



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

**VARIACIÓN NATURAL DE LA TOLERANCIA A
TEMPERATURAS EXTREMAS EN GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) SILVESTRE Y CULTIVADO**

Ing. Agr. Fernando Hernández

Directora: Dra. Mónica Poverene

Codirector: Dr. Alejandro Presotto

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2018

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre junio de 2015 y noviembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. Mónica Poverene y la codirección del Dr. Alejandro Presotto

.....



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mi mamá. Por el apoyo incondicional. Tan simple como imprescindible. Sería injusto agradecerle solo por el apoyo durante esta tesis.

A Mónica Poverene y Alejandro Presotto. Por la posibilidad de unirme al grupo durante el desarrollo de esta tesis. Por su guía y enseñanza constante. No existen palabras para agradecerles cuánto aprendí de ustedes.

A mi novia y compañera de vida, Anita Achilli. Por su amor, alegría y sobre todo paciencia en la etapa final de la tesis.

Al grupo de trabajo, Mónica Poverene, Alejandro Presotto, Claudio Pandolfo, Boris Vercellino, Francisco Torres Carbonel, Soledad Ureta, Marta Miravalles, Sofía Tilleria, Miguel Cantamutto, Agustina Gutierrez, Ana Mondon. Por la cálida bienvenida y la siempre excelente predisposición.

Al grupo de CERZOS, Alicia Carrera, Marina Diaz, Antonio Garayalde, Selva Cuppari, Daniela Soresi y Jessica Basualdo por la invaluable ayuda durante mis primeros pasos en el laboratorio y su excelente predisposición.

A la Dra. Jennifer Mandel por la posibilidad de trabajar en su laboratorio durante la etapa final de esta tesis y vivir una experiencia increíble fuera del país. A Ram, Adam, Mike, Paige y Erika por la cálida bienvenida en Memphis.

A los tesinistas con los que tuve el agrado de trabajar durante esta tesis, Hernán Irazabal, Camila Giacomozzi, Aldana Alonso, Matías Ledesma e Iván Diez.

A Soledad Ureta. Por abrirme las puertas de la cátedra de Genética, por la siempre excelente predisposición para ayudar y por contagiarme la pasión por lo que hacemos.

A Claudio Pandolfo, Boris Vercellino y Alejandro Presotto. Colegas y amigos con los que tengo la fortuna de compartir el día a día y a los que profundamente aprecio y admiro.

Al Departamento de Agronomía de la UNS. Por facilitarme las instalaciones donde se realizaron la mayor parte de los experimentos de esta tesis.

A CONICET. Por haber otorgado las becas de Doctorado que me permitieron realizar esta tesis.

A la Fundación Bunge y Born y a la comisión Fulbright. Por la beca otorgada para realizar una estadia de investigación en Estados Unidos.

Al jurado de esta tesis, los Doctores Gustavo Rodriguez, Diego Batlla y Luis Hernández por mejorar la versión final con sus valiosas sugerencias.

RESUMEN

Las plantas invasoras, además de representar una amenaza ambiental y económica, son excelentes modelos para el estudio de la evolución contemporánea y la predicción de las respuestas evolutivas ante el calentamiento global. Los parientes silvestres de un cultivo son un caso especial de especies invasoras debido a que su presencia puede dificultar el uso de tecnologías en sus parientes cultivados, la hibridación cultivo-silvestre puede catalizar la evolución de poblaciones invasoras y estas pueden ser consideradas una fuente de germoplasma útil para el mejoramiento. El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie nativa de Norteamérica. *H. annuus* es un grupo taxonómico complejo, integrado por el cultivo, poblaciones silvestres e híbridos cultivo-silvestre. Esta especie fue introducida y se naturalizó fuera de su rango nativo en varias regiones del mundo. Esto hace que el girasol sea un modelo ideal para estudiar aspectos evolutivos asociados a la domesticación, la evolución de poblaciones invasoras y la hibridación cultivo-silvestre. En Argentina, el girasol silvestre fue probablemente introducido como cultivo forrajero y se naturalizó y expandió por la zona central del país, convirtiéndose en una especie invasora no nativa. El objetivo general de esta tesis fue evaluar la presencia de variabilidad genética para la tolerancia a temperaturas extremas (<0°C y >40°C) usando un enfoque ecológico-evolutivo. Los objetivos específicos fueron: 1) evaluar la importancia relativa del efecto materno y de la hibridación sobre caracteres del fruto (dormición, peso, tamaño y anatomía del pericarpio) en híbridos cultivo-silvestre; 2) evaluar la existencia de adaptación rápida de los caracteres del fruto (dormición, peso y tamaño) en el rango no-nativo de girasol; 3) evaluar la divergencia evolutiva entre materiales silvestres y cultivados para la tolerancia a temperaturas extremas durante estadios vegetativos tempranos; 4) evaluar diferencias en la tolerancia a estrés por calor durante estadios reproductivos en materiales silvestres y cultivados de girasol y variaciones geográficas de la tolerancia a estrés dentro del germoplasma silvestre; 5) evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional del girasol silvestre de Argentina y caracterizar los principales procesos genéticos asociados a la invasión. Como material vegetal se utilizaron poblaciones no-nativas de girasol silvestre en Argentina, colectadas por el grupo de trabajo junto con poblaciones nativas y no-nativas de Australia, provistas por el USDA y materiales cultivados, tanto híbridos comerciales de Argentina como líneas públicas de EEUU. Todas las poblaciones silvestres utilizadas fueron geo-referenciadas y su ambiente local se caracterizó usando una base de datos climáticos pública. La evaluación de adaptación local y/o evolución rápida se realizó mediante técnicas estadísticas utilizadas en biogeografía. Se observó una gran divergencia entre biotipos silvestres y cultivados, de manera esperada para caracteres del fruto que fueron objetivo de la domesticación, tales como la dormición y el tamaño de los frutos, pero también en caracteres que probablemente no fueron, al menos de manera consciente, seleccionados durante la

domesticación, tales como la tolerancia a temperaturas extremas. Dentro del germoplasma silvestre se observó divergencia entre poblaciones del rango nativo, explicadas por diferencias en su ambiente local, en dormición y tolerancia a estrés por calor. Se encontraron grandes diferencias entre poblaciones nativas e invasoras que no pudieron ser explicadas totalmente por diferencias en las condiciones climáticas entre ambientes. Finalmente, se encontró que las poblaciones argentinas retuvieron la mayor parte de la variabilidad genética presente en el rango nativo, lo que ayuda a explicar la diversidad observada en caracteres adaptativos como la dormición y de interés agronómico como la tolerancia a temperaturas extremas.

ABSTRACT

Invasive plants represent a major environmental and economic threat, but they are also valuable models to study contemporary evolution and to predict evolutionary responses to global change. Crop wild relatives are a special case of invasive species because their presence can limit the use of technology in their crop relatives, crop-wild hybridization may catalyze the evolution of invasiveness and invasive populations can be considered useful germplasm sources for the purposes of breeding. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is native to North America. *H. annuus* is a complex taxonomic group, formed by domesticated sunflower, wild populations and crop-wild hybrids. Wild sunflower was introduced and naturalized out of their native range in several regions worldwide. This make sunflower an ideal model system to study the evolutionary aspects associated to domestication, evolution of invasiveness and crop-wild hybridization. In Argentina, wild sunflower was probably introduced as an experimental forage crop and since then it has spread over the central region, being currently considered a non-native, invasive species. The main objective of this thesis was to evaluate the presence of genetic variability in the tolerance to extreme temperatures (<0°C y >40°C) by using an ecological-evolutionary approach. The specific objectives were to: 1) evaluate the relative importance of maternal and hybridization effects on seed traits (dormancy, weight, size and pericarp anatomy) in crop-wild sunflower hybrids; 2) evaluate the existence of rapid adaptation of seed traits (dormancy, weight and size) in the non-native range; 3) evaluate the evolutionary divergence in the tolerance to extreme temperatures during early vegetative phases; 4) evaluate differences in heat stress tolerance during reproductive phases between cultivated and wild sunflower and to explore geographic variations in heat stress tolerance within the wild germplasm; and 5) evaluate the genetic diversity and population structure of wild Argentinean sunflower and to characterize the genetic processes associated with the invasion by using molecular tools. Wild germplasm consisted of wild populations from Argentina and Australia (invasive range), and North America (native range). Wild populations from Argentina were collected by our research group while populations from Australia and North America were provided by the USDA. Cultivated germplasm consisted of commercial hybrids currently grown in Argentina and public inbred lines from USA. Geographic coordinates of every wild populations were used to characterize their local environment by using a public climatic database. Biogeographic tools were used for evaluating local adaptation and/or rapid evolution. Mainly, we found high divergence between wild and cultivated sunflower in fruit traits that were target of domestication (e.g. dormancy and size) but also in non-target traits during domestication (at least not consciously selected for) as tolerance to extreme temperatures. Within wild sunflower, we observed divergence among native populations for both adaptive traits (as seed dormancy) and agronomic traits (as heat tolerance), which were explained by differences in their local environment. In addition, we

observed genetic differences between native and invasive populations, which could not be fully attributed to differences in climatic conditions between ranges. Finally, we found that wild sunflower from Argentina has retained most of the genetic variation observed in the native range, which helps explaining the wide diversity observed in both adaptive and agronomic traits.

ÍNDICE

PREFACIO	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	17
<i>Objetivo general</i>	17
<i>Objetivos específicos</i>	17
CAPÍTULO 1: El rol de la domesticación y el efecto materno en caracteres morfológicos/anatómicos y en la dormición de frutos de híbridos cultivo/silvestre de girasol.	19
INTRODUCCIÓN	19
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN	39
CAPÍTULO 2: Evolución rápida de la dormición durante la invasión del girasol en Argentina.....	46
INTRODUCCIÓN	46
MATERIALES Y MÉTODOS	48
RESULTADOS.....	53
DISCUSIÓN	64
CAPÍTULO 3: Tolerancia a eventos extremos de temperatura en girasol silvestre y cultivado durante estadios vegetativos tempranos.	69
INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	71
RESULTADOS.....	78
DISCUSIÓN	84

CAPÍTULO 4: Efecto del estrés por calor sobre caracteres reproductivos en girasol silvestre y cultivado: evidencia de adaptación local dentro del germoplasma silvestre	87
INTRODUCCIÓN	87
MATERIALES Y MÉTODOS	89
RESULTADOS	98
DISCUSIÓN	109
CAPÍTULO 5: Diversidad genética y estructura poblacional del girasol silvestre en Argentina: rastros genéticos del proceso de invasión	113
INTRODUCCIÓN	113
MATERIALES Y MÉTODOS	116
RESULTADOS	120
DISCUSIÓN	134
CONSIDERACIONES FINALES	139
REFERENCIAS	142
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA EN EL TRANCURSO DE ESTA TESIS	162

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Parentales maternos y paternos usados en los cuatro tipos de cruzamiento.....	23
Tabla 1.2. GLMM para la germinación en cada uno de los cuatro tiempos evaluados.....	28
Tabla 1.3. MANOVA para los dos juegos de caracteres.....	31
Tabla 2.1. Localización geográfica de las poblaciones de girasol silvestre.	49
Tabla 2.2. Variables BIOCLIM utilizadas para los análisis de componentes principales y canónico discriminante.....	52
Tabla 2.3. Análisis de la varianza y covarianza para los cinco caracteres del fruto.....	54
Tabla 2.4. Análisis de la varianza para la germinación de los frutos en T1 y T2 bajo tres temperaturas de incubación constantes	60
Tabla 2.5. Análisis de covarianza para los cinco caracteres del fruto usando independientemente BIO1, BIO3 y BIO5 como covariables.	61
Tabla 3.1. Información sobre los tratamientos y biotipos incluidos en cada experimento.....	73
Tabla 4.1. Poblaciones silvestres utilizadas en el presente capítulo y su ubicación.....	90
Tabla 4.2. Media y error estándar para los cuatro caracteres reproductivos (DC, PF, NF y REND) en cada uno de los tres grupos (Cultivados, Nativos e Invasores), en condiciones control y de EC y en los años 1 y 2.	95
Tabla 4.3. Variables BIOCLIM utilizadas en los análisis de componentes principales.....	97
Tabla 4.4. Media y error estándar de las variables ambientales registradas para la estación completa de crecimiento y la etapa de floración.	99
Tabla 4.5. Análisis de la varianza y covarianza para el número de frutos y el rendimiento, con y sin los PCs de las variables ambientales como covariables.	106
Tabla 5.1. Variables morfológicas utilizadas para el análisis discriminante de las 15 poblaciones utilizadas en este capítulo.....	119
Tabla 5.2. Diversidad genética, basada en 14 SSR nucleares y tres SSR del cloroplasto, de poblaciones de <i>H. annuus</i> provenientes de Estados Unidos y Argentina.....	121
Tabla 5.3. Estimaciones de F_{ST} apareados basadas en 10000 permutaciones, utilizando 14 marcadores SSR nucleares	122
Tabla 5.4. Parámetros demográficos previos y estimados para el escenario más probable en los modelos ABC 1 y 2.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Germinación de los frutos en cuatro momentos después de la cosecha e incubados en distintas temperaturas.....	29
Figura 1.2. Anatomía del pericarpio, observada con un microscopio electrónico de barrido, de frutos del cultivo, silvestres, y de híbridos cultivo-silvestre.	33
Figura 1.3. Anatomía del pericarpio observado con el microscopio óptico.....	34
Figura 1.4. Efecto de la hibridación con el cultivo sobre la germinación de los frutos en diferentes momentos y temperaturas de incubación.....	36
Figura 1.5. Relación entre la morfología y la germinación de frutos.....	38
Figura 2.1. Diferencias entre rangos en los caracteres del fruto.	55
Figura 2.2. Variabilidad ambiental dentro de los rangos nativos y no-nativos del girasol silvestre.	57
Figura 2.3. Relación entre la latitud y la germinación de los frutos en el girasol nativo y no-nativo.....	59
Figura 2.4. Germinación de los frutos de poblaciones nativas e invasoras de girasol incubados en tres temperaturas constantes.....	63
Figura 3.1. Vista de las parcelas en los distintos tipos de experimento.	74
Figura 3.2. Tratamiento óptimo para la evaluación de la tolerancia a temperaturas extremas en girasol cultivado y silvestre.....	79
Figura 3.3. Diferencias entre tipo de germoplasma en la tolerancia a temperaturas extremas.	81
Figura 3.4. Relación entre el porcentaje de alelos del cultivo y la biomasa previo al estrés y la supervivencia en los experimentos en cámara de crecimiento.....	83
Figura 4.1. Bolsas de papel utilizadas para los tratamientos control y estrés por calor	92
Figura 4.2. Número de frutos y rendimiento relativos en los grupos cultivados, nativos e invasores para los años 1 y 2.....	102
Figura 4.3. Variabilidad climática de los ambientes locales de poblaciones nativas y no-nativas de girasol.....	104
Figura 4.4 Número de frutos y rendimiento relativos en los grupos nativos y no-nativos.....	102
Figura 4.5. Relación entre el PC1 _{agua} y el número de frutos y rendimiento relativos.	106
Figura 4.6. Rendimiento relativo de cada uno de los biotipos utilizados en el presente capítulo en los años 1 y 2.....	108

Figura 5.1. Análisis bayesiano de la estructura genética para K=3 y K=6 basado en 14 SSR nucleares.....	124
Figura 5.2. Análisis de coordenadas principales de la estructura genética.....	125
Figura 5.3. Distribución geográfica de los grupos genéticos y los haplotipos en Estados Unidos y Argentina.....	127
Figura 5.4. Partición de la variación genética para los 14 SSR nucleares y los tres SSR del cloroplasto.....	128
Figura 5.5. Análisis discriminante de la estructura genética basado en 19 variables morfológicas y cuatro variables fenológicas.....	129
Figura 5.6 Escenarios de invasión del modelo ABC 1 evaluados en DIYABC.....	131
Figura 5.7. Escenarios de invasión del modelo ABC 2 evaluados en DIYABC.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

AAL: Población ruderal de Adolfo Alsina, Buenos Aires.
AK: Población silvestre del estado de Arkansas, Estados Unidos.
AMOVA: Análisis molecular de la varianza.
ANCOVA: Análisis de covarianza.
ANOVA: Análisis de la varianza.
AR: Población silvestre del estado de Arizona, Estados Unidos.
ARG: Argentina.
BAR: Población ruderal de Colonia Barón, La Pampa.
BIOCLIM: Variable climática biológicamente relevante de la base de datos pública WorldClim.
BL: Capa negra.
BRW: Población agrestal de Barrow, cerca de Tres Arroyos, Buenos Aires
CA: Población silvestre del estado de California, Estados Unidos.
Can: Eje canónico del análisis canónico discriminante.
CC: Cámara de crecimiento.
CDA: Análisis canónico discriminante.
CL: Resistencia a herbicida Clearfield
CO: Población silvestre del estado de Colorado, Estados Unidos.
DC: Diámetro del capítulo (cm).
Den g.l.: Denominador de los grados de libertad.
DIA: Población ruderal de Diamante, Entre Ríos.
EAU: Población silvestre no-nativa del estado de Nueva Gales del Sur, Australia.
EC: Estrés por calor.
EEUU: Estados Unidos de América.
EF: Estrés por helada.
F1: Primera generación.
G.l.: Grados de libertad.
GLMM: Modelos lineales mixtos generalizados.
H: Hipodermis.
ICCL: Células de la capa interna comprimidas.
IL: Población silvestre del estado de Illinois, Estados Unidos.
IN: Población silvestre del estado de Indiana, Estados Unidos.
IO: Población silvestre del estado de Iowa, Estados Unidos.
LMA: Población ruderal de Las Malvinas, Mendoza.
MAG: Población ruderal de Media Agua, San Juan.
MANOVA: Análisis multivariado de la varianza.
MI: Población silvestre del estado de Misuri, Estados Unidos.
ML: Capa media.
MO: Población silvestre del estado de Montana, Estados Unidos.

