

FORMACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE MAPEO
GENÉTICO EN GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) Y
EVALUACIÓN COMPARATIVA DE
APAREAMIENTO CROMOSÓMICO

JESÚS RODRÍGUEZ DE LA PAZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial
para Obtener el Grado de
Doctor en Ciencias
en Fitomejoramiento



Universidad Autónoma Agraria
“Antonio Narro”
PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Abril de 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

FORMACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE MAPEO GENÉTICO EN GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) Y EVALUACIÓN COMPARATIVA DE APAREAMIENTO
CROMOSÓMICO

TESIS

POR

JESÚS RODRÍGUEZ DE LA PAZ

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. Rolando Cavazos Cadena

Asesor:

Dr. Octavio Martínez de la Vega

Asesor:

Dr. Juan Manuel Martínez Reyna

Asesor:

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Abril de 2005

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento a esta gran institución, nuestra Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), por haberme abrigado en su seno y darme así la oportunidad de tener una formación académica.

Al Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés, por haberme brindado la oportunidad de participar en uno de sus proyectos de investigación para la realización del presente trabajo de tesis; por su gran colaboración en mi formación académica, así como por su apoyo, asesoría, observaciones y motivación.

Al Dr. Rolando Cavazos Cadena, por haber brindado generosamente mucho de su tiempo en mi formación académica, por las charlas sustanciosas con él, por su estímulo, por sus sugerencias precisas y apoyo incondicional de siempre.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega, por su asesoría, por sus valiosas observaciones y sugerencias, y por su amable disposición para conmigo.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Reyna, por sus consejos, por su asesoría y acertadas observaciones sobre el presente trabajo, por su estímulo y apoyo incondicional.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza, por sus observaciones y sugerencias, por el tiempo brindado en la asesoría del presente trabajo, por su estímulo y apoyo incondicional.

A mi muy apreciado Dr. Alfredo de la Rosa Loera, por su amistad, por sus valiosas y precisas sugerencias, por su apoyo y motivación en momentos críticos, por ser tan noble, por el apoyo total e incondicional de siempre. Se hace extensivo mi agradecimiento para con su esposa y para con toda la demás familia del Dr. Alfredo, estoy en deuda con todos ellos.

Al M.C. Noé Musito Ramírez, por haberme auxiliado generosamente en mucho del trabajo de campo, por su amistad desinteresada, por ser tan noble, por su inmensa bondad, por el apoyo total e incondicional. Se agradece al Dr. Eduardo Musito Ramírez, por su amistad y apoyo incondicional brindado durante el presente trabajo; admiro de él, que es muy centrado, ecuaníme y alegre. Se agradece al Ing. Gregorio Musito Ramírez, por su amistad y apoyo incondicional. También se agradece la amistad de Arturo Musito Ramírez. Además se hace extensivo mi agradecimiento para con toda la familia Musito Ramírez, estoy en deuda con todos ellos.

Al M.C. Regino Morones Reza, mi muy estimado y apreciado maestro, por su gran colaboración en mi formación académica, por su gentileza y generosidad de siempre, por su estímulo y apoyo en momentos difíciles, por su apoyo total e incondicional de siempre. Se hace extensivo mi agradecimiento para con toda su familia, estoy en deuda con todos ellos.

Al Dr. Humberto de León Castillo, por su amistad total y desinteresada, por su apoyo y estímulo en momentos difíciles.

Al M.C. Alberto Montesinos Cruz, por haberme auxiliado generosamente en mucho del trabajo de campo, por su amistad desinteresada, por el apoyo total e incondicional.

A mis demás compañeros del Programa de Postgrado en Fitomejoramiento M.C. Susana Gómez Martínez, M.C. Miriam Paulina Luevanos Escareño, Dra. Rosalinda Mendoza Villareal, M.C. Roberto Dorantes González, M.C. Ramiro Vidrio Hernández, Dr. Flavio Ramos Domínguez, M.C. Francisco Castillo Reyes, M.C. Bernardo Romero Ramírez, M.C. Silverio Hernández Sánchez, M.C. Heriberto Soqui Ortíz, M.C. Edgar Ivan Robledo González. A todos ellos por su amistad y apoyo.

Al M.V.Z. Javier de la Paz Castro, por su amistad, por su apoyo total e incondicional de siempre, por su estímulo en momentos difíciles.

Al M.C. José Salgado de la Paz, por su amistad desinteresada, por su apoyo incondicional.

Al M.C. Leopoldo Rivera Zavala, por su generosidad, estímulo, amistad y apoyo de siempre.

Al Dr. Gerardo Ramírez Rosales, por su amistad brindada generosamente, por su apoyo y motivación.

Al M.C. Gerardo Alvarado Esquivel, por su amistad y apoyo.

A la Lic. Martha Gómez Martínez, por su valiosa colaboración en el trabajo de laboratorio de la presente investigación.

Al Sr. Miguel Angel Rodríguez Armendáriz, por su colaboración en el trabajo de campo de la presente investigación.

Al M.C. Jaime Pedro Salas Campa y a toda su familia, por su amistad y apoyo total e incondicional de siempre.

Al M.C. Irineo Gallegos Pérez, al M.C. Jesús Gálvez Chávez, al M.C. Miguel Ángel Gallegos Robles, por su amistad y apoyo.

A Fernando Josué Pliego Hernández, David Terrazas Flores, Pedro Bautista Redondo y Ramón Bautista Redondo, por la amistad y apoyo que me han brindado.

Al Sr. Jesús Zavala Betancourt, por su amistad y apoyo moral incondicional de siempre.

Al CONACYT por el apoyo al proyecto del cual se derivó esta tesis.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Sr. Juan Rodríguez Palafox(+)

Sra. Audelia de la Paz Briceño

A quienes les debo todo.

A MIS HERMANOS:

Víctor

Rosa María

María Andrea

Micaela

Juan Manuel

Irma

A MIS SOBRINOS:

Juan Carlos

Miriam G^{pe}

Cervando

Efrain

Juan Alberto

Lluvia Isela

Julio Higinio

Britany

Alexia Yareli

Juan

Margarita

Marcos Gael

Rosa

Margarita

Jorge Eduardo

Adolfo

Norma Patricia

Miguel Ángel

Juana Laura

José Horacio

Alma Dayana

Sergio Alejandro

Laura Judith

A MI PEQUEÑA:

María Mayela de la Paz Ochoa

A MI ENTRENADOR Alberto Galván Córdova Y A MIS AMIGOS DEL EQUIPO DE ATLETISMO HALCONES DEL DESIERTO, DE TORREÓN, COAH., EN ESPECIAL A Rosa Elena Miranda Herrera, Liliana Flores Solís, Ángel Martínez Ramírez (1^{er} lugar general en la prueba de 21 K del maratón de San Antonio, Texas, en 2004), Moisés Valles Serrano, Rafael Ríos Flores, la Señora Rosario Ortiz Espinoza, Juan Pablo Pimentel Ortiz y a Felipe de Jesús Romo Huerta (1^{er} lugar de la categoría master en la prueba de maratón en San Antonio, Texas, en 2004). Todos ellos atletas de gran nivel competitivo. A LA GRAN ATLETA ELITE NACIONAL Gisel Monserrat Bautista Escobedo, con toda mi admiración y respeto.

Todos ellos fuente de apoyo moral y de inspiración.

COMPENDIO

**Formación de una Población de Mapeo Genético en Girasol (*Helianthus annuus* L.)
y Evaluación Comparativa de Apareamiento Cromosómico**

POR

JESÚS RODRÍGUEZ DE LA PAZ

**DOCTORADO EN
FITOMEJORAMIENTO**

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

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés - Asesor -

**Palabras clave: *Helianthus annuus* L., hibridación, población de mapeo, análisis
meiótico, configuraciones meióticas, quiasmas**

En esta investigación se efectuaron cruzamientos inter-subespecíficos en girasol (*Helianthus annuus* L.), con los siguientes objetivos: (i) formar una población de mapeo; y (ii) comparar los patrones de apareamiento cromosómico de los padres y del híbrido F₁. El progenitor femenino de la población fue la línea de girasol HA 89 y el masculino fue un material de *Helianthus annuus* ssp. *texanus* colectado en Saltillo, Coah.

Los cruzamientos inter-subespecíficos se efectuaron en el verano de 1999. Para el análisis meiótico se estableció un experimento con los progenitores y el híbrido F₁ en

la primavera de 2000, bajo el esquema de un diseño completamente al azar con submuestreo. Los patrones de apareamiento cromosómico meiótico de los padres y del híbrido fueron comparados por medio del análisis de meiocitos en diacinesis y metafase I. Se evaluó la viabilidad de polen por medio de un método de tinción.

Se tuvo éxito en la obtención de semilla de los cruzamientos inter-subespecíficos. Las poblaciones F_2 producto del cruzamiento inter-subespecífico presentaron una gran variación genética. Se formó una población de mapeo genético constituida por líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correcaminos $F_{2,3}$).

Ya que el apareamiento cromosómico fue normal, con ausencia de univalentes y multivalentes, y que sólo fueron observados cadenas y anillos bivalentes, entonces los genomas parentales son altamente compatibles en la meiosis. El híbrido presentó un índice de apareamiento cromosómico meiótico (0.82) próximo al valor medio parental (0.80) y las diferencias del híbrido con cada uno de los taxa parentales fueron altamente significativas. Además dicho índice fue variable dentro de poblaciones. Esto indica que el carácter número de quiasmas está bajo control multigénico y afectado por el ambiente. Así pues, una población formada con los progenitores podría ser utilizada para analizar los loci de caracteres cuantitativos (QTLs) para apareamiento cromosómico meiótico.

El taxón híbrido tuvo un porcentaje de viabilidad de polen (92.58) comparable a aquéllos de los taxa parentales. La viabilidad de polen del taxón híbrido fue alta, la F_1 fue fértil, y los genomas parentales fueron altamente compatibles en la meiosis. Esto indica que se pueden transferir caracteres deseables de *H. annuus* silvestre al cultivado.

ABSTRACT

Development of a Genetic Mapping Population in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Comparative Evaluation of Meiotic Pairing

BY

JESÚS RODRÍGUEZ DE LA PAZ

**DOCTOR OF SCIENCE
PLANT BREEDING**

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

Manuel Humberto Reyes Valdés, Ph. D. - Adviser -

Key words: *Helianthus annuus* L., hybridization, mapping population, meiotic analysis, meiotic configurations, chiasmata

In this research sunflower (*Helianthus annuus* L.) inter-subspecific crossing was carried out with the following objectives: (i) to form a mapping population; and (ii) to compare the patterns of chromosome pairing from both parents and the F₁ hybrid. The female parent of the population was the HA 89 cultivated inbred line, whereas the male parent was an accession of *Helianthus annuus* ssp. *texanus* collected in Saltillo, Coah.

The inter-subspecific crossings were performed in the summer of 1999, with emasculation of the cultivated progenitor. For the meiotic analysis an experiment with

both parents and the F₁ hybrid was established in the spring of 2000, under a completely randomized design with subsampling. Patterns of chromosome pairing from both parents and the hybrid were compared by means of the analysis of meiocytes in diakinesis and metaphase I. Pollen viability was evaluated by means of a staining method.

Seed production of the inter-subspecific crossings was successful. The F₂ populations showed a large genetic variation. A genetic mapping population was formed by a set of F₃ lines derived from F₂ plants (population Correcaminos F_{2:3}).

Since meiotic chromosome pairing was normal in the three materials, with absence of univalents and multivalents, and only chain and ring bivalents were observed, the parental genomes are highly compatible in meiosis. The hybrid showed a meiotic chromosome pairing index (0.82) close to the midparent value (0.80), and the differences between the hybrid and each parental taxon were highly significant. Besides, this index was variable within populations, including the HA 89 inbred line. This indicates that the chiasma number is under multigenic control and is affected by the environment. Then, a population formed with both progenitors could be used to analyze the quantitative trait loci (QTLs) for meiotic chromosome pairing.

The percentage of pollen viability in the hybrid taxon (92.58) was similar to those found in the parental taxa. The pollen viability of the hybrid taxon was high, the F₁ was fertile, and the parental genomes were highly compatible in meiosis; thus, there is no barrier for the sexual reproduction, in other words, the gene flow and the transference of desirable characters from wild to cultivated *H. annuus* are easily attainable.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS -----	xii
INTRODUCCION -----	1
Objetivos -----	3
Hipótesis -----	4
REVISION DE LITERATURA -----	5
Generalidades -----	5
Origen del girasol cultivado -----	8
Distribución -----	9
Taxonomía -----	10
Marcadores genéticos -----	11
Mapas genéticos -----	14
Poblaciones de mapeo genético -----	16
Hibridación y viabilidad de polen -----	17
Análisis de apareamiento cromosómico en meiosis -----	21
MATERIALES Y METODOS -----	24
Descripción del área de estudio -----	24
Población de mapeo genético -----	24
Material genético -----	24
Cruzamientos inter-subespecíficos -----	25
Formación de las poblaciones F ₂ -----	29
Formación de las líneas derivadas de F ₂ en F ₃ (población Correcaminos F _{2:3}) -----	31
Evaluación fenotípica de las poblaciones F ₂ -----	33
Incremento de M ₁ ⊗ y de M ₂ ⊗ -----	34
Análisis meiótico -----	35
Viabilidad de polen -----	37
Análisis estadístico -----	38
Análisis de varianza -----	38
Prueba de comparación de medias -----	40
Prueba generalizada de razón de verosimilitud -----	41
Correlación entre incidencia de quiasmas y viabilidad de polen -----	45
RESULTADOS Y DISCUSION -----	46
Población de mapeo genético -----	46
Cruzamientos inter-subespecíficos -----	46
Formación de las poblaciones F ₂ -----	47

Formación de las líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correcaminos $F_{2:3}$) -----	48
Evaluación fenotípica de las poblaciones F_2 -----	49
Incremento de $M_1 \otimes$ y de $M_2 \otimes$ -----	53
Análisis meiótico -----	53
Viabilidad de polen -----	60
Correlación entre incidencia de quiasmas y viabilidad de polen -----	63
CONCLUSIONES -----	64
RESUMEN -----	66
LITERATURA CITADA -----	68

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
4.1	Porcentaje de germinación de los materiales cosechados en el otoño de 1999. -----	47
4.2	Análisis descriptivo para los caracteres cuantitativos en la población F ₂ derivada por medio de cruza fraternas. -----	50
4.3	Análisis descriptivo para los caracteres cuantitativos en la población F ₂ derivada por medio de autopolinización. -----	51
4.4	Porcentajes observados para las diferentes categorías de los caracteres rugosidad de la hoja (RUG), pigmentación (PM) y ramificación (RM) en la población F ₂ derivada por medio de cruza fraternas. -----	52
4.5	Porcentajes observados para las diferentes categorías de los caracteres rugosidad de la hoja (RUG), pigmentación (PM) y ramificación (RM) en la población F ₂ derivada por medio de autopolinización. -----	52
4.6	Resultados del análisis meiótico llevado al cabo en poblaciones cultivadas, silvestres e híbridas de girasol. -----	55
4.7	Cuadrados medios del análisis de varianza del índice de apareamiento cromosómico. -----	56
4.8	Cuadrados medios del análisis de varianza del índice de apareamiento cromosómico en la línea HA 89. -----	56
4.9	Prueba de comparación de medias del índice de apareamiento cromosómico. -----	57
4.10	Estimación de la frecuencia relativa de cadenas para cada taxón. -----	57

4.11	Pruebas de Razón Generalizada de Verosimilitud (GLRTs) sobre las frecuencias relativas de cadenas. -----	58
4.12	Resultados del análisis de viabilidad de polen efectuado en poblaciones cultivadas, silvestres e híbridas de girasol. -----	61
4.13	Cuadrados medios del análisis de varianza de viabilidad de polen. -----	61

I. INTRODUCCIÓN

En México se ha usado el girasol (*Helianthus annuus* L.) desde hace varios cientos de años. Los indígenas usaban la semilla tostada para comer sus almendras o para elaborar atole. En tiempos modernos el principal producto del girasol es el aceite, el cual cuenta con magníficas características para la alimentación humana.

