



A. F. Garayalde



M. Poverene



M. Cantamutto

Antonio F. Garayalde¹; Mónica Poverene²; Miguel Cantamutto³; Alicia Carrera⁴

1) Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) – CCT-CONICET-BB. Camino La Carrindanga km. 7, 8000, Bahía Blanca. agarayalde@criba.edu.ar

2) CERZOS – CCT-CONICET-BB y Departamento de Agronomía UN del Sur. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. poverene@criba.edu.ar

3) Departamento de Agronomía UN del Sur. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. mcantamutto@yahoo.com

4) CERZOS – CCT-CONICET-BB y Departamento de Agronomía UN del Sur. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. acarreira@criba.edu.ar

Desarrollo de herramientas moleculares para la detección de genes de girasol silvestre (*helianthus annuus* sp. *annuus*) en la semilla híbrida de girasol

RESUMEN

La producción de semilla híbrida es susceptible a la contaminación por polen foráneo, proveniente de plantas silvestres de girasol. *Helianthus annuus* sp. *annuus* es una forma silvestre del girasol introducida en nuestro país, que se encuentra difundida en, al menos, siete provincias. El uso de marcadores moleculares permite evaluar la variabilidad genética de materiales silvestres y, a su vez, generar herramientas para detección de polen foráneo en la formación de semilla híbrida de girasol. Diez poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* sp. *annuus* fueron analizadas mediante marcadores moleculares ISSR y SSR. Las poblaciones locales presentan un nivel mayor de variabilidad genética que las líneas cultivadas analizadas y conservaron durante el proceso de introducción a nuestro país la mayor parte de la variabilidad genética observada en su centro de origen. Estas poblaciones de girasol silvestre representan una importante fuente de variabilidad genética que podría aportar genes novedosos para la mejora del cultivo de girasol. Se encontraron nueve bandas ISSR y 21 alelos SSR únicos del girasol silvestre, de utilidad para evaluar la transferencia de genes desde el silvestre hacia el cultivo, permitiendo la detección temprana de contaminación en lotes de producción de semilla híbrida.

Palabras clave:

Contaminación, flujo génico, germoplasma, ISSR- Microsatélites

Molecular tools development for detection of wild sunflower (*helianthus annuus* sp. *annuus*) genes in hybrid sunflower seed

ABSTRACT

Hybrid seed production can be affected by foreign pollen contamination, originating in wild plants. *Helianthus annuus* sp. *annuus* is a wild sunflower form introduced in our country that is

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE GIRASOL SILVESTRE (*Helianthus annuus* sp. *annuus*) EN LA SEMILLA HÍBRIDA DE GIRASOL

Garayalde, Antonio F.

Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) – CCT-CONICET-BB. Camino La Carrindanga km. 7, 8000, Bahía Blanca. agarayalde@criba.edu.ar

Poverene, Mónica

CERZOS – CCT-CONICET-BB y Departamento de Agronomía UN del Sur. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. poverene@criba.edu.ar

Cantamutto, Miguel

Departamento de Agronomía UN del Sur. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. mcantamutto@yahoo.com

Carrera, Alicia

CERZOS – CCT-CONICET-BB y Departamento de Agronomía UN del Sur. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. acarrera@criba.edu.ar

RESUMEN

La producción de semilla híbrida es susceptible a la contaminación por polen foráneo, proveniente de plantas silvestres de girasol. *Helianthus annuus* sp. *annuus* es una forma silvestre del girasol introducida en nuestro país que se encuentra difundida en al menos siete provincias. El uso de marcadores moleculares permite evaluar la variabilidad genética de materiales silvestres y a su vez generar herramientas para detección de polen foráneo en la formación de semilla híbrida de girasol. Diez poblaciones silvestres de *Helianthus annuus* sp. *annuus* fueron analizadas mediante marcadores moleculares ISSR y SSR. Las poblaciones locales presentan un nivel mayor de variabilidad genética que las líneas cultivadas analizadas y conservaron durante el proceso de introducción a nuestro país la mayor parte de la variabilidad genética observada en su centro de origen. Estas poblaciones de girasol silvestre representan una importante fuente de variabilidad genética que podría aportar genes novedosos para la mejora del cultivo de girasol. Se encontraron nueve bandas ISSR y 21 alelos SSR únicos del girasol silvestre de utilidad para evaluar la transferencia de genes desde el silvestre hacia el cultivo, permitiendo la detección temprana de contaminación en lotes de producción de semilla híbrida.