ND: Población silvestre del estado de Dakota del Norte, Estados Unidos.

NF: Número de frutos.

NM: Población silvestre del estado de Nueva Mexico, Estados Unidos.

OH: Población silvestre del estado de Ohio, Estados Unidos.

OK: Población silvestre del estado de Oklahoma, Estados Unidos.

PC: Eje componente principal.

PCA: Análisis de componentes principales.

PCo: Eje coordenada principal.

PCoA: Análisis de coordenadas principales.

PF: Fibras poligonales.

PF: Peso de un fruto (mg).

PL: Capa de fitomelanina.

PR: Rayos parenquimáticos.

PROC CANDISC: Paquete estadístico de SAS para análisis discriminante.

PROC GLIMMIX: Paquete estadístico de SAS para análisis de la varianza utilizando GLMM.

PROC PRINCOMP: Paquete estadístico de SAS para análisis de componentes principales.

PROC REG: Paquete estadístico de SAS para el análisis de regresión lineal simple y múltiple.

QTL: loci de caracteres cuantitativos.

RCU: Población ruderal de Río Cuarto, Córdoba.

REND: Rendimiento del capítulo (mg).

SA: Población silvestre del estado de Saskatchewan, Canadá.

SAU: Población silvestre no-nativa del estado de Australia Meridional, Australia.

TX: Población silvestre del estado de Texas, Estados Unidos.

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

WAU: Población silvestre no-nativa del estado de Australia Occidental, Australia.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas invasoras representan una gran amenaza ambiental y económica, degradando la biodiversidad nativa (Pimentel *et al.* 2005), disminuyendo la producción de cultivos y pasturas (cuando actúan como malezas agrícolas) (Ellstrand *et al.* 2010; Casquero *et al.* 2013) y limitando el uso de tecnologías en sus parientes cultivados, debido al flujo génico (Presotto *et al.* 2011; Mandel *et al.* 2016; Pandolfo *et al.* 2018). Además, las poblaciones invasoras representan un excelente modelo para estudiar la evolución en escalas de tiempo contemporáneas, la rápida adaptación local (Colautti y Barrett 2013; Turner *et al.* 2013; Colautti y Lau 2015) y para predecir respuestas evolutivas al calentamiento global (Moran y Alexander 2014). Las especies emparentadas con los cultivos representan un caso especial de especies invasoras debido a que el flujo génico entre dos taxones divergentes (cultivo y silvestre) puede influir en la adaptación y expansión a nuevos ambientes. Además, debido al fuerte cuello de botella asociado a la domesticación de los cultivos, los parientes silvestres representan la reserva natural más importante de variabilidad genética para el mejoramiento actual y futuro de las especies cultivadas (Hajjar y Hodgkin 2007; Dempewolf *et al.* 2017; Prohens *et al.* 2017).

Además de su mayor variabilidad genética, las poblaciones silvestres presentan adaptación local. La adaptación local puede ser definida como un proceso en el cual la selección natural favorece caracteres/alelos que maximizan la aptitud biológica en un determinado ambiente (y no necesariamente en otros) de los individuos que los portan (Kronholm *et al.* 2012; Wolfe y Tonsor 2014). En las especies de amplia distribución se espera que aún en presencia de flujo génico entre poblaciones, estas presenten diferencias en los caracteres/frecuencias alélicas que le confieren una ventaja en su ambiente local (Montesinos-Navarro *et al.* 2011). Por ejemplo, en especies distribuidas a lo largo de un gradiente latitudinal se espera que las poblaciones de altas latitudes presenten caracteres adaptativos que permitan la supervivencia al frío mientras que poblaciones de bajas latitudes puedan prescindir de la tolerancia al frío y necesiten adaptarse a las altas temperaturas, la mayor competencia y/o el estrés hídrico (Koehler *et al.* 2012). La variación gradual de uno o más caracteres a lo largo de su distribución geográfica, es denominada cline o variación clinal (Huxley 1938) y sugiere que sobre esos caracteres está actuando la selección natural. La divergencia de poblaciones o especies relacionadas debido a la adaptación local es un proceso comprobado que motivó la formulación de la teoría de la evolución de Charles Darwin. Sin embargo, la adaptación local a través de cambios evolutivos en escalas de tiempo ecológicas (p. ej. 15-150 años; evolución rápida) fue ampliamente ignorada en estudios ecológicos y actualmente se considera fundamental en la adaptación de las especies invasoras a los nuevos ambientes (Xu *et al.* 2010; Colautti y Barrett 2013; Colautti y Lau 2015).

Durante la domesticación, la selección consciente e inconsciente de los primeros agricultores cambió el fenotipo de las plantas cultivadas respecto de sus antecesores silvestres (Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). Los caracteres típicos de la domesticación incluyen frutos grandes sin dormición, retención de frutos, crecimiento temprano rápido y altos índices de cosecha (Mercer *et al.* 2007; Hancock 2012; Presotto *et al.* 2012). El incremento en la utilización de recursos para crecimiento en los cultivos posiblemente redujo la cantidad de recursos destinados a la tolerancia del estrés biótico (Agrawal *et al.* 2015) y abiótico (Koziol *et al.* 2012). La compensación entre el crecimiento y la tolerancia a estrés se ha sugerido como un factor clave en la distribución de especies silvestres (Koehler *et al.* 2012; Oakley *et al.* 2014; Wos y Willi 2015) y en la evolución del cultivo y de biotipos maleza de girasol (Mayrose *et al.* 2011; Koziol *et al.* 2012; Presotto *et al.* 2017).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie nativa de Norteamérica, de amplia distribución, domesticada hace aproximadamente 4000 años en la actual región centro-este de Estados Unidos. *H. annuus* es un grupo taxonómico complejo, integrado por la especie cultivada (*H. annuus* var. *macrocarpus*), biotipos ruderales (asociados principalmente a ambientes no agrícolas) y agrestales (malezas) e híbridos cultivo-silvestre, los cuales pueden actuar como malezas. Además, esta especie fue introducida y se naturalizó fuera de su rango nativo en el sur de Europa (Muller *et al.* 2011), el sur de Australia (Seiler *et al.* 2007) y la región central de Argentina (Cantamutto *et al.* 2008, 2010a; Poverene *et al.* 2008). Esto hace que el girasol sea un modelo ideal para estudiar aspectos evolutivos asociados a la domesticación, la evolución de poblaciones invasoras y malezas y la hibridación cultivo-silvestre. El girasol cultivado es actualmente uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo y en algunos países (p. ej. EEUU, Argentina, Australia, Francia, España y Serbia) su zona de producción se solapa con el área de distribución de especies silvestres emparentadas. En la mayor parte de estos lugares la hibridación espontánea entre el girasol cultivado y silvestre ha sido bien documentada. En Argentina, el girasol silvestre fue probablemente introducido como cultivo forrajero experimental hace aproximadamente 70 años, a partir del cual se naturalizó y se expandió por la zona central del país, convirtiéndose en una especie invasora no nativa (Poverene *et al.* 2008; Cantamutto *et al.* 2010a, b; Presotto *et al.* 2011). Sin embargo, los procesos genéticos asociados a la invasión del girasol en Argentina (efecto fundador, fuente de introducción, introducciones múltiples) aún no han sido explorados.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

El objetivo de esta tesis fue evaluar la variación natural de la tolerancia a temperaturas extremas en girasol silvestre y cultivado, utilizando un enfoque ecológico-evolutivo.

Objetivos específicos

Hipótesis 1: El efecto materno influye sobre los caracteres del fruto, especialmente en el comportamiento de los híbridos entre taxones altamente divergentes, como los materiales silvestres y cultivados.

Objetivo 1: Evaluar la importancia relativa del efecto materno y de la hibridación sobre caracteres del fruto en híbridos cultivo-silvestre.

Hipótesis 2: Los caracteres del fruto son importantes en la adaptación local en el rango nativo, lo que da como resultado variaciones clinales. La adaptación rápida de las poblaciones no-nativas puede detectarse a través de cambios genéticos en estos caracteres en respuesta a la introducción en nuevos ambientes.

Objetivo 2: Evaluar la existencia de adaptación rápida de los caracteres del fruto en el rango no-nativo de girasol comparando los caracteres del fruto y las condiciones ambientales de poblaciones del rango nativo y no-nativo.

Hipótesis 3: Debido a la fuerte presión de selección por mayor crecimiento en condiciones artificialmente benignas durante la domesticación, los materiales cultivados presentan mayor crecimiento en ausencia de estrés y menor tolerancia a estrés, como las temperaturas extremas.

Objetivo 3: Evaluar la divergencia evolutiva entre materiales silvestres y cultivados para la tolerancia a temperaturas extremas durante estadios vegetativos tempranos.

Hipótesis 4: Debido a la adaptación local, los materiales silvestres son más tolerantes al estrés por calor durante estadios reproductivos que los materiales cultivados. Los materiales silvestres presentan una variación clinal en la tolerancia a estrés por calor, a mayores temperaturas en el ambiente local, mayor tolerancia y viceversa.

Objetivo 4: Evaluar diferencias en la tolerancia a estrés por calor durante estadios reproductivos en materiales silvestres y cultivados de girasol y variaciones geográficas de la tolerancia a estrés dentro del germoplasma silvestre.

Hipótesis 5: La diversidad genética de las poblaciones no-nativas es menor respecto de las nativas debido a los cuellos de botella demográficos durante la introducción y expansión en el rango no-nativo. Las poblaciones no-nativas presentaran menor estructura poblacional que las nativas por los menores tiempos de divergencia.

Objetivo 5: Evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional del girasol silvestre de Argentina y caracterizar los principales procesos asociados a la invasión.

CAPÍTULO 1

El rol de la domesticación y el efecto materno en caracteres morfológicos/anatómicos y en la dormición de frutos de híbridos cultivo-silvestre de girasol

INTRODUCCIÓN

La hibridación, seguida por la introgresión de alelos entre las especies cultivadas y sus parientes silvestres tiene implicancias en la dinámica de las poblaciones naturales como la reducción de su variabilidad genética y el incremento en la capacidad invasora tanto de ambientes naturales como cultivados (Ellstrand *et al.* 1999; Mercer *et al.* 2014). Además, la hibridación entre especies cultivadas y silvestres puede promover el surgimiento de poblaciones ferales, las cuales constituyen poblaciones estables de malezas con origen cultivado (Warwick y Stewart, 2005; Bagavathiannan y Van Acker, 2008; Ellstrand *et al.* 2010). En este capítulo, definimos malezas como aquellas poblaciones que interfieren en los sistemas agrícolas, compitiendo con los cultivos por recursos, mientras que las poblaciones silvestres son aquellas que crecen y se reproducen fuera de los ambientes agrícolas, sean nativas o no (Ellstrand *et al.* 1999, 2010). La hibridación ocurre cuando plantas cultivadas y silvestres en estado reproductivo coinciden espacial y temporalmente y en el caso de especies polinizadas por insectos, comparten polinizadores (Ellstrand *et al.* 1999). La hibridación natural entre cultivos y sus parientes silvestres ha sido documentada en la mayoría de las especies cultivadas y en varios casos con implicancias en la evolución de malezas (revisado en Ellstrand *et al.* 1999, 2013).

Durante el proceso de domesticación, tanto la selección directa por los primeros agricultores como la selección indirecta como resultado de las prácticas agrícolas (p. ej. mayor disponibilidad de agua, nutrientes, menor presión de plagas) cambiaron el fenotipo de los cultivos respecto de sus antecesores silvestres (síndrome de domesticación; Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). Tales cambios fueron generalmente producto de una fuerte selección sobre un pequeño número de loci de caracteres cuantitativos (QTL), cada uno con grandes efectos sobre el fenotipo (Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). El girasol domesticado presenta el típico síndrome de domesticación, esto es, frutos grandes con baja dormición, crecimiento determinado, inflorescencia mono-cefálica, retención de frutos en la planta madre y un incremento tanto en la partición de biomasa a estructuras reproductivas como en el rendimiento de los frutos por planta (Purugganan y Fuller 2009; Presotto *et al.* 2011; Meyer y Purugganan 2013). Sin embargo, análisis genéticos en girasol han demostrado que un

gran número de QTL de efecto menor controlan estos caracteres (Burke *et al.* 2002; Wills y Burke 2007)

Los híbridos cultivo-silvestre de primera generación (F1) presentan comúnmente valores intermedios para la mayoría de los caracteres en los cuales sus padres difieren (Mercer *et al.* 2007; Presotto *et al.* 2011). Sin embargo, algunos caracteres de las poblaciones híbridas como los caracteres asociados a los frutos/semillas, dependen fuertemente del parental materno (Roach 1987; Snow *et al.* 1998; Weiss *et al.* 2013; Alexander *et al.* 2014; Mercer *et al.* 2014; Presotto *et al.* 2014; Pace *et al.* 2015). El parental materno afecta los caracteres del fruto a través de los tejidos que rodean al embrión en desarrollo, principalmente el pericarpio (Roach 1987). Estos tejidos comienzan su desarrollo independientemente de la fertilización y pueden tener una gran influencia sobre el tamaño y morfología de los frutos, y sobre caracteres funcionales como la dormición y germinación de las semillas.

La dormición de las semillas puede ser definida como una propiedad innata de los mismos que impide la germinación bajo ciertas condiciones ambientales, las cuales en ausencia de dormición son favorables para la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). Mientras que los requerimientos para la germinación (principalmente temperatura y humedad) impiden la germinación en ambientes desfavorables, la dormición es un fenómeno mucho más complejo que impide la germinación en ambientes solo efímeramente favorables (Willis *et al.* 2014). Por esto, la dormición juega un rol ecológico fundamental, contribuyendo a la formación de un banco de semillas persistente, necesario para la dispersión en el tiempo, la supervivencia en condiciones desfavorables y el establecimiento de poblaciones naturales (Alexander y Schrag 2003; Montesinos-Navarro *et al.* 2012). Además, por ser los primeros caracteres del ciclo de vida, la dormición y la germinación pueden ser fuertemente seleccionados durante la colonización de nuevos ambientes, condicionando la selección de otros caracteres expresados más tarde en el ciclo de vida (Huang *et al.* 2010; Chiang *et al.* 2013; Willis *et al.* 2014). En especies cultivadas, la selección por una rápida y uniforme germinación ha disminuido la dormición, el grosor de las cubiertas seminales y ha incrementado el tamaño de las semillas (Hancock 2012). Al igual que otros caracteres asociados a la domesticación en girasol, la dormición de los frutos es controlada por varios QTL de efecto menor (Burke *et al.* 2002; Gandhi *et al.* 2005; Wills y Burke 2007). En este sentido, un análisis de la estructura genética de la dormición encontró 43 QTL asociados a la dormición, en seis grupos de ligamiento (Brunick 2007) exhibiendo la alta complejidad de la dormición en girasol.

El girasol cultivado fue domesticado aproximadamente hace 4000 años a partir del girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.) en el actual centro-este de EEUU (Harter *et al.* 2004; Blackman *et al.* 2011). *H. annuus* es un grupo taxonómico complejo, integrado por la especie cultivada (*H. annuus* var. *macrocarpus*), biotipos ruderales (asociados principalmente a ambientes no

agrícolas) y agrestales (malezas) e híbridos cultivo-silvestre, los cuales pueden actuar como malezas. Esto hace que el girasol sea un sistema modelo ideal para estudiar aspectos evolutivos asociados a la domesticación, a la evolución de malezas y a la hibridación cultivo-silvestre. El girasol cultivado es actualmente uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo y en algunos países (e.g. EEUU, Argentina, Australia, Francia, España y Serbia) su zona de producción se solapa con el área de distribución de especies silvestres emparentadas. En la mayor parte de estos lugares la hibridación espontánea entre el girasol cultivado y silvestre ha sido bien documentada (Snow *et al.* 1998; Ureta *et al.* 2008a, b; Muller *et al.* 2011). De las especies de girasol silvestre, *H. annuus* es la de mayor área de distribución. En Argentina, esta especie fue probablemente introducida como cultivo forrajero experimental hace aproximadamente 70 años, a partir del cual se naturalizó y se expandió por la zona central del país, convirtiéndose en una especie invasora no nativa (Poverene *et al.* 2008; Cantamutto *et al.* 2010a, b; Presotto *et al.* 2011).