Las especies silvestres de girasol están adaptadas a un amplio rango de hábitats y poseen considerable variación para la mayoría de las características agronómicas y de calidad de semilla, de resistencia a insectos, enfermedades y en general de tolerancia a condiciones ambientales desfavorables. Esta variación o diversidad genética del germoplasma silvestre de girasol tiene un uso potencial para mejorar el girasol cultivado, mediante la transferencia a este último de características deseables.

La hibridación amplia ha sido de interés en el girasol, tanto desde el punto de vista teórico como con fines de mejoramiento genético, para transferir genes deseables de las especies silvestres a las líneas cultivadas.

En México, el germoplasma silvestre de girasol no ha sido estudiado extensivamente y como consecuencia no se ha obtenido provecho de él. Para el estudio del germoplasma silvestre de girasol se pueden usar los marcadores genéticos, ya que

estos permiten la elaboración de mapas genéticos completos, la estimación de la relación entre diferentes genotipos, la detección de recombinación entre genes, etc.

Una de las aplicaciones principales de los marcadores de DNA es la construcción de mapas genéticos completos, los cuales son informativos acerca de casi todas las regiones de todos los cromosomas en un organismo. Por el conocimiento de la posición mapa de un gen, se pueden usar marcadores de DNA próximos para diagnosticar su presencia, sin esperar a observar los efectos del gen.

Un mapa genético abre la posibilidad de ser más eficientes en la transferencia de genes desde poblaciones silvestres a cultivadas. Entonces, es deseable una población de mapeo para localizar genes de importancia económica en *Helianthus annuus* L. y así poder utilizarlos.

Una población de mapeo genético debe ser altamente polimórfica. Por lo que una cruce amplia puede proveer de una población adecuada para mapeo genético. Un tipo de población de mapeo ampliamente utilizada es la F₂ derivada de la cruce de dos padres altamente contrastantes. Cuando dichos padres proceden de especies o subespecies diferentes, es conveniente constatar su compatibilidad en cruzamientos.

Como parte de la determinación de la compatibilidad genómica del material silvestre con el cultivado es conveniente hacer un estudio meiótico, ya que este provee información importante sobre las relaciones de apareamiento cromosómico y sobre la posibilidad de transferencia de caracteres deseables de una especie a otra (Jauhar y

Joppa, 1996). Además, con esta información se puede conocer si existe una disminución del entrecruzamiento en la población híbrida, con fines de ajuste del mapa genético y de información básica sobre el comportamiento de la recombinación en poblaciones híbridas.

Resulta deseable la formación de una población de mapeo genético a partir del cruzamiento entre material cultivado y plantas silvestres. Esto permitirá la localización de genes de importancia económica en el genoma del girasol. Asimismo, el estudio de apareamiento cromosómico meiótico en el híbrido dará información relevante sobre la genética de la formación de quiasmas. Por lo anterior, se desarrolló el presente trabajo con los siguientes objetivos.

Objetivos

1. Formar una población de mapeo genético en girasol (*Helianthus annuus* L.) con base en la cruce de la línea pública cultivada HA89 y una planta de la población ocho (Ac-8) de *H. annuus* ssp. *texanus*, procedente de Saltillo, Coah.
2. Comparar los patrones de apareamiento cromosómico meiótico del girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*), girasol silvestre (*Helianthus annuus* L. ssp. *texanus* Heiser) y del híbrido F₁.

Hipótesis

1. El cruzamiento entre girasol (*Helianthus annuus* L.) cultivado y silvestre provee de una población altamente polimórfica, adecuada para mapeo genético.
2. Existen diferencias en el apareamiento cromosómico meiótico entre el girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*), el girasol silvestre (*Helianthus annuus* L. ssp. *texanus* Heiser) y el híbrido entre ambos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades

El éxito del mejoramiento genético de un cultivo está determinado por la eficiencia de los métodos y la variación o diversidad genética de la población con que se trabaja. Uno de los mayores reservorios de variación o diversidad genética de una especie cultivada es el germoplasma silvestre. En el país, se han estudiado muy poco los girasoles silvestres y por ende no se ha obtenido provecho de ellos. En el cultivo del girasol se tienen problemas de enfermedades, plagas y sequía. Las poblaciones silvestres son fuente potencial de resistencia a condiciones ambientales adversas, por lo que transfiriendo esa resistencia al girasol cultivado, se podrían superar o disminuir aquellos problemas.

Los recursos genéticos para un cultivo son el conjunto de toda la diversidad genética de la especie y sus parientes compatibles. Se encuentra establecido que el mejorador de plantas depende de la correcta combinación de alelos específicos de los 50,000-60,000 loci genéticos presentes en el genoma de una planta. La variación de alelos en estos 50,000-60,000 loci nos produce la variación o diversidad genética presente en una especie. El acceso a un amplio rango de diversidad genética es crítico para el éxito de cualquier programa de mejoramiento (Hoisington *et al.*, 1998).

Los parientes silvestres de las especies cultivadas son una rica fuente de características valiosas (Stephens, 1961; Harlan, 1976; Hawkes, 1977; Stalker, 1980; Rick, 1982; Brown *et al.*, 1985; Goodman *et al.*, 1987; Vaughan, 1989), de las cuales se ha aprovechado sólo una pequeña fracción de la ganancia potencial para mejorar los cultivos. El rango de variación genética para una característica frecuentemente es más grande en el germoplasma exótico que entre los tipos cultivados, puesto que los tipos cultivados son usualmente derivados de un pequeño número de ancestros, y han sido seleccionados intensivamente a través de muchos siglos (Hawkes, 1977; Vaughan, 1989). Consecuentemente, la base mejorada actual para muchos cultivos, especialmente en especies autógamas (tales como trigo, arroz, soya, algodón, y tomate) y en aquéllas en que se explota el vigor híbrido, contiene sólo una pequeña fracción de la variación genética existente.

Muchas características de herencia simple tales como resistencia a plagas y enfermedades (Harlan, 1976), y aun características cuantitativas tales como altos niveles de sólidos solubles en tomate (Rick, 1974) han sido extraídos de germoplasma exótico.

El principal producto del girasol es el aceite, del cual la semilla contiene de 33 a 50 por ciento. Está compuesto por el ácido linoleico con alrededor de 60 por ciento, el ácido oleico con alrededor de 35 por ciento, el ácido palmítico con alrededor de 4 a 5 por ciento, el ácido esteárico con alrededor de 2.5 por ciento; los demás ácidos grasos se encuentran en cantidades insignificantes. El índice de yodo (IY) es de aproximadamente 130, lo que sitúa al aceite de girasol entre los semisecantes con magníficas características para la alimentación humana (Robles, 1982).

Las especies silvestres de girasol están adaptadas a un amplio rango de hábitats y poseen considerable variación para la mayoría de las características agronómicas y de calidad de semilla, de resistencia a insectos, enfermedades y en general de tolerancia a condiciones ambientales desfavorables (Thompson *et al.*, 1981; Rogers *et al.*, 1982; Seiler, 1988, 1992). Por ejemplo, *H. hirsutus* y *H. tuberosus* son fuentes de resistencia para el patógeno *Alternaria helianthi* (Morris *et al.*, 1983). De aquí la importancia del germoplasma silvestre de girasol, pues su variación o diversidad genética tiene un uso potencial para mejorar el girasol cultivado, transfiriendo a este último características deseables.

Han sido reportadas especies diploides, tetraploides y hexaploides del género *Helianthus*, todas con un número cromosómico básico de 17. A nivel mundial se han realizado varios esfuerzos por estudiar dichas especies y su interacción con el girasol cultivado, especialmente por el grupo de la FAO (1994).

En México el germoplasma silvestre de girasol no ha sido estudiado extensivamente. El primer intento sistemático por coleccionar dicho germoplasma fue reportado por Gómez y González (1994). En este trabajo se lograron coleccionar 10 especies silvestres de *Helianthus*. Sin embargo, algunas especies que habían sido reportadas anteriormente, como *H. hirsutus* no fueron encontradas. Todo esto indica que se requiere una exploración más intensiva a fin de preservar y estudiar el germoplasma silvestre de girasol.

Origen del Girasol Cultivado

Schilling y Heiser (1981) dividieron a los girasoles del género *Helianthus* en cuatro secciones y seis series, así ellos establecieron que *Helianthus* consta de 49 especies nativas de América, localizadas desde el sur de Canadá hasta el norte de México.

Las siguientes especies silvestres de girasol se presentan en México (Schilling y Heiser, 1981): *H. arizonensis* (2x=34), *H. ciliaris* (4x=68, 6x=102), y *H. laciniatus* (2x=34) se presentan en el Norte de México; *H. californicus* (6x=102) en Baja California Norte; *H. annuus* (2x=34) en el Norte de México y *H. niveus* (2x=34) en el Norte de México y Baja California.

El centro de origen del girasol silvestre *Helianthus annuus* L. es el norte de México y el oeste y el sur de los Estados Unidos de Norte América, lo cual se infiere a partir de la gran diversidad genética presente en las poblaciones silvestres de esta área. El girasol domesticado se originó y se desarrolló a partir de su progenitor *H. annuus* silvestre. La evidencia indicaba que *H. annuus* silvestre posiblemente fue domesticado en la parte central de los Estados Unidos de Norte América (Seiler y Rieseberg, 1997); pero recientemente Pope *et al.* (2001) descubrieron, lo que son hasta ahora, los restos más antiguos de girasol completamente domesticado en el sitio San Andrés (en la costa tropical del Golfo de México), los cuales tienen 4700 años de antigüedad. Piperno (2001) menciona que aunque un origen separado del girasol domesticado en Norte

América es aún posible, se esta acumulando un fuerte soporte para la hipótesis de Pope *et al.* de un origen Mexicano del girasol domesticado.

Distribución

El girasol *H. annuus* silvestre está distribuido en la mayor parte de los Estados Unidos de Norte América y desde el sur de Canadá hasta el norte de México, pero más comúnmente en el Oeste (Schilling y Heiser, 1981).

El girasol anual silvestre común *H. annuus* es la especie de girasol más diversa geográficamente en el norte de América y exhibe la más grande variabilidad morfológica y de hábitats. Tiende a ser una maleza, casi siempre encontrado en hábitats que han sufrido un disturbio por el hombre, por lo que no es sorprendente que sea la más ampliamente distribuida de las especies de *Helianthus*. Se le encuentra en áreas con baja y alta precipitación, desde el nivel del mar hasta 3000 m, y florece en forma continua desde finales de primavera hasta principios de otoño (Seiler y Rieseberg, 1997).

Taxonomía

La clasificación botánica del girasol común *H. annuus* es la siguiente:

Reino	Methaphyta
División	Magnoliophyta
Sub-División	Magnoliopsida
Clase	Magnoliopsida
Sub-Clase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Compositae (Asteraceae)
Sub-Familia	Tubiflorae
Tribu	Heliantheae
Sub-Tribu	Helianthinae
Género	<i>Helianthus</i>
Especie	<i>annuus</i>

El girasol cultivado común es incluido en el complejo *H. annuus* L. bajo el nombre latino *Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*. El girasol anual silvestre común encontrado en Saltillo, Coahuila y zonas aledañas ha sido identificado como *Helianthus annuus* L. ssp. *texanus* Heiser (Reyes-Valdés *et al.*, 2000)

Marcadores Genéticos

Para el estudio del germoplasma, especialmente del germoplasma silvestre de una especie o género se pueden usar los marcadores genéticos, ya que estos permiten la elaboración de mapas genéticos completos, la estimación de la relación entre diferentes genotipos, la detección de recombinación entre genes, etc.

Para ser útil como un marcador genético, una característica debe satisfacer tres criterios: ser variable, cualitativa y heredable.

Hay tres tipos fundamentales de marcadores genéticos: marcadores morfológicos, marcadores basados en proteína y marcadores basados en DNA. El polimorfismo es definido como variación heredable detectable en un locus. Un marcador genético puede ser definido operacionalmente como un carácter polimórfico heredable con clara interpretación genética y reproducibilidad. Los marcadores de DNA simplemente son diferencias detectadas en la información genética portada por dos o más individuos. La información de los marcadores de DNA sirve para muchos propósitos, tales como medicina forense, pruebas de paternidad, identificación de genes responsables de enfermedades genéticas e inferencia de relaciones evolutivas entre organismos.

Algunos de los sistemas de marcadores de DNA son el RFLP (polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción) (Botstein *et al.*, 1980), el AFLP (polimorfismo en

longitud de fragmentos amplificados) (Vos *et al.*, 1995) y el RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) (Williams *et al.*, 1990).

Los marcadores de DNA pueden ser usados para obtener información acerca de los genes que influyen una característica de importancia agrícola, facilitando así los esfuerzos en el mejoramiento. En particular, uno puede estimar:

1. Número de genes. ¿Cuántos genes influyen una característica?
2. Localización cromosómica. ¿Dónde están los genes localizados en los cromosomas (por ejemplo, próximos a cuales marcadores genéticos)?
3. Efecto fenotípico. ¿En qué medida cada gen afecta la característica?
4. Dosificación del gen (o “acción génica”). ¿Un individuo portando dos copias de un gen se observa diferente de un individuo portando sólo una?
5. Pleiotropía. ¿Genes individuales afectan más de una característica?
6. Sensibilidad ambiental. ¿Los genes funcionan similarmente en ambientes diferentes?
7. Epistasis. ¿El efecto de un gen influye en los efectos de otros?

Las respuestas a estas preguntas pueden ayudar al mejorador a “diseñar” variedades cultivadas que se comporten consistentemente bien en un ambiente definido. Por la incorporación de genes que protejan contra riesgos ambientales, tales como sequía, alta y baja temperatura, salinidad o razas de plagas y enfermedades particulares, una variedad puede retener algo de productividad aún bajo condiciones subóptimas, las cuales son la regla, más que la excepción (Boyer, 1982).

