, el éxito de las cruces interespecíficas puede ser verificado por métodos moleculares (Kräuter *et al.*, 1991).

Hibridación intergenérica

Uno de los cruzamientos con éxito en la obtención de híbridos intergenéricos ocurre entre los géneros *Triticum* y *Secale* (trigo *Triticum aestivum*; centeno *Secale cereale*). Al híbrido obtenido de esta cruce se le asignó el nombre de triticale. El objetivo inicial era integrar en una nueva especie las características favorables tanto de trigo como centeno. El trigo se ha utilizado mayormente y con mejor éxito como progenitor femenino, mientras que el centeno se utiliza como progenitor masculino. (Briggle, 1969).

El primer reporte que se tiene acerca del cruzamiento entre trigo y centeno, es el que se realizó en 1876 por Stephen Wilson, aunque en ese momento el producto de este cruzamiento fue la obtención de plantas estériles (Briggle, 1969). Fue hasta el año de 1937, en que se realizó otro importante hallazgo, el descubrimiento del uso de la colchicina, lo cual permitió la duplicación de cromosómica, obteniéndose logros en la fertilidad, convirtiéndose así en una especie de mucho interés (Quiñones, 1967).

El triticale heredó las características positivas del centeno, referidas como mejor tolerancia a sequía y frío, resistencia superior a muchas enfermedades y una eficiente absorción del fósforo. El triticale muestra en general una mayor resistencia a las enfermedades que el trigo (Robles, 1983).

En maíz también se han realizado cruzamientos intergenéricos exitosos en los que se han obtenido híbridos. El maíz ha sido cruzado a mano con las especies del género

Tripsacum (*T. dactylides*, *T. floridanum*, *T. lanceolatum* y *T. pilosum*). Los híbridos generalmente tienen 28 cromosomas, 10 de maíz y 18 de *Tripsacum*, y son androestériles, con una fertilidad femenina limitada (Mangelsdorf and Reeves, 1939; Mangelsdorf, 1974). La fertilidad es común en tales cruzas lejanas a causa de las diferencias en el número de cromosomas y la falta de apareamientos entre cromosomas (Eubanks 1997b).

Los primeros intentos de producir híbridos entre *Tripsacum* y teosintles anuales fracasaron (Mangelsdorf and Reeves, 1939), sin embargo, hay investigaciones recientes que indican que cruzas de *Tripsacum dactyloides* por *Zea diploperennis* producen híbridos fértiles en condiciones controladas (Eubanks 1995, 1997a). El híbrido *Tripsacum-diploperennis* y la fertilidad cruzada con el maíz pueden ser un puente genético para la transferencia de genes de *Tripsacum* hacia el maíz (Eubanks 1997b).

En la literatura hay solamente dos reportes de hibridación intergenérica entre los géneros *Helianthus* y *Tithonia*. En el primer estudio realizado por Cristov y Panayotov (1991), utilizaron la variedad Peredovik, las líneas 3004 y HA 89 como progenitores cultivados.

Los cruzamientos entre Peredovik y *T. rotundifolia*, y la línea 3004 y *T. rotundifolia* dieron como resultado plantas con una sola inflorescencia, mientras que en el cruzamiento de HA 89 y *T. rotundifolia* se obtuvieron plantas muy ramificadas. De acuerdo con los autores, la ramificación de estos híbridos es debida a la interacción entre los genes de capítulos múltiples de *T. rotundifolia*, y alelos recesivos en la línea HA 89,

procedentes de *H. argophyllus* durante la incorporación de esterilidad masculina. Las plantas híbridas fueron obtenidas solamente cuando los progenitores cultivados se usaron como hembras.

En el cruzamiento con la línea 3004 solamente se obtuvo una semilla, mientras que en los cruzamientos con HA 89 y Peredovik se obtuvieron porcentajes más altos de semilla. También reportan que los híbridos obtenidos fueron fértiles tanto por autopolinización como polinización libre, y también lograron producir varias generaciones (F1-F4). Sin embargo no probaron molecularmente la naturaleza híbrida de las plantas.

El segundo reporte de hibridación fue realizado por Reyes-Valdés *et al.* (2005), el progenitor femenino fue la línea HA 89 y el progenitor masculino fue una planta *T. rotundifolia* de origen silvestre. Los resultados obtenidos mostraron un híbrido de cabezuela solitaria, estéril y con características morfológicas de ambos progenitores. Se demostró su naturaleza híbrida por medio de análisis de AFLPs, y se descartó el fenómeno de hibridación parcial. La obtención de un híbrido con cabezuela solitaria contrasta con lo reportado por Cristov y Panayotov (1991). Sin embargo, la versión androestéril de la línea HA 89 utilizada por Reyes-Valdés *et al.* (2005) no tiene citoplasma procedente de *H. argophyllus*, sino que tiene el citoplasma clásico francés CMS PET1 de *H. petiolaris* (Leclercq, 1969).

Faure *et al.* (2002), señala que la hibridación parcial es un fenómeno extraño reportado en el arroz y *Zizania*. Este autor menciona que realizaron cruzamientos

amplios entre *H. annuus* y las especies perenes *H. mollis* y *H. orgyallis*, donde al utilizar al girasol como hembra y polinizarlo con *H. mollis*, la tendencia de la progenie obtenida era parecerse a *H. annuus*. Cuando *H. mollis* era polinizado por girasol, la progenie era parecida a *H. mollis*. La falta de simetría en tales cruzas no es común. En el estudio molecular para huella genética, las bandas presentes en los híbridos, procedían de forma dominante del progenitor femenino.

Marcadores genéticos

Tradicionalmente una combinación de características morfológicas y agronómicas se ha utilizado para medir la diversidad genética, pero la mayoría de las características vegetativas están influenciadas por factores ambientales, muestran variación continua, y tiene un alto grado de plasticidad.

En un intento por superar esos problemas, técnicas bioquímicas y moleculares han sido usadas para monitorear la variabilidad genética de girasol (*H. annuus*) y resolver problemas taxonómicos y filogenéticos (Quagliaro *et al.*, 2001). Con la aparición de las técnicas modernas de la biología molecular surgieron diferentes métodos de detección del polimorfismo genético a nivel del ADN.

Un marcador genético es un carácter, heredable, típicamente cualitativo. Los marcadores genéticos son utilizados para: seleccionar, tipificar, diagnosticar, etc. Un marcador ideal debe ser reproducible, de herencia codominante, altamente polimorfo, que tenga ocurrencia en el genoma, discriminante y que sea selectivamente neutral.

Existen dos clases de marcadores moleculares genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. No obstante, el uso de los marcadores morfológicos tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos.

Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos las limitaciones de los métodos tradicionales (Azofeifa, 2006).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses, etc. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés.

En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer como se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como el análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos de loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

Los marcadores idóneos son los de ADN; éstos se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias de ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Azofeifa, 2006).

Algunos ejemplos de marcadores moleculares ellos son: polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites o polimorfismo en longitud de repeticiones de secuencia simples (SSR), polimorfismo en nucleótidos simples (SNP), etc.

Aplicaciones y usos importantes de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares han sido utilizados con varios fines. Algunos de los usos son: diversidad genética, construcción de mapas genéticos, análisis de ligamiento, domesticación, huella genética de ADN, cartografía de genomas, estudios filogenéticos, estudios evolutivos, identificación de secuencias, etc.(Vicente y Fulton, 2005).

Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Los AFLPs (polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados) son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles (Azofeifa, 2006).

El análisis AFLP combina la digestión con enzimas de restricción con PCR, emplea adaptadores que unen secuencias de reconocimiento con una enzima ligasa, así como una preamplificación y una amplificación selectiva de las secuencias de reconocimiento (Vos *et al.*, 1995).

Esta técnica detecta múltiples loci polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo; se ha utilizado para la caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos en plantas, bacterias, hongos y en estudios de genética de poblaciones (Vicente y Fulton, 2005).

a) Ventajas de los AFLP

Entre las ventajas que se pueden encontrar en los AFLPs está:

- No requieren ninguna información previa de la secuencia para su análisis.
- Se produce una gran cantidad de bandas polimórficas, lo cual permite una exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero.
- La técnica es altamente reproducible.
- Es una técnica muy útil para crear mapas genéticos en forma rápida.

b) Desventajas de los AFLP

- Requiere un gran número de pasos para producir resultados.
- Las bandas observadas en los geles de AFLP son clasificadas como presencia o ausencia de cada individuo y el análisis se desarrolla como un sistema dominante-recesivo.
- Requieren extracciones de ADN de gran cantidad y pureza.
- En los mapas genéticos, los AFLPs se agrupan, con frecuencia, en los centrómeros y telómeros.
- Es una técnica de laboratorio que requiere tiempo en el análisis de los datos.
- El costo de la técnica es elevado.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

El material genético que se utilizó en la presente investigación para la formación de híbridos intergenéricos estuvo conformado por la línea androestéril CMS HA 89 de girasol cultivado (*H. annuus*) como progenitor femenino. La especie silvestre *T. rotundifolia* procedente de una población de Iguala Guerrero, con clave de colecta Ac26, como progenitor masculino.

Cruzamientos intergenéricos

En la primavera de 2005 en el campo experimental de Buenavista en la UAAAN, se llevó a cabo la siembra de 80 semillas procedentes del cruzamiento efectuado entre *H. annuus* (línea CMS HA 89 y la variedad Primavera) con *T. rotundifolia* en el año de 2004, para determinar la existencia de algún híbrido intergenérico. Como testigos fueron utilizadas plantas representativas de cada especie para realizar la evaluación morfológica.