El girasol presenta dormición fisiológica leve (DF; Oracz *et al.* 2007). Los frutos con DF son permeables al agua y tienen mecanismos de inhibición en el embrión, los cuales impiden la emergencia de la radícula (Baskin y Baskin 2004). Los embriones extraídos de frutos con DF producen plántulas normales y este tipo de dormición puede ser removida o aliviada con tratamientos con ácido giberélico, escarificando los frutos, almacenando los frutos bajo condiciones de baja humedad y estratificando las semillas (Baskin y Baskin 2004; Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006; Presotto *et al.* 2014). Además, las cubiertas seminales pueden prevenir la germinación restringiendo el intercambio de agua y oxígeno con el ambiente, aportando inhibidores de la germinación y/o impidiendo físicamente la emergencia de la radícula (Baskin y Baskin 2004)

A pesar de la importancia de los caracteres del fruto en la colonización de nuevos ambientes, poca importancia se le ha dado al rol ecológico del efecto materno sobre los caracteres del fruto en híbridos cultivo-silvestre. Un fuerte efecto materno sobre la dormición, junto con más sutiles y variables efectos paternos han sido recientemente reportados en híbridos cultivo-silvestre de girasol (Weiss *et al.* 2013; Alexander *et al.* 2014; Presotto *et al.* 2014; Pace *et al.* 2015). Sin embargo, la mayoría de estos estudios han focalizado en la hibridación en un sentido (cultivo a silvestre) y pocas exploraron caracteres anatómicos y/o morfológicos del fruto posiblemente involucrados en las diferencias en dormición.

En este capítulo, se investigó la dinámica de la dormición de frutos y se exploraron caracteres anatómicos y morfológicos del fruto, posiblemente involucrados en la dormición de los mismos, usando cruzamientos recíprocos de girasol silvestre y cultivado. Los objetivos específicos fueron: 1) Cuantificar el efecto materno y de hibridación sobre la dormición del fruto en diferentes momentos después de cosecha; 2) Explorar diferencias anatómicas y morfológicas

entre los híbridos cultivo-silvestre y sus parentales y 3) Detectar caracteres anatómicos y morfológicos de los frutos que regulan su dormición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma

Se utilizaron cruzamientos recíprocos de materiales silvestres y cultivados de girasol. Las poblaciones silvestres fueron colectadas en la región central de Argentina (Cantamutto *et al.* 2010a): Diamante (DIA; S 32°03' W 60°38') y Colonia Barón (BAR; S 36°10' W 63°53') las cuales fueron seleccionadas para este estudio por tener niveles de dormición contrastante (Presotto *et al.* 2014). Los materiales cultivados utilizados fueron: Cacique CL (CAC; Criadero El Cencerro) y Paraíso 104CL (PAR; Nidera Semillas). Para minimizar los efectos del ambiente materno todos los frutos fueron producidos en jardín común en el Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina (S 38°41'38", W 62 °14'53") en la campaña 2012/2013. Una parcela de al menos 30 plantas por biotipo fue asignada aleatoriamente dentro del campo experimental. Cada parcela consistió en dos surcos de 5m de largo y plantas espaciadas a 1m y 0,3m (entre y dentro del surco, respectivamente) logrando una población de 3,3 plantas m². Para la implantación, la dormición de los frutos silvestres se redujo por estratificación, incubando los frutos en una cámara de crecimiento a 5°C durante una semana (ISTA 2004). Frutos pregerminados de las poblaciones silvestres fueron sembrados en bandejas plásticas de 200 celdas de 28x54cm (50cc por celda) y mantenida en invernadero por 30 días a 20-25°C. Los cultivares fueron sembrados manualmente en el jardín común y en V4-V6 (Schneiter y Miller 1981) se ajustó la densidad a 3,3 plantas por m² mediante raleo manual. La siembra/transplante se realizó el 5 de noviembre. Los experimentos fueron regados por goteo diariamente durante todo el ciclo y fertilizados con 80kg ha⁻¹ de fosfato diamónico antes de la siembra y 100kg ha⁻¹ de urea en V4-V6 para lograr un crecimiento óptimo.

Se realizaron todos los cruzamientos recíprocos excepto el cruzamiento entre materiales cultivados. Por lo tanto, 14 cruzamientos (de aquí en adelante biotipos) fueron utilizados y caracterizados de acuerdo a su parental materno y paterno y agrupados en cuatro categorías (tipo de cruzamiento; Tabla 1.1): silvestre, silvestre-cultivo (silvestre como parental materno), cultivo-silvestre (cultivo como parental materno) y cultivo. Los frutos de todos los biotipos fueron producidos bajo una polinización controlada de los capítulos de 20-30 plantas cubiertas con bolsas de papel en el estado R3-R4 (Schneiter y Miller 1981). Durante la floración, los capítulos fueron emasculados por la mañana y polinizados a la tarde con polen fresco del parental paterno correspondiente. Los frutos de los materiales cultivados fueron producidos por autopolinización, cubriendo los capítulos, previo a la floración, con bolsas de papel. Los frutos

de todos los biotipos fueron cosechados simultáneamente aproximadamente 30 días después de madurez fisiológica (R9; Schneider y Miller 1981) para permitir el secado en la planta madre. Los biotipos silvestres presentan una floración escalonada con una duración de 100 a 170 días, por lo tanto, para que la producción de frutos ocurra en el mismo momento los estados fenológicos de referencia para realizar los cruzamientos y cosechar los capítulos fueron tomados del cultivo. Esto es, en R4 del cultivo se taparon capítulos de todos los biotipos de manera simultánea y se realizaron todos los cruzamientos.

Tabla 1.1. Parentales maternos y paternos usados en los cuatro tipos de cruzamiento. BAR: Colonia Barón; CAC: Cacique CL; DIA: Diamante; PAR: Paraíso 104 CL. BAR y DIA son poblaciones silvestres de Argentina elegidas por su nivel contrastante de dormición (BAR con alta dormición y DIA con baja dormición; Presotto et al. 2014) mientras que CAC y PAR son materiales cultivados elegidos de manera aleatoria.

Biotipo	Tipo de cruzamiento	Materno	Paterno
BAR	silvestre	BAR	BAR
BAR x DIA	silvestre	BAR	DIA
DIA	silvestre	DIA	DIA
DIA x BAR	silvestre	DIA	BAR
BAR x CAC	silvestre-cultivo	BAR	CAC
BAR x PAR	silvestre-cultivo	BAR	PAR
DIA x CAC	silvestre-cultivo	DIA	CAC
DIA x PAR	silvestre-cultivo	DIA	PAR
CAC x BAR	cultivo-silvestre	CAC	BAR
CAC x DIA	cultivo-silvestre	CAC	DIA
PAR x BAR	cultivo-silvestre	PAR	BAR
PAR x DIA	cultivo-silvestre	PAR	DIA
CAC	cultivo	CAC	CAC
PAR	cultivo	PAR	PAR

Experimentos de germinación

Los experimentos de germinación se llevaron a cabo bajo un diseño completamente aleatorizado en diferentes momentos: inmediatamente (T1); a las dos semanas (T2); a los 6 meses (T3); y 18 meses (T4) después de la cosecha. Entre momentos, los frutos fueron almacenados en bolsas trilaminadas de aluminio para protegerlos de la luz y la humedad. Después de T2, los frutos fueron almacenados en una cámara de crecimiento a 5°C constantes durante seis meses (frutos usados en T3). Después de T3, los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente durante 12 meses (T4). En cada uno de los momentos, los frutos fueron puestos en bandejas cerradas, con base de papel y humedecidas con agua destilada a temperatura constante de 20°C y fotoperiodo neutro (12 horas de luz/oscuridad). Los frutos germinados de cada repetición fueron contados periódicamente (cada 2-3 días) durante 16 días. La temperatura de incubación fue elegida de acuerdo a un estudio previo donde el efecto de la hibridación sobre la germinación fue evaluado en diferentes momentos a temperaturas en el rango de 5°C a 30°C (Presotto *et al.* 2014). En dicho estudio, el efecto de la hibridación fue detectado solo a 20°C y 25°C. Además, sobre el final del presente capítulo, evaluamos el efecto de la temperatura de incubación sobre la germinación de frutos almacenados durante tres años. Para esto, se utilizaron tres temperaturas de incubación (10°C, 20°C y 30°C), con fotoperiodo neutro. Para cada experimento, la proporción de frutos germinados fue calculada como la relación entre los frutos germinados al final del experimento (día 16) y el número total de frutos viables. La viabilidad de los frutos se evaluó usando un test de tetrazolio sobre los frutos no germinados para cada repetición al final de cada experimento (ISTA 2004).

Experimentos sobre la morfología y anatomía del fruto

Luego de 18 meses desde la cosecha, diez frutos, elegidos aleatoriamente, de cada uno de los 14 biotipos se utilizaron para determinar el tamaño y la forma de los frutos. Fueron registrados el largo y el ancho y se calculó la relación largo/ancho tomando cada uno de los 10 frutos como réplica. El ancho se midió en el tercio basal del fruto. Además, fue registrado el peso de los frutos para cada uno de los 14 biotipos pesando cinco muestras independientes de 50 frutos cada una. Para evaluar las características anatómicas del pericarpio del fruto (posiblemente involucrado en la dormición), se realizaron cortes transversales de los pericarpios de dos poblaciones silvestres (DIA y BAR), un material cultivado (PAR) y sus cruzamientos recíprocos y los mismos fueron observados con un microscopio electrónico de barrido. Los cortes transversales fueron obtenidos cortando manualmente el fruto a la mitad bajo un microscopio óptico. Los frutos fueron previamente embebidos para ablandar los pericarpios (12 h y 3 h para frutos provenientes de plantas silvestres y cultivadas, respectivamente). Los cortes fueron fijados siguiendo a Croce y Parodi (2013). Una vez hechos los cortes, estos fueron inmediatamente fijados en glutaraldehído-agua al 2.5% en buffer a 5°C durante 2 h para ser

deshidratados usando una serie gradual de acetona hasta el 80%. Las muestras finalmente fueron secadas hasta el punto crítico durante 1 h, cubiertas con oro y observadas con un microscopio electrónico de barrido Jeol 35 CF. Además, la sección transversal de los pericarpios de una población silvestre (BAR), un material cultivado (PAR) y sus cruzamientos recíprocos fueron observados bajo un microscopio óptico. Para esto, se siguió el protocolo de Andrade *et al.* (2015). Se fijaron frutos enteros en solución FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético), embebidos en parafina y procesados usando técnicas convencionales para el corte (10 μ m) y teñido (safranina-fast green). Todos los cortes fueron montados en glicerol-agua (1:1). Los cortes bajo el microscopio fueron fotografiados usando una cámara Nikon Coolpix 4500 y un micrómetro ocular.

Análisis estadístico

Para el análisis de la varianza se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) usando PROC GLIMMIX (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). Los GLMM fueron elegidos debido a que son la herramienta recomendada para analizar datos sin distribución normal y con efectos aleatorios (Bolker *et al.* 2009). Debido a la natural distribución no-normal de las proporciones, todos los modelos fueron ajustados usando la distribución Beta en lugar de la normal (Bolker *et al.* 2009; Montesinos-Navarro *et al.* 2012). La significancia de los efectos fijos fue evaluada usando la estimación pseudo verosimilitud Quasi-Newton y reportada con sus valores F y P. Por otro lado, la significancia de los efectos aleatorios fue evaluada removiendo de a uno cada factor aleatorio y comparando la pseudo verosimilitud del residual con test χ^2 (Bolker *et al.* 2009; Montesinos-Navarro *et al.* 2012) usando la opción COVTEST GLM (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). Cuando el efecto fijo principal fue significativo, las medias mínimas cuadradas fueron comparadas usando contrastes ortogonales. Todas las medias en el texto son reportadas con su error estándar.

Efecto materno sobre la germinación de los frutos: Fue realizado un GLMM para cada uno de los momentos (T1-T4). Los efectos de parental materno, paterno y la interacción parental materno*paterno fueron considerados fijos. El efecto post-maduración fue calculado como la diferencia en germinación entre T2 y T1. El efecto materno fue calculado usando la relación de los efectos parental materno y paterno del GLMM ($F_{\text{materno}}/F_{\text{paterno}}$), valores cercanos a uno indican ausencia de efecto materno (ambos parentales contribuyen igual) mientras que mayor es la relación, mayor es el efecto materno.

Efecto del tipo de cruzamiento sobre los caracteres del fruto: Debido a la mayor importancia del tipo de cruzamiento respecto a las combinaciones individuales, los biotipos fueron agrupados en cuatro tipos de cruzamiento: silvestre, silvestre-cultivo, cultivo-silvestre y cultivo (Tabla 1.1). Para evaluar germinación, los cuatro momentos fueron analizados de manera

conjunta. En el GLMM, el efecto tipo de cruzamiento fue considerado fijo mientras que el biotipo anidado dentro de cada tipo, el momento (T1-T4) y la interacción entre tipo de cruzamiento y el tiempo fueron considerados aleatorios. La interacción fue desglosada usando contrastes ortogonales. Además, se evaluó el efecto del tipo de cruzamiento sobre la respuesta a la post-maduración. El tipo de cruzamiento fue considerado fijo y el efecto biotipo anidado dentro de tipo de cruzamiento fue considerado aleatorio. De manera similar, para evaluar si la hibridación afectó los caracteres del fruto, el tipo de cruzamiento (incluyendo solo los silvestres y silvestre-cultivo) fue incluido como fijo y los efectos biotipo anidado dentro de tipo, tiempo y la interacción tipo de cruzamiento por tipo fueron considerados aleatorios.

Efecto materno sobre los caracteres morfológicos del fruto: Para evaluar el efecto materno sobre la morfología de los frutos se realizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) con los cuatro caracteres del fruto (largo, ancho, largo/ancho y peso de los frutos). Los efectos del parental materno, paterno y su interacción fueron considerados fijos. El test Lambda de Wilks fue utilizado para evaluar la significancia de los efectos fijos. Cuando uno de los efectos fue significativo en el MANOVA, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) usando una matriz de correlación para producir componentes principales (PCs) que explicaran la variación multivariada de la morfología del fruto. Además, para evaluar la relación entre la morfología y la germinación de los frutos realizamos un PCA usando los seis caracteres de la germinación: germinación en cada uno de los cuatro momentos, respuesta a la post-maduración y dormición secundaria. Los PCA fueron realizados usando PROC PRINCOMP (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC) con los valores medios de cada uno de los 14 biotipos. La regresión lineal entre los caracteres morfológicos y la germinación de los frutos se realizó usando PROC REG (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). Finalmente, los caracteres anatómicos considerados cuantitativos (ancho de la capa media y número de capas celulares fueron medidos utilizando el microscopio óptico en al menos tres cortes y las medias fueron comparadas utilizando pruebas-t no apareadas y reportadas con su error estándar.

RESULTADOS

Fuerte efecto materno sobre la dormición del fruto y la respuesta a la post-maduración

Se encontraron efectos significativos del parental materno, paterno y su interacción sobre la dormición de los frutos (Tabla 1.2). Sin embargo, el efecto del parental materno fue mayor al del parental paterno y al de la interacción en los cuatro momentos evaluados (Tabla 1.2) y en las tres temperaturas (Fig 1.1B). Inmediatamente después de la cosecha (T1), la germinación fue relativamente alta en los silvestres, baja en el cultivo e intermedia en sus híbridos; sin embargo, esta tendencia se revirtió en el T2 y se mantuvo en T3 y T4 (Fig. 1.1A). En T1, el efecto del

parental materno fue 8,5 veces mayor al del parental paterno, lo que demuestra un fuerte efecto materno. Los híbridos producidos en plantas silvestres presentaron una menor germinación que sus parentales maternos ($0,25\pm 0,08$ vs. $0,12\pm 0,04$, respectivamente) mientras que los frutos producidos sobre plantas cultivadas presentaron muy baja germinación independientemente de la fuente de polen ($\sim 3\%$; Fig. 1.1A). En T2, el efecto materno fue aproximadamente el doble al observado en T1 (16,1; Tabla 1.2). Aquí, la germinación de los híbridos fue similar a la de sus parentales maternos (Fig. 1.1A). En T3 y T4, los frutos producidos en plantas cultivadas no expresaron dormición, mientras que para aquellos producidos en plantas silvestres, la germinación fue mayor en los híbridos que en los frutos silvestres ($0,80\pm 0,08$ vs. $0,58\pm 0,12$ en T3 y $0,45\pm 0,12$ vs. $0,35\pm 0,13$ en T4, respectivamente; Fig. 1.1A). Además, utilizando frutos de tres años después de la cosecha, diferentes temperaturas de incubación no alteraron estos resultados. El efecto materno fue al menos 15,6 mayor al efecto paterno. Los frutos producidos en plantas cultivadas no presentaron dormición en ninguna de las temperaturas (Fig. 1.1B) y las semillas producidas en plantas silvestres germinaron en mayor proporción cuando la fuente de polen fue el cultivo ($0,77\pm 0,04$ vs. $0,53\pm 0,06$ a 10°C , $0,48\pm 0,09$ vs. $0,33\pm 0,12$ a 20°C y $0,16\pm 0,04$ vs. $0,04\pm 0,02$ a 30°C para silvestre-cultivo y silvestre, respectivamente; Fig. 1.1B).