PALABRAS CLAVES

Contaminación- Flujo génico- Germoplasma- ISSR- Microsatélites

MOLECULAR TOOLS DEVELOPMENT FOR DETECTION OF WILD SUNFLOWER (HELIANTHUS ANNUUS SP. ANNUUS) GENES IN HYBRID SUNFLOWER SEED

ABSTRACT

Hybrid seed production can be affected by foreign pollen contamination, originating in wild plants. *Helianthus annuus* sp. *annuus* is a wild sunflower form introduced in our country that is widespread in at least seven central provinces. Molecular markers allow to evaluate genetic variability of wild materials and constitute tools able for detect foreign pollen during hybrid sunflower seed obtain. Ten wild naturalized populations of *Helianthus annuus* sp. *annuus* were analyzed by ISSR and SSR molecular markers. Local populations showed higher level of genetic variability than cultivated lines and also they conserved significant genetic diversity in comparison to its center of origin. These wild sunflower populations represent an important source of novel genes for improving sunflower crop. Nine ISSR private bands and 21 SSR private alleles of wild sunflower were found; they become useful markers for evaluation of wild-crop gene flow, allowing early detection of contamination in lots of hybrid seed production.

KEYWORDS

Seed contamination-Gene flow- Germplasm- ISSR- Microsatellites

INTRODUCCIÓN

La Argentina es uno de los principales productores de girasol (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus*) a nivel mundial. La exportación de aceite y harina alcanza unas 200.000 toneladas, que es la mitad de lo que aporta la Comunidad Económica Europea (ASAGIR, 2008).

La producción de semilla híbrida implica cruzamientos entre una línea materna androestéril sobre la cual se cosecha la semilla y una línea restauradora como fuente de polen. Este proceso es susceptible a la contaminación por polen foráneo, proveniente de plantas voluntarias o silvestres de girasol. La coexistencia de poblaciones silvestres y girasol cultivado ha sido señalada como un problema para la producción de semilla híbrida en EEUU y Europa (Anfinrud, 1997; Muller et al., 2006). *H. annuus* sp. *annuus*. y *H. petiolaris* son especies de girasol silvestre que se

encuentran naturalizadas en la Argentina central. Ambas se encuentran expandiendo su territorio (Cantamutto et al., 2008) y si invadieran las zonas dedicadas a la obtención de semilla híbrida, como el valle bonaerense del Río Colorado (Cantamutto et al., 2007) constituirían una importante fuente de contaminación ya que existe un significativo grado de hibridación de ambas especies con el cultivo (Ureta et al., 2008a y b; Gutierrez et al., 2010).

Helianthus annuus sp. *annuus* se encuentra difundido en siete provincias argentinas (Poverene et al., 2008). Es una especie anual y diploide ($x=17$), originaria de América del Norte que en nuestro país presenta una distribución en parches, formando poblaciones de un número elevado de plantas.

Para estudiar poblaciones silvestres son ampliamente utilizadas herramientas que examinan directamente el ADN, denominados marcadores moleculares, los cuales permiten evaluar su variabilidad y estructura genética. Esta información resulta necesaria para realizar un manejo eficiente del germoplasma y planificar estrategias de mejoramiento. Además, los marcadores moleculares son una valiosa herramienta para detectar hibridación entre girasol silvestre y cultivado (Ureta et al., 2008a).

Los marcadores moleculares ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) se basan en la amplificación de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando un iniciador único que contiene una secuencia de ADN repetida (Zietkiewicz et al., 1994). Los marcadores moleculares microsátélites o SSR (Simple Sequence Repeats) consisten en repeticiones contiguas de unidades compuestas por uno, dos y hasta cinco nucleótidos que pueden ser amplificados por medio de PCR utilizando iniciadores que alinean con sus secuencias flanqueantes. Ambos tipos de marcadores detectan elevados niveles de polimorfismo y son adecuados para el análisis de poblaciones naturales (Wolfe et al., 1998; Yatabe et al., 2007).