Las semillas primeramente fueron sembradas en vasos de polipropileno. En la etapa de plántula fueron transplantadas en macetas. Solamente una planta presentó una posible

morfología híbrida y el capítulo principal fue cubierto con bolsas de papel y se le anotó la clave de identificación.

Se recolectó polen fresco de girasol silvestre (*H. annuus*) en una caja de Petri para polinizar al capítulo de manera artificial. La polinización se realizó dos veces con un aplicador de franela, con un intervalo de dos días para asegurar el cruzamiento. Posteriormente se realizó la colecta de las hojas inferiores de la planta en estado adulto para realizar extracción de ADN. Finalmente se cosechó el capítulo polinizado.

Cruzamientos verano-otoño 2005

En el verano de 2005 las semillas de diferentes líneas y variedades de girasol cultivado como Primavera, AN-3 y HA 89 fueron sembradas, para realizar cruzamientos con *Tithonia rotundifolia*. Pero durante la polinización se tuvo que realizar emasculación de las anteras dentro del capítulo. Lo anterior aumentó la posibilidad de contaminación con el polen mismo de la planta. En el siguiente año al sembrar las semillas obtenidas en estos cruzamientos ninguna planta presentó posibles características morfológicas de naturaleza híbrida.

Cruzamientos verano-otoño 2006

Debido a lo anterior, se procedió a realizar nuevamente en el verano-otoño de 2006 la siembra de semillas del girasol cultivado CMS HA 89 (progenitor femenino) y *Tithonia rotundifolia* (progenitor masculino). Las semillas fueron sembradas en vasos de

polipropileno que posteriormente fueron trasladados al invernadero. Al llegar al estado de plántula se transplantaron al campo 101 plantas, de la línea CMS HA 89 en surcos a una distancia de 50cm entre plantas y 80cm entre surcos. Veinticuatro plantas de *Tithonia rotundifolia* fueron sembradas en campo con una distancia entre surcos de 1 m. Treinta plantas de CMS HA 89 permanecieron en el invernadero.

Cuando las plantas previamente identificadas llegaron a la etapa de floración los capítulos principales se cubrieron con bolsas de papel. Después se colectó polen fresco de *Tithonia rotundifolia* en cajas de Petri para polinizar de manera artificial los capítulos de CMS HA 89. La polinización y la colecta de hojas para la extracción de ADN, se realizaron de la misma forma que se mencionó anteriormente.

Finalmente se cosecharon 100 capítulos polinizados. La semilla obtenida de cada cruzamiento se sembró al año siguiente. De la cosecha obtenida se determinó el porcentaje de semillas completamente desarrolladas por cada cruzamiento, contando las semillas completamente llenas (desarrolladas) y las vacías (no desarrolladas) de cada planta. Después se sumó el total de semilla por cada planta y se sacó un porcentaje individual, para posteriormente obtener un porcentaje total por cruzamiento. En los cruzamientos se empleó la siguiente identificación: CMS HA 89 denota a la línea progenitora de *H. annuus*, con plantas identificadas numéricamente. TR es la especie *T. rotundifolia* Ac26, con plantas identificadas por las letras A, C, D, F, G, I, H y K. No se anotan las claves de los machos que no tuvieron descendencia.

Por último en la primavera de 2007 se sembraron 210 semillas procedentes de los cruzamientos efectuados el año anterior entre CMS HA89 y *T. rotundifolia*, en vasos de polipropileno que posteriormente fueron trasladados al invernadero. En la etapa de plántula se pudieron observar claramente múltiples características morfológicas muy particulares de ambos progenitores en los híbridos. El transplante en campo se realizó como se mencionó con anterioridad.

De manera adicional también se plantaron 10 semillas de *T. rotundifolia*, 10 semillas de HA 89 y 10 semillas de algunas otras cruza girasol, como proveedores de polen para realizar retrocruzas. La polinización se realizó de dos maneras: libre o abierta, y artificial. Posteriormente se realizó la colecta de las hojas mas bajas de cada planta híbrida en estado adulto para realizar la extracción de ADN. Finalmente se realizó la cosecha de los capítulos.

Estudio morfológico

El estudio morfológico de las plantas fue realizado de manera visual, observando las diferencias o similitudes de la progenie, comparando con los progenitores. También se tomaron algunos datos como la altura de planta, diámetro de capitulo, color de pétalos (conocidas como lígulas), fecha de inicio y final de floración, tipo de fertilidad, forma de las hojas, tipo de pubescencia, número de inflorescencias.

Prueba t de Student

La prueba “t” de Student es utilizada para la comparación de medias y proporciones en distintas poblaciones. Se realizó una prueba “t” de Student para determinar las diferencias existentes entre dos poblaciones de las plantas híbridas.

La hipótesis nula planteada fue la siguiente: Son iguales las plantas híbridas de inflorescencias de varias cabezuelas pequeñas (Híbrido 1) y las de inflorescencia de cabezuela solitaria grande (Híbrido 2). Las muestras utilizadas en la comparación de medias fueron de diferente tamaño. Los datos obtenidos a partir de la altura de plantas y el diámetro de capítulos, fueron analizados con el programa R versión 2.7.0. (R Development Core Team, 2008).

La formula de t Student es:

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Donde,

\bar{X} = es la media de la muestra

μ = es la media de la población

S = es la desviación estándar de la muestra

n = es el tamaño de la muestra

Los comandos utilizados del software R para determinar la t de Student fueron:

var.test: contraste para igualdad de varianzas de dos muestras de una población normal.

t.test: representa la prueba t de Student que puede ser utilizada con una o dos muestras.

Extracción de ADN

Procedimiento de extracción de ADN (método Doyle y Doyle, 1990)

El ADN fue aislado de hojas en estado adulto de las plantas correspondiente a la línea CMS HA 89, *T. rotundifolia* e híbridos, por medio de la técnica propuesta por Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones.

1.- Cuando las plantas que se encontraban sembradas en campo e invernadero alcanzaron su estado adulto, fueron muestreadas. Para ello se tomaron de la planta las hojas inferiores y se colocaron en papel aluminio. Se trasladaron en hielo al Laboratorio de Análisis de Genomas del Departamento de Fitomejoramiento para la extracción de ADN.

2.- Por cada planta se pesaron en balanza analítica de 0.2 a 0.3 gramos de muestra por duplicado.

3.- El tejido de hoja se lavó en una solución de alcohol al 70 % por 2 minutos, y después se pasó a una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (1ml de hipoclorito de sodio en 100 ml de agua destilada estéril) durante un minuto. Posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó a temperatura ambiente sobre un papel secante. Algunas

de las hojas fueron almacenadas a largo plazo con deshidratación a temperatura ambiente.

4.- Las muestras se colocaron en morteros previamente identificados, que posteriormente fueron congeladas a una temperatura de -75°C durante 15 minutos en el ultracongelador marca REVCO.

5.- Las hojas fueron molidas hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en un tubo Eppendorf nuevo estéril de 1.0 ml. Se agregaron 800 μl de buffer de extracción [NaCl (cloruro de sodio) 2 M, Tris-HCl 1 M, EDTA (ácido etilendiamino tetracético) 0.5 M. Completar a 100 ml con agua destilada estéril. Esterilizar en autoclave. Añadir CTAB (cetiltrimetil bromuro de amonio) y 2-mercaptoetanol] que fue calentado a 65°C , y se mezcló por inversión suavemente. Después se colocó en baño María a 65°C por 30 minutos con agitación ocasional.

6.- Al finalizar el tiempo de incubación se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos.

7.- Después de la centrifugación se formaron dos fases. La fase superior se separó colocándola en un tubo nuevo estéril y se le añadieron 600 μl de una solución de cloroformo-álcohol isoamílico en una proporción de 24:1. Se mezcló todo por inversión hasta formar una emulsión, y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones dos veces más.

8.- Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo estéril, y se le añadió la enzima RNAsa (30 μ l de enzima por cada 100 μ l de volumen extraído) y se colocó en baño María a 37° C por 40 minutos.

9.- Se añadieron 800 μ l de etanol absoluto y se colocó en el congelador a -20 ° C por una hora y media para precipitar el ADN.

10.- Una vez transcurrido el tiempo, se separó la pastilla de ADN con una varilla de vidrio doblada en forma de gancho, para extraer manualmente ADN de alto peso molecular. El ADN aislado se lavó con 600 μ l de una solución de lavado (etanol al 76%, acetato de sodio 3 M, agua destilada estéril) por dos ocasiones o hasta que la pastilla se observó limpia.

11.- Posteriormente la pastilla se lavó otra vez con 600 μ l de alcohol al 70%, de la misma manera descrita anteriormente.

12. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Por último la pastilla de ADN fue disuelta con buffer TE 1X (10 ml de la solución TE 10X + 90 ml de agua, ajustar pH 8) y se almacenó a -20° C.

Electroforesis para determinar la integridad del ADN

- 1.- Para determinar la integridad del ADN se preparó un gel de agarosa al 1%. Se pesó 0.1 g de agarosa y se disolvió en 100 ml de buffer TBE 0.5X (50 ml de TBE 10X + 950 ml de agua destilada estéril) calentando en el horno de microondas.
- 2.- El gel fue colocado en una cámara para electroforesis hasta su solidificación.
- 3.- Una vez solidificado el gel, fue cubierto con un buffer de electroforesis (TBE 0.5 X)
- 4.- Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga (5 μ l ADN + 1 μ l de buffer de carga). El buffer de carga compuesto por 0.025 g de azul de bromofenol, 0.025 g xileno-cianol y 3 ml glicerol. Posteriormente fueron colocadas sobre el gel de agarosa. Se dejaron correr las muestras a 64 volts por 2 horas.
- 5.- La detección de las muestras fue con bromuro de etidio 0.1 % (0.1gr de bromuro de etidio en 100 ml de agua) y se visualizó por medio de un transiluminador fluorescente UV 365nm.