Tabla 1.2. GLMM para la germinación en cada uno de los cuatro tiempos evaluados. Los tiempos están expresados como tiempo después de la cosecha y son: inmediatamente (T1); dos semanas (T2); seis meses (T3) y 18 meses (T4). Las poblaciones silvestres (BAR y DIA) y los cultivares (CAC y PAR) fueron usados como parentales maternos y paterno en 14 de las 16 combinaciones posibles (biotipos; Tabla 1.1).

Fuente de variación		Germinación de los frutos		
	g.l.	F	P	
<i>Tiempo 1 (T1)</i>				
Parental materno	3	52,88	<0,0001	
Parental paterno	3	6,19	0,0014	
Materno*Paterno	7	4,01	0,0019	
<i>Tiempo 2 (T2)</i>				
Parental materno	3	107,77	<0,0001	
Parental paterno	3	6,66	0,0006	
Materno*Paterno	7	15,96	<0,0001	
<i>Tiempo 3 (T3)</i>				
Parental materno	3	83,26	<0,0001	
Parental paterno	3	6	0,0017	
Materno*Paterno	7	2,46	0,033	
<i>Tiempo 4 (T4)</i>				
Parental materno	3	186,55	<0,0001	
Parental paterno	3	5,64	0,0024	
Materno*Paterno	7	3,59	0,0041	

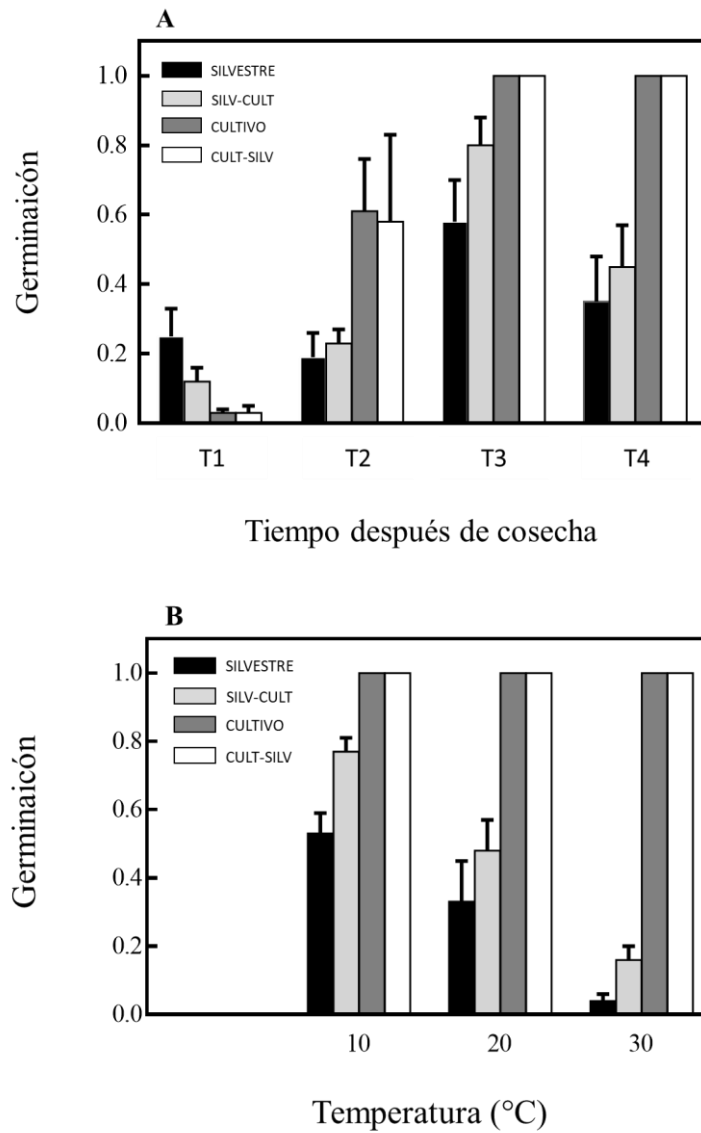


Figura 1.1. Germinación de los frutos en cuatro momentos después de la cosecha (A) e incubados en distintas temperaturas (B). Las barras representan el promedio de los biotipos de cada tipo de cruzamiento incubado a 20°C (A) y a 10°C, 20°C y 30°C (B). Todos los frutos fueron incubados a temperatura constante usando 12 horas de luz/oscuridad. La barra de error estándar indica variabilidad dentro de cada tipo de cruzamiento. Los momentos corresponden a tiempo desde la cosecha T1: inmediatamente después; T2: dos semanas, T3: seis meses; T4: 18 meses. Frutos de tres años después de la cosecha, almacenados en seco a temperatura ambiente, fueron incubados a 10°C, 20°C y 30°C.

Para evaluar el impacto de la dormición de corta y larga duración (típica de los materiales cultivados y silvestres, respectivamente) se incluyó la respuesta a la post-maduración como variable. Se encontraron efectos significativos del parental materno, y de la interacción parental materno por paterno ($F=135,17$; $P<0,0001$ y $F=12,68$; $P<0,0001$) sobre la respuesta a la post-maduración, el efecto paterno no fue significativo ($F=0,74$; $P=0,5331$). El efecto materno, fue 182,7 veces mayor al paterno. Además, encontramos un efecto significativo del tipo de cruzamiento ($F=5,69$; $P=0,0155$). La respuesta a la post-maduración fue mucho mayor en el cultivo que en el silvestre (contraste: $F=6,56$; $P=0,0283$) y los híbridos tuvieron un comportamiento muy similar a sus parentales maternos (contrastes: $F=0,03$; $P=0,8637$ y $F=0,06$; $P=0,811$ para cultivo vs. cultivo-silvestre y silvestre vs. silvestre-cultivo, respectivamente). Esta respuesta diferencial confirma las diferencias en el tipo de dormición y no solo en el nivel de la misma entre frutos producidos en plantas cultivadas y silvestres.

Fuerte efecto materno sobre la morfología y anatomía de los frutos

En el MANOVA, se encontraron efectos significativos de los parentales materno, paterno y su interacción sobre los caracteres morfológicos del fruto (Tabla 1.3). En el GLMM, el efecto materno fue significativo y mucho mayor al efecto paterno y a la interacción en cada una de las cuatro variables. El efecto materno fue 14,9 veces mayor al paterno en el MANOVA (Tabla 1.3). Además, el efecto tipo de cruzamiento fue significativo para el largo ($F=197,06$; $P<0,0001$), ancho ($F=164,22$; $P<0,0001$) y peso de los frutos ($F=101,25$; $P<0,0001$) pero no así para la relación largo/ancho de los mismos ($F=3,04$; $P=0,0795$). Los frutos de los cultivos presentaron un mayor largo ($0,81\pm 0,04$ vs. $0,59\pm 0,10$ cm), ancho ($0,39\pm 0,04$ vs. $0,26\pm 0,04$ cm) y peso ($43,8\pm 2,9$ vs. $18,5\pm 7,1$ mg fruto⁻¹) que los frutos silvestres, mientras que estos últimos presentaron una mayor relación largo/ancho ($2,28\pm 0,06$ vs. $2,12\pm 0,09$). Aunque en los híbridos se observaron cambios sutiles en el largo, ancho y peso de los frutos en la dirección del parental masculino, no se encontraron diferencias significativas en ningún contraste para ninguna de las cuatro variables.

Tabla 1.3. MANOVA para los dos juegos de caracteres. Los caracteres morfológicos incluyen el largo, ancho, peso y relación largo/ancho de los frutos. Los caracteres de germinación incluyen la germinación encada uno de los cuatro tiempos, la respuesta a la post-maduración y la dormición secundaria.

Caracteres	Efecto	g.l.	Lambda de Wilks	F	P
<i>Morfológicos</i>	Parental materno	12	0,0011	130,4	<0,0001
	Parental paterno	12	0,2040	8,7	<0,0001
	Materno*Paterno	28	0,0738	6,6	<0,0001
<i>Germinación</i>	Parental materno	18	0,0004	88,2	<0,0001
	Parental paterno	18	0,0755	8,7	<0,0001
	Materno*Paterno	42	0,0109	6,8	<0,0001

En cuanto a la anatomía del pericarpio, se observaron claras diferencias entre cultivo y silvestre. Las mayores diferencias fueron observadas en la capa media del pericarpio. En pericarpios de frutos silvestres la capa media estuvo formada por $9,9 \pm 0,7$ capas celulares con paredes gruesas y fuertemente esclerificadas (Fig. 1.2B y 1.3B), mientras que la capa media de los pericarpios de frutos cultivados consistió de $6,3 \pm 0,7$ capas celulares con paredes más delgadas y menos esclerificadas (Fig. 1.2A y 1.3A). Además, los rayos parenquimáticos y las capas celulares internas fueron impregnadas con fitomelanina en los pericarpios silvestres y no así en los cultivados (Fig. 1.3A y B).

Aunque los pericarpios de los híbridos fueron similares a su parental materno (Fig 1.2 y 1.3), se observaron cambios sutiles en la dirección del parental paterno. Analizando los frutos producidos sobre plantas silvestres, la hibridación con el cultivo afectó la capa celular media, disminuyendo el número de capas celulares ($7,3 \pm 1,2$ vs. $9,9 \pm 0,7$ en híbridos y silvestres, respectivamente; $t=4,78$, $P=0,0014$), el ancho de la capa ($194,7 \pm 4,6 \mu\text{m}$ vs. $217,1 \pm 18,0 \mu\text{m}$ en híbridos y silvestres, respectivamente; $t=2,07$, $P=0,0725$) y la esclerificación de las paredes celulares, principalmente de las capas más internas (Fig. 1.3B y D). En el mismo sentido, en frutos producidos en plantas cultivadas, la hibridación afectó la capa media disminuyendo su ancho ($183,3 \pm 8,2 \mu\text{m}$ vs. $232,0 \pm 10,9 \mu\text{m}$ en cultivo-silvestre y cultivo, respectivamente; $t=8,45$; $P=0,0001$) e incrementando la esclerificación de la pared celular (Fig. 1.3A y C). Además, en los pericarpios de los híbridos cultivo-silvestre, los rayos parenquimáticos de la capa celular interna fueron impregnados con fitomelanina al igual que en los pericarpios silvestres (Fig. 1.3).

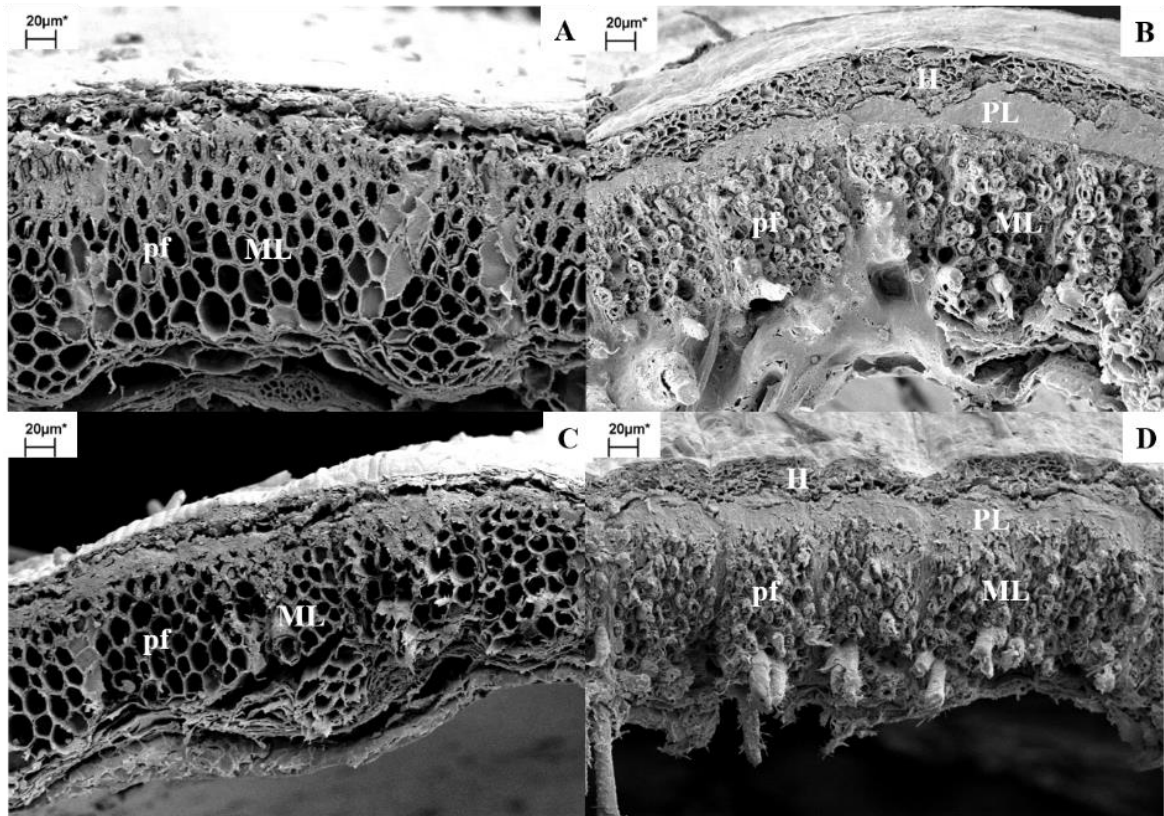


Figura 1.2. Anatomía del pericarpio, observada con un microscopio electrónico de barrido, de frutos del cultivo (A), silvestres (B), y de híbridos cultivo-silvestre (C y D). Las imágenes corresponden a PAR como material cultivado (A), BAR como población silvestre (B) y sus cruzamientos recíprocos C y D). H: hipodermis; ML: capa media; pf: fibras poligonales; PL: capa de fitomelanina. Abreviaturas en minúsculas corresponden a sub-estructuras.

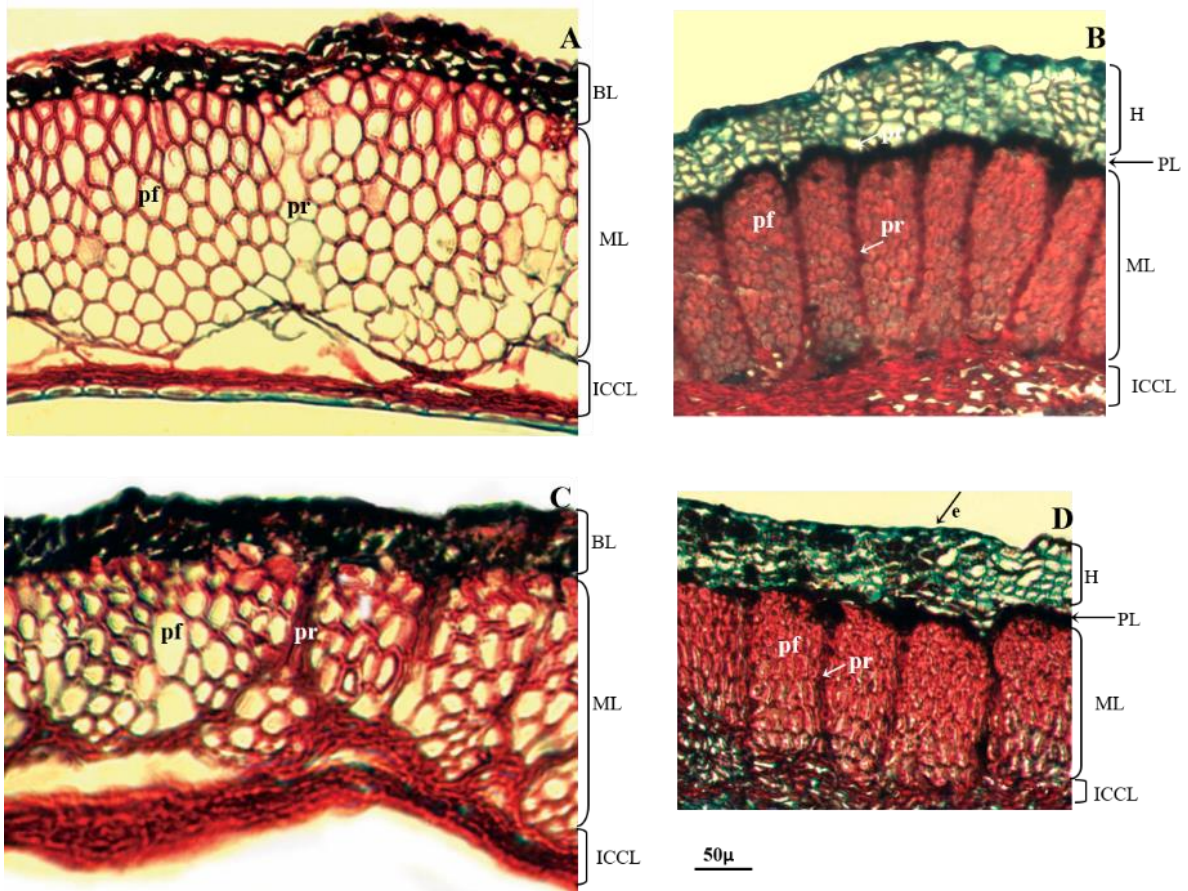


Figura 1.3. Anatomía del pericarpio observado con el microscopio óptico. Las imágenes corresponden a PAR como material cultivado (A), BAR como población silvestre (B) y sus cruzamientos recíprocos C y D). BL: capa negra; e: epidermis; H: hipodermis; ICCL: células de la capa interna comprimidas; ML: capa media; pf: fibras poligonales; PL: capa de fitomelanina; pr: rayos parenquimáticos. Abreviaturas en minúsculas corresponden a subestructuras.