Objetivos: Caracterizar y evaluar la diversidad genética de accesiones de girasol silvestre *H. annuus* sp. *annuus* mediante el uso de marcadores moleculares, generando herramientas para detectar polen foráneo en la formación de semilla híbrida de girasol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El girasol silvestre se distribuye en nuestro país desde las latitudes 31°58' al 37°31'S, y 60°33' al 68°14'W. Diez poblaciones representativas de este rango fueron seleccionadas. Las poblaciones provenían de: (1) A Alsina, (ALS) y (2) Carhué (CAR), provincia de Buenos Aires, (3) J. Celman, (JCE), (4) Río Cuarto (RCU) y (5) La Carlota (LCA), provincia de Córdoba, (6) Rancul (RAN) y (7) Colonia Barón (CBA), La Pampa, (8) Media Agua (MAG), San Juan, (9) Malvinas (MAL), Mendoza y (10) Diamante (DIA), Entre Ríos. Las semillas se sembraron en el campo experimental del Departamento de Agronomía (UNS) y se analizaron 10 plantas por población. Se incluyeron seis líneas cultivadas (HA367, HAR274, HAR2, HAR3, HAR5 y HA89) previamente analizadas con marcadores microsatélites (Paniego et al. 2002). La extracción de ADN se realizó a partir de hoja, siguiendo un protocolo CTAB (Hoisington et al., 1994).

Marcadores Moleculares

Los marcadores ISSR se amplificaron por PCR siguiendo un protocolo modificado de Zietkiewicz et al. (1994). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis a voltaje constante en geles de agarosa y fueron teñidos con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con luz UV y se registraron con cámara digital. Los marcadores SSR se amplificaron por PCR siguiendo un protocolo modificado de Tang et al. (2003). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida, teñidos con nitrato de plata. Las bandas se escanearon para su posterior análisis. En ambos casos se utilizaron reacciones sin DNA como controles negativos. Se calcularon medidas de diversidad genética como la heterocigocidad esperada (He), número de alelos totales (NT), número de alelos únicos silvestres al compararlas con los genotipos cultivados (NS) y número de alelos únicos por población (NU). Todos los cálculos se efectuaron mediante el programa GenAlEx 6 (Genetic Analysis in Excel; Peakall & Smouse, 2006. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de 106 individuos silvestres y cultivados se obtuvieron un total de 64 bandas ISSR reproducibles, de las cuales 55 resultaron polimórficas (85.9%). Las medidas de diversidad genética resultaron ser casi tres veces mayores entre los individuos silvestres que entre las líneas cultivadas (Figura 1). A partir de los cinco loci SSR analizados se obtuvieron un total de 29 alelos en los 106 individuos analizados. También los microsatélites mostraron mayores niveles de variabilidad entre los individuos silvestres que entre los cultivados. Estudios con marcadores microsatélites en poblaciones silvestres en el centro de origen mostraron valores de heterocigocidad media de aproximadamente 0,8 (Tang & Knapp, 2003). La variabilidad encontrada con los marcadores microsatélites en las poblaciones locales fue cercana a 0,6 lo que indica que los materiales introducidos conservaron aproximadamente un 70% de la heterocigocidad observada en el centro de origen.

Se encontraron nueve bandas ISSR y 21 alelos SSR únicos del girasol silvestre, pero ningún alelo único del girasol cultivado. Estudios previos muestran la dificultad de encontrar alelos únicos del cultivo cuando es comparado con su pariente silvestre *H. annuus*. Tang & Knapp (2003) trabajando con 1.341 alelos microsatélites sólo encontraron 15 alelos únicos de las líneas cultivadas elite. Además hay una gran similitud a nivel de isoenzimas y secuencias d ADN de cloroplasto entre los genotipos silvestres y cultivados (Rieseberg & Seiler, 1990).

Por el contrario, se encontraron varias bandas ISSR y alelos SSR únicos del girasol silvestre (Tabla 1), los cuales resultan de utilidad para evaluar la transferencia de genes desde el silvestre hacia el cultivo. Esta dirección de flujo génico ha sido demostrada previamente a través de la evaluación morfológica de lotes de girasol cultivado invadido por silvestres (Ureta et al. 2008a).