Los mejoradores de plantas han desarrollado muchas estrategias sofisticadas para alcanzar objetivos de mejoramiento particulares en diferentes especies, y bajo diferentes situaciones (Allard, 1960; Simmonds, 1979). Sin embargo, estas estrategias son similares una a otra en que el progreso del mejoramiento está en gran medida determinado por tres factores:

1. Identificación de la variación genética entre individuos, cultivares, razas o especies diferentes; los cuales muestran atributos diferentes, o los cuales muestran un atributo común pero debido a genes diferentes.
2. Realización de cruzamientos para obtener recombinación entre genotipos con atributos diferentes, creando genotipos con nuevos conjuntos de atributos (o niveles superiores de un atributo particular).
3. Selección precisa de estos genotipos ocasionales con nuevos conjuntos de atributos, los cuales son parte de grandes poblaciones que se desarrollan en ambientes variables e incluyendo muchos genotipos inferiores.

Cada una de estas áreas puede beneficiarse del uso de los marcadores genéticos, especialmente marcadores de DNA. Los marcadores genéticos representan variación genética, permitiendo estimar la relación entre diferentes genotipos, y consecuentemente predecir cuales apareamientos pueden producir combinaciones de genes nuevas y superiores. Además, al tener marcadores para genes de interés, se puede detectar recombinación entre estos genes, y ejecutar selección precisa para individuos genéticamente superiores, de entre la masa de candidatos incluyendo aquéllos que fueron favorecidos por una combinación particular genes-ambiente.

Cuando se cruza un material cultivado con un pariente silvestre usado como fuente de una característica deseable, por retrocruzarse se recupera el tipo cultivado que además lleva la característica deseable extraída del germoplasma silvestre. Por lo general se tienen problemas, ya que además de la característica deseable se arrastran otras características del germoplasma silvestre. Los marcadores genéticos proveen un medio para controlar el grado de disrupción del genotipo parental cultivado. Se pueden usar marcadores genéticos para determinar cuales regiones cromosómicas portan genes agrícolamente deseables, y también para revelar cuales individuos portan esas regiones cromosómicas. De esta forma es posible restaurar la mayor parte del genotipo parental doméstico (y consecuentemente, el fenotipo) por retrocruzamiento, mientras se retienen los genes deseables (y características) del padre silvestre. Los marcadores genéticos pueden todavía ser usados para acelerar la restauración de los atributos del padre doméstico, seleccionando contra marcadores del padre silvestre fuera de las regiones que portan los genes deseados (Tanksley, 1983; Burr *et al.*, 1983; Soller y Beckman, 1988; Paterson *et al.*, 1990; Young y Tanksley, 1989; Reyes-Valdés, 2000).

Mapas Genéticos

Una de las más amplias aplicaciones de los marcadores de DNA es la construcción de mapas genéticos, los cuales pueden ser usados para determinar la localización cromosómica de loci que afectan características simples o complejas (Paterson *et al.*, 1988; Lander y Botstein, 1989). Los marcadores de DNA pueden ser encontrados en muy grandes números. Con un número grande de marcadores genéticos,

se puede construir un mapa genético completo, el cual es informativo acerca de casi todas las regiones de todos los cromosomas en un organismo.

Por el conocimiento de la posición mapa de un gen, se pueden usar marcadores de DNA próximos para diagnosticar su presencia, sin tener que esperar para que sus efectos sean observados.

Un mapa genético es un modelo abstracto del arreglo lineal de un grupo de genes y marcadores. Representa el orden relativo de marcadores genéticos y sus distancias relativas a lo largo de cada cromosoma de un organismo. Un mapa genético está basado en la recombinación homóloga durante meiosis, de manera que un mapa genético es también un mapa meiótico.

La resolución de un mapa genético está limitada tanto por el número de marcadores, como por el número de eventos de recombinación. Si no pueden ser detectados eventos de recombinación dentro de una región del genoma, entonces el mapeo genético no puede resolver las posiciones relativas de genes y marcadores en aquella región. Para incrementar la resolución de un mapa genético, se necesita un número grande de marcadores y una población de mapeo grande.

Poblaciones de Mapeo Genético

Una población usada para mapeo genético es llamada población de mapeo genético. Las poblaciones de mapeo genético más comúnmente usadas son obtenidas a partir de cruzas controladas.

La selección de una población para mapeo genético involucra la elección de los padres y la determinación de un esquema de apareamiento. Las decisiones sobre la selección de los padres y el diseño de apareamiento, así como el tipo de marcadores, dependen de los objetivos del experimento.

En las poblaciones de mapeo genético obtenidas a partir de cruzas controladas el esquema de apareamiento determina el tipo de población. En los esquemas de apareamiento hay dos métodos: el de padres endogámicos y el de padres heterocigotos. En el primer método, los tipos de población de mapeo genético que se pueden generar son población F_2 de intercruza, población de líneas endogámicas recombinantes (RIL), población F_2 de retrocruza (BC_1), población F_3 de retrocruza (BC_2) y población de líneas doble haploides (DHL) (Hui, 1988).

El tipo de población o progenie segregante común de los mapas moleculares del genoma de maíz con RFLPs (polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción) son: población RIL, población F_2 autofecundada y población F_2 inmortalizada (Coe y Gardiner, 1994).

Para las características de interés, los padres de una población de mapeo genético deben tener suficiente variación genética. La variación al nivel de DNA es esencial para trazar los eventos de recombinación.

Se han elaborado algunos mapas genéticos del girasol. Gentzbittel *et al.* (1995) desarrollaron un mapa consenso del genoma de girasol cultivado a partir de cinco progenies segregantes: tres poblaciones F_2 y dos poblaciones BC_1 . Berry *et al.* (1995) construyeron un mapa genético del girasol cultivado, en donde la población de mapeo fue una F_2 de 289 individuos derivados de una cruce entre las líneas HA 89 y ZENB8. En un mapa genético del girasol cultivado construido por Jan *et al.* (1998) 93 plantas F_2 de una cruce entre las líneas RHA 271 y HA 234 fueron usadas como la población de mapeo. Gentzbittel *et al.* (1999) elaboraron un mapa del genoma de girasol cultivado incorporando datos de siete poblaciones F_2 , para un total de 1115 individuos. Gedil *et al.* (2001) desarrollaron un mapa genético integrado del girasol cultivado al usar marcadores RFLP y marcadores AFLP en una población F_2 de 180 individuos derivados de una cruce entre las líneas HA 370 y HA 372.

Hibridación y Viabilidad de Polen

Una población de mapeo genético debe ser altamente polimórfica; para esto los padres deben tener suficiente variación en secuencia de DNA y en el nivel fenotípico. Entonces, una cruce amplia nos puede proveer de una población adecuada para mapeo genético. Quillet *et al.* (1995) desarrollaron una población de mapeo basada en el cruzamiento de *H. argophyllus* por *H. annuus*. Sin embargo, se observó un alto grado de

anomalías cromosómicas en la progenie. Por lo tanto, es necesario examinar la compatibilidad genómica de los padres usados en una cruce amplia.

La hibridación amplia ha sido de interés en el girasol, tanto desde el punto de vista teórico como con fines de mejoramiento genético, para transferir genes deseables de las especies silvestres a las líneas cultivadas. Un mapa genético abre la posibilidad de ser más eficientes en esta transferencia de genes.

La hibridación es común entre los girasoles anuales de *Helianthus* secc. *Helianthus*, y la integridad de las especies se considera que es mantenida por fuertes barreras de esterilidad cromosómica, la cual produce semiesterilidad en los híbridos (Rieseberg *et al.*, 1995). Si de la cruce entre diferentes especies de *Helianthus* se producen híbridos F₁, estos presentan una semiesterilidad o esterilidad completa, ocasionada generalmente por anormalidades cromosómicas meióticas como formación de multivalentes, entre otras. Se sabe que estas anormalidades cromosómicas meióticas son producidas generalmente por translocaciones e inversiones.

La ocurrencia de irregularidades meióticas o anormalidades cromosómicas meióticas (formación de multivalentes y univalentes) en los híbridos F₁ puede ser debida a que los genomas parentales presentan una homología o compatibilidad reducida (incompatibilidad genómica), esto es, que los padres difieren en su constitución genómica (Whelan, 1978, 1979, 1982; Jackson, 1988; Jan y Chandler, 1989; Atlagic *et al.*, 1993, 1995; Atlagic y Skoric, 1999) o puede deberse a uno o pocos genes, tales

como los genes *Ph*-like (apareamiento homeólogo), los cuales son genes de control del apareamiento cromosómico (Jackson, 1982).

La esterilidad en los híbridos F_1 puede deberse a anomalías cromosómicas meióticas (Whelan, 1979, 1982; Jackson, 1988; Jan y Chandler, 1989; Atlagic *et al.*, 1993, 1995; Atlagic y Skoric, 1999) y/o a incompatibilidad genética entre los genomas. Podemos hablar de incompatibilidad genética en lugar de incompatibilidad genómica cuando el híbrido tiene comportamiento meiótico regular (Morgan y Thomas, 1991).

Se han realizado cruzas interespecíficas entre el girasol *H. annuus* y otras especies de *Helianthus*, tal es el caso de *H. laciniatus* (Jackson, 1988) y *H. tuberosus* (Vanozzi, 1994). Whelan (1979) formó híbridos interespecíficos entre *H. petiolaris* y *H. annuus*. La meiosis en la F_1 fue caracterizada por multivalentes, sugiriendo que 10 de los 34 cromosomas fueron heterocigotos para intercambios cromosómicos. Un par adicional de cromosomas contenía una inversión paracéntrica. Los híbridos F_1 tuvieron menos de 5 por ciento de polen normal.

Los primeros híbridos interespecíficos a partir del cruzamiento entre las dos especies perennes *H. giganteus* ($2n=2x=34$) y *H. maximiliani* ($2n=2x=34$) con la especie anual *H. annuus* ($2n=2x=34$) fueron obtenidos por Whelan (1978). El híbrido de *H. giganteus* x *H. annuus* cultivado tuvo meiosis anormal con meiocitos que contenían univalentes y multivalentes; resultó completamente con esterilidad femenina y con alta esterilidad de polen (menos de 5 por ciento de polen normal). Los híbridos de *H. giganteus* x *H. annuus* silvestre y de *H. maximiliani* x *H. annuus* silvestre tuvieron

menos de 5 por ciento de polen normal. El comportamiento meiótico de todos los híbridos formados sugería la presencia de al menos tres intercambios y una inversión paracéntrica. La viabilidad de polen de *H. giganteus* y de *H. maximiliani* fue de al menos 95 por ciento.

Whelan (1982) realizó cruza interespecíficas entre la especie perenne *H. maximiliani* ($2n=2x=34$) y *H. annuus* silvestre ($2n=2x=34$). La F_1 tuvo multivalentes en meiosis, pero el retrocruzamiento consecutivo de los híbridos hacia girasol cultivado resultó en una rápida normalización de la meiosis. Sin embargo, algunas plantas resultaron trisómicas ($2n+1$).

La viabilidad de polen y el apareamiento cromosómico en 17 poblaciones de *H. tuberosus* y en los híbridos F_1 con *H. annuus*, fueron estudiados por Atlagic *et al.* (1993). En viabilidad de polen existieron diferencias significativas entre poblaciones (47.1-98.8 por ciento). En los 15 híbridos F_1 la viabilidad de polen varió desde 12.4 hasta 57.1 por ciento. Los híbridos F_1 presentaron una meiosis irregular. Un alto porcentaje de meiocitos poseyeron bivalentes (85.9 por ciento), pero también ocurrieron univalentes (0.3 por ciento) y multivalentes (13.8 por ciento). En metafase y anafase, el porcentaje de meiocitos con cromosomas adelantados o retrazados fue alto. En anafase, fueron detectados puentes cromosómicos en 9.9 por ciento de los meiocitos.

La capacidad de cruzamiento de *Helianthus mollis*, *H. salicifolius* y *H. maximiliani* con el girasol cultivado fue examinada por Atlagic *et al.* (1995). Las plantas F_1 exhibieron el fenotipo dominante de las especies silvestres. La viabilidad de polen

varió desde 32.1 hasta 69.9 por ciento. La meiosis fue irregular en los híbridos F_1 . En diacinesis, fueron detectados bivalentes (62.7-97.9 por ciento de los meiocitos), univalentes (0.0-31.2 por ciento) y multivalentes (3.8-7.7 por ciento). En anafase I fueron detectados puentes cromosómicos en 6.8 a 11.4 por ciento de los meiocitos. Cromosomas adelantados en metafase I, y cromosomas retrazados en anafase I y telofase II fueron observados en un alto porcentaje de meiocitos.

En un estudio citogenético de la cruce entre el tetraploide *H. laevigatus* y *H. annuus* cultivado Atlagic y Skoric (1999) encontraron esterilidad masculina en el híbrido F_1 ; la viabilidad de polen fue más baja en la progenie que en los padres (51.6-77.2 por ciento en la F_1). La meiosis fue normal en *H. laevigatus*. Numerosas irregularidades fueron observadas en la meiosis de los híbridos F_1 . Durante diacinesis, cuadrivalentes y hexavalentes fueron registrados en adición a los bivalentes. Cromosomas fracturados y puentes cromosómicos estuvieron presentes en otras fases. La ocurrencia de irregularidades meióticas en los híbridos interespecíficos F_1 indica que *H. laevigatus* y el girasol cultivado difieren en su constitución genómica.

Análisis de Apareamiento Cromosómico en Meiosis

En cruces amplias se debe examinar la compatibilidad genómica de los padres. Reyes-Valdés y Stelly (1995) mencionaron la utilidad de un análisis meiótico en profase y metafase I, entre otras cosas, en cuanto a estudios de afinidad genómica entre variedades o especies relacionadas.

El análisis meiótico que se llevo a cabo en este trabajo es un análisis de quiasmas. Reyes-Valdés *et al.* (1996) mencionaron dos métodos generales para análisis de quiasmas; uno de ellos consiste en conteo de quiasmas y el otro en el registro de las frecuencias de las configuraciones meióticas en metafase I o diacinesis (análisis de meiocitos en diacinesis y metafase I) con la subsecuentemente estimación de la frecuencia de quiasmas. Con este último método se estima la frecuencia de la condición quiasmática (esto es, al menos un quiasma) en segmentos cromosómicos específicos. Dicho método ha sido usado, entre otras cosas, para estudiar la compatibilidad genómica y relaciones en híbridos interseccionales (Jackson, 1988), interespecíficos (Jan y Chandler, 1989) e intergenéricos (Thomas y Morgan, 1990; Morgan y Thomas, 1991).

El índice de apareamiento cromosómico, la frecuencia relativa de configuraciones cromosómicas en cadena, el número promedio de cadenas bivalentes y la frecuencia media de quiasmas (la media del número de brazos cromosómicos con quiasma) (Jackson, 1988) están linealmente relacionados e indican la incidencia de quiasmas.