Efecto de la hibridación cultivo-silvestre sobre los caracteres del fruto

Cuando los híbridos silvestre-cultivo fueron comparados con sus parentales silvestres, no se encontraron diferencias significativas en dormición ($F=0,05$; $P=0,8285$). De manera similar, cuando se evaluó usando tres temperaturas de incubación, no se encontraron efectos significativos del tipo de cruzamiento ($F=1,04$; $P=0,4160$) ni de la interacción tipo de cruzamiento por temperatura ($F=1,92$; $P=0,1605$). La germinación de los híbridos cambió en la dirección del cultivo (Fig. 1.1A y 1.1B), sin embargo, tales diferencias fueron explicadas por la gran variabilidad dentro de cada tipo de cruzamiento (efecto aleatorio significativo; $Z=1,69$; $P=0,0454$). Para desglosar el efecto del biotipo anidado dentro de cada tipo, se realizó un GLMM para cada tiempo y temperatura con el efecto biotipo como fijo y cada población silvestre fue comparada con su híbrido silvestre-cultivo usando contrastes ortogonales. El efecto biotipo fue significativo en los cuatro tiempos, pero la respuesta fue variable dependiendo del tiempo y la temperatura. (Fig. 1.4A). Inmediatamente después de la cosecha, el efecto de la hibridación del cultivo afectó la dormición en DIA pero no en BAR, mientras que lo opuesto fue observado en los tres momentos restantes (Fig. 1.4A). Con la única excepción de DIA en T2, todos los cambios estadísticamente significativos en la germinación se produjeron en la dirección del cultivo (Fig. 1.4A). Además, con la excepción de DIA a 20°C y BAR a 30°C, la hibridación del cultivo incrementó significativamente ($P<0.05$) la germinación de ambas poblaciones a cada una de las temperaturas (Fig 1.4B). Finalmente, los híbridos silvestre-cultivo mostraron una dormición secundaria (inducida por el almacenamiento en seco de los frutos) mayor que sus contrapartes silvestres ($0,35\pm 0,05$ vs. $0,24\pm 0,04$, respectivamente).

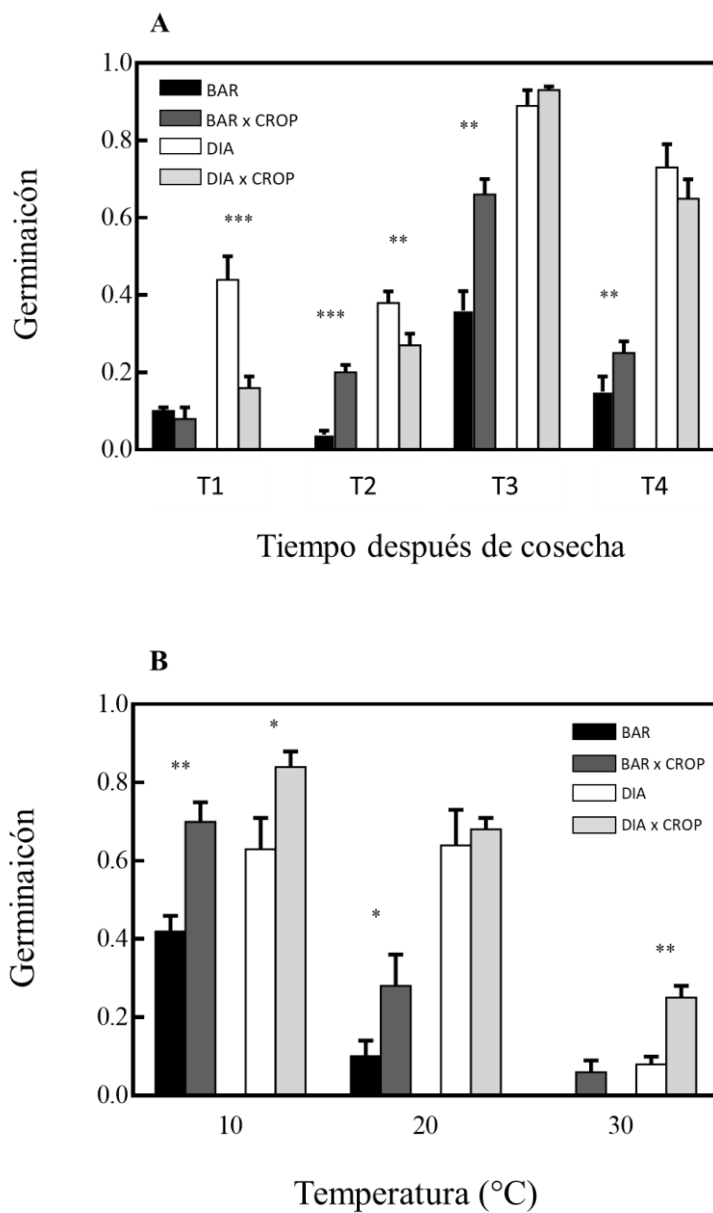


Figura 1.4. Efecto de la hibridación con el cultivo sobre la germinación de los frutos en diferentes momentos (A) y temperaturas de incubación (B). Las barras representan la proporción media de las semillas germinadas de cada biotipo incubado a 20°C (A) y a 10°C, 20°C y 30°C (B). Todos los frutos fueron incubados a 12 horas de luz/oscuridad. Dentro de cada tiempo y temperatura, cada población silvestre (BAR y DIA) se comparó con sus dos híbridos silvestre-cultivo (Fig. 1.4A; PAR y CAC usados como padres) usando contrastes ortogonales. Cuando el contraste fue significativo: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$.

Relación entre los caracteres morfológicos y la dormición de los frutos

El PCA de las cuatro variables morfológicas resultó en una variable compuesta, designada como “PC1 morfología del fruto”, la cual capturó 79,6% de la variación total. Mayores valores del PC1 morfología del fruto representan mayores valores del largo, ancho y peso de los frutos, con autovectores de 0,51 a 0,54 y menores valores de la relación largo/ancho, con un autovector de -0,37. Mayores y menores valores del PC1 morfología del fruto representan una morfología de fruto similar al cultivo y al silvestre, respectivamente. Por lo tanto, el PC1 morfología del fruto se utilizó como un *proxy* de la variación multivariada de la morfología del fruto. Además, el PCA de los caracteres asociados a la germinación/dormición resultó en una variable compuesta designada “PC1 germinación del fruto”, la cual capturó 69,7% de la variación total. Mayores valores del PC1 germinación del fruto representaron mayores valores de germinación en T2, T3, T4 y una mayor respuesta a la post-maduración, con autovectores de 0,41 a 0,46 y menores valores de germinación en T1 y dormición secundaria, con autovectores de -0,23 y -0,43, respectivamente. Con excepción de la respuesta a la post-maduración, mayores y menores valores del PC1 germinación del fruto representaron exactamente los caracteres del cultivo y silvestre, respectivamente. Por lo tanto, el PC1 germinación del fruto se utilizó como *proxy* de la variación multivariada en la germinación y se analizó la regresión lineal entre el “PC1 morfología del fruto” y “PC1 germinación del fruto”. Se encontró una fuerte relación lineal entre la morfología y la germinación de los frutos ($n=14$, $r^2=0,92$, $P<0,0001$; Fig. 5), lo que sugiere que el efecto materno observado en la germinación es producido (al menos en parte) por la morfología de los frutos, heredada por vía materna.

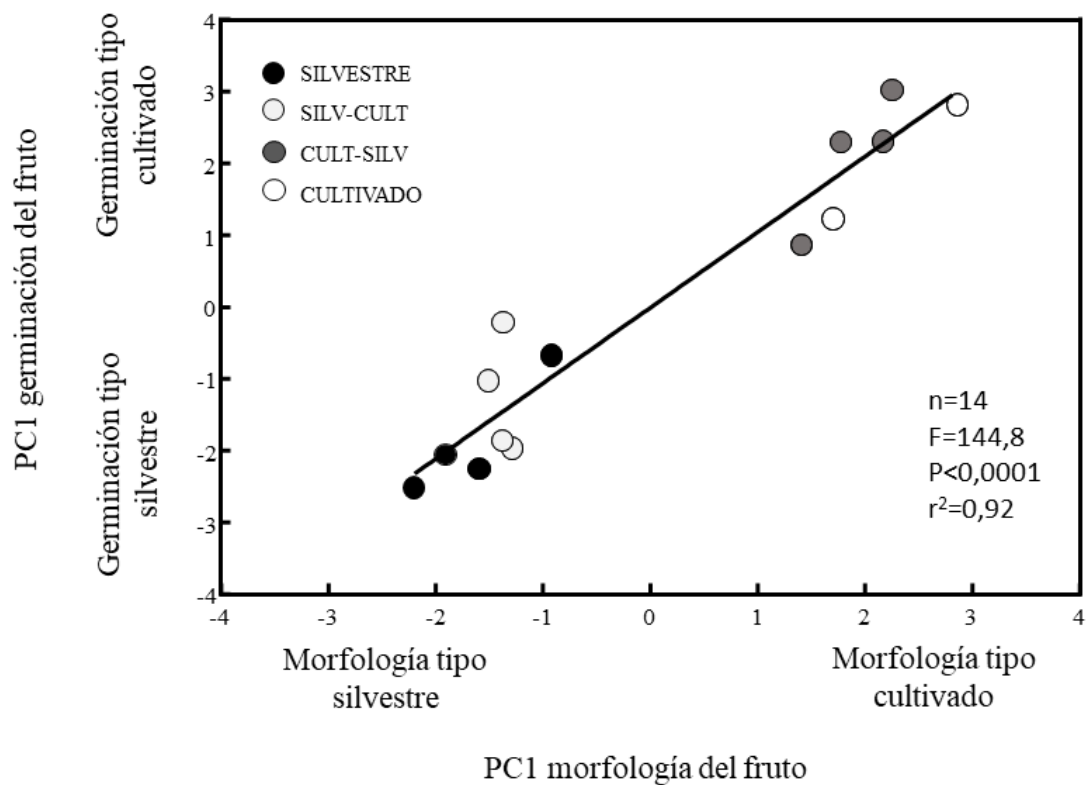


Figura 1.5. Relación entre la morfología y la germinación de frutos. Ambos ejes representan el primer componente principal del PCA. Los híbridos son denominados cultivo-silvestre y silvestre-cultivo indicando la dirección del cruzamiento (parental materno-paterno). Mayores valores del PC1 morfología del fruto representan mayores valores del largo, ancho y peso de los frutos y menores valores de la relación largo/ancho de los mismos. Mayores valores del PC1 germinación de los frutos indican mayores valores de germinación en T2, T3, T4 y respuesta a la post-maduración y menores valores de germinación en T1 y dormición secundaria.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se identificó un comportamiento estacional de la germinación y la dormición en los frutos silvestres, pero no así en los cultivados. La dormición de los frutos silvestres disminuyó después de un período de almacenamiento en frío y se incrementó cuando los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente, mientras que los frutos cultivados presentaron una fuerte dormición inmediatamente después de la cosecha, la cual fue rápidamente removida después de un período de post-almacenamiento. Además, después del almacenamiento en frío, no observamos dormición ni capacidad para desarrollar dormición secundaria en los frutos cultivados (Fig. 1.1A y B). La presión de selección negativa sobre la dormición de los frutos durante la domesticación es la explicación más probable de las diferencias en dormición y germinación de los frutos silvestres y cultivados. Los híbridos cultivo-silvestre de primera generación mostraron una germinación muy similar a sus parentales maternos con solo efectos sutiles del parental paterno. Por esto, analizamos características del fruto heredadas del parental materno, como el tamaño, la forma y el peso de los frutos y la anatomía del pericarpio de estos. Encontramos grandes diferencias en la morfología y anatomía de los frutos silvestres y cultivados (Fig. 1.2 y 1.3), las cuales correlacionaron con las diferencias observadas en la germinación (Fig. 5). Aunque los biotipos silvestres mostraron diferencias en dormición entre sí (Fig. 1.4), no observamos diferencias en la anatomía del pericarpio entre BAR y DIA (datos no mostrados). Debido al efecto materno encontrado en los caracteres morfológicos, anatómicos y en la germinación, se focalizó la discusión en la divergencia evolutiva de estos caracteres y su implicancia en los caracteres de los híbridos cultivo-silvestre.

Divergencia evolutiva de los caracteres del fruto

La pérdida de dormición de los frutos fue uno de los primeros caracteres en ser seleccionados durante la domesticación (Purugganan y Fuller 2009; Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). Los frutos con dormición fisiológica leve presentan una variación estacional de la dormición (Baskin y Baskin 2004; Gardarin y Colbach 2015). Las especies cultivadas y sus parientes silvestres con este tipo de dormición incluyen la mayor parte de los cereales - como trigo, cebada, sorgo, maíz y arroz - y especies modelos como *Arabidopsis* y girasol (Snow *et al.* 1998; Baskin y Baskin 2004; Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006; Li *et al.* 2006; Vanhala y Stam 2006; Montesinos-Navarro *et al.* 2012; Shu *et al.* 2015). En el presente capítulo, los frutos silvestres mostraron niveles variables de dormición inmediatamente después de la cosecha, variando del 57% al 91%. Las diferencias en los niveles de dormición entre las dos poblaciones (DIA y BAR) fueron consistentes en el tiempo (T1 a T4) y bajo distintas temperaturas y sus posibles causas fueron discutidas en un trabajo previo (Presotto *et al.* 2014). El período post-maduración no afectó la dormición en los frutos silvestres (Fig. 1.1), posiblemente debido a su

corta duración (2 semanas). En girasol cultivado, períodos de post-maduración de 30 a 60 días a 25°C fueron necesarios para maximizar la germinación en condiciones óptimas (Rodríguez *et al.* 2018). Después de un período de post-maduración en frío (T3), la dormición disminuyó hasta un 42% y volvió a aumentar hasta un 65% cuando los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente (Fig. 1.1A). En ambas poblaciones y en cada uno de los cuatro tiempos y tres temperaturas, una proporción de frutos permaneció dormida, lo que ayuda a explicar la habilidad de las poblaciones silvestres para formar bancos de semillas persistentes en el suelo (Fig. 1.1A).

El comportamiento estacional en la dormición observado en condiciones controladas ha sido previamente reportado en experimentos a campo usando frutos de girasol silvestre (Snow *et al.* 1998; Pace *et al.* 2015) y revisado por Gardarin y Colbach (2015) usando frutos de varias especies de malezas. La variación estacional de la dormición es uno de los principales caracteres adaptativos de las poblaciones anuales de ciclo primavero-estival. Esto evita la germinación durante el otoño (y por lo tanto la mortandad de plantas por las bajas temperaturas invernales) y contribuye a la formación de bancos de semilla persistentes. Desafortunadamente, con estos experimentos, no es posible separar los efectos del tiempo post-maduración y de las bajas temperaturas sobre la salida de la dormición. El almacenamiento post-maduración tiene fuerte efecto sobre la germinación del girasol cultivado, maximizando la germinación en 30 a 70 días, dependiendo de las temperaturas durante el almacenamiento y de incubación (Andrade *et al.* 2015; Rodríguez *et al.* 2018). A pesar de esto, el aumento en la dormición observada en T4 respecto a T3 sugiere que las bajas temperaturas son las responsables, al menos parcialmente, de la salida de la dormición de los frutos silvestres. Futuros experimentos evaluando los efectos de las bajas temperaturas y el tiempo post-maduración simultáneamente son necesarios para mejorar la comprensión de la variación estacional de la dormición en girasol silvestre.