Marcadores moleculares

El análisis molecular a través de AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) Vos *et al.* (1995), fue realizado con el protocolo “IRDye Fluorescent AFLP Kit for Large Plant Genome Analysis LI-CoR® (Biosciences)” con un software SAGA^{MX} versión 3.2. Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Alimentos, de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila; en Saltillo, Coahuila México.

Una vez comprobada la calidad del ADN, se procedió a determinar la concentración de las muestras.

- a) A partir de cada muestra de ADN concentrado se tomó una alícuota de 10 μ l ADN + 990 μ l de agua desionizada estéril.
- b) Utilizando el espectrofotómetro Termo-Spectronic, se leyó el blanco (agua) y posteriormente se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de 260 y 280 nm.
- c) Los datos obtenidos fueron convertidos a nanogramos (ng), debido a que es la unidad de medida requerida de ADN para iniciar con los AFLP.

Preparación de ADN

Debido a que la cantidad necesaria de ADN para iniciar con el análisis molecular de AFLP es 100 ng/ μ l, se tuvo que realizar una serie de cálculos a partir de la concentración inicial de las muestras para determinar el volumen de exacto.

A continuación se describe el procedimiento que se basó en cuatro etapas:

1. Etapa de digestión-restricción de ADN genómico

Esta etapa se caracteriza por la digestión del ADN empleando dos enzimas específicas una de corte poco frecuente *EcoRI*, y la otra de corte frecuente *MseI*. La digestión se realizó bajo condiciones de esterilidad y control de la temperatura de las muestras.

En una gradilla congelada se colocaron tubos para PCR de 0.2 ml etiquetados con cada muestra correspondiente. En cada tubo se colocaron 100 ng de ADN, un buffer de reacción, una mezcla de enzimas de restricción (*EcoRI/MseI*), y agua desionizada (Cuadro 3.1). Las muestras fueron mezcladas generosamente y se incubaron a 37° C durante 2 horas en el termociclador Termo-Electrón (PX2 Thermal cycler).

Posteriormente, las muestras se incubaron a 70° C por 15 minutos, para inactivar las enzimas de restricción. Una vez transcurrido el tiempo las muestras fueron colocadas en frío a 4° C.

Cuadro 3.1. Mezcla para la digestión enzimática.

Reactivos	Volumen
Buffer de reacción 5X	2.5 µl
ADN templete (100 ng en ≤ 9µl)	3 µl
Mezcla de enzimas <i>EcoRI/MseI</i>	1.0 µl
Agua desionizada	6 µl
Volumen total	12.5 µl

2. Etapa de adaptación-ligación.

En esta etapa se utilizaron adaptadores específicos para pegar los bordes de los fragmentos recién formados y proveer una secuencia conocida. En esta etapa también se requiere el uso de la enzima ligasa para facilitar la unión de los extremos y las secuencias conocidas. A cada tubo de reacción obtenido en la etapa de digestión, se agregó una mezcla de adaptadores y la enzima T4 ligasa, (Cuadro 3.2). Se mezcló suavemente por pipeteó y se incubó durante 2 horas a una temperatura de 20° C en el termociclador.

Cuadro 3.2. Mezcla para la etapa adaptación-ligación.

Reactivos	Volumen
Mezcla de Adaptadores	12.0 μ l
Enzima T4 ADN Ligasa	0.5 μ l
Volumen total combinado (digestión-ligación)	25.0 μl

Al finalizar esta etapa se hicieron diluciones 1:10, transfiriendo 10 μ l de la mezcla a un tubo de 0.5 μ l y se añadió una cantidad de 90 μ l de buffer TE. Los 15 μ l restantes fueron guardados en refrigeración.

3. Etapa de pre-amplificación selectiva

En la etapa de preamplificación se emplearon iniciadores de secuencia conocida y complementaria al iniciador.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación y con las diluciones ya listas, se preparó una mezcla reacción de pre-amplificación en tubos de 0.5 ml colocados en hielo, (Cuadro 3.3). Se mezclaron suavemente y se centrifugaron.

Cuadro 3.3. Mezcla para la pre-amplificación selectiva.

Reactivos	Volumen
Mezcla de ligación diluida (1:10)	2.5 μ l
Iniciador mix pre- amp AFLP [®]	20.0 μ l
Buffer de reacción para PCR (10X)	2.5 μ l
Taq ADN polimerasa (5 unit/ μ l)	0.5 μ l
Volumen Total	25.5 μl

Después las muestras fueron colocadas en el termociclador y se corrieron 20 ciclos de PCR con programa que se muestra el Cuadro 3.4:

Cuadro 3.4. Programa de PCR para la pre-amplificación selectiva.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94 ° C	30 segundos
Alineamiento	56° C	1 minuto
Amplificación	72 ° C	1 minuto

El producto de PCR del paso anterior para cada una de las muestras se diluyó 1:40 (49 veces) en un tubo para microcentrifuga de 0.5 ml.

4. Etapa de amplificación selectiva

En esta etapa se emplean iniciadores marcados con fluorescencia. Para realizar la amplificación selectiva se prepararon dos mezclas de reacción: una mezcla I para Taq ADN polimerasa (mezcla de trabajo) para reducir el grado de error, ya que las cantidades de los reactivos a utilizar son muy pequeñas; y una mezcla II constituida por una combinación de un iniciador *MseI* con dos iniciadores marcados con fluorescencia *EcoRI* (700 y 800 nm), realizada para un protocolo de PCR.

- a) Mezcla I para Taq ADN polimerasa (cálculos para 33 reacciones en un volumen de 200 μ l). (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Reactivos para la mezcla de amplificación selectiva I.

Reactivos	Volumen
Agua desionizada	158.0 μ l
Buffer de Amplificación (10X)	40.0 μ l
Taq ADN polimerasa (5 units/ μ l)	2.0 μ l
Volumen Total	200 μl

- b) La mezcla II (un iniciador *MseI* con dos iniciadores marcados con fluorescencia *EcoRI*) se muestra a continuación (Cuadro 3.6). Se realizó una evaluación para seleccionar los iniciadores que serían utilizados en esta etapa. El *MseI* utilizado

fue M-CAG; para *EcoRI* se utilizaron las siguientes combinaciones E-ACA (700) y E-ACT (800), y E-ACC (700) y E-ACT (800).

De las mezclas I y II para la amplificación selectiva se tomó la cantidad de 9.0 μl y se colocó a cada tubo, posteriormente se añadió 2.0 μl de ADN pre-amplificado diluido hasta alcanzar un volumen de 11 μl centrifugar generosamente.

Cuadro 3.6. Mezcla de amplificación selectiva II.

Reactivos	Volumen
Mezcla I para Taq ADN polimerasa	6.0 μl
ADN pre-amplificado Diluido	2.0 μl
Inicador <i>MseI</i> (M-CAG)	2.0 μl
Marcador fluorescente 700 <i>EcoRI</i> (E-ACA, ACC)	0.5 μl
Marcador fluorescente 800 <i>EcoRI</i> (E-ACT, ACT)	0.5 μl
Volumen total	11.0μl

Posteriormente las muestras fueron trasladadas al termociclador, el cual se programó con 35 ciclos como se muestra a continuación (Cuadro3.7):

Cuadro 3.7. Programa de PCR para la amplificación selectiva.

<i>Etapas</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	
1.	94 ° C	30 segundos	
2.	65 ° C	30 segundos	
3.	72 ° C	1 minuto	
4.	94° C	30 segundos	} 12 ciclos
5.	65° C	30 segundos	
6.	72° C	1 minuto	
7.	94° C	30 segundos	} 23 ciclos
8.	56° C	30 segundos	
9.	72° C	1 minuto	
10.	4° C		

A cada una de las muestras obtenidas de la amplificación selectiva, se les adicionó 5.0 μ l de la solución Blue Stop. Cuando el gel de poliacrilamida para electroforesis se encontraba listo, las muestras fueron desnaturalizadas por 3 minutos a 94° C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para verificar la presencia de bandas, los productos de PCR obtenidos en la amplificación selectiva se corrieron en un gel de poliacrilamida.

Preparación del gel de poliacrilamida para electroforesis

Para la preparación del gel de poliacrilamida se utilizaron los siguientes reactivos: 150 μ l de persulfato de amonio (APS) al 10 % (se disolvió 0.1 gr de APS en 1ml de agua destilada estéril), 15 μ l de NNNN-Tetrametiltilenodiamina (TEMED) y 20ml de gel Matrix Mix al 6% (poliacrilamida).

Antes de preparar el gel, los vidrios de electroforesis fueron limpiados rigurosamente. Se montaron los vidrios, y una vez listos se vació el gel preparado, poniendo finalmente un peine de 48 dientes. Se dejó polimerizar por dos horas.

Al finalizar el tiempo de polimerización, el gel se montado en los vidrios se colocó en el secuenciador Li-COR[®]. Se realizó el programa correspondiente a las muestras de amplificación selectiva. Las muestras se desnaturalizaron durante 3 minutos a 94° C, después se colocaron en el gel y se dejaron correr por espacio de 3 horas.

Análisis molecular

Para determinar la huella genética en cuanto a bandas compartidas entre progenie y progenitores, así como la estimación de las distancias euclidianas se utilizó un programa diseñado *ex profeso* en R versión 2.7.0. (R Development Core Team, 2008). Las distancias fueron calculadas con datos codificados con (0) ausencia y (1) presencia de bandas.

