

Gutierrez, Agustina¹ y Poverene, Mónica²

Departamento de Agronomía UN del Sur y CERZOS - CONICET

San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca

¹ aguti@criba.edu.ar

² poverene@criba.edu.ar

GERMINACIÓN Y DORMICIÓN EN GIRASOL SILVESTRE (*HELIANTHUS PETIOLARIS*) Y CRUZAS CON GIRASOL CULTIVADO

Palabras Clave: banco de semillas, contaminantes, flujo génico, voluntarios

RESUMEN

El girasol silvestre *Helianthus petiolaris* abarca gran parte de la región de producción de semilla del girasol cultivado en la Argentina. Ambas especies pueden cruzarse produciendo plantas fértiles, afectando la producción de semilla del girasol. Las plantas voluntarias, las especies silvestres y las cruza cultivo-silvestre contribuyen a formar el banco de semillas del suelo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la germinación y dormición de semillas de *H. petiolaris* y de sus cruza con girasol cultivado, a fin de contribuir a diseñar medidas de control de su diseminación en áreas de producción de semilla. Se estudiaron plantas cruce entre girasol cultivado y silvestre provenientes de semilla de poblaciones de *H. petiolaris* lindantes con lotes de cultivo. De cada cruce, se obtuvo semilla producida por polinización abierta en dos generaciones sucesivas, y retrocruza con plantas de *H. petiolaris* de la población de origen cultivadas en el campo experimental. El ambiente tuvo menos influencia que el genotipo sobre la germinación, ya que no se observaron diferencias entre poblaciones de *H. petiolaris* provenientes de diversas regiones geográficas. La especie silvestre tiene una alta dormición y el girasol cultivado carece de ella; los descendientes de primera generación muestran la mayor germinación, pero ese efecto disminuye a medida que los genes del girasol cultivado se van diluyendo en las sucesivas cruza.

Introducción

Argentina se encuentra entre los cuatro primeros productores mundiales de girasol, con una producción estimada para la presente campaña de 4,7 millones de toneladas y una superficie sembrada de 2,66 millones de hectáreas (SAGPYA, 2008). La demanda de semilla híbrida de alta calidad ha estimulado su producción en diversas regiones del país. La semilla fiscalizada garantiza la identidad y calidad del producto y el girasol se encuentra entre las especies de fiscalización obligatoria (INASE, 2008). La semilla debe estar libre de contaminantes (Res. SAGYP 2270/93) y originar más del 95% de plantas del híbrido comercializado (OECD, 2006). Durante la producción de semilla de girasol se debe evitar la cercanía de polen diferente al del genotipo paterno, ya que al ser una especie de polinización cruzada entomófila, podrían producirse fecundaciones no controladas originando plantas fuera de tipo.

En la región central del país se han naturalizado dos parientes silvestres del girasol cultivado originarios de América del Norte, *Helianthus annuus* L. y *H. petiolaris* Nutt. Ambas especies son anuales y pueden cruzarse con el girasol cultivado produciendo descendencia total o parcialmente fértil (Heiser, 1978; Ferreira, 1980). La polinización incontrolada puede afectar la producción de semilla de girasol, tal como se ha comprobado en EE.UU. (Anfinrud, 1997) y en Europa (Muller *et al.*, 2006). Una de las características distintivas entre el girasol cultivado y el silvestre es que este último posee un extenso período de floración, produciendo numerosos capítulos cuyas pequeñas semillas se desprenden fácilmente. Otra diferencia consiste en la dormición que caracteriza a las semillas silvestres, que pueden permanecer inactivas en el suelo durante largos períodos, escapando a diversos métodos de control. La germinación retrasada preserva a la plántula silvestre de las heladas y la acción de herbicidas, le permite sobrevivir y dejar des-