Por otro lado, la mayor parte de los frutos cultivados presentó dormición inmediatamente después de la cosecha (Fig. 1.1A) y respondieron fuertemente al período post-almacenamiento germinando hasta en un 58% después de solo dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (Fig. 1.1A). En T3, no se observó dormición en los frutos del cultivo (Fig. 1.1A). Además, cuando los frutos del cultivo perdieron la dormición primaria, no se observó dormición secundaria en ninguna de las tres temperaturas (Fig. 1.1B), germinando hasta un 90% en los primeros cuatro días (datos no mostrados).

Una dormición de corta duración es un carácter deseable en las especies cultivadas ya que previene la germinación sobre la planta madre (brotado en el campo) y a la vez permite una rápida y uniforme germinación en la siguiente temporada de crecimiento (Shu *et al.* 2015). Una fuerte dormición primaria, total o parcialmente removida por un proceso de post-maduración ha sido previamente publicada en girasol cultivado (Brunick 2007; Andrade *et al.* 2015;

Dominguez *et al.* 2016; Roselló *et al.* 2016; Rodriguez *et al.* 2018) y tales resultados son similares a otros reportados en cultivos como trigo, maíz y arroz (revisado en Shu *et al.* 2015). Este tipo de dormición de corta duración en los cultivos de grano podría ser el resultado de una dormición remanente del proceso de domesticación (Dominguez *et al.* 2016), de selección directa en contra de la germinación en la planta madre durante el mejoramiento moderno (Shu *et al.* 2015) o de una combinación de ambos. Debido a que la pérdida de dormición está asociada con las primeras etapas de la domesticación (Purugganan y Fuller 2009; Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013) es poco probable que la misma sea un remanente de la domesticación.

Además de la pérdida de dormición de los frutos, durante las primeras etapas de la domesticación fueron seleccionados frutos de mayor tamaño y pericarpios más delgados y blandos (Purugganan y Fuller 2009; Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). Como era de esperar, se observaron grandes diferencias en los caracteres morfológicos entre frutos silvestres y cultivados. Los frutos del cultivo fueron, en promedio, 1,4 veces más largos y 2,4 veces más pesados que los silvestres. El incremento del tamaño de los frutos debido a la domesticación es la regla en los cultivos en los cuales se consume el fruto/semilla y este carácter posiblemente fue seleccionado por su correlación positiva con una rápida y uniforme germinación y un mejor establecimiento de las plántulas emergidas (Purugganan y Fuller 2009; Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). Por otro lado, pericarpios más delgados y blandos fueron probablemente seleccionados por la facilidad de “descascarar” las semillas/frutos para su consumo. En girasol cultivado, además de la esperada reducción en el ancho del pericarpio durante la domesticación (Hancock 2012), la mayor parte de la ganancia genética en la concentración de aceite durante el mejoramiento moderno fue lograda disminuyendo la relación pericarpio/embrión (Mantese *et al.* 2006; de la Vega *et al.* 2007).

Para explorar diferencias a nivel de anatomía del pericarpio se analizaron los pericarpios de un material cultivado, de las dos poblaciones silvestres y de sus híbridos recíprocos. El pericarpio del girasol cultivado consiste de epidermis, hipodermis, capa media y en algunos materiales, una capa de fitomelanina, con pocas diferencias anatómicas entre frutos con y sin dormición primaria (Andrade *et al.* 2015). La capa de fitomelanina es exclusiva de unas pocas tribus de la familia Asteraceae (Pandey y Dhakal 2001) y es una capa dura, negra y resistente la cual es responsable del color negro de los frutos y de la resistencia a la polilla de girasol en el girasol cultivado (Rogers y Kreitner 1983; Pandey y Dhakal 2001). En el presente capítulo, se observó una estructura típica del pericarpio del cultivo, la cual consistió en una fina hipodermis y una capa media formada por células parenquimáticas. Las células parenquimáticas presentaron una pared celular delgada y se agruparon de manera laxa (Fig. 1.2 y 1.3; Rogers y Kreitner 1983; Mantese *et al.* 2006; Andrade *et al.* 2015). Esta estructura podría imponer dormición en los materiales cultivados en una o más de las siguientes vías: disminuyendo la tasa de imbibición,

retrasando la entrada de oxígeno al embrión, aportando inhibidores de la germinación o evitando la salida al exterior de tales inhibidores provenientes del embrión (Baskin y Baskin 2014). Sin embargo, es poco probable que esta estructura pueda actuar como una barrera física. En contraste, el pericarpio de los frutos silvestres mostró una gruesa hipodermis, una gruesa capa de fitomelanina y pequeñas fibras poligonales con paredes celulares mucho más gruesas que las observadas en el pericarpio del cultivo (Fig. 1.2 y 1.3). La capa media presentó una estructura más similar a un esclerénquima que a un parénquima. Además del mayor ancho y lignificación de las paredes celulares de las fibras poligonales, la capa de fitomelanina llenó los espacios de la capa media (Fig. 1.3) haciendo la estructura más compacta.

La capa de fitomelanina adopta su morfología a medida que llena los espacios intercelulares en el pericarpio, usualmente entre la hipodermis y el esclerénquima (Rogers y Kreitner 1983) pero a veces también cruzando verticalmente la capa media y formando bloques rectangulares (Fig. 1.3). Dichos bloques podrían actuar como una barrera física similar a las barreras encontradas en frutos con dormición física. Esto podría explicar parcialmente la mayor tasa de imbibición de frutos con y sin escarificación (Presotto *et al.* 2014) pero no puede explicar las variaciones estacionales en la dormición. Los frutos o semillas con dormición física no son capaces de germinar debido a la presencia de una cubierta impermeable al agua, tienen normalmente embriones no dormidos y una o más capas de células en empalizada, responsables de la impermeabilidad al agua (Baskin y Baskin 2004). La germinación de los frutos con dormición física comúnmente ocurre debido a la formación de estructuras anatómicas especializadas en la cubierta del fruto, las cuales actúan como canales a partir de los cuales el agua se puede mover (Baskin y Baskin 2004, 2014). Weiss *et al.* (2013) reportaron que el pericarpio de girasol permitía la imbibición del embrión a través de una apertura presente en la mayoría de los frutos del cultivo pero ausente en los frutos silvestres, sugiriendo un mecanismo físico responsable de la dormición. Sin embargo, la variación estacional de la dormición observado en este capítulo (Fig. 1.1A) y la ausencia de una capa de células en empalizada en el pericarpio (Fig. 1.2B y 1.3B) aportan evidencia fisiológica y anatómica de la presencia de dormición fisiológica y no física en los frutos de girasol silvestre.

El rol del efecto materno y la domesticación en los caracteres del fruto de los híbridos cultivo-silvestre

En el presente capítulo, la germinación de los híbridos producidos sobre plantas silvestres cambió en la dirección del cultivo en los cuatro tiempos y las tres temperaturas evaluadas (Fig. 1.1A y B). La germinación de los frutos híbridos en T1 fue menor que la de frutos silvestres (Fig. 1.1A). La dormición del cultivo es usualmente descripta como de corta duración e impuesta principalmente por el embrión, con efectos variables de dormición impuesta por el pericarpio, principalmente expresada en altas temperaturas (Brunick 2007; Andrade *et al.* 2015;

Dominguez *et al.* 2016; Roselló *et al.* 2016) mientras que la dormición de los frutos silvestres es de larga duración e impuesta principalmente por el pericarpio (Brunick 2007). El incremento en la dormición de los frutos híbridos en T1 podría ser explicado por un efecto aditivo del pericarpio (proveniente del silvestre) y el efecto de la combinación de alelos del cultivo y silvestre en el embrión. Después del tratamiento de frío, el embrión híbrido sería el responsable de la mayor germinación de los híbridos ya que el pericarpio es compartido por los frutos silvestres e híbridos (Fig. 1.1A). De todas maneras, el efecto de la hibridación sobre los eventos post-fertilización en el pericarpio, como esclerificación de la capa media y/o el depósito de fitomelanina no puede ser descartado. El incremento en la dormición observado a 30°C (Fig. 1.1A) ha sido previamente reportado (Presotto *et al.* 2014) y podría deberse a un incremento en la dormición impuesta por el pericarpio (Dominguez *et al.* 2016).

El incremento en la germinación con la hibridación del cultivo ya fue reportado en híbridos silvestre-cultivo de girasol (Snow *et al.* 1998; Mercer *et al.* 2006), y otros complejos cultivo-silvestre como colza-nabo (Adler *et al.* 1993) y arroz (Dong *et al.* 2011). Además del efecto general arriba descrito, se observó un efecto diferencial según la población silvestre (Fig. 1.4A y 4B). Inmediatamente después de la cosecha, la hibridación del cultivo solo afectó a la población con menor dormición (DIA) pero en los tres tiempos restantes la hibridación incrementó la germinación en la población con mayor dormición (BAR; Fig. 1.4A). Resultados similares se encontraron en experimentos de campo por Snow *et al.* (1998) quienes reportaron un incremento en la germinación en respuesta a la hibridación en las poblaciones con mayor dormición. Esta respuesta diferencial podría tener implicancia en introgresión de alelos del cultivo. Por ejemplo, si la hibridación del cultivo no produce cambios en la dormición, la aptitud relativa de los híbridos F1 dependerá de caracteres expresados más tarde en el ciclo, como la habilidad para competir de las plántulas, el tiempo a floración y la producción de biomasa y frutos. Aunque la aptitud relativa de los híbridos F1 es generalmente menor que en sus contrapartes silvestres (Presotto *et al.* 2012), esta ventaja es reducida y puede incluso desaparecer bajo condiciones de estrés (Mercer *et al.* 2007, 2014). Por otro lado, el incremento en la germinación de los híbridos aparentemente reduciría las chances de introgresión debido a un incremento de la germinación otoñal (y la consecuente mortandad de plántulas durante el invierno; germinación maladaptativa) y a la exposición de los híbridos a una intensa competencia con las plantas silvestres (Alexander *et al.* 2014). Sin embargo, la germinación otoñal maladaptativa puede ser rápidamente eliminada por selección (Huang *et al.* 2010) y una mayor germinación primaveral podría incrementar la agresividad de las poblaciones híbridas. Con respecto a las poblaciones silvestres utilizadas en el presente capítulo, estas no presentaron evidencia morfológica de mayor introgresión del cultivo con respecto a poblaciones nativas (Cantamutto *et al.* 2010a). En el caso de DIA, la ausencia de simpatría explica la ausencia de

introgresión del cultivo. En contraste, BAR es simpátrica con el cultivo y se han reportado híbridos cultivo-silvestre naturales (Ureta *et al.* 2008a).

Respecto de los caracteres de los frutos producidos sobre plantas cultivadas, no se observaron cambios con la hibridación del parental silvestre. Inmediatamente después de la cosecha, los híbridos cultivo-silvestre mostraron una dormición primaria profunda similar a sus parentales cultivados (Fig. 1.1A). En T2, la dormición de los frutos híbridos y cultivados fue muy similar pero varió de acuerdo a la fuente de polen, por ejemplo, los frutos de CAC germinaron hasta un 30%, pero la germinación se incrementó cuando la fuente de polen fue BAR (66%) y disminuyó con DIA (20%). Lo opuesto ocurrió cuando PAR fue el parental materno, los frutos germinaron hasta un 82%, pero la hibridación con BAR y DIA disminuyó (66%) y aumentó (93%) la germinación, respectivamente. Por lo tanto, aunque la hibridación del silvestre afectó la dormición y germinación de los frutos, no se observó un patrón claro de variación (datos no mostrados). Después del invierno simulado, no se observó dormición en ninguno de los cruzamientos producidos sobre plantas cultivadas (Fig. 1.1A), ni dormición secundaria en ninguna de las temperaturas evaluadas (Fig. 1.1B). El rápido incremento de la germinación junto con la pérdida de dormición después del tratamiento frío (T3 y T4) y la ausencia de dormición secundaria explican por qué los frutos producidos sobre plantas cultivadas rara vez persisten por más de un año bajo condiciones de campo (Warwick y Stewart 2005; Bagavathiannan y Van Acker 2008). La germinación en T2 podría considerarse maladaptativa en condiciones de campo (Pace *et al.* 2015); es decir, la mayoría de las plantas provenientes de frutos que germinan en otoño no sobreviven el invierno y por lo tanto no contribuyen ni al banco del suelo ni a la siguiente generación. La ausencia de efectos de la hibridación del biotipo silvestre en la dormición podría residir en las características del pericarpio. De la anatomía de frutos cultivo-silvestre y del cultivo, se observa que no existen barreras físicas a nivel del pericarpio (Fig. 1.2 y 1.3). Recientemente, Andrade *et al.* (2015) comparando líneas de girasol con y sin dormición primaria impuesta por el pericarpio notaron que los perfiles hormonales del pericarpio explicaron las diferencias en dormición y no así la anatomía de los mismos. Por lo tanto, en cultivos con dormición fisiológica leve, aún cuando el pericarpio juega un rol en la dormición, dicho efecto parecería estar mediado por los niveles hormonales, ser de corta duración y podría ser fácilmente eliminado por un período post-almacenamiento (Andrade *et al.* 2015; Shu *et al.* 2015; Roselló *et al.* 2016). Finalmente, queda por responder si los perfiles hormonales pueden explicar la dormición impuesta por el pericarpio bajo altas temperaturas de incubación (Dominguez *et al.* 2016) y/o altas temperaturas durante el llenado de granos (Bodrone *et al.* 2017).

A pesar de las bajas probabilidades de supervivencia de los frutos producidos en plantas cultivadas, la supervivencia de una pequeña fracción de estos durante solo una temporada de

crecimiento puede ser clave para la evolución de biotipos ferales. Los caracteres que primero se expresan en el ciclo, como la dormición y germinación son claves en los biotipos ferales (Warwick y Stewart 2005; Bagavathiannan y Van Acker, 2008) y pueden ser fuertemente seleccionadas durante la colonización de nuevos ambientes (Huang *et al.* 2010). Bajo condiciones de campo, los frutos producidos en plantas cultivadas que caen al suelo pueden presentar una fuerte dormición primaria, independientemente de que sean híbridos cultivo-silvestre o no (Fig. 1.1A). La respuesta a la post-maduración puede eliminar total o parcialmente la dormición de los frutos, pero la germinación solo ocurrirá si se reúnen los requerimientos de temperatura y humedad. En este caso, las plantas de frutos que germinen en otoño difícilmente sobrevivan hasta la primavera. En este capítulo, más del 50% de los frutos producidos sobre el material cultivado con mayor dormición (CAC) permanecieron dormantes. Aunque la germinación podría haber sido mayor debido a períodos más largos de post-maduración o por menores temperaturas de incubación (menor expresión de la dormición), altas temperaturas durante el llenado de granos (Bodrone *et al.* 2017) podrían incrementar la dormición expresada en el otoño, incrementando así las chances de supervivencia hasta la primavera. Por otro lado, una mayor germinación maladaptativa de los frutos producidos sobre plantas cultivadas expondría los híbridos cultivo-silvestre a una intensa selección por dormición, condicionando la selección de caracteres expresados más tarde en el ciclo (Huang *et al.* 2010). El surgimiento de biotipos maleza de girasol de origen cultivado ha sido reportado en Argentina (Casquero *et al.* 2013) y el sur de Europa (Muller *et al.* 2011), en ambos casos facilitado por la hibridación con poblaciones silvestres. Estos casos se suman a los informes de biotipos malezas de sorgo, arroz y rabanito con similar origen (Ellstrand *et al.* 2010) y advierten sobre la importancia de la hibridación cultivo-silvestre en la rápida evolución de malezas.

En resumen, en el presente capítulo se demostró la fuerte influencia que tiene el efecto materno sobre caracteres ecológicamente relevantes, como la dormición y germinación de los frutos. La hibridación entre taxones muy divergentes como los cultivos y sus parientes silvestres puede exacerbar la importancia del efecto materno sobre sobre los caracteres del fruto. Las características cultivadas o silvestres de los frutos heredadas del parental materno probablemente afectaran el comportamiento de los híbridos en condiciones naturales. Por lo tanto, después de la hibridación, híbridos de similar composición genética podrían ser expuestos a distintas presiones o fuerzas de selección, afectando la selección de caracteres expresados más tarde en el ciclo y en las siguientes generaciones.