La formula de los cuadrados de las distancias euclidiana es:

$$d_{XY} = \sum_{i=1}^k (x_i - y_i)^2$$

Donde, x_i y y_i son valores binarios que corresponden a cada individuo X y Y respectivamente; k es el número de bandas polimórficas. Las distancias euclidianas al cuadrado equivalen al número de bandas no compartidas; se espera aditividad entre las mismas para un conjunto de dos líneas puras y el híbrido. La simetría entre las distancias euclidianas progenitor-híbrido, proveen una prueba para descartar hibridación parcial (Reyes-Valdés *et al.*, 2005).

Los comandos utilizados en el programa R para determinar las distancias euclidianas fueron:

rbind: construyen matrices uniendo otras matrices (o vectores), horizontalmente (modo column) o verticalmente (modo fila), respectivamente.

dist (x,method="euclidean"): Esta función se utiliza para especificar la medida correspondiente a las distancias entre las filas de datos de la matriz de las distancias euclidianas.

Se muestra como ejemplo el Script:

```
dat<-read.table("fam2.txt")  
names(dat)<-c("locus","macho","híbrido","hembra")  
attach(dat)  
x<-rbind(macho,híbrido)  
d12<-dist(x,method="euclidean")  
x<-rbind(macho,hembra)  
d13<-dist(x,method="euclidean")  
x<-rbind(híbrido,hembra)  
d23<-dist(x,method="euclidean")
```

La familia 2 se utilizó como ejemplo de la forma de ejecución del programa R para obtener los cuadrados de las distancias euclidianas. El archivo lleva por nombre ("*fam2.txt*"), los datos a analizados fueron ("*locus*", "*macho*", "*híbrido*", "*hembra*"), se utilizaron tres matrices utilizando el comando (***rbind***) en el siguiente orden: *rbind(macho, híbrido)*, *rbind(macho, hembra)* y *rbind(híbrido, hembra)*. Las distancias se representaron por los comandos *dist(x,method="euclidean")*.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cruzamientos intergénicos

Etapa 1. Primer híbrido intergénico

De los cruzamientos realizados en 2004 entre *H. annuus* y *T. rotundifolia*, solo se obtuvo una planta híbrida.

Algunas de las características morfológicas que permitieron determinar la naturaleza híbrida de dicha planta al ser comparada con sus progenitores fueron: la forma intermedia de las hojas; la forma, tamaño y color de pétalos, el tipo de pubescencia suave aterciopelada. Todas estas características fueron intermedias entre las que presentan *H. annuus* y *T. rotundifolia*.

Se tomaron algunas medidas, el diámetro de capítulo fue de 3.0 cm; la altura de planta que fue de 1.43 cm. Los pétalos (lígulas) presentaron una pigmentación amarilla-anaranjada, siendo en la mayor parte amarillas. El tamaño de los pétalos fue 2.4 cm. El tipo de pubescencia fue suave y aterciopelada similar a *T. rotundifolia*. Las inflorescencias axiales que se presentaron en la planta fueron dos, manteniendo un capítulo o inflorescencia principal que es característico de

H. annuus (Figura 4.1). En la cosecha no se obtuvo ninguna semilla desarrollada. La planta fue estéril.



Figura 4.1. Características sobresalientes de la planta híbrida: **A.** Planta híbrida, presenta un capitulo pequeño y pétalos amarillos; **B.** Vista lateral de la inflorescencia del híbrido; **C.** Tipo de pubescencia suave aterciopelada (pilosa), y la forma del receptáculo es convexa; **D.** Forma de las hojas.

Para realizar el análisis molecular se utilizó el ADN de plantas progenitoras que no fueron los padres verdaderos del híbrido, debido a que durante los cruzamientos no se tomaron muestras de dichas plantas. El análisis de AFLP para huella genética reveló la existencia de bandas polimórficas y gracias a estas se pudo determinar la naturaleza híbrida de la planta (Figura 4.2). En dicha figura se puede apreciar que los carriles del 1

al 3 están conformados por tres diferentes plantas de *T. rotundifolia*, los cuales fueron utilizados como muestra del progenitor masculino, en el carril 4 y 8 corresponden al híbrido obtenido, mientras que en los carriles 5, 6 y 7 corresponden a *H. annuus* (las líneas HA 89 y CMS HA 89) como progenitor femenino. Se logra apreciar algunas de las bandas polimórficas que son muy características tanto en *H. annuus* como en *T. rotundifolia* señaladas con las flechas de color negro.

Los resultados presentados en esta etapa son diferentes a los que reportaron Cristov y Panayotov (1991), en el estudio de un cruzamiento intergenérico entre *Helianthus annuus* y *T. rotundifolia*. Ellos obtuvieron híbridos con múltiples ramificaciones en uno de los cruzamientos HA 89 x *T. rotundifolia*, mientras que en los cruzamientos Peredovik x *T. rotundifolia*, y 3004 x *T. rotundifolia* dieron como resultado plantas con una sola inflorescencia. Ellos reportaron plantas híbridas fértiles, caso contrario a lo sucedido en este trabajo, ya que la línea androestéril utilizada tiene el citoplasma clásico francés CMS PET1 de *H. petiolaris* (Leclercq, 1969); además no confirmaron por medio de análisis molecular la naturaleza híbrida.

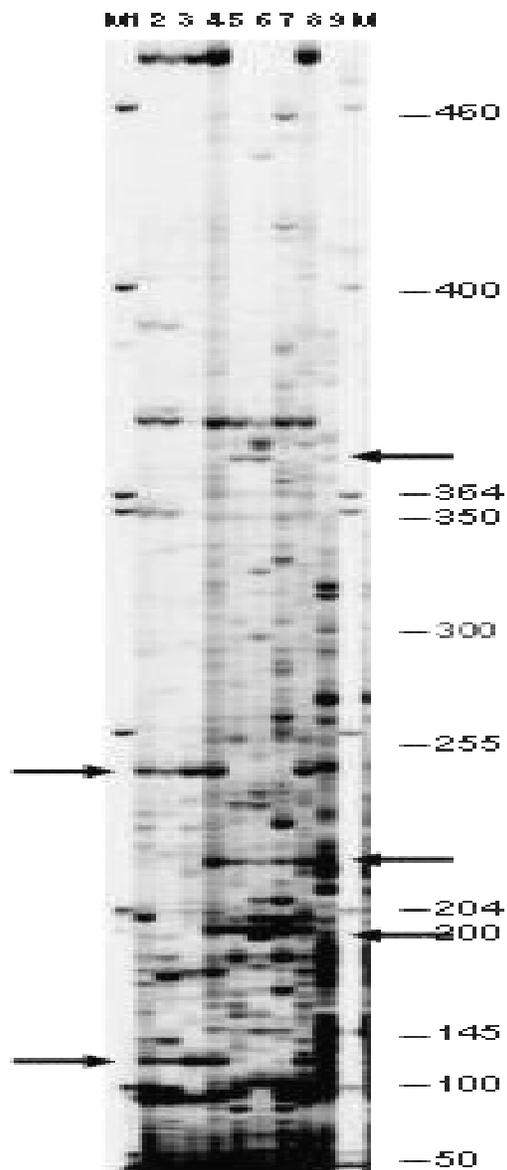


Figura 4.2 AFLP Huella genética de girasol. EcoR1 ACAM/Mse1-CAG. M = marcador de peso molecular 50-700 pb. 1 = *Tithonia rotundifolia* 1; 2 = *Tithonia rotundifolia* 2; 3 = *Tithonia rotundifolia* 3; 4 = Híbrido [CMSHA89 (6)*TRC (7)]; 5 = HA89 (5); 6 = CMSHA89 (6); 7 = CMSHA89 (4); 8 = HA89* *Tithonia rotundifolia* (9); 9 = frijol. En la codificación de los híbridos se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.

Etapa 2. Cruzamientos intergénéricos 2006

De los cruzamientos realizados en el verano-otoño de 2006, entre girasol cultivado CMS HA 89 (progenitor femenino) y *Tithonia rotundifolia* (progenitor masculino) se cosechó un total de 100 capítulos hibridados, de los cuales 47 produjeron semilla. A partir de los datos anteriores se calculó el porcentaje de semilla (aquenios) obtenidos de cada cruce, y se determinó en porcentaje que cruzamiento produjo la mayor cantidad de semilla (Cuadro 4.1).

Los porcentajes con respecto al total de aquenios se presentan en la última columna. El porcentaje promedio de producción de aquenios en estos 47 capítulos fue de 0.93. Teniendo en cuenta que estos capítulos solamente representan el 47% del total, se puede inferir que la producción de aquenios en este tipo de cruzamiento intergenérico se reduce a un aproximado de 0.4 %. Es decir, sólo se esperan obtener cuatro semillas desarrolladas de cada 1000 producidas por los capítulos.

Esto refleja el alto grado de incompatibilidad entre las dos especies, que sin embargo no es sorprendente tratándose de miembros de diferentes géneros. Se obtuvo un total 826 aquenios desarrollados, donde los cruzamientos CMSHA89*TRA, CMSHA89*TRC y CMSHA89*TRG fueron los mayores productores (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Semilla obtenida en los distintos cruzamientos realizados entre *Helianthus annuus* (CMS HA 89), codificada como CMS HA 89 y *Tithonia rotundifolia* (Ac26), codificada como TR. En la codificación de las genealogías se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.