cendientes, aumentando su aptitud biológica. La fecundación de plantas silvestres con polen del cultivo incrementa la germinación de la semilla y disminuye la dormición (Snow *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 2006) favoreciendo la reproducción de las plantas indeseables en las regiones productoras de semilla de girasol. Las plantas voluntarias (nacidas de semilla de girasol caída durante la cosecha o el transporte), las especies silvestres y las cruza cultivo-silvestre contribuyen a formar el banco de semillas del suelo. Este almacena semillas disponibles para la germinación y permite que una especie persista en un sitio incluso en ausencia de reproducción del año anterior o cuando una población desaparece debido a que las semillas no se han producido los últimos años (Alexander & Schrag, 2003). El flujo de polen es la vía directa para el intercambio de genes entre el cultivo y las poblaciones silvestres pero las oportunidades de que esto ocurra son generalmente limitadas debido a las diversas prácticas agrícolas, como rotación del cultivo o aplicación de herbicidas. Si las semillas de voluntarios se incorporan dentro del banco de semillas del suelo y posteriormente germinan y florecen, las poblaciones silvestres pueden seguir expuestas al flujo de genes incluso en ausencia de campos cultivados cercanos. De esta manera los voluntarios actúan como un puente entre las poblaciones cultivadas y silvestres (Reagon & Snow, 2006). El flujo de genes mediado por las semillas del girasol implica la persistencia de genes del cultivo en plantas silvestres, incluyendo la resistencia a herbicidas y eventualmente, a los transgenes.

Cantamutto *et al.* (2007) describieron las condiciones propicias para la diseminación del girasol silvestre y propusieron medidas de prevención. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la germinación y dormición de semillas de la especie silvestre *H. petiolaris* y de sus cruza con girasol cultivado, a fin de contribuir a diseñar medidas de control de su diseminación en áreas de producción de semilla.

Materiales y métodos

Plantas cruza entre girasol cultivado y silvestre provenientes de semilla de poblaciones de *H. petiolaris* lindantes con lotes de girasol se cultivaron en el campo experimental del Departamento de Agronomía, UNS. Las poblaciones silvestres provenían de diferentes departamentos de la región girasolera de nuestro país: Guaminí (Buenos Aires), Atreucó, Catrilo y Santa Rosa (La Pampa) y General Pedernera (San Luis). Se obtuvo semilla de cada cruza producida por polinización abierta (PA1) y semilla de las plantas descendientes, también producida por polinización abierta (PA2). Polen de cada planta cruza se utilizó para polinizar manualmente plantas de *H. petiolaris* de la población de origen (HP) cultivadas en el campo experimental y se obtuvo semilla de esas retrocruzas (R).

Se separaron 200 semillas de cada uno de los cuatro grupos provenientes de cada población y se lavaron en una solución de lavandina 10% (v/v). Con el objetivo de romper la dormición, a 100 semillas se les practicó un corte de la cubierta en el extremo opuesto al embrión y 100 permanecieron sin cortar, como testigos. Se colocaron en bandejas con papel de filtro húmedo y se mantuvieron a 4°C por una semana. Luego se colocaron a temperatura ambiente y se procedió al conteo de las semillas germinadas (emergencia y desarrollo activo de la radícula) y no germinadas; la respuesta germinativa se evaluó en ocho conteos a lo largo de 15 días. Se comparó el número de semillas germinadas cortadas y sin cortar dentro de cada grupo mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. El número de semillas dormidas fue calculado como la diferencia entre semillas germinadas cortadas y sin cortar. Aquellas semillas cortadas que no germinaron a lo largo de 15 días fueron consideradas inviables. Se obtuvo el intervalo de confianza para el número de semillas dormidas dentro de cada grupo y la varianza entre grupos fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Se hizo un análisis de con-

tingencia para evaluar la dormición entre las distintas poblaciones dentro de cada uno de los grupos, comparando semillas germinadas sin cortar y semillas dormidas mediante la prueba estadística de asociación de Pearson. Esta prueba permite comprobar si existe alguna relación entre las variables, en este caso germinación y origen de la población analizada. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete InfoStat (FCA, UN de Córdoba).