CAPÍTULO 2

Evolución rápida de la dormición durante la invasión del girasol en Argentina

INTRODUCCIÓN

Las plantas invasoras representan una gran amenaza ambiental y económica, degradando la biodiversidad nativa (Pimentel *et al.* 2001; Todesco *et al.* 2016), disminuyendo la producción de cultivos y pasturas cuando actúan como malezas agrícolas (Casquero *et al.* 2013) y limitando el uso de tecnologías OGM y no OGM en sus parientes cultivados, debido al flujo génico cultivo-silvestre (Cantamutto y Poverene 2007; Presotto *et al.* 2012; Mandel *et al.* 2016; Pandolfo *et al.* 2018). Además, las poblaciones invasoras representan excelentes modelos para estudiar la evolución en escalas de tiempo contemporáneas (Maron *et al.* 2004; Prentis *et al.* 2008; Turner *et al.* 2013) y para predecir respuestas evolutivas al calentamiento global (Moran y Alexander 2014). La rápida adaptación al clima ha sido recientemente reconocida como factor clave en las invasiones biológicas (Buswell *et al.* 2011; Turner *et al.* 2013). Sin embargo, el muestreo no aleatorio (Colautti *et al.* 2009; Colautti y Lau 2015) y el desconocimiento de la fuente de introducción (Xu *et al.* 2010; Colautti y Lau 2015) comúnmente complican su detección.

Después de la introducción de una especie no-nativa, una invasión exitosa involucra los procesos de colonización, naturalización y expansión a partir del/los punto/s de entrada (Keller y Taylor 2008). Una naturalización exitosa puede ser definida como el establecimiento de poblaciones que se auto-perpetúan por varias generaciones (Richardson *et al.* 2000) y esta a menudo requiere que las poblaciones introducidas se adapten a las nuevas condiciones bióticas y abióticas encontradas en el rango no-nativo. Esta adaptación puede involucrar cambios genéticos en respuesta al nuevo ambiente (evolución rápida) pero también puede observarse adaptación si los genotipos introducidos son transportados directamente entre regiones con características bióticas y/o abióticas similares (coincidencia ambiental; Maron *et al.* 2004; Montague *et al.* 2008). Además, la plasticidad de los caracteres adaptativos puede permitirle a las poblaciones introducidas adaptarse al nuevo ambiente sin necesidad de cambios genéticos. La coincidencia ambiental y la plasticidad fenotípica de las poblaciones introducidas juegan un rol importante durante el establecimiento, la naturalización y/o la expansión sobre pequeñas áreas (Keller y Taylor 2008). Sin embargo, es esperable que la expansión sobre áreas mayores, heterogéneas en clima e interacciones bióticas, involucre una evolución adaptativa dentro del rango no-nativo (Montague *et al.* 2008; Konarzewski *et al.* 2012; Colautti y Barrett 2013).

Por ser los primeros caracteres expresados en el ciclo de vida, la dormición y la germinación determinan el éxito de las poblaciones naturales a través de varias vías. Estos caracteres ajustan el momento de germinación al período favorable de crecimiento (construcción de nicho), evitan la germinación fuera de la estación de crecimiento (p. ej. veranos secos o inviernos fríos) y condicionan fuertemente la selección sobre caracteres expresados más tarde en el ciclo (Huang *et al.* 2010; Donohue *et al.* 2010; Chiang *et al.* 2013). La construcción de nicho probablemente es el aspecto evolutivo más importante del momento de germinación (Donohue *et al.* 2005; Donohue 2014; Arana *et al.* 2016; Burghardt *et al.* 2016) y es especialmente importante durante la colonización de nuevos ambientes (Huang *et al.* 2010; Xia *et al.* 2011; Postma y Ågren 2016). En especies de amplia distribución, variaciones clinales en la dormición contribuyen en la conservación de condiciones ambientales similares (y óptimas para la especie) durante la reproducción a lo largo de su distribución geográfica (Montesinos-Navarro *et al.* 2012; Burghardt *et al.* 2016). Por ejemplo, en especies invernales de ciclo anual, poblaciones de bajas latitudes muestran una mayor dormición, lo cual les permite sobrevivir a los veranos secos en forma de semilla dormida (Postma *et al.* 2016). Por esto, los caracteres del fruto (especialmente la dormición) son excelentes candidatos para evaluar la evolución rápida en respuesta a nuevos ambientes.

El girasol silvestre presenta una dormición fisiológica leve, con efectos mayores del pericarpio y variación estacional de la dormición (Brunick 2007; Presotto *et al.* 2014; Pace *et al.* 2015). Previamente se reportó divergencia para los niveles de dormición entre poblaciones del rango nativo (Mercer *et al.* 2006; Brunick 2007) y no-nativo (Presotto *et al.* 2012, 2014), sin embargo la importancia adaptativa de tal divergencia aún no ha sido evaluada.

En este capítulo, se investigó la probable evolución adaptativa rápida de caracteres del fruto en respuesta a las nuevas condiciones abióticas encontradas en el rango no-nativo. Los objetivos específicos fueron: 1) Evaluar si las poblaciones nativas y no-nativas muestran cambios fenotípicos en la dormición, el tamaño (largo y ancho) y peso de los frutos, 2) Evaluar si los rangos nativo y no-nativo difieren en las condiciones climáticas y 3) Si existen diferencias fenotípicas en los caracteres del fruto entre rangos, evaluar si tales diferencias pueden ser explicadas por las variables climáticas locales. En este capítulo se aporta evidencia de evolución adaptativa rápida de la dormición en respuesta a las mayores temperaturas (asociadas a menores latitudes) encontradas en el rango no-nativo y se discute la importancia de los procesos evolutivos durante las invasiones biológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma

El rango nativo estuvo representado por 10 y 14 poblaciones en los experimentos 1 y 2, respectivamente. El rango no-nativo estuvo representado por cuatro poblaciones en el experimento 1 (BAR de Argentina y EAU, SAU y WAU de Australia) y siete poblaciones en el experimento 2 (BAR, DIA, LMA y RCU de Argentina y EAU, SAU y WAU de Australia). La tabla 2.1 resume la información de cada una de las poblaciones estudiadas en el presente capítulo. Las poblaciones argentinas fueron colectadas en la región central de Argentina (Cantamutto *et al.* 2010a) mientras que las poblaciones nativas y australianas fueron provistas por el North Central Regional Plant Introduction Station del USDA. En cuanto a las poblaciones argentinas, al menos 50 plantas fueron colectadas de cada población original. De las poblaciones provistas por el USDA, al menos 18 plantas fueron colectadas de las poblaciones originales (G. Seiler, comunicación personal; Tabla 2.1). Cuando fue necesario, cada población fue regenerada bajo condiciones de polinización controlada usando 25-50 plantas hermanas para mantener la integridad genética de la población original (Cronn *et al.* 1997; Seiler 2015).

Para minimizar el efecto del ambiente materno, todos los frutos fueron producidos en un jardín común en el Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, durante las estaciones de crecimiento 2015/16 (experimento 1) y 2016/17 (experimento 2). Una parcela de al menos 30 plantas por biotipo fue asignada aleatoriamente dentro del campo experimental. Cada parcela consistió en dos surcos de 5m de largo y plantas espaciadas a 1m y 0,3m (entre y dentro del surco, respectivamente) logrando una población de 3,3 plantas m⁻². Para la implantación, la dormición de los frutos silvestres se redujo por estratificación, incubando los frutos en una cámara de crecimiento a 5°C durante una semana (ISTA 2004). Frutos pregerminados de las poblaciones silvestres fueron sembrados en bandejas plásticas de 200 celdas de 28x54cm (50cc por celda) y mantenida en invernadero por 30 días a 20-25°C. Los cultivares fueron sembrados manualmente en el jardín común y en V4-V6 (Schneider y Miller 1981) se ajustó la densidad a 3,3 plantas por m⁻² mediante raleo manual. La siembra se realizó el 23 y el 14 de noviembre para los años 1 y 2, respectivamente. Los experimentos fueron regados por goteo diariamente durante todo el ciclo y fertilizados con 80kg ha⁻¹ de fosfato diamónico antes de la siembra y 100kg ha⁻¹ de urea en V4-V6 para lograr un crecimiento óptimo.

Los frutos de cada población fueron producidos bajo condiciones de polinización controladas de los capítulos de 20-30 plantas cubiertas con bolsas de papel previo a la floración, siguiendo a Presotto *et al.* (2014). Durante la floración, los capítulos fueron manualmente polinizados con polen fresco de plantas hermanas en el tercer, quinto y séptimo día desde la floración para asegurar la polinización de todas las flores. Todos los capítulos fueron cosechados

simultáneamente, 60-80 días después de floración (R5; Schneiter y Miller 1981). Después de la cosecha, los frutos fueron inmediatamente trillados y almacenados en condiciones de temperatura ambiente durante dos meses, momento en el cuál empezaron los experimentos.

Tabla 2.1. Localización geográfica de las poblaciones de girasol silvestre. El superíndice indica el experimento en el cual la población fue incluida. Se indican el número de registro, la ciudad más cercana (Argentina) o el estado (Australia, Canadá y EEUU) y el país del cual proviene cada población.

Población	ID	Estado/ciudad	Rango	País	Nº de plantas	Latitud	Longitud
TX ^{1,2}	613728	TEXAS	Nativo	EEUU	-	27,4	-97,8
NM ^{1,2}	468470	NUEVA MÉXICO	Nativo	EEUU	25	33,3	-104,5
OK ²	468483	OKLAHOMA	Nativo	EEUU	18	35,3	-99,6
AK ^{1,2}	613727	ARKANSAS	Nativo	EEUU	-	36,4	-93,7
IN ^{1,2}	468633	INDIANA	Nativo	EEUU	25	38,5	-87,3
CA ²	413131	CALIFORNIA	Nativo	EEUU	-	38,7	-121,8
CO ²	468621	COLORADO	Nativo	EEUU	30	39,1	-108,6
OH ^{1,2}	649853	OHIO	Nativo	EEUU	25	39,2	-84,5
MI ^{1,2}	613789	MISURI	Nativo	EEUU	~120	40,0	-95,3
NE ²	586867	NEBRASKA	Nativo	EEUU	35	41,0	-95,9
IL ¹	435540	ILLINOIS	Nativo	EEUU	90	41,5	-88,1
IO ²	613779	IOWA	Nativo	EEUU	~100	41,7	-96,0
ND ^{1,2}	586888	DAKOTA DEL NORTE	Nativo	EEUU	28	46,0	-98,4
MO ^{1,2}	531035	MONTANA	Nativo	EEUU	~100	46,6	-108,5
SA ^{1,2}	592321	SASKATCHEWAN	Nativo	Canadá	~150	49,4	-104,3
EAU ^{1,2}	653582	NUEVA GALES DEL SUR	No-nativo	Australia	21	-26,6	148,9
DIA ²	834	DIAMANTE	No-nativo	Argentina	~50	-32,0	-60,4
RCU ²	832	RIO CUARTO	No-nativo	Argentina	~150	-33,1	-64,2
WAU ^{1,2}	664685	AUSTRALIA OCCIDENTAL	No-nativo	Australia	22	-33,8	121,9
SAU ^{1,2}	653586	AUSTRALIA MERIDIONAL	No-nativo	Australia	~150	-34,2	140,6
LMA ²	835	LAS MALVINAS	No-nativo	Argentina	~150	-34,5	-68,2
BAR ^{1,2}	833	COLONIA BARON	No-nativo	Argentina	~100	-36,2	-63,9

Experimentos de germinación

Los experimentos de germinación se llevaron a cabo en un diseño en bloques completos aleatorizados en dos momentos: dos meses (T1) y ocho meses (T2) después de la cosecha y temperaturas constantes de 20°C (experimento 1) y 10, 20 y 30°C (experimento 2). La germinación de los frutos fue registrada en dos tiempos para capturar la variación estacional de la dormición del girasol silvestre (Presotto *et al.* 2014): fuerte dormición primaria para evitar la germinación en otoño (evaluada en T1) y dormición disminuida por las bajas temperaturas invernales, las cuales permiten una alta germinación durante la primavera temprana (evaluada en T2). Entre T1 y T2, los frutos fueron almacenados en bolsas trilaminadas de aluminio para protegerlos de la luz y la humedad en una cámara de crecimiento a 5°C durante seis meses.

En cada uno de los momentos, los frutos se colocaron en bandejas cerradas, con base de papel y humedecidas con agua destilada a temperatura constante y fotoperiodo neutro (12 horas de luz/oscuridad). Los frutos germinados de cada repetición fueron contados periódicamente (cada 2-3 días) durante 16 días. En el experimento 2, se utilizaron tres temperaturas de incubación (10°C, 20°C y 30°C) en cuatro poblaciones nativas (AK, IN, ND y TX) y tres poblaciones no-nativas de Argentina (BAR, DIA y RCU). La proporción de frutos germinados fue calculada siguiendo a Presotto *et al.* (2014). Por otro lado, se midieron 10 frutos de cada población, elegidos de manera aleatoria, para determinar el tamaño del fruto (largo y ancho). El peso de los frutos fue obtenido pesando tres muestras independientes de 50 fruto cada una. Los frutos utilizados para medir tamaño y peso son frutos almacenados en condiciones de temperatura ambiente durante al menos 6 meses, suponiendo humedad similar y constante entre poblaciones.

Análisis estadístico

Diferencias entre rangos de los caracteres del fruto: el análisis de la varianza de los cinco caracteres del fruto se realizó usando modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) usando PROC GLIMMIX (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). Debido a la distribución no-normal de los datos expresados en proporción, los modelos que incluyeron este tipo de datos (germinación en T1 y T2) fueron ajustados usando una distribución Beta en lugar de una distribución normal (Bolker *et al.* 2009; Montesinos-Navarro *et al.* 2012). Para el resto de las variables se utilizó una distribución normal y los datos fueron transformados con la raíz cuadrada para mejorar la normalidad y homocedasticidad. La significancia de los efectos fijos fue evaluada usando la estimación pseudo verosimilitud Quasi-Newton y reportada con sus valores F y P. Por otro lado, la significancia de los efectos aleatorios fue evaluada comparando la pseudo verosimilitud del residual (modelo con y sin efectos aleatorios) con test χ^2 (Bolker *et al.* 2009; Montesinos-Navarro *et al.* 2012) usando la opción COVTEST GLM (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). Cuando el efecto aleatorio no fue significativo (es decir,

no mejoró el modelo), este fue removido del modelo (Montesinos-Navarro *et al.* 2012). En el texto, todas las medias son reportadas con su error estándar, a menos que se especifique otra cosa. Cuando las diferencias entre rangos fueron significativas, las medias mínimas cuadradas fueron comparadas usando cuatro contrastes ortogonales: nativo vs. no-nativo (Argentina y Australia); nativo vs. Argentina; nativo vs. Australia y Argentina vs. Australia.

Caracterización climática de los rangos nativos y no-nativos: se obtuvieron 19 variables climáticas biológicamente relevantes de la base de datos BIOCLIM (Hijmans *et al.* 2005) para cada una de las 22 poblaciones geo-referenciadas incluidas en este capítulo. Además, a partir de estas se calcularon y agregaron cuatro variables relacionadas a la temperatura (temperaturas medias y máximas durante la primavera y el verano) y dos relacionadas a las precipitaciones (cantidad de precipitaciones durante la primavera y el verano) para reflejar mejor las condiciones climáticas durante la estación de crecimiento del girasol. Debido a la alta correlación entre variables, se realizaron correlaciones múltiples y para todas las comparaciones con $r > 0,90$ una variable del par fue removida del análisis. Esto se realizó para evitar la redundancia en los análisis y para facilitar la interpretación de los resultados. A partir de esta remoción, 13 variables BIOCLIM representaron los datos climáticos de entrada para los análisis de componentes principales (PCA) y canónico discriminante (CDA) (Tabla 2.2). El PCA se utilizó para producir componentes principales (PCs) que expliquen la variación ambiental independientemente del rango del cual proviene cada población. Por el contrario, el CDA se utilizó para identificar aquellas variables climáticas que maximizan la variación entre grupos (aquí, rangos). El PCA y el CDA fueron realizados usando PROC PRINCOMP y PROC CANDISC (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC), respectivamente.

Tabla 2.2. Variables BIOCLIM utilizadas para los análisis de componentes principales (PCA) y canónico discriminante (CDA). Para cada variable BIOCLIM (BIO1-13) se proveen los autovectores sobre los primeros cuatro (PC) o dos (Can) ejes. Las columnas y filas de latitud y longitud indican los coeficientes de correlación con el resto de las variables. Las correlaciones significativas se indican en negrita. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,0001.