Reyes-Valdés *et al.* (2000) en un análisis meiótico de la cruza entre girasol (*Helianthus annuus* L.) silvestre y cultivado encontraron que el apareamiento cromosómico meiótico en ambos padres y el híbrido fue normal, pero la F₁ presentó la más alta frecuencia de cadenas bivalentes, lo que revela una frecuencia reducida de brazos cromosómicos con condición quiasmática en el híbrido. Esto puede ser consecuencia de una homología reducida entre los genomas silvestre y cultivado. Ellos postulan que la fluidez del genoma de *Helianthus annuus* puede afectar el apareamiento

cromosómico meiótico de los híbridos entre poblaciones que han estado reproductivamente aisladas una de otra.

Jackson (1982) menciona que hay esencialmente dos maneras en las que los híbridos diploides pueden comportarse citológicamente: los quiasmas pueden estar distribuidos aleatoriamente, o pueden estar distribuidos no aleatoriamente como en los diploides normales. El modelo aleatorio requiere que una frecuencia apropiada de univalentes ocurra entre todos los bivalentes teóricamente posibles. Algunos híbridos se ajustan al modelo NR (no aleatorio) mientras que otros se ajustan al modelo R (aleatorio). Parece ser que no hay manera de predecir si el híbrido se va a ajustar al modelo R o al NR, y es también evidente que el rango taxonómico de los individuos que están siendo cruzados no es un indicador exacto de fallas en el apareamiento cromosómico meiótico (sinapsis). Esto sugiere que la sinapsis al nivel diploide puede estar controlada por uno o pocos genes, tales como los genes *Ph*-like (apareamiento homeólogo), los cuales son genes de control del apareamiento cromosómico. Este autor postula que estudios futuros mostrarán polimorfismo para esta clase de genes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Área de Estudio

El presente trabajo se desarrolló en el campo experimental de la UAAAN, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, que se sitúa a 25° 22' latitud Norte, 101° 00' longitud Oeste, con una altitud de 1754 m. El clima que prevalece es seco con una precipitación pluvial media anual de 490 mm y con una temperatura media anual de 17.1° C.

Población de Mapeo Genético

Material genético

El material de girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *Macrocarpus*) utilizado como progenitor femenino de la cruza, para formar la población de mapeo genético en girasol, fue la línea pública cultivada HA 89. El material silvestre (*Helianthus annuus* L. ssp. *texanus* Heiser), utilizado como macho, estuvo representado por dos plantas (identificadas como M₁ y M₂), provenientes de la población ocho (Ac-8) de la colección de girasol silvestre (*Helianthus annuus* L. ssp. *texanus* Heiser) del Laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales, Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Además, se realizó el

cruzamiento de la línea pública cultivada androésteril CMS HA 89 con cada uno de los dos machos. Las plantas F₁ de la cruce androésteril con silvestre sirvieron como testigo para corroborar la identidad híbrida del cruzamiento HA 89 con silvestre.

Cruzamientos inter-subespecíficos

El 10 de Junio de 1999 se sembraron 30 plantas de la línea HA 89 en vasos de poliestireno en vivero, utilizando como sustrato suelo esterilizado; el siete de Junio se sembraron también 30 plantas de línea CMS HA 89. Se logró tener plantas para trasplante en los 30 vasos de HA 89 y en 25 vasos de CMS HA 89. Este material cultivado se trasplanto el 25 de Junio en el campo experimental de la UAAAN, en Buenavista, Saltillo, Coahuila. El 28 de Junio en una población silvestre (Ac-8) establecida en el campo experimental de la UAAAN, en Buenavista, se hizo la elección de las dos plantas silvestres que se utilizaron como progenitor masculino de la cruce y fueron identificadas por medio de etiquetas como macho uno (M₁) y macho dos (M₂). El cruzamiento entre el material cultivado y el silvestre se llevó a cabo en el verano de 1999 en el campo experimental de la UAAAN, en Buenavista, Saltillo, Coahuila. Los instrumentos utilizados fueron: bolsas de papel, clips, marcadores, pinzas para emascular, alcohol para desinfectar, atomizadores, navaja o bisturí, cajas de petri para colectar y almacenar polen, y aplicadores de felpa (varillas cortas de madera con un atado de franela en un extremo).

Las florecillas del capítulo de girasol son flores perfectas (cada una de ellas tiene estambres y pistilo). La corola de cada florecilla esta compuesta de cinco pétalos

fusionados, excepto en la punta, formando así la corola tubular. Dentro de la corola tubular, cinco anteras fusionadas forman un segundo tubo (el tubo de las anteras) con filamentos separados. Encerrado en el tubo de las anteras se encuentra el pistilo, el cual termina en un estigma bilobulado. Para iniciar con el cruzamiento, primero se realizaron emasculaciones en la línea HA 89. La emasculación consiste en la extirpación de las anteras con ayuda de unas pinzas cuando emergen de las flores tubulares, antes de que derramen polen; se debe llevar a cabo en el momento en que el pistilo todavía no llega cerca del extremo superior del tubo de las anteras, porque en este caso puede tener una lesión o se puede romper junto con las anteras. Para iniciar la emasculación se contó con 29 plantas de HA 89. El procedimiento consistió en cubrir con bolsas de papel y clips los botones florales cuando se empezaban a abrir, previa identificación del material genético (con marcador sobre la bolsa de papel).

A los capítulos de HA 89, una vez que ya fueron cubiertos con bolsas de papel, se les revisó a diario para detectar la más leve hinchazón de las florecillas de la periferia del capítulo, ya que ello indicaría que en el transcurso del día o al día siguiente, en estas florecillas el tubo de las anteras estará emergiendo de la corola tubular. El lapso de tiempo adecuado para emasculación es desde inmediatamente en que el tubo de las anteras se hace visible hasta unas dos horas después; en estas condiciones las anteras no han soltado polen y el pistilo todavía no llega cerca del extremo superior del tubo de las anteras.

Para extirpar las anteras de las florecillas, se sujetó con las puntas de las pinzas el extremo superior del tubo de las anteras y se les removió. En caso de que quedaran

anteras o fragmentos de antera, estos fueron removidos con mucho cuidado. Después de sacar las anteras, se aplicó agua pulverizada con un atomizador para lavar el capítulo. Se emasculó por tres días consecutivos cada capítulo, lo cual nos da un total de seis hileras de florecillas en cada uno. En ocasiones en la primera emasculación de un capítulo sólo se encontraban unas cuantas florecillas mostrando el tubo de las anteras, por lo cual para alcanzar un total de alrededor de seis hileras de florecillas emasculadas en estos capítulos, se requirió emasculación por cuatro días consecutivos. Al terminar la última emasculación, con un bisturí se procedió a la remoción del resto de las florecillas de la zona central del capítulo (las cuales estaban sin abrir). Antes de empezar a trabajar en cada ocasión en cada capítulo, las pinzas, el bisturí y nuestras manos fueron rociados con alcohol mediante un atomizador, para desinfectar y así eliminar residuos de polen.

Los botones florales de M_1 y M_2 se cubrieron con bolsas de papel y clips cuando empezaban a abrirse, identificando el material genético con marcador sobre la bolsa, para posteriormente recolectar polen. El polen de cada macho se recolectó por separado, utilizando una caja de petri identificada para cada uno. La recolección se realizó sacudiendo suavemente el capítulo por arriba de la caja de petri.

De las 29 plantas de HA 89 con que se contó a inicios de la emasculación, 15 de ellas se destinaron para polinización con M_1 (a este cruzamiento se le designo como HA 89-Em x M_1) y las 14 restantes se destinaron para polinización con M_2 (cruzamiento HA89-Em x M_2); para indicar esto, a cada planta se le etiquetó con los datos necesarios. En cada capítulo, al día siguiente de la última emasculación se llevó a cabo la polinización con el macho silvestre indicado. La polinización se repitió por dos días más

(el polen fue recolectado durante los días anteriores y también en el día de la polinización). Esta consistió en aplicar el polen del macho silvestre a los estigmas del material cultivado emasculado, utilizando para ello un aplicador de felpa, éste se impregnó con polen y se frotó suavemente sobre los estigmas. Antes de manipular el polen y el aplicador de otro macho, se desinfectaron las manos para evitar contaminar con polen no deseado.

Durante las polinizaciones en las plantas emasculadas también se polinizaron las plantas cultivadas androestériles (de la línea CMS HA 89). Previo a esto, los botones florales se cubrieron con bolsas de papel y clips cuando se empezaban a abrir, identificando el material genético (con marcador sobre la bolsa de papel). Se les revisó a diario para detectar la aparición de estigmas receptivos y proceder con la polinización. De las 21 plantas de CMS HA 89 con que se contó a inicios de la polinización, 11 se destinaron para polinización con M_1 (cruzamiento CMS HA 89 x M_1) y las diez restantes se destinaron para polinización con M_2 (cruzamiento CMS HA 89 x M_2); para indicar esto, a cada planta se le etiquetó con los datos necesarios.

Por otro lado, en cada uno de los machos silvestres se efectuaron autopolinizaciones para perpetuar su composición genética. Al momento de recolectar polen en los machos silvestres, aprovechamos para autofecundar esos mismos capítulos de los cuales se recolectó polen; para ello se frotó suavemente sobre los estigmas con un aplicador para cada macho. La semilla proveniente de la autofecundación de M_1 es una

línea S_1 (a esta línea la designamos como $M_1 \otimes$) y la proveniente de la autofecundación de M_2 es otra línea S_1 (a esta otra línea la designamos como $M_2 \otimes$).

En el otoño de 1999 se cosechó la semilla F_1 de los cruzamientos y también la S_1 de la autofecundación de los machos. El 12 de Noviembre de 1999 se estableció una prueba de germinación de los materiales cosechados.

Formación de las poblaciones F_2

La semilla F_1 producto de los cruzamientos inter-subespecíficos presentó una germinación de 100 por ciento. Con el fin de formar las poblaciones F_2 , a finales del otoño de 1999 (6 de Diciembre) se sembraron 15 plantas F_1 del cruzamiento de HA 89 con cada uno de los machos silvestres (M_1 y M_2) en vasos de poliestireno en invernadero, utilizando como sustrato suelo esterilizado; además también se sembraron cinco plantas F_1 del cruzamiento de CMS HA 89 con cada macho. A inicios de Enero de 2000 estos materiales se trasplantaron a macetas-bolsas de plástico en el invernadero. Las plantas F_1 se trasladaron a vivero el 15 de Febrero de 2000.

En las plantas F_1 del cruzamiento de HA 89 con cada uno de los machos silvestres se cubrieron los botones florales principales con bolsas de papel a partir del siete de Marzo de 2000, y se autopolinizaron seis días después. La autopolinización se repitió por dos o tres ocasiones a intervalos de dos días; para esto se frotó suavemente sobre los estigmas utilizando un aplicador para cada planta. Antes de pasar a trabajar con

otra planta, las manos se desinfectaron para evitar contaminar con polen no deseado. Así, se obtuvieron dos poblaciones F_2 derivadas por autopolinización, una originada del cruzamiento inicial con M_1 y otra del cruzamiento inicial con M_2 .

En las F_1 se cubrieron los botones laterales con bolsas de papel a partir del dos de Abril de 2000. Estos capítulos se destinaron para hacer cruzamientos fraternos con mezcla de polen y derivar así otro tipo de población F_2 . Los cruzamientos fraternos se comenzaron a hacer seis días después de cubrir los botones; la polinización con mezcla de polen se repitió por dos o tres ocasiones a intervalos de dos días. Para esto, primero se recolectó polen de las F_1 que provienen del cruzamiento inicial con M_1 en forma separada de las que provienen del cruzamiento inicial con M_2 , utilizando para ello una caja de petri identificada para cada uno de los dos tipos de plantas F_1 ; la recolección se realizó sacudiendo suavemente el capítulo por arriba de la caja de petri. Una vez recolectado el polen de todas las plantas F_1 de un tipo, este fue mezclado y se procedió a la polinización de los capítulos de los cuales fue recolectado. Para la polinización se utilizó un aplicador para cada uno de los dos tipos de plantas F_1 , que se impregnó con polen y se frotó suavemente sobre los estigmas. Antes de pasar a trabajar de un tipo de plantas F_1 a otro, se desinfectaron las manos para evitar contaminar con polen no deseado. A las F_1 que provienen del cruzamiento inicial con M_1 se les manejó pues en forma separada de las que provienen del cruzamiento inicial con M_2 , obteniendo así dos poblaciones F_2 derivadas por cruza fraternas.

A principios de Mayo se revisaron los capítulos principales autopolinizados para verificar la formación de semilla. Se observó que la semilla no estaba llena; bajo esta

circunstancia se decidió que en adelante se autopolinizarían también algunos capítulos laterales, tratando que en cada planta F_1 la mitad del total de los capítulos producidos fueran polinizados con mezcla de polen y la otra mitad fueran autopolinizados.

Durante el mes de Junio y principios de Julio de 2000 se continuó con la polinización en las plantas F_1 . En estas plantas se cosechó la semilla F_2 el 20 de Julio.

Se cosechó individualmente la semilla de las plantas F_1 ; además los capítulos polinizados con mezcla de polen se separaron de los que fueron autopolinizados.

Formación de las líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correccaminos $F_{2,3}$)

Para sembrar las poblaciones F_2 se decidió utilizar la semilla cosechada en las plantas F_1 obtenidas del cruzamiento HA 89 x M_2 , ya que fue más abundante. Así pues, se sembraron dos tipos de población F_2 (la población de mapeo es una población F_2): una derivada de cruzamientos fraternos con mezcla de polen en las plantas F_1 (de cada una de las ocho plantas F_1 que produjeron más aquenios se tomaron 48 para formar un compuesto balanceado y sembrar la población F_2) y otra derivada por medio de autopolinización. Para sembrar esta última población se tomo la planta F_1 que tuvo la mayor cantidad de semilla (300 semillas) formada a partir de autopolinización. La siembra de las poblaciones F_2 se efectuó el 26 de Julio de 2000 en el vivero.

En la población F_2 derivada por medio de cruza fraternas el trasplante se realizó el 24 de Agosto de 2000, se establecieron 340 plantas; mientras que en la derivada por

autopolinización el trasplante se efectuó el 25 de Agosto de 2000, se establecieron 166 plantas. En ambas poblaciones se fertilizó el tres de Septiembre de 2000 con la fórmula 60-40-00.

En las poblaciones F_2 se cubrieron botones florales con bolsas de papel a partir del 22 de Septiembre de 2000 (se cubrieron el capítulo principal y dos secundarios en cada planta) y se comenzó a autopolinizar el 28 de Septiembre de 2000. En cada capítulo la autopolinización se repitió por tres ocasiones a intervalos de tres días; para esto se frotó suavemente sobre los estigmas utilizando un aplicador para cada planta. Antes de pasar a trabajar con otra planta, se desinfectaron las manos para evitar contaminar con polen no deseado. La autopolinización se hizo con el fin de obtener líneas derivadas de F_2 en F_3 .

Las líneas derivadas de F_2 en F_3 permitirán contar con material suficiente para el aislamiento de DNA y el análisis fenotípico. Asimismo, servirán de base para desarrollar líneas endogámicas recombinantes “RILs”.

La semilla de cada planta F_2 se cosechó en forma individual, esto a finales de Enero y durante el mes de Febrero. Las bolsas con los capítulos cosechados se colocaron en el asoleadero de la Sección Cereales de la UAAAN para su secado final.