Genealogía de cruzamiento	Cruzamientos realizados	Plantas formadoras de semilla por cruzamiento	Total de semillas desarrolladas	Promedio del porcentaje de semillas desarrolladas en los cruzamientos exitosos
CMSHA89*TRA	2	2	206	0.88
CMSHA89*TRC	23	11	367	3.44
CMSHA89*TRD	15	7	29	0.54
CMSHA89*TRF	19	6	10	0.19
CMSHA89*TRG	11	10	173	1.59
CMSHA89*TRH	5	4	7	0.13
CMSHA89*TRI	20	5	29	0.44
CMSHA89*TRK	5	2	5	0.25
Total	100	47	826	7.46
Promedio	12.50	5.88	103.25	0.93

Etapa 3. Evaluación de semilla híbrida

De las 826 semillas obtenidas de los cruzamientos en 2006, solamente se sembró un total de 210 en verano de 2007. En la etapa de plántula cuando las plantas se encontraban en el invernadero observamos claramente múltiples características morfológicas muy particulares de ambos progenitores en los híbridos, la pubescencia

suave y aterciopelada, el tipo de hojas, la apariencia física en algunas plantas era muy similar al progenitor masculino. Es importante mencionar que algunas de las plántulas tenían malformaciones en sus hojas, la mayoría de estas no llegó a desarrollarse hasta la madurez. Solamente un total de 49 plantas alcanzaron la etapa de floración.

Se observaron dos tipos de planta: con inflorescencia de varias cabezuelas pequeñas (Híbrido 1) y con inflorescencia de una sola cabezuela grande (Híbrido 2). Un total de 17 plantas tuvieron la característica de Híbrido 1, y 32 de Híbrido 2, los que nos da unas proporciones de 35% - 65%. Esto contrasta con lo reportado por Cristov y Panayotov (1991), de la obtención de solamente plantas ramificadas con el progenitor HA 89. Cabe aclarar que la línea usada por dichos autores tiene citoplasma androestéril de *H. argophyllus*, mientras que la utilizada en este trabajo lo tiene de *H. petiolaris*.

Las diferencias genéticas proveídas por la infiltración de distintas especies silvestres, pueden ser causales de la discrepancia en la morfología de los híbridos. Por otro lado, las poblaciones de *T. rotundifolia* empleadas en estos trabajos son distintas, y puede haber una variación en frecuencias alélicas para ramificación que esté influyendo en los resultados.

A continuación se presenta la descripción taxonómica de los dos fenotipos detectados, realizada por el Dr. José A. Villarreal Quintanilla:

a) Híbrido 1 (Inflorescencia de varias cabezuelas pequeñas) Figura 4.3 A. Hierba anual de 50 a 70 cm de alto; tallos ramificados en la base, pilosos; hojas alternas, con

pecíolos de 6 a 8 cm largo, láminas rómbicas, de 5 a 14 cm de largo y 6 a 10 cm de ancho, la base cuneada, el ápice agudo, el borde crenado, pilosas, con pelos ásperos, color verde amarillento; cabezuelas varias en la parte terminal, de 3 a 4 cm de diámetro, en pedúnculos fistulados de 17 a 20 cm de largo, pilosos, brácteas involucrales en 2 hileras, oblongas de 1 a 2 cm de largo y 8 a 10 mm de ancho, pilosas; receptáculo ligeramente convexo de 2.5 a 3.5 cm de diámetro; flores liguladas 18 a 20, de 30 a 35 mm de largo, amarillas; flores del disco 30 a 60, corolas de 5 a 7 mm de largo, amarillas; aquenios oblongos, base cuneada, de 6 a 9 mm de largo, 2.5 a 3.5 mm de ancho, aplanados lateralmente, velutinosos; vilano de 2 escamas aristadas subyúgales, de 3 a 4.5 mm de largo y 4(6) escamas ovadas ligeramente laceradas, de 0.5 a 2.0 mm de largo.

b) Híbrido 2 (Inflorescencia de cabezuela solitaria grande) Figura 4.3 B. Hierba anual de 80 a 110 cm de alto; tallos no ramificados en la base, pilosos; hojas alternas, con pecíolos de 8 a 10 cm largo, láminas rómbico-triangules, de 16 a 20 cm de largo y 8 a 15 cm de ancho, la base cuneada, ligeramente astada, el ápice agudo a obtuso, el borde crenado, pilosas, con pelos ásperos, color verde oscuro; cabezuelas solitaria en la parte terminal, de 7 a 8 cm de diámetro, en pedúnculos fistulados de 18 a 20 cm de largo, pilosos, brácteas involucrales en 2 hileras, oblongas de 2 a 4 cm de largo y 8 a 10 mm de ancho, pilosas; receptáculo ligeramente convexo de 5 a 7 cm de diámetro; flores liguladas 18 a 22, de 40 a 60 mm de largo, amarillas; flores del disco 30 a 60, corolas de 5 a 7 mm de largo, amarillas; aquenios oblongos, base cuneada, de 6 a 9 mm de largo, 2.5 a 3.5 mm de ancho, aplanados lateralmente, velutinosos; vilano de 2 escamas

aristadas subyúgales, de 3 a 4.5 mm de largo y 4(6) escamas ovadas ligeramente laceradas, de 0.5 a 2.0 mm de largo.

Todas las plantas híbridas fueron estériles, es decir, que no produjeron polen, ni semillas (Figura 4.3 C).

Algunas de las características descritas con anterioridad como altura de planta, diámetro de capitulo, numero de inflorescencias y tamaño de pétalos, fueron medidas y se muestran sus valores medios en los Cuadros 4.2 y 4.3.

Cuadro 4.2. Valores Medios de los híbridos correspondientes a plantas con inflorescencias de varias cabezuelas pequeñas (Híbrido 1). En la codificación de los híbridos se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.

Híbridos	Altura de planta (cm)	Diámetro de capítulos (cm)	Tamaño de pétalos (cm)	Número de inflorescencias
(CMSHA89*TRA)1-2006-1	30	0.6	1.4	5
(CMSHA89*TRA)3-2006-1	28	0.8	2	6
(CMSHA89*TRA)3-2006-4	39	1	2	12
(CMSHA89*TRA)3-2006-6	37	1	2.4	12
(CMSHA89*TRA)3-2006-8	29	0.8	1.5	12
(CMSHA89*TRA)3-2006-9	54	2.25	3.1	10
(CMSHA89*TRA)3-2006-10	14	1.8	3	10
(CMSHA89*TRA)3-2006-12	39	2.5	2.3	10
(CMSHA89*TRA)3-2006-13	29	0.85	2.5	10
(CMSHA89*TRC)1-2006-1	32	0.35	1.6	10
(CMSHA89*TRC)2-2006-1	41	2.2	3	10
(CMSHA89*TRC)2-2006-2	44	1	1.8	10
(CMSHA89*TRC)8-2006-4	9	0.35	2	10
(CMSHA89*TRC)8-2006-9	30	1.2	1.65	10
(CMSHA89*TRD)2-2006-2	26	0.5	1	10
(CMSHA89*TRD)5-2006-2	20	2.4	1.55	10
(CMSHA89*TRG)1-2006-3	30	0.8	2	3
(CMSHA89*TRG)1-2006-4	22	0.75	2.25	3
(CMSHA89*TRG)2-2006-2	32	1.35	2	-
(CMSHA89*TRG)4-2006-1	40	2	2.5	10
(CMSHA89*TRG)8-2006-2	48	3	3	10
(CMSHA89*TRG)8-2006-7	47	3	3.2	5
(CMSHA89*TRH)4-2006-1	27	0.7	1.5	10
(CMSHA89*TRH)4-2006-2	37	0.5	1.25	10
(CMSHA89*TRI)2-2006-1	39	3	3	4
(CMSHA89*TRI)3-2006-1	27	0.6	1.5	10
(CMSHA89*TRI)3-2006-4	28	0.7	0.8	10
(CMSHA89*TRI)4-2006-1	38	0.75	1.25	10
(CMSHA89*TRK)2-2006-1	32	0.5	1.7	6
(CMSHA89*TRF)-2-2006-1	50	4	4.25	10

Cuadro 4.3. Valores Medios de los híbridos correspondientes a plantas con inflorescencia de una sola cabezuela grande (Híbrido 2). En la codificación de los híbridos se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.

Híbridos	Altura de planta (cm)	Diámetro de capítulos (cm)	Tamaño de pétalos (cm)	Número de inflorescencias axiales
(CMSHA89*TRD)2-2006-1	102	7.75	5	6
(CMSHA89*TRD)5-2006-1	100	8.5	5.75	10
(CMSHA89*TRG)1-2006-1	108	5.5	3	9
(CMSHA89*TRG)2-2006-1	74	7	5	3
(CMSHA89*TRG)3-2006-2	75	6	5	0
(CMSHA89*TRG)3-2006-3	44	2.5	4.5	3
(CMSHA89*TRG)3-2006-5	75	7.75	5	5
(CMSHA89*TRG)8-2006-1	95	7	4.5	4
(CMSHA89*TRG)8-2006-3	65	6	4.5	0
(CMSHA89*TRG)8-2006-4	60	2.5	3.5	4
(CMSHA89*TRG)8-2006-5	57	3	3	4
(CMSHA89*TRG)8-2006-6	85	7.5	5	6
(CMSHA89*TRG)9-2006-1	100	7	5.3	3
(CMSHA89*TRG)9-2006-3	115	6	5.3	2
(CMSHA89*TRG)9-2006-4	73	7.75	5.5	1
(CMSHA89*TRI)3-2006-2	49	2.5	3	4
(CMSHA89*TRI)3-2006-3	58	2	2.6	7
(CMSHA89*TRI)5-2006-1	83	5	4.75	9
(CMSHA89*TRK)2-2006-2	84	5.5	4.2	8



Figura 4.3. **A.** Planta híbrida con inflorescencia de varias cabezuelas pequeñas (Híbrido 1). **B.** Planta híbrida con inflorescencia de una cabezuela grande (Híbrido 2). **C.** Detalle de inflorescencia híbrida.

Prueba “t” de Student para comparación de medias.