CONCLUSIONES

Las poblaciones de girasol silvestre naturalizadas en Argentina representan una importante fuente de variabilidad genética que podría aportar genes novedosos para la mejora del cultivo de girasol. Los marcadores ISSR y en especial los SSR constituyen una herramienta de utilidad para caracterizarlas y detectar polen de girasol silvestre. Es factible realizar la extracción de ADN a

partir de hojas de plántula y buscar alelos de poblaciones silvestres en lotes de producción de semilla híbrida, permitiendo la detección temprana de contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR). 2008. <http://www.asagir.org.ar>.
- 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.
- Gutierrez, A.; Carrera, A.; Basualdo, J.; Rodríguez, R.; Cantamutto, M. and Poverene, M. 2010. Gene flow between cultivated sunflower and *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *Euphytica*, 172:67–76
- Hoisington, D.; Khairallah, M. and González de León, D. 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. CIMMYT, México, D.F.
- Muller, M.H.; Arlie, G.; Bervillé, A.; David, J.; Delieux, F.; Fernandez-Martinez, J.M.; Jouffret, P.; Lecomte, V.; Reboud, X.; Rousselle, Y.; Serieys, H.; Teissere, N. and Tsitrone, A. 2006. Le compartiment spontané du tournesol *Helianthus annuus* en Europe: prospections et premières caractérisations génétiques. *Les Actes du BRG*, 6: 335-353.
- Paniego, N.; Echaide, M.; Muñoz, M.; Fernández, L.; Torales, S.; Faccio, P.; Fuxan, I.; Carrera, M.; Zandomeni, R.; Suárez, E.Y. and Hopp, H.E. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*, 45: 34–43. DOI: 10.1139/G01-120.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

- Poverene, M.; Cantamutto, M. and Seiler, G.J. 2008. Ecological characterization of wild *Helianthus annuus* and *H. petiolaris* germplasm in Argentina. *Plant Genetic Resources Characterization and Utilization* (UK), 7(1): 42–49
- Rieseberg, L.H. and Seiler, G.J. 1990. Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae.). *Econ Bot*, 44:79–91
- Tang, S.; Kishore, V.K. and Knapp, S.J. 2003. PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower. *Theor Appl Genet*, 107:6–19
- Tang, S. and Knapp, S.J. 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in Native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theor Appl Genet*, 106:990–1003
- Ureta, M.S.; Carrera, A.; Cantamutto, M.A. and Poverene, M.M. 2008a. Gene flow among wild and cultivated sunflower, *Helianthus annuus* in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123: 343–349
- Ureta, S.; Cantamutto, M.; Carrera, A; Delucchi, C. and Poverene, M. 2008b. Natural hybrids between wild and cultivated sunflower. *Genet Resour Crop Evol*, 55: 1267-1277
- Wolfe, A.D.; Xiang, Q-Y. and Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125
- Yatabe, Y.; Kane, N.C.; Scotti-Saintagne, C. and Rieseberg L.H. 2007. Rampant gene exchange across a strong reproductive barrier between the annual sunflowers, *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Genetics*, 175:1883–1893
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183

Tabla 1: Número de alelos totales (**NT**), número de alelos únicos silvestres al compararlas con los genotipos cultivados (**NS**) y número de alelos únicos por población (**NU**) para marcadores ISSR y SSR en *H. annuus*.

		ALS	MAL	DIA	RAN	MAG	CBA	JCE	RCU	CAR	LCA
NT	ISSR	49	49	51	49	48	53	53	49	52	52
	SSR	18	12	12	12	15	19	20	17	17	18
NS	ISSR	5	5	7	4	6	6	8	4	6	6
	SSR	10	8	6	6	9	11	13	11	11	13
NU	ISSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SSR	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0

Figura 1: Medidas de diversidad genética para marcadores ISSR y SSR en *H. annuus*. Número de bandas polimórficas ISSR o de alelos SSR (**A**) y Heterocigocidad esperada (**B**) en líneas cultivadas (**C**), poblaciones silvestres (**S**) y en toda la muestra (**T**).