El desgrane se realizó durante la segunda mitad de Febrero y durante el mes de Marzo. Para cada planta, antes de desgranar lo cosechado, se registró el diámetro del capítulo principal. Una vez terminado el desgrane se procedió a tomar datos de

rendimiento pesando la semilla. En cada planta se pesó por separado la semilla del capítulo principal. Posteriormente, de cada planta se mezcló toda su semilla en un sobre, para constituir así una línea derivada de F_2 en F_3 .

En vista de que en la población F_2 derivada por medio de cruza fraterna el número obtenido de líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correcaminos $F_{2:3}$) no es suficiente, se decidió sembrar 25 plantas F_1 el 14 de Mayo de 2001 para incrementar la población de mapeo genético (población Correcaminos $F_{2:3}$). En estas plantas F_1 se realizaron cruza fraterna con mezcla de polen, para obtener así semilla F_2 . Como continuación del presente trabajo, en otra tesis, de esta semilla se sembraría una población F_2 . Cada planta F_2 sería autofecundada para obtener líneas derivadas de F_2 en F_3 . Las líneas que se obtendrían se añadirían a las que ya se tienen para incrementar la población de mapeo genético (población Correcaminos $F_{2:3}$).

Evaluación fenotípica de las poblaciones F_2

Se realizó una evaluación fenotípica en las plantas F_2 tanto de la población derivada por medio de cruza fraterna, como también de la población derivada por autopolinización. En cada planta F_2 se tomaron datos de rendimiento del capítulo principal (RECP), rendimiento medio por capítulo lateral (RMCL). Se construyó un índice de rendimiento ($I_{rend} = \text{rendimiento del capítulo principal} + \text{rendimiento medio por capítulo lateral}$); también se tomaron datos de diámetro medio del capítulo principal (DMCP), altura de planta (ALT), días a floración (DAF), rugosidad de la hoja (RUG), pigmentación (PM) y ramificación (RM).

Se hizo una clasificación arbitraria de tipos o categorías en los caracteres rugosidad de la hoja, pigmentación y ramificación. Las categorías para RUG fueron lisa (tipo presente en el material cultivado), intermedia (tipo intermedio) y rugosa (tipo presente en el material silvestre). Para PM las categorías fueron 0 (tipo característico del material cultivado, sin antocianinas), 1 (tipo intermedio) y 2 (tipo característico del material silvestre, con antocianinas, principalmente en tallo y nervaduras). Las categorías para RM fueron 0 (tipo que presenta el material cultivado, sin ramificaciones), 1 (tipo intermedio) y 2 (tipo que presenta el material silvestre, con múltiples ramificaciones).

Incremento de $M_1 \otimes$ y de $M_2 \otimes$

El 13 de Marzo de 2000 se sembraron 20 plantas de la línea S_1 originada de la autofecundación de M_2 para incrementar la semilla y perpetuar su composición genética. En estas plantas el incremento se llevó a cabo por medio de cruza fraterna con mezcla de polen. El siete de Mayo de 2000 se efectuó esto mismo en la línea S_1 originada de la autofecundación de M_1 .

En las 20 plantas de la línea S_1 provenientes de la autofecundación de M_2 se cubrieron botones florales a partir del 21 de Mayo. El 27 de Mayo se inició la colecta de polen y los cruzamientos fraternos con mezcla de polen. Se continuó polinizando durante Junio y Julio, y se cosecharon el 9 de Septiembre.

En las plantas de la línea S_1 provenientes de la autofecundación de M_1 se cubrieron botones florales a partir del 10 de Julio. El 16 de Julio se inició la colecta de polen y los cruzamientos fraternos con mezcla de polen. Se continuó polinizando durante el resto de Julio, Agosto y Septiembre. Se cosecharon 13 plantas el 11 de Noviembre.

Análisis Meiótico

Como parte de la determinación de la compatibilidad del material silvestre con el cultivado se llevó a cabo un estudio meiótico. El material genético disponible para este análisis fueron el cultivado, el silvestre y el híbrido producidos en las etapas anteriormente descritas.

A principios de la primavera de 2000 se sembraron los materiales cultivado, silvestre e híbrido en vasos de poliestireno en vivero. El 13 de Marzo de 2000 se sembraron ocho plantas S_1 provenientes de la autofecundación de M_1 , ocho plantas S_1 provenientes de la autofecundación de M_2 y ocho plantas de la accesión ocho. Este material se sembró con anticipación porque tarda más en germinar que el cultivado y además porque si hubiese fallas se resembraría al momento de efectuar la siembra del material cultivado y del híbrido. El dos de Abril del 2000 se sembraron 20 plantas de HA 89; 20 de CMS HA 89; ocho de CMS HA 89 x M_1 y ocho de CMS HA 89 x M_2 . Posteriormente, todas estas plantas se trasplantaron a macetas-bolsas de plástico y se distribuyeron en el vivero bajo el esquema de un diseño completamente al azar con submuestreo. La repetición fue la planta y cada meiocito analizado fue una unidad de la

submuestra, de manera que el tamaño de la submuestra es el número de meiocitos analizados en esa planta.

La colecta de botones se inició el 18 de Mayo y se continuó durante los meses de Junio, Julio, Agosto y parte de Septiembre. Los botones florales tiernos fueron fijados, para el estudio citológico (llevado a cabo en el Laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales, Dpto. de Fitomejoramiento, UAAAN) de microsporocitos, en una solución consistente en tres cuartas partes de alcohol de 96° y una cuarta parte de ácido acético. Se hicieron incisiones con navaja para que penetrara el fijador y entonces los botones se colocaron en un frasco con la solución. En unas etiquetas colocadas en los frascos se identificó el material genético, después se almacenaron los frascos en refrigeración. El fijador arresta a las células en la fase meiótica en la cual se encuentran.

Las preparaciones cromosómicas se realizaron por el método del aplastado o “squash” utilizando meiocitos de anteras jóvenes y tinción de los cromosomas meióticos con acetocarmín. Se comenzó a hacer preparaciones cromosómicas a inicios del otoño de 2000 y se terminaron a principios de Abril de 2001.

El análisis de meiocitos se realizó en diacinesis y metafase I, basándose en las frecuencias de las configuraciones meióticas. Esto es, se registró el número de cadenas y anillos formados por los cromosomas en cada meiocito, para así determinar las frecuencias de las diferentes configuraciones y los patrones de quiasmas (Jackson, 1988; Reyes-Valdés y Stelly, 1995; Reyes-Valdés *et al.*, 1996). Se utilizó como índice de apareamiento cromosómico (incidencia de quiasmas) a la frecuencia de brazos

cromosómicos con quiasma (Jackson, 1988), definido como: $I = [2(oII) + cII] / 34$, donde oII es el número de anillos bivalentes y cII es el número de cadenas bivalentes.

Viabilidad de Polen

En las plantas del experimento para el análisis de apareamiento cromosómico meiótico se evaluó la viabilidad de polen. Se agregaron 10 plantas de la línea pública cultivada HA 89 a este experimento, para así poder tener muestras de polen del taxón cultivado. Puesto que de estas plantas (de la línea HA 89) dos enfermaron y produjeron capítulos dañados, tres enfermaron y murieron antes de producir capítulos y dos fueron quebradas por el viento antes de producir polen, sólo se logró tener muestras de polen en tres plantas. La repetición fue la planta y cada determinación de viabilidad de polen fue una unidad de la submuestra, de manera que el tamaño de la submuestra es el número de determinaciones en esa planta.

Para la colecta de polen los botones florales se cubrieron con bolsas de papel y clips cuando empezaban a abrirse, identificando el material genético con marcador sobre la bolsa. Cada capítulo que se cubrió fue revisado a diario y cuando presentaba dos hileras de florecillas derramando polen se procedió a realizar la colecta del mismo; ésta consistió en sacudir suavemente el capítulo por arriba de una caja de petri identificada con los mismos datos que estaban sobre la bolsa. El polen fue evaluado mediante la técnica de tinción con el colorante citoplásmico Buffalo Black NBR (Jackson, 1988) en el Laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales.

De cada capítulo se hicieron dos determinaciones. Para obtener cada determinación se colocó una gota de Buffalo Black (0.01 por ciento indicador y ácido acético al 45 por ciento) en un portaobjetos; luego con unas pinzas se aplicó una pizca de polen sobre la gota de colorante, después se colocó encima un cubreobjetos y se dejó en reposo por 20 segundos. El portaobjetos fue llevado al microscopio para realizar conteos en diferentes campos visuales hasta completar 100 granos de polen, para obtener el porcentaje de polen viable, bajo el criterio de considerar como abortivos a los granos no teñidos.

Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete SAS (1999) para efectuar el ANOVA bajo el modelo del diseño completamente al azar con submuestreo; la prueba de Tukey de comparación de medias y el análisis de correlación entre las variables índice de apareamiento cromosómico y viabilidad de polen.

Análisis de varianza

Para el análisis de varianza se utilizó el modelo lineal aditivo del diseño completamente al azar con submuestreo (Modelo I. Efectos fijos), dicho modelo es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_{ij} + \rho_{ijk} + \eta_{ijkl}$$

donde:

$i = 1, 2, \dots, t$ (taxa)

$j = 1, 2, \dots, b_i$ (poblaciones del i -ésimo taxón)

$k = 1, 2, \dots, p_{ij}$ (plantas de la j -ésima población del i -ésimo taxón)

$l = 1, 2, \dots, m_{ijk}$ (meiocitos o determinaciones de la k -ésima planta de la j -ésima población del i -ésimo taxón)

$$\rho_{ijk} = \varepsilon_{ijk} \sim nI(0, \sigma^2_\varepsilon)$$

$$\eta_{ijkl} \sim nI(0, \sigma^2_\eta)$$

Y_{ijkl} = Observación en la l -ésima unidad de la submuestra (observación en el l -ésimo meiocito, en el caso de la variable índice de apareamiento cromosómico; observación en la l -ésima determinación, en el caso de la variable viabilidad de polen) dentro de la k -ésima planta de la j -ésima población del i -ésimo taxón.

μ = Media general del carácter o variable en estudio.

τ_i = Efecto del i -ésimo taxón.

β_{ij} = Efecto de la j -ésima población dentro del i -ésimo taxón.

$\rho_{ijk} = \varepsilon_{ijk}$ = Error experimental = Efecto de la k -ésima planta dentro de la j -ésima población del i -ésimo taxón.

η_{ijkl} = Error de muestreo.

Se estimó el coeficiente de variación mediante la fórmula siguiente:

$$CV = \frac{\sqrt{CMEE}}{\bar{Y}...} \times 100$$

donde:

CV = Coeficiente de variación, expresado en porcentaje.

$CMEE$ = Cuadrado medio del error experimental.

$\bar{Y}...$ = Media general del experimento.

Para la variable índice de apareamiento cromosómico también se llevo a cabo un ANOVA bajo el modelo del diseño completamente al azar con sólo la línea HA 89, esto para investigar sobre la posible variación de origen ambiental.

Prueba de comparación de medias

Cuando en los resultados del análisis de varianza se encontraron diferencias significativas, se procedió a realizar la prueba de Tukey de comparación de medias. En el presente trabajo, el comparador de la prueba de Tukey para la diferencia entre las medias de los taxa i e i' es el siguiente:

$$T_{\alpha} = \sqrt{\frac{CMEE}{2} \left(\frac{1}{m_{i..}} + \frac{1}{m_{i'..}} \right)} (q_{\alpha, t, g.l.e})$$

donde:

T_{α} = Comparador de la prueba de Tukey para la diferencia entre las medias de los taxa i e i' a un nivel de significancia α .

$CMEE$ = Cuadrado medio del error experimental.

$q_{\alpha, t, g.l.e}$ = Valor q obtenido de la tabla A.8 del libro de Steel y Torrie (1989), para un nivel de significancia α , t taxa y los grados de libertad del error experimental.

$m_{i..}$ = Número total de unidades de las submuestras (número total de meiocitos o de determinaciones, según sea el caso) para el i -ésimo taxón.

$m_{i'..}$ = Número total de unidades de las submuestras (número total de meiocitos o de determinaciones, según sea el caso) para el i' -ésimo taxón.

Prueba generalizada de razón de verosimilitud

Para reforzar o confirmar los resultados tanto del análisis de varianza como de la prueba de comparación de medias de la variable índice de apareamiento cromosómico, se llevó a cabo la prueba de Neyman-Pearson de la Razón Generalizada de Verosimilitud (GLRT). Esta es una prueba de bondad de ajuste de un conjunto de datos

observados a una hipótesis nula, que se basa en la razón de verosimilitud. Se lleva a cabo una prueba de GLR (Razón Generalizada de Verosimilitud) para probar si los datos observados son consistentes con un parámetro o vector de parámetros especificado por la hipótesis nula (Larsen y Marx, 1986; Lynch y Walsh, 1998; Edwards, 1992). En nuestro caso, para efectuar las GLRTs (Pruebas Generalizadas de Razón de Verosimilitud) los parámetros deben ser proporciones o frecuencias relativas.

La función de verosimilitud de un conjunto de k muestras aleatorias independientes (m_s, a_s, i_s) es representada como:

$$L(\Theta) = \prod_{i=1}^k L(\theta_i)$$

donde:

$L(\Theta)$ = Función de verosimilitud de un conjunto de k m_s, a_s, i_s .

(bajo el modelo completo).

$L(\theta_i)$ = Función de verosimilitud de la i -ésima muestra aleatoria (m, a).

La función de verosimilitud de un conjunto de k m_s, a_s, i_s bajo $H_0: \theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_k$, es representada como:

$$L(\Theta') = \prod_{i=1}^k [L(\theta)]_i$$

donde:

$L(\Theta')$ = Función de verosimilitud de un conjunto de k m_s, a_s, i_s .

bajo H_0 (modelo reducido).

$[L(\theta)]_i$ = Función de verosimilitud de la i -ésima m.a. bajo H_0 .

La razón de las dos funciones de verosimilitud donde sus parámetros han sido reemplazados por sus estimadores de máxima verosimilitud, es la GLR, la cual también es denotada como λ y es definida como:

$$GLR = \lambda = \frac{L(\hat{\Theta})}{L(\hat{\Theta})} = \frac{\prod_{i=1}^k [L(\hat{\theta})]_i}{\prod_{i=1}^k L(\hat{\theta}_i)}$$

La GLR es el instrumento para probar $H_0: \theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_k$ contra H_a : al menos una θ es diferente de las demás.

Para un conjunto de k m.s. a.s. i_s ., la GLR es la razón entre el máximo de la función de verosimilitud bajo H_0 y el máximo de la función de verosimilitud. El numerador es pues, la función de verosimilitud de ese conjunto de k muestras aleatorias independientes cuando sus parámetros han sido reemplazados por sus estimadores de máxima verosimilitud (MLEs) bajo H_0 ; en nuestro caso, es decir bajo nuestra H_0 particular, en realidad sólo tenemos un MLE conjunto para todas las k muestras, éste es la proporción conjunta muestral original; de manera que el i -ésimo factor en el numerador es la función de verosimilitud de la i -ésima muestra aleatoria cuando su parámetro ha sido reemplazado por su MLE bajo H_0 ; este MLE es el MLE conjunto (proporción conjunta muestral original). A su vez, el denominador es la función de

verosimilitud de ese mismo conjunto de k muestras aleatorias independientes cuando sus parámetros han sido reemplazados por los MLEs sin la restricción impuesta por H_0 ; estos MLEs sin restricción son las proporciones muestrales originales.