Los datos de medias de altura y diámetro de capítulo para los dos tipos de híbridos se presentan en el Cuadro 4.4. El Híbrido 2 fue significativamente más alto y con mayor diámetro de capítulo que el Híbrido 1. La naturaleza solitaria del capítulo del Híbrido 2 le permite ser de mayor tamaño, como en los girasoles cultivados, ya que el aporte de nutrientes se canaliza a un capítulo principal. Se observaron casos de capítulos axilares en este tipo de híbrido, pero estos fueron por lo general muy pequeños y tardíos. Los valores de “t” obtenidos para altura de planta fue -9.04 ($P = 3.76 \times 10^{-9}$); mientras en diámetro de capítulo el valor de “t” fue -8.17 ($P = 0.000254$).

Cuadro 4.4. Comparación de medias de altura y diámetro de capítulo en plantas híbridas procedentes de los cruzamientos realizados entre *Helianthus annuus* (CMS HA 89) y *Tithonia rotundifolia* (Ac 26).

<i>Variable</i>	<i>Muestra</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>t de Student</i>	<i>Valor de P</i>
Altura de planta (cm)	Híbrido 1	30	33.27	10.18	-9.04	3.766e-09**
	Híbrido 2	19	79.05	20.52		
Diámetro de capítulo (cm)	Híbrido 1	30	1.375	0.98	-8.17	0.0002543**
	Híbrido 2	19	5.62	2.12		

Híbrido 1: inflorescencias de varias cabezuelas pequeñas; Híbrido 2: inflorescencia de cabezuela solitaria grande; N: tamaño de muestra; **altamente significativo.

Análisis molecular con AFLPs

En las Figuras 4.4 y 4.5 se muestran la imagen de los geles con el bandeo obtenido de la amplificación de bandas del análisis de AFLP en 700 y 800 nm. En cada carril se observan las bandas obtenidas de las diferentes muestras utilizadas de *T. rotundifolia*, *H. annuus* y de los híbridos. A los carriles internos se les asignó la numeración del uno al veintisiete.

Los híbridos entre *H. annuus* y *T. rotundifolia* comparten bandas polimórficas de ambos progenitores. En particular, el híbrido debe exhibir la mayor parte de las bandas únicas de cada uno de los progenitores. Al respecto, los resultados del análisis de huella genética con AFLPs se muestran en el Cuadro 4.5. Se muestrearon diez tríos familiares. El progenitor femenino *H. annuus* (CMS HA 89) presentó un promedio de 15.5 bandas únicas, mientras que *T. rotundifolia* (Ac26) exhibió un promedio de 12.25, es decir, se tuvo un promedio de 28 bandas polimórficas totales. Los híbridos compartieron el 100% de las bandas de los progenitores, tanto para *H. annuus* como para *T. rotundifolia*.

Los resultados son consistentes con lo que se esperaría para híbridos verdaderos de ambos progenitores. Por otro lado, ya que los porcentajes de bandas compartidas de los dos progenitores son iguales (100%), se tiene evidencia de simetría en el material genético de los dos progenitores en el híbrido.

Cuadro 4.5. Resultados del análisis de paternidad con huella genética en tríos familiares de hibridación *H. annuus* (CMS HA 89) X *T. rotundifolia* (Ac26). Los cuadrados de distancias euclidianas están en el orden: *H. annuus* – híbrido, *H. annuus* – *T. rotundifolia* y *T. rotundifolia* – híbrido. En la codificación de las familias se utiliza el símbolo “*” para indicar cruzamiento.

Familias	Bandas únicas. <i>H.</i> <i>Annuus</i>	Bandas únicas <i>T.</i> <i>rotundifolia</i>	Bandas polimórficas	Bandas compartidas por el híbrido %	Bandas de <i>H. annuus</i> compartid as por el híbrido %	Bandas de <i>T.</i> <i>rotundifolia</i> compartidas por el híbrido %	Cuadrados de distancias euclidianas
(CMSHA89(36)*TRA)-1	17	23	40	100	100	100	23-40-17
(CMSHA89(7)*TRF)-2	11	19	30	100	100	100	19-30-11
(CMSHA89(24 *TRG)-1	17	10	27	100	100	100	10-27-17
(CMSHA89(24)*TRG)-2	9	6	15	100	100	100	6-15-9
(CMSHA89(24)*TRG)-3	17	11	28	100	100	100	11-28-17
(CMSHA89(24)*TRG)-4	17	11	28	100	100	100	11-28-17
(CMSHA89(24)*TRG)-5	16	12	28	100	100	100	12-28-16
(CMSHA89(29)*TRG)-1	16	9	25	100	100	100	9-25-16
(CMSHA89(14)*TRG)-2	17	12	29	100	100	100	12-29-17
(CMSHA89(16)*TRG)-3	18	12	30	100	100	100	12-30-18
Medias	15.5	12.5	28	100	100	100	12.5-28- 15.5

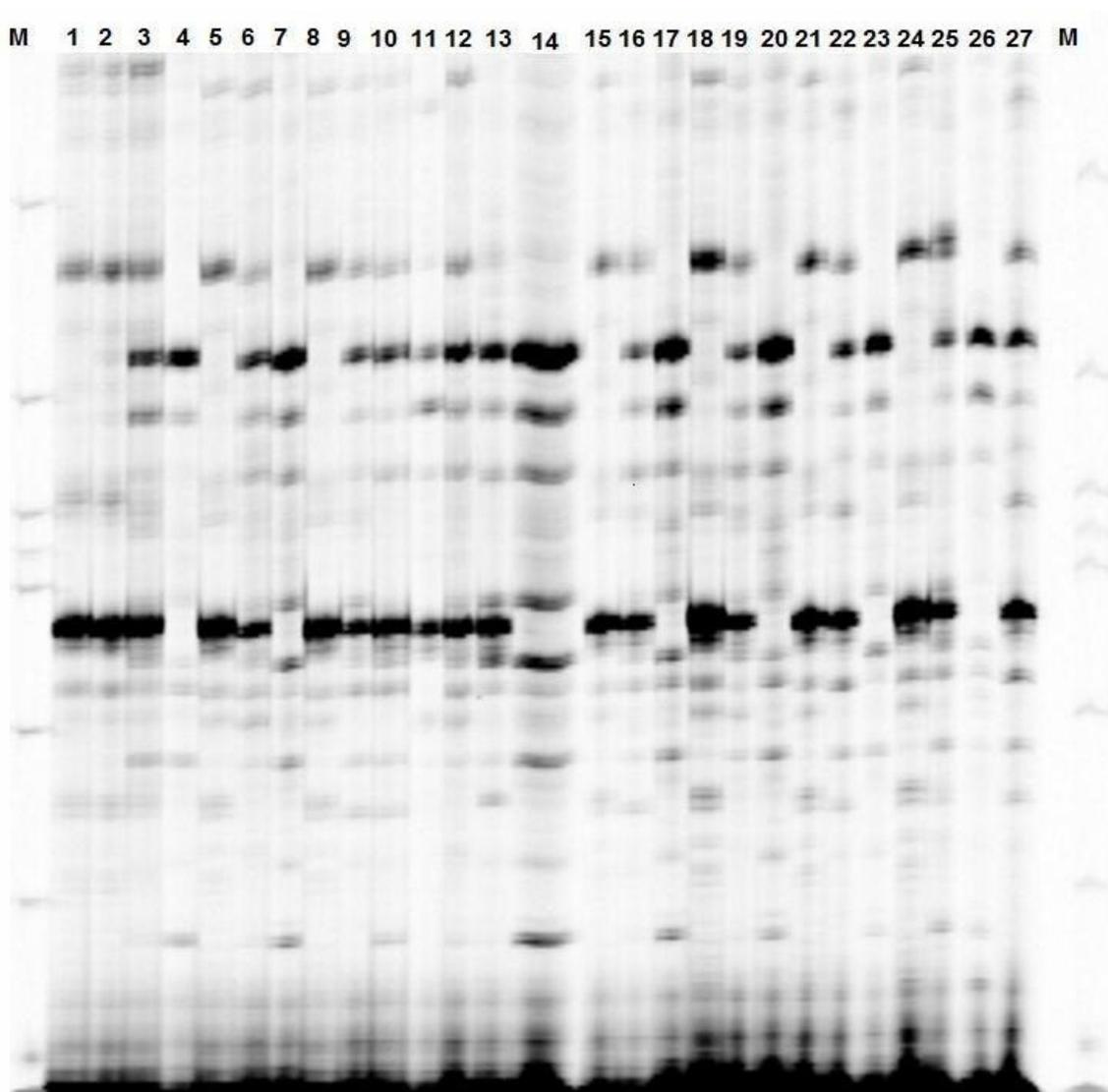


Figura 4.4. Gel de poliacrilamida con bandas AFLP (700nm). M= marcador de peso molecular 700 pb; 1 = *T. rotundifolia* (TRA), 2 = *T. rotundifolia* (TRA), 3 = (CMSHA89*TRA)3-2006-4) 4 = CMSHA89 (36); 5 = *T. rotundifolia* (TRG), 6 = (CMSHA89*TRG) 8-2006-6, 7 = CMSHA89 (24); 8 = *T. rotundifolia* (TRG), 9 = (CMSHA89*TRG)8-2006-3), 10 = (CMSHA89*TRG)8-2006-4), 11 = (CMSHA89*TRG)8-2006-5), 12 = (CMSHA89*TRG)8-2006-6), 13 = (CMSHA89*TRG)8-20006-7), 14 = CMSHA89(24); 15 = *T. rotundifolia* (TRG), 16 = (CMSHA89*TRG)1-2006-1), 17 = CMSHA89(29); 18 = *T. rotundifolia* (TRG), 19 = (CMSHA89*TRG)3-2006-1), 20 = CMSHA89(14); 21 = *T. rotundifolia* (TRG), 22 = (CMSHA89*TRG)4-2006-1), 23 = CMSHA89(16); 24 = *T. rotundifolia*(TRG), 25 = (CMSHA89*TRG)9-2006-4), 26 = CMSHA89(24); *T. rotundifolia* (TRG).