Resultados y Discusión

La dispersión de las especies de girasol silvestre en la Argentina abarca gran parte de la región de producción de semilla (Figura 1). El girasol y la especie silvestre *Helianthus petiolaris* pueden cruzarse produciendo plantas fértiles. La frecuencia promedio de polinización del cultivo al silvestre fue de 1,3% y del silvestre al cultivo fue de 0,5%, en varias localidades (Gutierrez *et al.*, datos no publicados). Los resultados obtenidos son representativos de una amplia región del país. La dormición es un rasgo crítico para la persistencia de la semilla en ambientes variables (Venable & Lawlor, 1980) y es gobernada por factores ambientales y genéticos.

La prueba de Wilcoxon arrojó diferencias entre el número de semillas germinadas

Tabla 1: Número de semillas germinadas sin cortar (SC) y cortadas (C) y número de semillas dormidas expresado como diferencia en seis poblaciones de *H. petiolaris* (HP), descendientes de primera generación de siete plantas cruce cultivo-silvestre (PA1), descendientes de segunda generación (PA2) y retrocruzas con la especie silvestre (R). En la localidad Atreucó se hallaron dos cruces (-1 y -2).

Procedencia de los materiales	Semillas germinadas		Semillas dormidas (C-SC)
	SC	C	
Guaminí HP	36	71	35
Catriló HP	32	57	25
Atreucó HP	42	94	52
Santa Rosa HP	41	81	40
Santa Rosa HP	46	86	40
Gral Pedernera HP	45	84	39
Guaminí PA1	42	69	27
Catriló PA1	30	60	30
Atreucó PA1-1	56	91	35
Atreucó PA1-2	50	88	38
Santa Rosa PA1	72	81	9
Santa Rosa PA1	74	87	13
Gral Pedernera PA1	75	86	11
Guaminí PA2	56	82	26
Catriló PA2	52	74	22
Atreucó PA2-1	67	91	24
Atreucó PA2-2	66	93	27
Santa Rosa PA2	59	95	36
Santa Rosa PA2	59	96	37
Gral Pedernera PA2	68	92	24
Guaminí R	30	78	48
Catriló R	29	52	23
Atreucó R-1	49	93	44
Santa Rosa R	26	80	54
Santa Rosa R	48	84	36
Gral Pedernera R	49	80	31

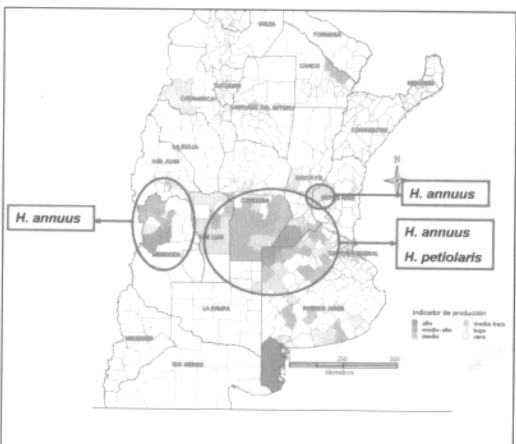


Figura 1: Distribución de las especies silvestres *Helianthus annuus* y *H. petiolaris* en relación a las regiones productoras de semilla de girasol en Argentina. Mapa fuente: INASE, 2008.