Puesto que los estimadores de máxima verosimilitud son funciones de los valores observados de las variables aleatorias (v. a.s.) X_1, X_2, \dots, X_n , la razón λ es una función sólo de los valores observados de X_1, X_2, \dots, X_n y es, por lo tanto, un valor observado o valor particular de una variable aleatoria (v. a.) Λ ; entonces λ es un estadístico.

En cualquier situación particular puede ser difícil determinar la distribución de la v. a. Λ , por lo que es necesario encontrar una aproximación a la prueba GLR usual. Cuando el tamaño de muestra es grande, la v. a. $G = -2\ln\Lambda$ tiene aproximadamente la distribución $\chi^2_{(k-1) \text{ g.l.}}$ bajo la hipótesis nula. El estadístico de prueba de la razón generalizada de verosimilitud es $G = -2\ln\lambda$. Así, una prueba aproximada de la GLR al nivel de significancia α para H_0 contra H_a es obtenida por rechazar H_0 cuando el estadístico de prueba G es mayor o igual a $\chi^2_{\alpha, (k-1) \text{ g.l.}}$.

Para llevar a cabo las GLRTs se determinó el estimador de máxima verosimilitud (MLE) de la frecuencia de cadenas relativa al total de configuraciones cromosómicas en cada uno de los taxa como su proporción muestral, además también se estimó el error estándar de dichas frecuencias haciendo uso de las propiedades de una proporción, las cuales se derivan de las propiedades de la distribución binomial.

También se determinó el MLE de la frecuencia relativa conjunta de cadenas como la proporción conjunta muestral. Se efectuaron las GLRTs para probar diferencias entre los taxa en cuanto a sus frecuencias relativas de cadenas.

Correlación entre Incidencia de Quiasmas y Viabilidad de Polen

Para determinar si la incidencia de quiasmas y la viabilidad de polen están relacionados, se llevó a cabo un análisis de correlación entre las variables índice de apareamiento cromosómico y viabilidad de polen. Para este análisis se tomaron en cuenta todas aquellas plantas en las cuales se logró tener datos de índice de apareamiento cromosómico y de viabilidad de polen en la misma planta. Dada la incidencia de capítulos múltiples, en este análisis sólo entraron plantas de los taxa silvestre e híbrido, de las que hubo 21 y 12 plantas, respectivamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población de Mapeo Genético

Cruzamientos inter-subespecíficos

En el otoño de 1999 se cosechó la semilla F_1 de los cruzamientos y también la S_1 de la autofecundación de los machos. Se tuvo éxito en la obtención de semilla tanto de los cruzamientos, como de las autofecundaciones. Del cruzamiento de CMS HA 89 con silvestre se obtuvo prácticamente el total de la semilla F_1 posible en cada capítulo (para CMS HA 89 x M_1 y CMS HA 89 x M_2 se obtuvieron en total aproximadamente 1215 y 1260 aquenios, respectivamente). Mientras que del cruzamiento de HA 89 con silvestre se obtuvo aproximadamente el 80 por ciento de la semilla posible en cada capítulo (para HA 89 x M_1 y HA 89 x M_2 se obtuvieron en total aproximadamente 1004 y 837 aquenios, respectivamente), debido a que en los capítulos emasculados algunos estigmas se deshidrataron antes de la polinización o sufrieron daño mecánico durante la emasculación. De las autofecundaciones de los machos se obtuvo aproximadamente el 10 por ciento de la semilla posible en cada capítulo (para $M_1 \otimes$ y $M_2 \otimes$ se obtuvieron en total aproximadamente 500 aquenios en cada una de esas dos autofecundaciones), debido a la autoincompatibilidad en el girasol y además se presentaron problemas por

lluvias; la humedad daño a cierto porcentaje de semilla en formación, la cual no alcanzó a llenar, ni a completar su desarrollo.

El día 12 de Noviembre de 1999 se estableció una prueba de germinación de los materiales cosechados (Cuadro 4.1). La semilla F_1 de cada uno de los diferentes cruzamientos presentó una germinación de 100 por ciento; la semilla S_1 proveniente de la autofecundación de M_1 tuvo cero por ciento de germinación y en la proveniente de la autofecundación de M_2 se registro 25 por ciento.

Cuadro 4.1. Porcentaje de germinación de los materiales cosechados en el otoño de 1999.

Material	Germinación %
$M_1 \otimes$	0
$M_2 \otimes$	25
HA 89 x M_1	100
HA 89 x M_2	100

Formación de las poblaciones F_2

De la siembra (con el fin de formar las poblaciones F_2) efectuada a finales del otoño de 1999, tenemos que a la cosecha se contó con 15 plantas F_1 del cruzamiento de HA 89 con M_1 . De la polinización con mezcla de polen, una planta tuvo una producción

de 29 aquenios, el resto tuvo una producción, cada una, de 100 a 600 aquenios. De la planta F_1 más productiva se obtuvieron sólo 37 aquenios de autopolinización.

Del cruzamiento de HA 89 con M_2 se contó con 9 plantas F_1 al momento de la cosecha. De la polinización con mezcla de polen, una planta tuvo una producción de 23 aquenios, el resto tuvo una producción, cada una, de 48 a 150 aquenios. De la planta F_1 más productiva se obtuvieron 300 aquenios de autopolinización.

Formación de las líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correcaminos $F_{2,3}$)

De las poblaciones F_2 (sembradas el 26 de Julio de 2000) derivadas del cruzamiento HA 89 x M_2 se obtuvieron los siguientes resultados en formación de líneas derivadas de F_2 en F_3 :

- a) De la población F_2 derivada por medio de cruza fraterna, se tuvo un total de 145 sobres, que son 145 líneas derivadas de F_2 en F_3 . Sin embargo, de estas líneas sólo 117 (población Correcaminos $F_{2,3}$) tuvieron al menos 50 aquenios.
- b) De la población F_2 derivada por medio de autopolinización, se tuvo un total de 124 líneas, pero sólo 74 tuvieron al menos 50 aquenios.

De la siembra (efectuado el 14 de Mayo de 2001) adicional de plantas F_1 para realizar cruza fraterna con mezcla de polen, se pudo cosechar material de 22 plantas. Se obtuvo una buena cantidad de semilla F_2 en cada una de estas plantas F_1 (en total de las 22 plantas se obtuvieron aproximadamente 13200 aquenios). Como continuación del

presente trabajo, en otra tesis, se tiene que de esta semilla se sembró una población F_2 y cada planta se autofecundó para obtener líneas derivadas de F_2 en F_3 . Las líneas que se obtuvieron se añadieron a las que ya se tenían para incrementar la población de mapeo genético (población Correcaminos $F_{2:3}$).

Evaluación fenotípica de las poblaciones F_2

En los Cuadros 4.2 y 4.3 se presentan las estadísticas básicas de las poblaciones F_2 formadas a través de cruzas fraternas y autopolinización, respectivamente. Ya que estos caracteres son cuantitativos y se tomaron en poblaciones sembradas con fines de autopolinización y no de evaluación, debe considerarse el hecho de que influyeron fuertemente factores ambientales no controlados. Sin embargo, estos cuadros nos dan una idea de la amplia variación observada en estas poblaciones segregantes y de la gran diferencia que se tiene en la media de rendimiento por capítulo principal (RECP) y el diámetro medio de capítulo principal (DMCP) en comparación con lo que se observa comúnmente en los girasoles cultivados.

Las medias observadas para la F_2 derivada por medio de autopolinización son menores que para la F_2 derivada por medio de cruzas fraternas. Teóricamente se espera que la F_2 derivada de cruzas fraternas sea más vigorosa debido a un menor coeficiente de endogamia, y también más variable. Aunque esto fue lo que se observó, no se descarta que sea consecuencia de diferencias microambientales entre los lotes experimentales.

Cuadro 4.2. Análisis descriptivo para los caracteres cuantitativos en la población F₂ derivada por medio de cruza fraternas.

MEDIDAS DESCRIPTIVAS	RECP gr	RMCL gr	I _{rend} gr	DMCP cm	ALT m	DAF días
Media	6.72	2.28	8.75	7.97	1.42	82.69
Máximo	29.00	5.00	25.33	18.90	2.53	117.00
Mínimo	1.00	0.67	2.00	3.75	0.60	61.00
Rango	28.00	4.33	23.33	15.15	1.93	56.00
s	6.01	1.10	6.14	2.63	0.39	10.94
C.V.(%)	89.44	48.25	70.26	33.01	27.29	13.23
n	67	44	36	135	144	144

RECP = Rendimiento de capítulo principal RMCL = Rendimiento medio por capítulo lateral I _{rend} = Índice de rendimiento = RECP + RMCL DMCP = Diámetro medio de capítulo principal ALT = Altura de planta DAF = Días a floración

En los Cuadros 4.4 y 4.5 se muestran los porcentajes observados para las diferentes categorías de los caracteres RUG, PM y RM en las poblaciones F₂ derivadas por medio de cruza fraternas y autopolinización, respectivamente. En general, en ambas poblaciones las categorías intermedias presentaron las frecuencias relativas más grandes para los tres caracteres. Cada uno de estos caracteres en realidad mostró una distribución amplia, pues hay toda una gama continua de tipos o categorías, desde el tipo que presenta el material cultivado, hasta el tipo que presenta el material silvestre. En lo que

respecta a la ramificación (RM), para motivos prácticos se podría considerar un carácter dominante, sin embargo puede haber dos o más loci involucrados.

Cuadro 4.3. Análisis descriptivo para los caracteres cuantitativos en la población F₂ derivada por medio de autopolinización.

MEDIDAS DESCRIPTIVAS	RECP gr	RMCL gr	I _{rend} gr	DMCP cm	ALT m	DAF días
Media	3.03	1.58	5.00	5.84	1.08	74.99
Máximo	10.00	4.00	15.00	10.50	1.55	117.00
Mínimo	1.00	0.25	1.25	3.00	0.58	61.00
Rango	9.00	3.75	13.75	7.50	0.97	56.00
s	2.08	1.02	3.03	1.44	0.20	7.12
C.V.(%)	68.63	64.56	60.62	24.63	18.50	9.49
n	61	33	32	124	124	124

RECP = Rendimiento de capítulo principal RMCL = Rendimiento medio por capítulo lateral I _{rend} = Índice de rendimiento = RECP + RMCL DMCP = Diámetro medio de capítulo principal ALT = Altura de planta DAF = Días a floración

En general, los caracteres rendimiento del capítulo principal, rendimiento medio por capítulo lateral, índice de rendimiento, diámetro medio del capítulo principal, altura de planta, días a floración, rugosidad de la hoja, pigmentación y ramificación

presentaron una gran variación en ambas poblaciones, lo cual pone en evidencia una gran variación genética para cada uno de ellos.

Cuadro 4.4. Porcentajes observados para las diferentes categorías de los caracteres rugosidad de la hoja (RUG), pigmentación (PM) y ramificación (RM) en la población F₂ derivada por medio de cruza fraternal.

RUG	%	PM	%	RM	%
lisa	31.72	0	35.17	0	15.28
intermedia	48.28	1	44.83	1	77.78
rugosa	20.00	2	20.00	2	6.94
n	145	n	145	n	144

RUG = Rugosidad de la hoja PM = Pigmentación RM = Ramificación
--

Cuadro 4.5. Porcentajes observados para las diferentes categorías de los caracteres rugosidad de la hoja (RUG), pigmentación (PM) y ramificación (RM) en la población F₂ derivada por medio de autopolinización.

RUG	%	PM	%	RM	%
lisa	52.42	0	30.64	0	21.77
intermedia	41.13	1	45.97	1	57.26
rugosa	6.45	2	23.39	2	20.97
n	124	n	124	n	124

RUG = Rugosidad de la hoja PM = Pigmentación RM = Ramificación
--

Incremento de $M_1 \otimes$ y de $M_2 \otimes$

Del incremento de $M_1 \otimes$, el cual se cosechó el 11 de Noviembre, se obtuvo poca semilla (117 aquenios), mientras que del incremento de $M_2 \otimes$, el cual se cosechó el 9 de Septiembre, se obtuvo una gran cantidad de semilla (aproximadamente 21968 aquenios).

Análisis Meiótico

Los patrones de apareamiento cromosómico meiótico del padre cultivado, el silvestre y el híbrido F_1 fueron normales, con ausencia de univalentes y multivalentes, y sólo fueron observados cadenas y anillos bivalentes (Figura 4.1). Esto, en el híbrido indica que los genomas parentales son altamente homólogos o compatibles en la meiosis.

En el Cuadro 4.6 se presentan las medias de índice de apareamiento cromosómico y de frecuencia relativa de cadenas del material genético utilizado para análisis meiótico. Tanto para el índice de apareamiento cromosómico, como para la frecuencia relativa de cadenas se observó, en general, que el material híbrido presentó un comportamiento consistentemente intermedio entre el de los materiales cultivado y silvestre.

Cuadro 4.6. Resultados del análisis meiótico llevado a cabo en poblaciones cultivadas, silvestres e híbridas de girasol.

Taxón	Población	Plantas	Meiocitos analizados	\bar{I}	Frecuencia relativa de cadenas
Cultivado	HA 89	15	224	0.87356	0.25289
Silvestre	Ac-8	7	101	0.77402	0.45195
Silvestre	M ₁ ⊗	8	118	0.74875	0.50249
Silvestre	M ₂ ⊗	8	120	0.73971	0.52059
Híbrido	CMS HA 89 x M ₁	8	119	0.81241	0.37519
Híbrido	CMS HA 89 x M ₂	7	104	0.83682	0.32636

\bar{I} = Índice promedio de apareamiento meiótico.

CMS denota androesterilidad citoplásmica.

Los cuadrados medios del análisis de varianza del índice de apareamiento cromosómico se presentan en el Cuadro 4.7. Se detectaron diferencias altamente significativas entre los taxa. También hubo diferencias altamente significativas entre plantas dentro de poblaciones, lo cual parece deberse a variación genética y ambiental existente entre las plantas en las poblaciones silvestres e híbridas. Para investigar sobre la posible variación de origen ambiental de la variable índice de apareamiento cromosómico se llevó a cabo un ANOVA con solamente la línea HA 89 (Cuadro 4.8). Se observaron diferencias altamente significativas entre plantas (de la línea HA 89), lo que muestra que el índice de apareamiento cromosómico presenta variación de origen ambiental. Todo lo anterior indica la existencia de polimorfismo genético involucrado en

la variación en frecuencia de quiasmas, y que el carácter número de quiasmas está bajo control multigénico y afectado por el ambiente. Esto refuerza lo que Jackson (1988) señala como una sospecha, que el número de quiasmas probablemente está bajo control multigénico. Lo aquí observado concuerda con lo encontrado por Morgan *et al.* (1986), quienes al analizar el apareamiento cromosómico en una población F_2 de *Festuca donax* x *Festuca drymeja*, encontraron que la diferencia entre *F. drymeja* y *F. donax* en promedio de quiasmas (*F. drymeja* 8.85 y *F. donax* 11.47) es genética y que el control de este carácter es poligénico.