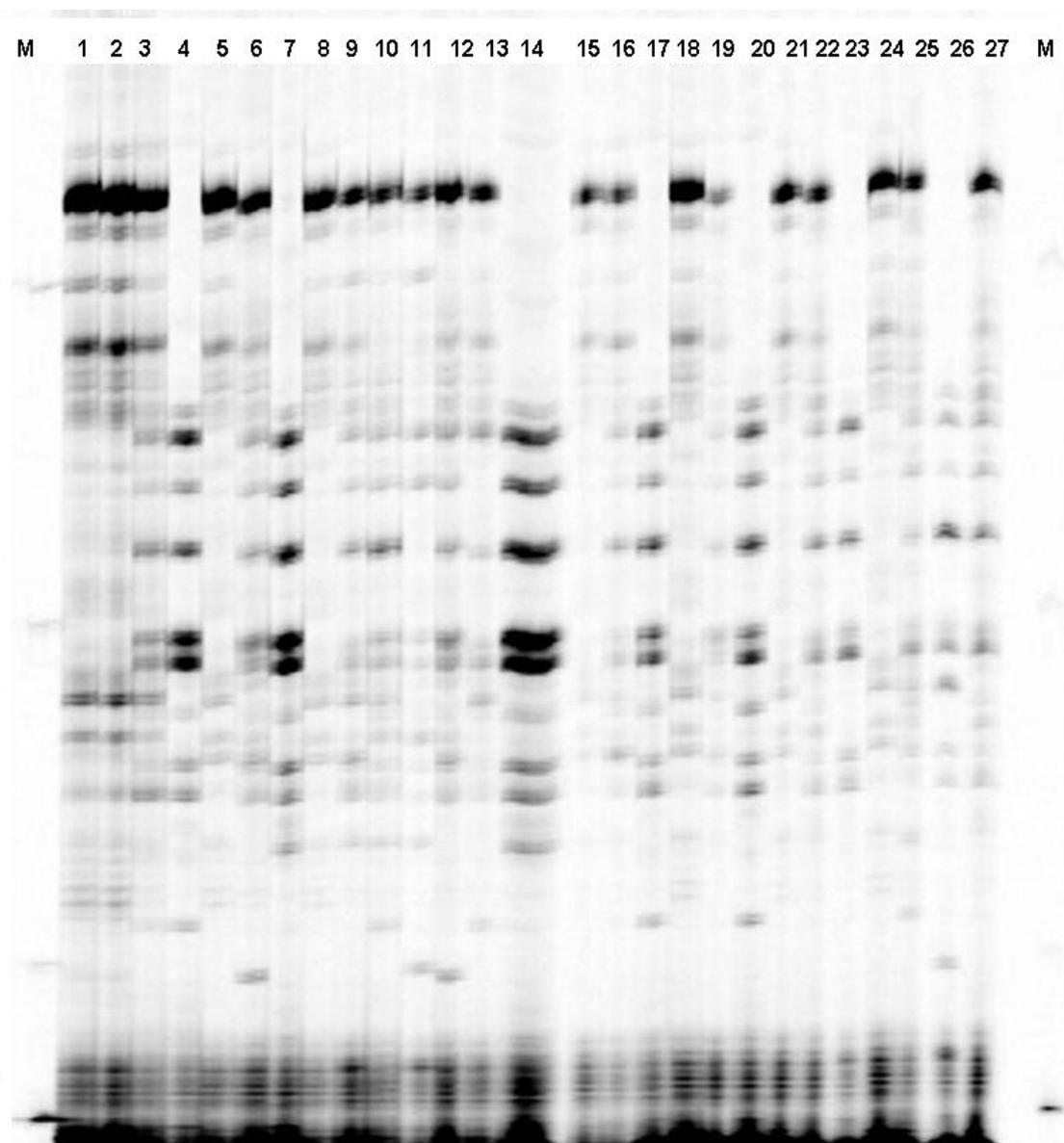


Figura 4.5. Gel de poliacrilamida con bandas AFLP (800nm). M= marcador de peso molecular 800 pb; 1 = *T. rotundifolia* (TRA), 2 = *T. rotundifolia* (TRA), 3 = (CMSHA89*TRA)3-2006-4) 4 = CMSHA89 (36); 5 = *T. rotundifolia* (TRG), 6 = (CMSHA89*TRG) 8-2006-6, 7 = CMSHA89 (24); 8 = *T. rotundifolia* (TRG), 9 = (CMSHA89*TRG)8-2006-3), 10 = (CMSHA89*TRG)8-2006-4), 11 = (CMSHA89*TRG)8-2006-5), 12 = (CMSHA89*TRG)8-2006-6), 13 = (CMSHA89*TRG)8-2006-7), 14 = CMSHA89(24); 15 = *T. rotundifolia* (TRG), 16 = (CMSHA89*TRG)1-2006-1), 17 = CMSHA89(29); 18 = *T. rotundifolia* (TRG), 19 = (CMSHA89*TRG)3-2006-1), 20 = CMSHA89(14); 21 = *T. rotundifolia* (TRG), 22 = (CMSHA89*TRG)4-2006-1), 23 = CMSHA89(16); 24 = *T. rotundifolia*(TRG), 25 = (CMSHA89*TRG)9-2006-4), 26 = CMSHA89(24); *T. rotundifolia* (TRG)

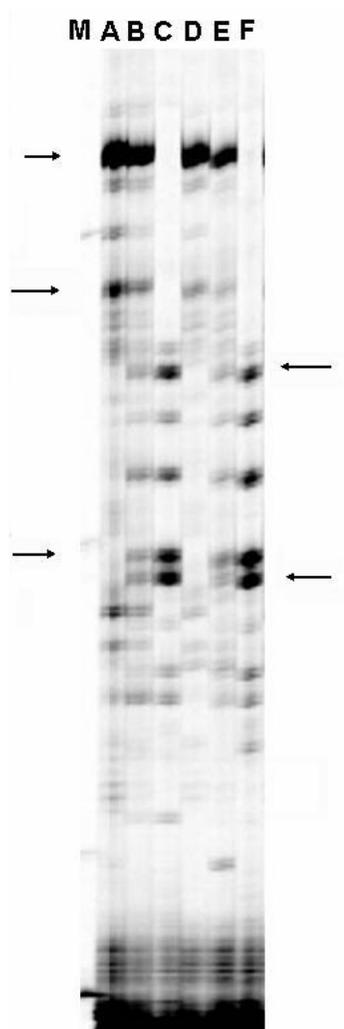


Figura 4.6. Huella genética híbridos de girasol. M = marcador de peso molecular 800 pb, A = macho *T. rotundifolia* (TRA), B = híbrido (CMSHA89(36)*TRA); C = hembra CMSHA89(36), D = macho *T. rotundifolia* (TRG), E = híbrido (CMSHA89(24)*TRG), F = hembra CMSHA89(24). Las flechas indican bandas polimórficas de alguno de los dos padres, compartidas por el híbrido. El símbolo “*” en los códigos de los híbridos significa cruzamiento.

Distancias euclidianas

Las distancias cuadráticas euclidianas, con valores medios de 12.5, 28 y 15.5 para las distancias *H. annuus* – híbrido, *H. annuus* - *T. rotundifolia* y *T. rotundifolia* – híbrido, muestran simetría y aditividad para las relaciones entre el híbrido y los dos progenitores. En todos los casos el cuadrado de la distancia euclidiana entre los progenitores es igual a la suma de las dos restantes. Estos resultados son también consistentes con la naturaleza híbrida de las progenies. Además, descartan el fenómeno de hibridación parcial reportado por Faure *et al.* (2002) para cruzas interespecíficas dentro del género *Helianthus*, manifestada en asimetría genómica en los híbridos. Como se verá, algunos progenitores comunes entre tríos presentaron diferentes números de bandas (Cuadro 4.5).

En la Figura 4.6 se señalan con flechas algunas bandas polimórficas que, como puede observarse, provienen solamente de uno de los progenitores y son compartidas por los híbridos. Los resultados de huella genética coinciden básicamente con los reportados por Reyes-Valdés *et al.* (2005), donde se menciona que no hubo evidencia de hibridación parcial en los experimentos utilizando las mismas especies.

Sin embargo, en dicho trabajo no se utilizaron los progenitores verdaderos del híbrido en las pruebas moleculares, a diferencia de esta investigación, en donde el control estricto del ADN de los progenitores le da mayor precisión a los análisis. Por otro lado, en este trabajo se usa una muestra bien representada de 49 híbridos, de los cuales diez fueron analizados molecularmente.

V. CONCLUSIONES

1. A partir del cruzamiento de *Helianthus annuus* X *Tithonia rotundifolia* se logró la obtención de híbridos intergenéricos.
2. La población de híbridos intergenéricos se dividió en dos clases morfológicas: *a)* plantas con inflorescencia representada por cabezuelas múltiples y pequeñas, y *b)* plantas con inflorescencia de cabezuela solitaria grande.
3. En la población de híbridos intergenéricos, los análisis morfológico y molecular con AFLPs, demostraron la naturaleza híbrida de las plantas. El análisis molecular de la progenie demostró simetría en la representación de los genomas parentales, lo cual descarta el fenómeno de hibridación parcial.
4. Todas las plantas híbridas fueron estériles: no produjeron polen, y fueron incapaces de producir semilla.
5. Todo esto indica que aunque las dos especies tienen la suficiente compatibilidad para hibridarse, su divergencia genómica es capaz de causar esterilidad, estableciéndose así una barrera reproductiva a la hibridación, que en todo caso podría ser evitada a través de manipulación en el laboratorio.