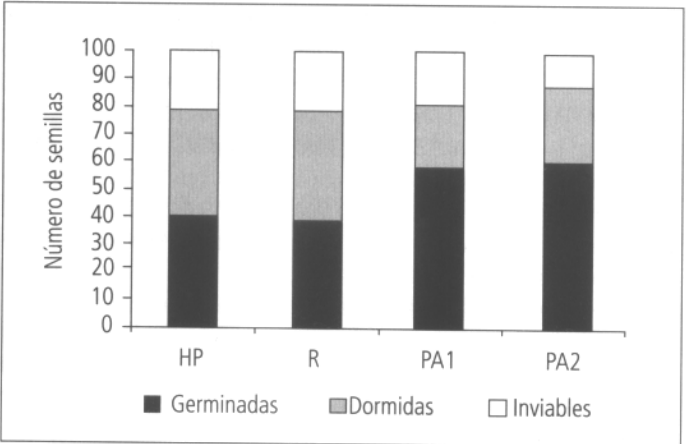


Figura 2: Número de semillas germinadas, dormidas e inviables de *H. petiolaris* (HP), retrocruzas con plantas silvestres (R) y plantas cruce de primera y segunda generación producidas por polinización abierta (PA1 y PA2 respectivamente).

cortadas y sin cortar para los cuatro grupos, HP, R, PA1 y PA2 (Tabla 1, Figura 2) Esas diferencias fueron significativas para la primera generación de descendientes de cruza cultivo-silvestre (PA1) y altamente significativas para los restantes grupos. Esto indica que el progenitor silvestre aumentó la dormición en sus descendientes. Sin embargo, el grado de dormición difirió entre los grupos, como lo demostró la comparación de medias y la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 2). La comparación no arrojó diferencias en el grado de dormición de las semillas de la especie silvestre (HP) y de sus retrocruzas (R), pero sí entre estos y la primera generación de descendientes de cruza cultivo-silvestre (PA1), en tanto la segunda generación de descendientes (PA2) mostró un grado intermedio de dormición entre ellos. La especie silvestre *H. petiolaris* tiene una alta dormición y el girasol cultivado carece de ella; los descendientes de primera generación muestran la mayor germinación, pero ese efecto disminuye a medida que los genes del girasol cultivado se van diluyendo en las sucesivas cruza.

Los resultados del análisis de contingencia no mostraron diferencias entre la cantidad de semillas germinadas y dormidas en seis poblaciones de *H. petiolaris* provenientes de distintas localidades, en tanto hubo diferencias altamente significativas para los descendientes de primera generación de plantas cruce y para sus retrocruzas (Tabla 3). Esto indica que las poblaciones de la especie silvestre no difieren en el grado de dormición, aunque sí lo hacen sus descendientes, señalando una relación entre el grado de dormición y el genotipo del parental cultivado que originó esas cruza, que no pudo ser identificado con certeza. Esa diferencia desaparece en la segunda generación de descendientes de las cruza cultivo-silvestre, indicando que el efecto del genotipo se pierde como consecuencia de la variación genética que se origina en la polinización abierta.

La germinación es estimulada por señales ambientales, particularmente la humedad

Tabla 2: Intervalos de confianza de la media y prueba de Kruskal-Wallis para promedio de semillas dormidas en seis poblaciones de *H. petiolaris* (HP), descendientes de primera generación de siete plantas cruce cultivo-silvestre (PA1), descendientes de segunda generación (PA2) y retrocruzas con la especie silvestre (R).

Población	N	Medias	D.E.	Lim Inf ¹	Lim Sup ¹	p	Ranking ²
HP	6	38,50	8,73	31,44	45,53	0,0380	18,42 B
R	6	39,33	11,48	29,57	47,24		17,92 B
PA1	7	23,29	12,07	13,61	31,77		8,86 A
PA2	7	28,00	6,03	24,04	31,91		10,14 AB

¹ Intervalos de confianza al 95% estimados por bootstrap (B=250).

² Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3: Análisis de contingencia de promedios de semillas germinadas y dormidas para seis poblaciones silvestres, dos generaciones de descendientes de siete plantas cruce cultivo-silvestre y sus retrocruzas con plantas silvestres de la respectiva población.