Cuadro 4.7. Cuadrados medios del análisis de varianza del índice de apareamiento cromosómico.

F.V.	g.l.	C.M.
Taxa	2	0.99847671**
Pob / Taxa	3	0.03448568
Pta / Pob Taxa	47	0.02458430**
Error de muestreo	733	0.00336513

** = $P \leq 0.01$; C.V.(%) = 19.42

Cuadro 4.8. Cuadrados medios del análisis de varianza del índice de apareamiento cromosómico en la línea HA 89.

F.V.	g.l.	C.M.
Plantas	14	0.01132295**
Error experimental	209	0.00260032

** = $P \leq 0.01$; C.V.(%) = 5.84

Con la prueba de Tukey de comparación de medias se encontró que, para el índice de apareamiento cromosómico, las diferencias entre las medias de todos los taxa resultaron altamente significativas (Cuadro 9). La media del taxón híbrido (0.82) fue intermedia entre las de los taxa parentales (0.87 y 0.75 para los taxa cultivado y silvestre, respectivamente); de hecho fue muy próxima al valor medio parental (0.80).

Cuadro 4.9. Prueba de comparación de medias del índice de apareamiento cromosómico.

Taxón	Media	Agrupamiento Tukey
Cultivado (HA 89)	0.87356	a
Híbrido	0.82379	b
Silvestre (Ac-8)	0.75308	c

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.01).

A partir de los registros del número de cadenas y anillos se determinó el MLE de la frecuencia relativa de cadenas para cada taxón como su proporción muestral, además también se estimó el error estándar de dichas frecuencias (Cuadro 4.10).

Cuadro 4.10. Estimación de la frecuencia relativa de cadenas para cada taxón.

Taxón	Frecuencia	Error estándar
Cultivado (HA 89)	$\hat{\theta}_1 = 0.25289$	0.00704
Híbrido	$\hat{\theta}_3 = 0.35241$	0.00776
Silvestre (Ac-8)	$\hat{\theta}_2 = 0.49384$	0.00659

En el Cuadro 4.11 se presentan las pruebas de Razón Generalizada de Verosimilitud sobre las frecuencias relativas de cadenas de los taxa. Se observaron diferencias altamente significativas entre los taxa y además para todos los pares de taxa las diferencias en frecuencias relativas de cadenas también fueron altamente significativas. Con lo anterior se confirman en una manera contundente los resultados del análisis de varianza y de la comparación de medias entre los taxa para el índice de apareamiento cromosómico.

Cuadro 4.11. Pruebas de Razón Generalizada de Verosimilitud (GLRTs) sobre las frecuencias relativas de cadenas.

H_0	G
$\theta_1 = \theta_3 = \theta_2$	595.781264**
$\theta_1 = \theta_3$	89.471550**
$\theta_1 = \theta_2$	571.808790**
$\theta_3 = \theta_2$	187.538516**

** = $P \leq 0.01$

θ_1 , θ_2 y θ_3 son las frecuencias relativas de cadenas de los materiales cultivado, silvestre e híbrido, respectivamente.

Es claro, a partir de los resultados del análisis del índice de apareamiento cromosómico y de la frecuencia relativa de configuraciones cromosómicas en cadena, que el híbrido presentó una incidencia de quiasmas consistentemente intermedia (Cuadro 4.6) entre las de los taxa parentales (próxima al valor medio parental) y además que la

diferencia en incidencia de quiasmas del híbrido con cada uno de los taxa parentales fue altamente significativa.

El número promedio de cadenas bivalentes para la línea HA 89, el híbrido y la población silvestre fueron 4.30, 5.99 y 8.40, respectivamente (la media parental fue 6.77). Esto difiere de lo encontrado por Reyes-Valdés *et al.* (2000); ellos reportaron valores de 3.36, 7.05 y 6.43 para los taxa cultivado, híbrido y silvestre. Sin embargo, cabe hacer notar tres situaciones en el trabajo de Reyes-Valdés *et al.* (2000) que lo hacen diferente de este estudio. La primera es que la línea cultivada que se usó fue la AN-3; la segunda es que el experimento se hizo en el campo y con poco control de variables ambientales y la tercera, que el tamaño de muestra que se usó fue pequeño. A pesar de lo anterior, cabe hacer notar que en ambos trabajos se observó una gran diferencia en el apareamiento meiótico entre plantas cultivadas y silvestres, ya que en estas últimas la incidencia de cadenas bivalentes fue de casi el doble que en las plantas cultivadas. En el trabajo de Morgan *et al.* (1986) la diferencia en el apareamiento meiótico entre *F. donax* y *F. drymeja* es más fácilmente notable al observar que *F. drymeja* tuvo una incidencia de cadenas bivalentes (5.15) de casi el doble que el de *F. donax* (2.53).

Haciendo uso de las relaciones lineales, tenemos que las frecuencias medias de quiasma (las medias del número de brazos cromosómicos con quiasma) para los taxa cultivado, híbrido y silvestre fueron 29.70, 28.10 y 25.60, respectivamente (la media parental del número de brazos cromosómicos con quiasma fue 27.23). La frecuencia media de quiasma en el híbrido tomó un valor intermedio entre las de los taxa parentales. Esta situación es semejante a lo reportado por Morgan *et al.* (1986) en el

estudio de una cruce entre *Festuca donax* x *Festuca drymeja* (la frecuencia media de quiasma fue 8.85 para *F. drymeja*, 9.65 para el híbrido y 11.47 para *F. donax*), así como también a lo reportado por Jackson (1988) en el análisis de una cruce entre *Helianthus laciniatus* x *Helianthus annuus* silvestre; aunque en el trabajo de Jackson se observaron multivalentes y algunas otras irregularidades cromosómicas meióticas. En el estudio de Jackson la frecuencia media de quiasma fue 20.58 para *H. laciniatus* y 24.76 para *H. annuus* silvestre. Haciendo ciertas suposiciones Jackson transformó los multivalentes a bivalentes equivalentes y a partir de estos determinó la frecuencia media de quiasma en el híbrido F₁ (23.95). Es de notarse cierta similitud en la frecuencia media de quiasma de *H. annuus* silvestre (24.76) en el análisis de Jackson con la que presenta *H. annuus* silvestre (25.60) en el presente trabajo. Para ver esta similitud en términos de número promedio de cadenas bivalentes para *H. annuus* silvestre tenemos en el análisis de Jackson un valor de 9.24 y en el presente estudio tenemos 8.40.

Viabilidad de Polen

En el Cuadro 4.12 se presentan las medias de viabilidad de polen del material genético utilizado. Los taxa silvestre y cultivado tuvieron medias muy similar (95.55 y 95.33 por ciento, respectivamente). Por otra parte, el taxón híbrido presentó una media (92.58 por ciento) menor que aquéllas de los taxa parentales silvestre y cultivado, aunque esto no es consistente, puesto que mientras una población híbrida presentó una media (96.21 por ciento) muy similar a aquéllas de los materiales silvestre y cultivado, la otra población híbrida mostró una media (89.23 por ciento) menor que las de tales materiales.

Cuadro 4.12. Resultados del análisis de viabilidad de polen efectuado en poblaciones cultivadas, silvestres e híbridas de girasol.

Taxón	Población	Plantas	Determinaciones	Viabilidad de polen (%)
Cultivado	HA 89	3	6	95.33
Silvestre	Ac-8	7	28	95.71
Silvestre	M ₁ ⊗	7	28	94.18
Silvestre	M ₂ ⊗	8	32	96.66
Híbrido	CMS HA 89 x M ₁	6	24	96.21
Híbrido	CMS HA 89 x M ₂	7	26	89.23

En el Cuadro 4.13 se muestran los cuadrados medios del análisis de varianza de viabilidad de polen. Se puede observar que hubo diferencias altamente significativas entre los taxa. También hubo diferencias altamente significativas entre poblaciones dentro de taxa y entre plantas dentro de poblaciones.

Cuadro 4.13. Cuadrados medios del análisis de varianza de viabilidad de polen.

F.V.	g.l.	C.M.
Taxa	2	134.403**
Pob / Taxa	3	236.928**
Pta / Pob Taxa	32	20.569**
Error de muestreo	106	3.479

** = $P \leq 0.01$; C.V.(%) = 4.80

Las diferencias entre plantas dentro de poblaciones pueden deberse a variación genética y ambiental existente entre las plantas en las poblaciones silvestres e híbridas.

Las diferencias entre los taxa y entre poblaciones dentro de taxa se debieron sólo al comportamiento de la población híbrida CMS HA 89 x M₂. En el taxón híbrido hubo una diferencia muy marcada en la viabilidad de polen de las dos poblaciones (Cuadro 4.12). La población CMS HA 89 x M₁ presentó una viabilidad de polen (96.21 por ciento) muy similar a aquéllas de las poblaciones silvestres y cultivada; por otra parte, la población CMS HA 89 x M₂ presentó una viabilidad de polen (89.23 por ciento) por debajo de todas las demás poblaciones del experimento.

Estas condiciones en las poblaciones híbridas parecen deberse a variación genética que existe entre las poblaciones dentro del taxón híbrido (Atlagic *et al.*, 1993). Aunque más bien, la menor viabilidad de polen de la población CMS HA 89 x M₂ puede ser debida a interacciones genéticas, como cierto grado de incompatibilidad genética entre las plantas de la línea CMS HA 89 y la planta silvestre M₂.

Se puede establecer que el taxón híbrido presentó un porcentaje de viabilidad de polen (92.58) comparable a aquéllos de los taxa parentales silvestre y cultivado (95.57 y 95.33, respectivamente). Además, la viabilidad de polen en las poblaciones híbridas (96.21 y 89.23 por ciento) fue alta y no constituye una barrera a la reproducción sexual.

Correlación entre Incidencia de Quiasmas y Viabilidad de Polen

También se llevó a cabo un análisis de correlación entre la incidencia de quiasmas (representada por el índice de apareamiento cromosómico) y la viabilidad de polen. El coeficiente de correlación fue de -0.29 (no significativo). Esto indica que la variación en frecuencia de quiasma en las poblaciones estudiadas no afectó la viabilidad de polen.

V. CONCLUSIONES

Las poblaciones F_2 producto del cruzamiento inter-subespecífico presentan una gran variación y son fértiles. Por lo tanto, son factibles de ser usadas en un programa de mapeo genético de *H. annuus*.

A partir del cruzamiento de la línea pública cultivada de girasol HA 89 con la planta macho silvestre M_2 de *H. annuus* ssp. *texanus* se formó una población de mapeo genético constituida por líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correcaminos $F_{2:3}$).

La línea cultivada de girasol HA 89 y la población silvestre de *H. annuus* ssp. *texanus*, utilizadas en este trabajo, son diferentes en índice de apareamiento cromosómico meiótico y el híbrido presenta un comportamiento consistentemente intermedio para este índice. Además, dicho índice es variable dentro de poblaciones, incluida la línea HA 89. Esto indica la existencia de polimorfismo genético involucrado en la variación en frecuencia de quiasmas, y que el carácter número de quiasmas está bajo control multigénico y afectado por el ambiente. Así pues, una población formada con los progenitores podría ser utilizada para analizar los QTLs para apareamiento cromosómico meiótico.

El presente trabajo indica la posibilidad de que el proceso de domesticación de *Helianthus annuus*, haya traído consigo un incremento en el promedio de quiasmas.

Como el apareamiento cromosómico meiótico fue normal, con ausencia de univalentes y multivalentes, y sólo fueron observados cadenas y anillos bivalentes, entonces los genomas parentales son altamente compatibles en la meiosis. Ya que además la viabilidad de polen del híbrido fue alta y la F₁ fue fértil, entonces no hay barrera para la reproducción sexual. Esto indica que no hay dificultad en el flujo genético y que se pueden transferir caracteres deseables de *H. annuus* silvestre al girasol cultivado.

VI. RESUMEN

En el presente trabajo se efectuaron cruzamientos inter-subespecíficos en girasol (*Helianthus annuus* L.), con los siguientes objetivos: (i) formar una población de mapeo genético; y (ii) comparar los patrones de apareamiento cromosómico meiótico de los padres y del híbrido F₁. El progenitor femenino de la población fue la línea pública de girasol cultivado HA 89, mientras que el progenitor masculino fue un material de *Helianthus annuus* ssp. *texanus* colectado en Saltillo, Coah.

El trabajo de campo se llevó a cabo en el área experimental de la UAAAN, en Buenavista, Saltillo, Coahuila. Los cruzamientos inter-subespecíficos se efectuaron en el verano de 1999, con emasculación del progenitor cultivado. Para el análisis meiótico se estableció un experimento con los progenitores y el híbrido F₁ en la primavera de 2000, bajo el esquema de un diseño completamente al azar con submuestreo. Los patrones de apareamiento cromosómico meiótico de los padres y del híbrido fueron comparados por medio del análisis de meiocitos en diacinesis y metafase I, basándose en las frecuencias de las configuraciones meióticas. Se evaluó la viabilidad de polen por medio de un método de tinción basado en el colorante Buffalo Black.

Se tuvo éxito en la obtención de semilla de los cruzamientos inter-subespecíficos. Las poblaciones F₂ producto del cruzamiento inter-subespecífico

presentaron una gran variación genética. Se formó una población de mapeo genético constituida por líneas derivadas de F_2 en F_3 (población Correcaminos $F_{2,3}$).

Ya que el apareamiento cromosómico meiótico fue normal en los tres materiales, con ausencia de univalentes y multivalentes, y que sólo fueron observados cadenas y anillos bivalentes, se infiere que los genomas parentales son altamente compatibles en la meiosis. El híbrido presentó un índice de apareamiento cromosómico meiótico (0.82) próximo al valor medio parental (0.80) y las diferencias del híbrido con cada uno de los taxa parentales (taxón cultivado 0.87 y taxón silvestre 0.75) fueron altamente significativas. Además dicho índice fue variable dentro de poblaciones, incluyendo la línea HA 89. Esto indica la existencia de polimorfismo genético involucrado en la variación en frecuencia de quiasmas, y que el carácter número de quiasmas está bajo control multigénico y afectado por el ambiente. Así pues, una población formada con los progenitores podría ser utilizada para analizar los loci de caracteres cuantitativos (QTLs) para apareamiento cromosómico meiótico.

El taxón híbrido tuvo un porcentaje de viabilidad de polen (92.58) comparable a aquéllos de los taxa parentales (taxón silvestre 95.57 y taxón cultivado 95.33). La viabilidad de polen del taxón híbrido fue alta, la F_1 fue fértil, y los genomas parentales fueron altamente compatibles en la meiosis; por lo que no hay barrera para la reproducción sexual. Esto indica que no hay dificultad en el flujo genético y que se pueden transferir caracteres deseables de *H. annuus* silvestre al girasol cultivado.