VI. RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de obtener plantas híbridas a partir del cruzamiento intergenérico de *Helianthus annuus* X *Tithonia rotundifolia*, con el interés de lograr una nueva especie con fines ornamentales. Los objetivos principales fueron: (i) evaluar el potencial de hibridación a partir de la cruce de *Helianthus annuus* con *Tithonia rotundifolia*, (ii) realizar una caracterización molecular con los padres verdaderos y los híbridos obtenidos de las cruces y (iii) probar o refutar el fenómeno de hibridación parcial.

Se efectuó el cruzamiento entre la línea androestéril CMS HA 89 como progenitor femenino, y *T. rotundifolia* (Ac26) utilizada como progenitor masculino. Se cosecharon los aquenios y se determinó el porcentaje de semillas híbridas completamente desarrolladas por cada cruzamiento. Se produjeron un total 826 semillas completamente desarrolladas, es decir con una tasa de éxito de cuatro en 1000 aquenios potenciales.

En la etapa evaluación de híbridos 49 plantas híbridas llegaron hasta la etapa de madurez. Claramente se pudieron observar dos clases de fenotipos diferentes: a) Híbrido 1, Inflorescencia de varias cabezuelas pequeñas), y b) Híbrido 2, Inflorescencia de cabezuela solitaria grande. Ambos tipos fueron caracterizados taxonómicamente y

presentaron una morfología claramente híbrida. Todas las plantas híbridas fueron estériles.

Para el análisis de huella genética con AFLPs se muestrearon diez tríos familiares. El progenitor femenino *H. annuus* (CMS HA 89) presentó un promedio de 15.5 bandas únicas, mientras que *T. rotundifolia* (Ac26) exhibió un promedio de 12.25, es decir, se tuvo un promedio de 28 bandas polimórficas totales. Los híbridos compartieron el 100% de las bandas de los progenitores, tanto para *H. annuus* como para *T. rotundifolia*. Los resultados son consistentes con lo que se esperaría para híbridos verdaderos de ambos progenitores. El análisis de huella genética de las plantas complementó al estudio morfológico, permitió constatar la naturaleza híbrida de las progenies y descartar el fenómeno de hibridación parcial.

VII. LITERATURA CITADA

- Alba, A. y Llanos M. 1990. El cultivo del girasol. Ediciones Mundiprensa. Madrid. 13-16 pp.
- Azofeifa, A. 2006. Uso de los marcadores moleculares en plantas; aplicación en frutales del trópico. Agronomía mesoamericana.
- Blanco M. y R. Valverde. 2005. Identificación y mapeo de AFLPs ligados al gen de resistencia PVX en *Solanum commersonii*. Agronomía costarricense. Univ. de Costa Rica. Vol. 29 No. 002. pp. 57-71
- Briggle. L. W. 1969. Triticale a review. Crop Science 9: 197-202.
- Burke J., Tang S., Knapp S. and Rieseberg L. 2002. Genetic analysis of sunflower domestication. Genetics 161:1257-1267.
- Carter. J. F. 1978. Sunflower science and technology, Agronomy Series 19, Am. Soc. of Agronomy, Inc. Publishers, Madison, Wisconsin, 31-35 pp.
- Cristov, M. and Panayotov, L. 1991. Hybrids between the genera *Helianthus* and *Tithonia* and their study. Helia 14:27-34.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Eubanks M. W. 1997a. Further evidence for two progenitors in the origin of maize. Maize Newsletter. 71: 35
- Eubanks, M. W. 1995. A cross between two maize relatives: *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). Economic Botany. 49: 172-182.
- Eubanks, M.W. 1997b. Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). Theor. Appl. Genetics 94, 707-712.
- Faure, N., Serieys, H., Cazaux, E., Kaan, F. and Bervillé, A. 2002. Partial hybridization in wide crosses between cultivated sunflowers and the perennial *Helianthus* Species *H. mollis* and *H. orgyalis*. Ann. Bot. 89:31-3.
- Geisler, F. 1931. Chromosome numbers in certain species of *Helianthus*. Butler Univ. Bot. Stad. 11:53-62.

- Georgieva-Todorova, J. 1983. Interspecific hybridization in the genus *Helianthus* L. Z. Pflanzzüchtg. 93: 265-279.
- Harter A., Gardner K.A, Falush D., Lentz D., Bye R., and Rieseberg L.H. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. Nature. 43:201-205.
- Heiser C.B. Jr, 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. En: J.F. Carter, (Ed.) Sunflower science and technology, Agronomy Series 19, Am. Soc. of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, 31-35 pp.
- Heiser C.B., Jr., Smith D. M., Clevenger S.B. and Martin W.C. 1969. The North American sunflowers (*Helianthus*). Mem. Torrey Bot. Club 22 (3). p 3.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>
- Kane N. and Rieseberg L. 2007. Selective reveal candidate genes for adaptation to drought and salt tolerance in common Sunflower, *Helianthus annuus*. Genetics Society of America. 175: 1823-1823
- Korell, M., Brahm L., Horn R., and Friedt W. 1996. Interspecific and intergeneric hybridization in sunflower breeding, I: General breeding aspects. Plant Breeding Abstracts 66:925–931.
- Kräuter, R., Steinmetz A., and Friedt W. 1991. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via “Embryo Rescue” and characterization of the hybrids. Theor. Appl. Genet. 82:521–525
- Laferrière, J.E. 1986. Interspecific hybridization in sunflowers: an illustration of the importance of wild genetic resources in plant breeding. Outlook on Agriculture. 15: 104-109.
- Langar K., Lorieux M., Desmarais E., Griveau Y., Gentzbittel L. and Bervillé A. 2003. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. Theor Appl Genet. 106:1068-1074.
- Leclercq, P., 1969. Une stérilité male cytoplasmique chez le tournesol. Ann. Amélior. Plantes 19:99-106.
- Lentz D., DeLand M., Alvarado J., Tarighat S., and Bye R. 2008. Sunflower (*Helianthus annuus* L) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. PNAS. 105: 6232-6237.

- Lexer C., Welch M., Durphy J. L., and Rieseberg L. H., 2003. Natural selection for salt tolerance QTL in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a homoploid hybrid species. *Mol. Ecol.* 12: 1225-1235.
- Liu, X. and Vance W. 2003. Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. *Crop Sci.* 43: 678-687
- Mangelsdorf, P. and Reeves, R. (1939). The origin of Indian corn and its relatives. *Texas Agric. Expt. Sta. Bull.* 574.
- Mangelsdorf, P. 1974. *Corn: Its origin, evolution and improvement.* Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- Ortegón, A. 1993. *El girasol.* Editorial Trillas. México.
- Pérez-Vich B., Berry S., Velasco L., Fernández-Martínez J., Gandhi S., Freeman C., Heesacker A., Knapp S. and Leon A. 2005. Molecular mapping of nuclear male sterility Genes In Sunflower. *Crop Sci.* 45:1851-1857.
- PLANTS United States Department of Agriculture (PLANTS USDA). 2008. <http://plants.usda.gov/>
- Quagliaro G., Vischi M., Tyrka M., and Olivieri A. 2001. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. *The American Genetic Association.* 92: 38-42.
- Quiñónez, M. A. 1976. Mejoramiento genético del anfiploide triticale. Folleto de investigación No. 6. Centro internacional de Mejoramiento del Maíz y trigo. México.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environmental for statistical computing, Viena Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-Project.org>.
- Reyes-Valdés, M. H., Gómez-Martínez M., Martínez O. y Hernández F. 2005. Intergeneric hybrid between cultivated sunflower (*Helianthus annuus L.*) and *Tithonia rotundifolia* (Mill.) Blake. *Helia* 28: 61-68.
- Rieseberg, L.H., Desrochers, A.M. and Young S.J. 1995. Interspecific Pollen Competition as A Reproductive Barrier Between Sympatric Species Of *Helianthus* (*Asteraceae*). *Am. J. Bot.* 82: 515-519.
- Rieseberg, L. H. and Seiler G.,1990. Molecular evidence and origin and development of the domesticated sunflower (*H. annuus L.*). *Econ Bot.* 44: 79-91.

- Robles S. R. 1986. Producción de oleaginosas y textiles. Ed. Limusa, S.A. México. 431-436 pp.
- Robles, S. R. 1983. Producción de granos y forrajes. Ed. Limusa, S. A. México. 229-244 pp.
- Rodríguez B. y Porras M. 1996. Botánica sistemática. Compilación. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Schilling, E. E., and Heiser C.B. 1981. Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon* 30:393-403.
- Schilling, E.E., and Jansen R.K. 1989. Restriction fragment analysis of chloroplast DNA and the systematics of *Viguiera* and related genera (Asteraceae: Heliantheae). *Amer. J. Bot.* 76 (12): 1769-1778.
- Seiler G. J., and Rieseberg L. H. 1997. Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower, pp. 21-65.
- Serieys, H. 1997. Report On 1995-1996 Activities Of The Fao Technical Meeting On The Sunflower. 18p.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76.
- Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.
- Upfold, S. J. and Vanstaden, J. 1990. The germination characteristics of *Tithonia rotundifolia*. *Ann. Bot.* 66:57-62.
- Vicente, M. C. y Fulton T. 2005. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Institute for Genomic Diversity, Cornell University.
- Vos, P., Hogers, R., Bleker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407- 4414.