Generaciones	Grados de libertad	Chi Cuadrado Pearson (p-valor)
<i>Helianthus petiolaris</i> (HP)	5	0,7701
Retrocruzas (R)	5	0,0010
Descend. de cruza I (PA1)	6	<0,0001
Descend. de cruza II (PA2)	6	0,345

y la temperatura pero influenciada fuertemente por controles maternos (Rice, 1985; Vleeshouwers *et al.*, 1995; Clauss & Venable, 2000). Nuestros resultados indican que el ambiente tuvo menos influencia que el genotipo, ya que no se observaron diferencias entre poblaciones de *H. petiolaris* provenientes de diversas regiones geográficas. Sin embargo, esta especie prefiere suelos arenosos y sueltos (Cantamuto *et al.*, 2008) por lo que los ambientes de origen podrían no diferir demasiado. Las diferencias halladas entre los descendientes de cruza podrían atribuirse al genotipo del progenitor cultivado que actuó como polinizador, el cual se va perdiendo en las sucesivas generaciones polinizadas por mayoría de plantas silvestres. Estos resultados concuerdan con Snow *et al.* (1998) y Mercer *et al.* (2006) quienes concluyen que los cambios en la germinación y en la dormición causados por la hibridación con las plantas cultivadas podían afectar fuertemente la aptitud y la evolución de la población silvestre.

Algunas características del cultivo, tales como la reducida dormición, podrían tener efectos negativos en la aptitud de las poblaciones silvestres (Stewart *et al.*, 2003). Su recuperación en las generaciones

siguientes a la hibridación indicaría que las plantas silvestres que han incorporado genes del cultivo sobreviven y se reproducen eficazmente. El flujo de genes desde el cultivo a sus parientes silvestres puede resultar en la evolución de nuevas malezas o especies vegetales más invasoras, como se ha demostrado en 22 de los 25 cultivos más importantes del mundo (Ellstrand, 2003). La resistencia a herbicidas del tipo imidazolinona característica de las variedades de girasol Clearfield® puede ser transferida a *H. petiolaris* (Massinga *et al.*, 2005). La presencia de plantas voluntarias favorece el intercambio de material genético entre el girasol y sus parientes silvestres (Reagon & Snow, 2006). Los bancos de semillas constituidos por las especies silvestres y las cruza cultivo-silvestre son un problema importante para los productores ya que son depósitos de semilla altamente heterogénea que ocasionan pérdidas agrícolas en la cosecha (Dekker, 1997) y contribuyen a la persistencia de los girasoles silvestres en ambientes variables (Alexander & Schrag, 2003).

Conclusiones

La especie silvestre *H. petiolaris* tiene un alto grado de dormición, con un promedio

de 38,5% de semillas dormidas. Esto le permitiría escapar de condiciones ambientales adversas, como frío, sequía o acción de herbicidas.

La hibridación cultivo-silvestre reduce la dormición, con un promedio de 23,3% en descendientes de primera generación, favoreciendo la germinación en lotes del cultivo o en áreas vecinas.

En generaciones sucesivas (segunda generación de las cruizas, retrocruzas) la dormición se recupera rápidamente, asegurando la supervivencia de plantas que han incorporado características del cultivo. Estas plantas contribuyen a formar el banco de semillas del suelo, junto con semilla de girasol que originará plantas voluntarias.

Los girasoles voluntarios aumentan el flujo de genes, actuando como puente entre plantas cultivadas y silvestres.

Estas condiciones favorecen el origen de plantas heterogéneas cuyo polen puede interferir en la producción de semilla híbrida de girasol de alta calidad.

El control del banco de semillas debería sumarse a otras medidas de prevención de invasión recomendadas por Cantamutto *et al.* (2007).

Bibliografía

Alexander, H.M. and Schrag, A.M. 2003. Role of soil seed banks and newly dispersed seeds in population dynamics of the annual sunflower, *Helianthus annuus*. *Journal of Ecology*, 91: 987-998.