VII. LITERATURA CITADA

- Allard, R. W. 1960. Principles of Plant Breeding. Wiley, New York.
- Atlagic, J., B. Dozet, and D. Skoric. 1993. Meiosis and pollen viability in *Helianthus tuberosus* L. and its hybrids with cultivated sunflower. Pl. Breed. 111(4): 318-324.
- 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 81(3): 259-263.
- Atlagic, J., and D. Skoric. 1999. Cytogenetic study of *Helianthus laevigatus* and its F₁ and BC₁F₁ hybrids with cultivated sunflower, *Helianthus annuus*. Pl. Breed. 118(6): 555-559.
- Berry, S. T., A. J. Leon, C. C. Hanfrey, P. Challis, A. Burkholtz, S. R. Barnes, G. K. Rufener, M. Lee, and P. D. S. Caligari. 1995. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. Theor. Appl. Genet. 91 (2): 195-199.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Amer. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
- Burr, B., S. V. Evola, F. A. Burr, and J. S. Beckmann. 1983. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In "Genetic Engineering" (J. K. Setlow and A. Hollaender, eds.), Vol. 5. Plenum, New York.
- Boyer, J. S. 1982. Plant productivity and environment. Sci. 218: 447-448.
- Brown, A. H. D., J. E. Grand, J. J. Burdon, J. P. Grace, and R. Pullen. 1985. Collection and utilization of wild perennial *Glycine*. World Soybean Res. Conf. III: Proc. (R. Shibles, ed.). Westview Press, Boulder, Colorado.
- Edwards, A. W. F. 1992. Likelihood. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 275 p.

- Coe, E. H., and J. M. Gardiner. 1994. RFLP maps of maize. In: DNA-Based Markers in Plants. R. L. Phillips and I. K. Vasil (eds.). Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- FAO Working Group. 1994. Evaluation of wild *Helianthus* species. Progress report 1991-1993. Montpellier, France.
- Gedil, M. A., C. Wye, S. Berry, B. Segers, J. Peleman, R. Jones, A. Leon, M. B. Slabaugh, and S. J. Knapp. 2001. An integrated restriction fragment length polymorphism – amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. *Genome* 44: 213-221.
- Gentzbittel, L., F. Vear, Y. X. Zhang, A. Berville, and P. Nicolas. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90 (7/8): 1079-1086.
- Gentzbittel, L., E. Mestries, S. Mouzeyar, F. Mazeyrat, S. Badaoui, F. Vear, D. Tourvielle De Labrouhe, and P. Nicolas. 1999. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Theor. Appl. Genet.* 99 (1/2): 218-234.
- Gómez-Sánchez, D., and S. González-Elizondo. 1994. Germplasm collection of wild species of *Helianthus* in México. In: FAO working group: evaluation of wild *Helianthus* species. Seiler G. J. (ed.). p. 126-133.
- Goodman, R. M., H. Hauptli, A. Crossway, and V. C. Knaut. 1987. Gene transfer in crop improvement. *Science* 236: 48-54.
- Harlan, J. R. 1976. Genetic resources in wild relatives of crops. *Crop Science* 16: 329-333.
- Hawkes, J. G. 1977. The importance of wild germplasm in plant breeding. *Euphytica* 26: 615-621.
- Hoisington, D., M. Khairallah, T. Reeves, Jean-Marcel Ribaut, B. Skovmand, S. Taba, and M. Warburton. 1998. Plant genetic resources: what can they contribute towards increased crop productivity?. NAS Colloquium. Plants and Population: is there time?, 5-6 December 1998. Beckman Center of the National Academy of Sciences, UC Irvine. p. 1-10.
- Hui, L. B. 1988. *Statistical Genomics*. CRC Press LLC. Boca Raton, New York. 611 p.
- Jackson, R. C. 1982. Polyploidy and diploidy: new perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *Amer. J. Bot.* 69(9): 1512-1523.
- Jackson, R. C. 1988. A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in *Helianthus* (Compositae). *Amer. J. Bot.* 75(5): 609-614.

- Jan, C. C., and J. M. Chandler. 1989. Sunflower interspecific hybrids and amphiploids of *Helianthus annuus* x *H. bolanderi*. *Crop Sci.* 29: 643-646.
- Jan, C. C., B. A. Vick, J. F. Miller, A. L. Kahler, and E. T. III Butler. 1998. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 96 (1): 15-22.
- Jauhar, P. P., and L. R. Joppa. 1996. Chromosome pairing as a tool in genome analysis: merits and limitations. *In: Methods of genome analysis in plants.* Jauhar P. P. (ed.). CRC. p. 9-37.
- Lander, E. S., and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genet.* 121: 185-199.
- Larsen, R. J., and M. L. Marx. 1986. *An Introduction to Mathematical Statistics and Its Applications.* Second Edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 630 p.
- Lynch, M., and B. Walsh. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits.* Sinauer Associates, Inc. Canada. 980 p.
- Morgan, W. G., and H. Thomas. 1991. A study of chromosome association and chiasma formation in the amphidiploid between *Lolium multiflorum* and *Festuca drymeja*. *Heredity* 67: 241-245.
- Morgan, W. G., H. Thomas, M. Evans, and M. Borrill. 1986. Cytogenetic studies of interspecific hybrids between diploid species of *Festuca*. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 921-925.
- Morris, J. B., S. M. Yang, and L. Wilson. 1983. Reaction of *Helianthus* species to *Alternaria helianthi*. *Plant Disease* 67: 539-540.
- Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln, and S. D. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors, using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature (London)* 335, 721-726.
- Paterson, A. H., J. W. Deverna, B. Lanini, and S. D. Tanksley. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an inter-species cross of tomato. *Genet.* 124: 735-742.
- Piperno, D. R. 2001. On maize and the sunflower. *Sci.* 292 (5525): 2260-2261.
- Pope, K. O., M. E. D. Pohl, J. G. Jones, D. L. Lentz, C. von Nagy, F. J. Vega, and I. R. Quitmyer. 2001. Origin and environmental setting of ancient agriculture in the lowlands of mesoamerica. *Sci.* 292: 1370-1373.

- Quillet, M. C., N. Madjidian, V. Griveau, H. Serieys, M. Tersac, M. Lorieux, and A. Berville. 1995. Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1195-1202.
- Reyes-Valdés, M. H. 2000. A Model for Marker-Based Selection in Gene Introgression Breeding Programs. *Crop Sci.* 40: 91-98.
- Reyes-Valdés, M. H., Y. Ji, C. F. Crane, J. F. Taylor, M. N. Islam-Faridi, H. J. Price, and D. M. Stelly. 1996. ISH-facilitated analysis of meiotic bivalent pairing. *Genome* 39: 784-792.
- Reyes-Valdés, M. H., R. Mendoza-Villareal, M. Gómez-Martínez, C. Espinosa-Zapata, J. A. Villareal-Quintanilla, and J. P. Martínez-Soriano. 2000. Meiotic analysis of a cross between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant & Animal Genome VIII Conference*. January 9-12. San Diego, CA. <<http://www.intl-pag.org/pag/8/abstracts/pag8204.html>>.
- Reyes-Valdés, M. H., and D. M. Stelly. 1995. A maximum likelihood algorithm for genome mapping of cytogenetic loci from meiotic configuration data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 9824-9828.
- Rick, C. M. 1974. High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. *Hilgardia* 42: 493-510.
- Rick, C. M. 1982. The potential of exotic germplasm for tomato improvement. In "Plant Improvement and Somatic Cell Genetics" (I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, and K. J. Frey, eds.). Academic Press, New York.
- Rieseberg, L. H., A. M. Desrochers, and S. J. Youn. 1995. Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 82: 515-519.
- Robles S., R. 1982. Producción de oleaginosas y textiles. LIMUSA. México, D. F. 675 p.
- Rogers, C. E., T. E. Thompson, and G. J. Seiler. 1982. Sunflower species of the United States. *Natl. Sunflower Assoc.*, Bismarck, N D.
- SAS Institute. 1999. SAS/STAT Version 6.12. Cary, NC: SAS Institute, Inc.
- Schilling, E. E., and C. B. Heiser. 1981. Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon* 30: 393-403.
- Seiler, G. J. 1988. The genus *Helianthus* as a source of genetic variability for cultivated sunflower. Vol. 1 p. 17-58. In Proc. 12th Int. Sunflower Conf., Novi Sad, Yugoslavia. 25-29 July 1988. Int. Sunflower Assoc., Paris, France.

- Seiler, G. J. 1992. Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. *Field Crops Res.* 30: 195-230.
- Seiler, G. J., and L. H. Rieseberg. 1997. Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. In: *Sunflower Technology and Production, Agronomy Monograph no. 35.* Schneiter A. A. (ed.). p. 41.
- Simonds, N. W. 1979. "Principles of Crop Improvement". Longman, New York.
- Soller, M., and J. Beckmann. 1988. Genomic genetics and the utilization for breeding purposes of genetic variation between populations. *Proc. Int. Conf. Quant. Genet. 2nd* (B. S. Weir, M. M. Goodman, E. J. Eisen, and G. Namkoong, eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Stalker, M. T. 1980. Utilization of wild species for crop improvement. *Adv. Agron.* 33: 111-147.
- Steel, R. G. D., y J. H. Torrie. 1989. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* McGraw-Hill. México, D. F.
- Stephens, S. G. 1961. Species differentiation in relation to crop improvement. *Crop Sci.* 1: 1-5.
- Tanksley, S. D. 1983. Introgression of genes from wild species. In "Isozymes in Plant Genetics and Breeding" (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Thomas, H. M., and W. G. Morgan. 1990. Analysis of synaptonemal complexes and chromosome pairing at metaphase I in the diploid intergeneric hybrid *Lolium multiflorum* x *Festuca drymeja*. *Genome* 33: 465-471.
- Thompson, T. E., D. C. Zimmerman, and C. E. Rogers. 1981. Wild *Helianthus* as a genetic resource. *Field Crops Res.* 4: 333-343.
- Vanozzi, G. P. 1994. Study of embryogenesis in interspecific hybrids. In: *FAO working group: evaluation of wild Helianthus species.* Seiler G. J. (ed.). p. 117-118.
- Vaughan, D. A. 1989. Collection, conservation, and potential use of the wild relatives of rice in Asia and Australia. *Rev. Adv. Plant Biotechnol. 1985-1988. Int. Symp. Genet. Manipulation Crops, 2nd* (A. Mujeeb-Kazi and L. A. Stich, eds.). p. 179-190.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

- Whelan, E. D. P. 1978. Hybridization between annual and perennial diploid species of *Helianthus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 20: 523-530.
- Whelan, E. D. P. 1979. Interspecific hybrids between *Helianthus petiolaris* Nutt. and *H. annuus* L.: effect of backcrossing on meiosis. *Euphytica* 28: 297-308.
- Whelan, E. D. P. 1982. Trisomic progeny from interspecific hybrids between *Helianthus maximiliani* and *H. annuus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 375-384.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Young, N. D., and S. D. Tanksley. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77: 95-101.

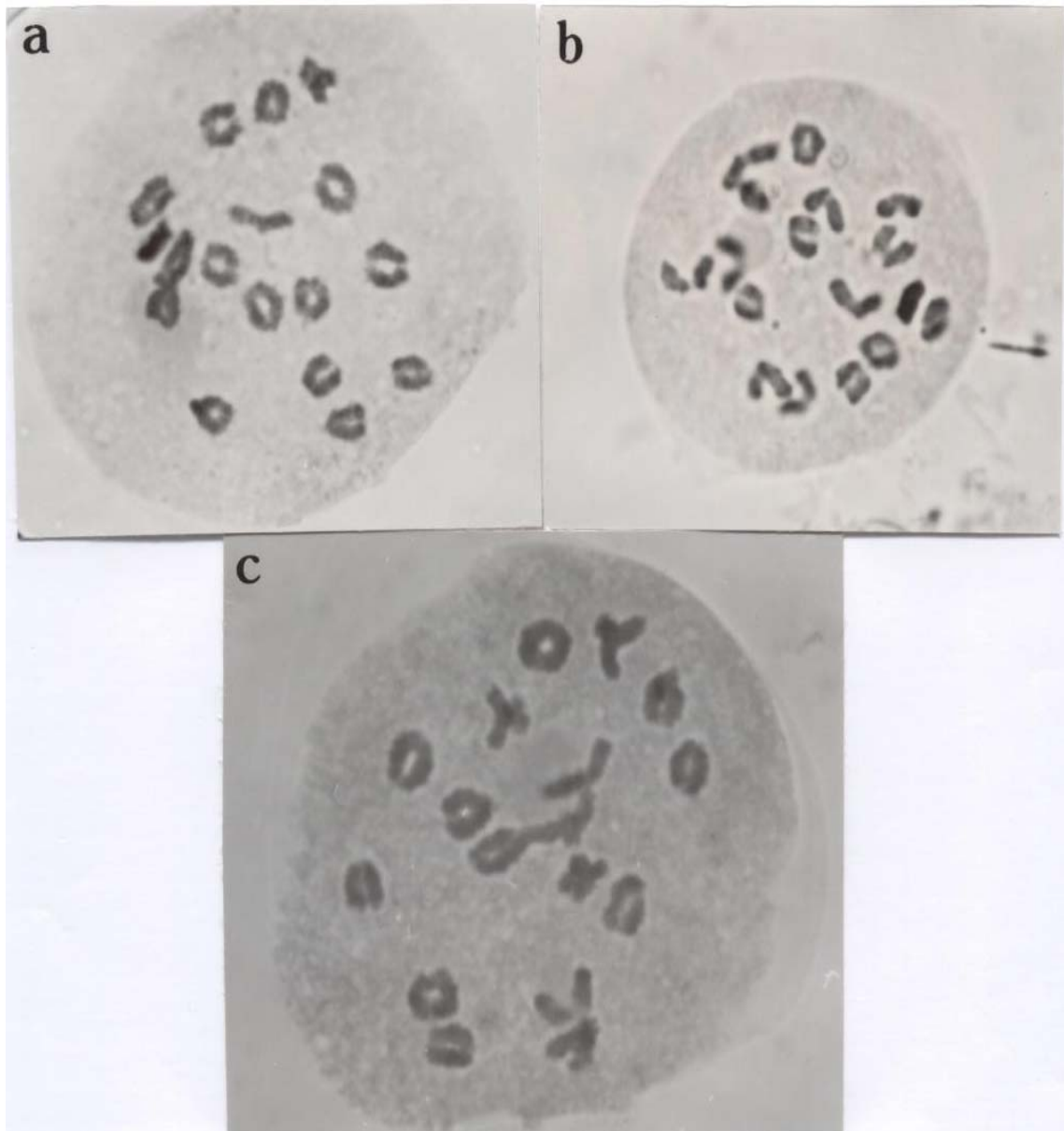


Figura 4.1. Configuraciones meióticas en células en diacinesis de: (a) girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*) línea HA 89; (b) girasol silvestre (*Helianthus annuus* ssp. *texanus* Heiser); y (c) híbrido F₁ entre el material cultivado y el silvestre.