Anfinrud, M.N. 1997. Planting Hybrid Seed Production and Seed Quality Evaluation in Sunflower Technology and Production A.A. Schneiter (Ed.) American Society of Agronomy, Madison, USA, 697-708. Blackwell Publishing Ltd.

Cantamutto, M.; Poverene, M. and Peinemann, N. 2008. Multi-scale analysis of two annual *Helianthus* species naturalization in Argentina. *Agriculture, Ecosystems*

and Environment, 123: 69-74.

Cantamutto, M.; Presotto, A.; Poverene, M.; Rivas, J.; Matarazzo, R. and Renzi, J. 2007. *Helianthus* que amenazan la producción de girasol en el Valle Bonaerense del Río Colorado. *Boletín Técnico* N° 16 EEA Hilario Ascasubi. Ediciones INTA.

Clauss, M.J. and Venable, D.L. 2000. Seed germination in desert annuals: an empirical test of adaptive bet hedging. *American Naturalist*, 155: 168-186.

Dekker, J. 1997. Weed diversity and weed management. *Weed Science*, 45: 357-363.

Ellstrand, N.C. 2003. Dangerous Liaisons? When Cultivated Plants Mate with Their Wild Relatives. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, 244 pp.

Ferreira, V. 1980. Hibridación e introgressión entre *Helianthus annuus* L. y *Helianthus petiolaris* Nutt. *Mendeliana*, 4: 81-93.

Heiser, C.B. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and Origin of Domesticated Sunflower in *Sunflower Science and Technology*. J.F. Carter (Ed.) American Society of Agronomy, Madison, USA, 31-53.

INASE Instituto Nacional de Semillas. 2008. Certificación y Control. www.inase.gov.ar

Massinga, R.A.; Al-Khatib, K.; St-Amand, P. and Miller, J.F. 2005. Relative fitness of imazamox-resistant common sunflower and prairie sunflower. *Weed Science*, 53:160-174.

Mercer, K.L.; Shaw, R.G. and Wyse, D.L. 2006. Increased germination of diverse crop-wild hybrid sunflower seeds. *Ecological Applications*, 16: 845-854.

Muller, M.H.; Arlie, G.; Bervillé, A.; David, J.; Delieux, F.; Fernandez-Martinez, J.M.; Jouffret, P.; Lecomte, V.; Reboud, X.; Rouselle, Y.; Serieys, H.; Teissere, N. and Tsitroni, A. 2006. Le compartiment spontané du tournesol *Helianthus annuus* en Europe: prospections et premières caractérisations génétiques. *Les Actes du BRG*, 6: 335-353.

Organisation for Economic Co-operation

and Development (OECD). 2006. Schemes for the Varietal Certification or the Control of Seed Moving in International Trade, 2nd. part Rules and Directions by Seed Scheme, Annex VII Crucifer Seed and Other Oil or Fibre Species Seed en www.oecd.org/dataoecd/41/3/15289156.pdf

Reagon, M. and Snow, A.A. 2006. Cultivated *Helianthus annuus* (*Asteraceae*) volunteers as a genetic "bridge" to weedy sunflower populations in North America. *American Journal of Botany*, 93:127-133.

Rice K.J. 1985. Responses of *Erodium* to varying microsites: the role of germination cueing. *Ecology* 66: 1651-1657.

SAGPYA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2008 Estimaciones agrícolas. www.sagpya.mec.gov.ar

Snow, A.A., Moran-Palma, P., L.H. Riesenberg, A. Wszelaki, and G. Seiler. 1998. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, *Asteraceae*). *American Journal of Botany* 794-801

Stewart, C. N., Jr., M. D. Halfhill and S. I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics* 4:806-817.

Venable D.L. and Lawlor L. 1980. Delayed germination and dispersal in desert annuals: escape in space and time. *Oecologia* 46: 272-282.

Vleeshouwers L.M., Boumeester H.J. and Karssen C.M. 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology* 83: 1031-1037.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral otorgada a la primera autora.