Variable y descripción	Can1	Can2	PC1 _{CLIM}	PC2 _{CLIM}	PC3 _{CLIM}	PC4 _{CLIM}	Latitud	Longitud	
Porcentaje de la variación explicada (%)	93,5	6,5	31,9	26,7	17,2	9,4			
Autovectores									
BIO1	Temperatura (T°) media anual	-0,56	-0,02	0,11	0,51	0,02	-0,13	-0,97***	0.06
BIO2	Rango de T° media mensual	0,00	0,11	-0,38	0,12	0,17	0,32	0,00	0.22
BIO3	Rango de T° anual	0,78	0,03	-0,15	-0,40	0,25	0,36	0,78***	0.01
BIO4	T° media trimestre más húmedo	-0,18	0,36	-0,01	0,14	0,54	-0,35	-0,46*	-0.27
BIO5	T° media trimestre más seco	-0,64	-0,21	0,03	0,44	-0,30	-0,13	-0,68**	0.27
BIO6	T° media del verano	0,16	-0,05	0,13	0,36	0,35	0,25	-0,69**	0.06
BIO7	T° máxima del verano	0,03	0,05	-0,07	0,41	0,29	0,34	-0,62**	0.15
BIO8	Precipitación (pp) anual	0,14	0,22	0,47	-0,09	0,08	0,05	-0,10	-0,44*
BIO9	Pp del mes más húmedo	0,11	0,35	0,43	-0,01	0,10	-0,02	-0,16	-0,46*
BIO10	Estacionalidad de las pp	0,18	0,10	0,10	0,00	0,02	0,51	0,17	-0.01
BIO11	Pp del trimestre más seco	0,16	-0,03	0,40	-0,07	0,01	0,21	-0,13	-0.24
BIO12	Pp del trimestre más húmedo	0,01	-0,33	0,31	0,10	-0,42	0,30	-0,17	0.13
BIO13	Pp del verano	0,14	0,43	0,35	-0,18	0,36	-0,18	0,00	-0,56**
Latitud		0,57**	0,06	-0,25	-0,89***	0,43*	0,36		
Longitud		-0,04	-0,78***	-0,36	0,21	0,24	-0,39	-0,07	

Relación entre las variables climáticas y los caracteres del fruto: se utilizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para evaluar si las diferencias entre rangos encontradas en el modelo nulo podrían ser explicadas por las covariables ambientales. Con el CDA, primero identificamos variables BIOCLIM que difirieran entre rangos. Las variables BIOCLIM significativas fueron incluidas como covariables sustituyendo al efecto fijo población anidado dentro de rango y se comparó el modelo nulo (son covariables) con el modelo completo. El modelo completo incluyó el efecto de la covariable y la interacción covariable por rango. Si las diferencias entre rangos son reducidas o desaparecen después de incluir la covariable climática, tales diferencias pueden ser atribuidas a diferencias climáticas entre los rangos (Colautti *et al.* 2009). En este caso, una regresión lineal entre el carácter y la covariable determinará la fuerza y dirección del cline.

Efecto de la temperatura de incubación sobre la dormición de los frutos: el nivel de dormición de los frutos controla la proporción de semillas germinadas a una temperatura específica (p. ej. 20°C) pero también el rango de temperaturas dentro del cual la germinación ocurre (Batlla y Benech-Arnold 2015; Arana *et al.* 2016). Entonces, para explorar la expresión de dormición en función de la temperatura, se incubaron frutos de tres poblaciones argentinas y cuatro poblaciones nativas a 10, 20 y 30°C. El rango (Argentina y nativo), la temperatura (10, 20 y 30°C), la latitud y todas las interacciones fueron considerados efectos fijos mientras que el bloque dentro de cada temperatura fue considerado aleatorio.

RESULTADOS

Diferencias entre rangos en los caracteres del fruto

Se encontraron diferencias significativas entre rangos y población dentro de rango para la germinación en T1 y T2 (Tabla 2.3). En T1, los efectos experimento e interacción experimento por rango no fueron significativos, pero en T2 se observó un efecto significativo de la interacción experimento por rango (Tabla 2.3). Las poblaciones invasoras germinaron en mayor proporción que las nativas en T1 ($F=34,1$, $P<0,0001$; $0,53\pm 0,10$ y $0,22\pm 0,07$, respectivamente) y T2 ($F=60,2$, $P<0,0001$; $0,67\pm 0,08$ y $0,46\pm 0,07$, respectivamente). Dentro del rango no-nativo, las poblaciones australianas germinaron en proporción significativamente mayor que las argentinas en T1 ($F=8,4$, $P=0,0045$; $0,65\pm 0,12$ y $0,39\pm 0,16$, respectivamente) pero no en T2 ($F=0,32$, $P=0,5738$; $0,76\pm 0,07$ y $0,60\pm 0,14$, respectivamente).

Tabla 2.3. Análisis de la varianza y covarianza para los cinco caracteres del fruto en modelos nulo (sin covariable) y completo (con latitud como covariable). Los efectos significativos ($P < 0,05$) están indicados en negrita.

Carácter	Modelo nulo			Modelo completo		
	Fuente de variación	F	P	Fuente de variación	F	P
Germinación (T1)	Rango	38,5	<0,0001	Rango	3,78	0,0257
	Experimento	2,43	0,1224	Experimento	0,63	0,4294
	Rango*Exp	0,32	0,7256	Rango*Exp	0,26	0,7712
	Pob (Rango)	14,4	<0,0001	Latitud	21,6	<0,0001
				Lat*Rango	4,14	0,0182
Germinación (T2)	Rango	30,1	<0,0001	Rango	5,00	0,0083
	Experimento	0,04	0,8328	Experimento	0,00	0,9953
	Rango*Exp	13,3	<0,0001	Rango*Exp	1,35	0,2634
	Pob (Rango)	23,2	<0,0001	Latitud	22,7	<0,0001
				Lat*Rango	5,31	0,0063
Peso del fruto	Rango	354,5	<0,0001	Rango	0,14	0,8654
	Experimento	1,87	0,176	Experimento	0,04	0,847
	Rango*Exp	0,55	0,5767	Rango*Exp	0,60	0,5501
	Pob (Rango)	92,8	<0,0001	Latitud	1,49	0,2256
				Lat*Rango	0,11	0,9003
Largo del fruto	Rango	7,90	0,0008	Rango	2,65	0,0765
	Experimento	0,04	0,836	Experimento	0,07	0,798
	Rango*Exp	1,33	0,272	Rango*Exp	0,35	0,7061
	Pob (Rango)	10,8	<0,0001	Latitud	7,07	0,0093
				Lat*Rango	3,84	0,0253
Ancho del fruto	Rango	7,22	0,0014	Rango	0,88	0,4165
	Experimento	2,53	0,116	Experimento	0,50	0,483
	Rango*Exp	1,24	0,295	Rango*Exp	0,64	0,5288
	Pob (Rango)	6,16	<0,0001	Latitud	0,31	0,5791
				Lat*Rango	1,49	0,2314

Además, los frutos de las poblaciones invasoras tuvieron mayor peso ($F=646,1$, $P<0,0001$; $13,5\pm 1,4$ vs. $9,2\pm 1,4$ mg fruto⁻¹), largo ($F=15,7$, $P=0,0002$; $0,49\pm 0,02$ vs. $0,45\pm 0,02$ cm) y ancho ($F=13,4$, $P=0,0005$; $0,23\pm 0,01$ vs. $0,20\pm 0,01$ cm) que los frutos de las poblaciones nativas. Dentro del rango no-nativo, las poblaciones australianas presentaron mayor peso que las poblaciones argentinas ($F=170,0$, $P<0,0001$; $16,3\pm 1,2$ vs. $11,5\pm 0,9$ mg fruto⁻¹) pero no fueron significativamente más largas ($F=0,48$, $P=0,4919$; $0,51\pm 0,03$ vs. $0,49\pm 0,02$ cm) ni anchas ($F=3,6$, $P=0,0628$; $0,25\pm 0,01$ vs. $0,22\pm 0,01$ cm). En todos los caracteres se observó una amplia variabilidad dentro del rango (Fig. 2.1).

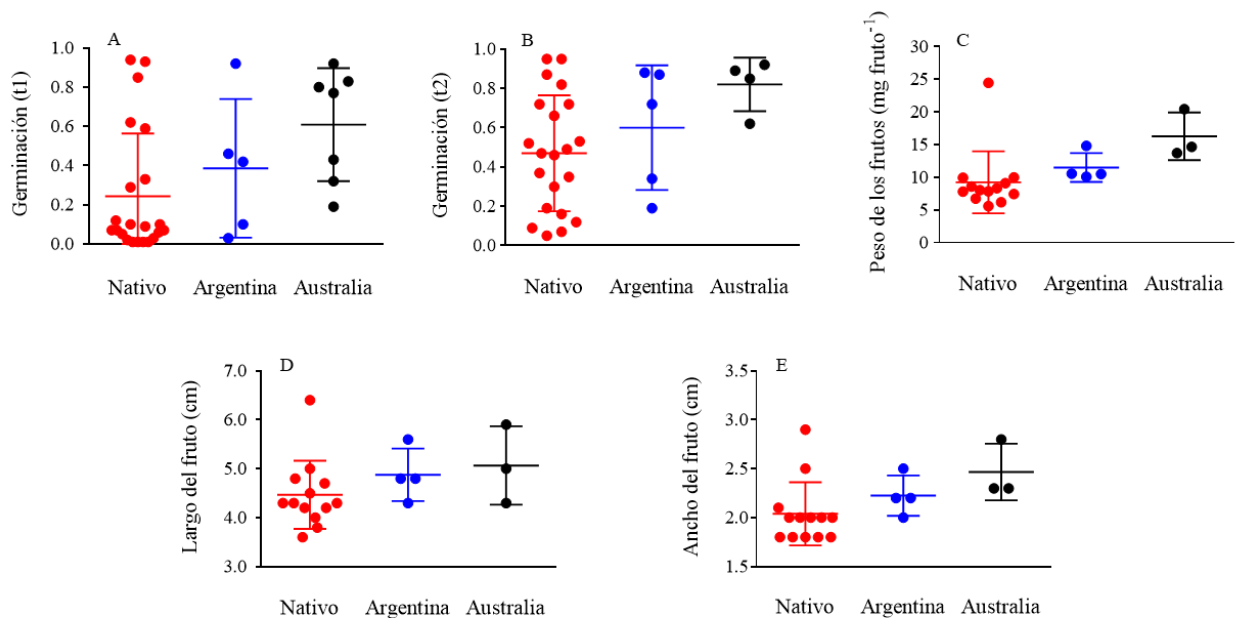


Figura 2.1. Diferencias entre rangos en los caracteres del fruto. Germinación de los frutos en T1 (A) y T2 (B), peso (C), largo (D) y ancho (E) de los frutos. Cada punto corresponde al valor medio de una población dentro de un experimento y tiempo (A y B) o al valor medio de dos experimentos (C-E). Las poblaciones nativas, argentinas y australianas están representadas por símbolos rojos, azules y negros, respectivamente.

Caracterización climática de los rangos nativos y no-nativos

El análisis de PCA de las 13 variables BIOCLIM resultó en cuatro variables compuestas designadas PC1_{CLIM}-PC4_{CLIM}, las que captataron 31,9%, 26,7%, 17,2% y 9,4% de la variación total, respectivamente (Tabla 2.2). El PC1_{CLIM} estuvo representado por valores positivos de todas las variables relacionadas con la cantidad de precipitaciones, mientras que el PC1_{CLIM} lo estuvo por valores positivos de todas las variables relacionadas con la temperatura y un valor negativo de BIO3 (Tabla 2.2). La distribución de las poblaciones nativas ocurrió en todo el rango climático mientras que las poblaciones invasoras (rango no-nativo) no se encontraron en los ambientes más fríos (Fig. 2.2A). Por esto, se realizó un CDA para identificar las variables BIOCLIM que explicaran las diferencias climáticas entre rangos.

El CDA mostró diferencias significativas entre rangos (λ de Wilks =0,0053, $F=6,89$, $P=0,0002$; Fig. 2.2B). El primer eje canónico (Can1) explicó el 93,5% de la variación entre rangos y claramente diferenció los rangos no-nativos (Argentina y Australia) del rango nativo ($F=14,1$, $P=0,0009$ y $F=16,1$, $P=0,0006$, respectivamente; Fig. 2.2B). Tres de las 13 variables BIOCLIM estuvieron asociadas significativamente al Can1 (BIO1, BIO3, y BIO5). Cuanto mayor el Can1, menor la temperatura media anual (BIO1; $F=4,3$, $P=0,0297$), menor la temperatura media del trimestre más seco (BIO5; $F=7,2$, $P=0,0048$) y mayor el rango de temperatura anual (BIO3; $F=14,4$, $P=0,0002$). La media y el desvío estándar de estas tres variables es provista para cada rango en la Fig. 2.2B. Por otro lado, el segundo eje canónico (Can2) explicó solo el 6,5% de la variación entre rangos y diferenció los rangos no-nativos entre sí (Fig. 2.2B); sin embargo, tal diferencia no fue estadísticamente significativa ($F=2,1$; $P=0,1521$). Las tres variables BIOCLIM que explicaron las diferencias entre rangos mostraron una fuerte correlación con la latitud (Tabla 2.2) indicando que la latitud puede ser utilizada como un buen proxy de las diferencias climáticas entre rangos.

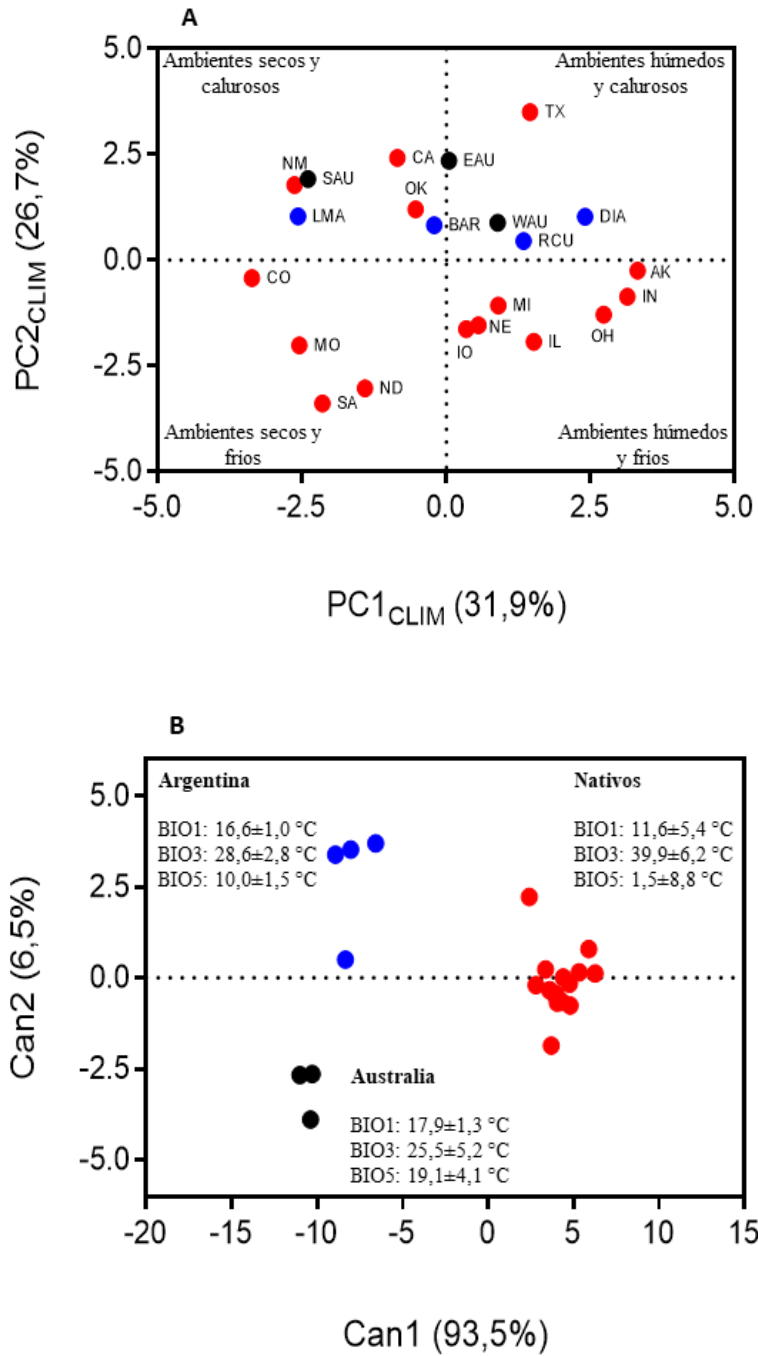


Figura 2.2. Variabilidad ambiental dentro de los rangos nativos y no-nativos del girasol silvestre. Ambos ejes representan el primer y segundo eje del análisis de componentes principales (PCA; A) y del análisis canónico discriminante (CDA; B) de las 13 variables BIOCLIM (Tabla 2.2). Las poblaciones nativas, argentinas y australianas están representadas por símbolos rojos, azules y negros, respectivamente.

La variación geográfica explica las diferencias en dormición, pero no en el peso ni el tamaño de los frutos

Cuando la latitud fue incluida como covariable en los modelos de germinación, el efecto latitud fue significativo y explicó la mayor parte de las diferencias entre rango (Tabla 2.4). En el modelo completo, se observaron efectos significativos del rango, latitud y de la interacción rango por latitud, tanto en T1 como T2 (Tabla 2.4). Sin embargo, el efecto latitud explicó la mayor parte de la variación (~70%; Tabla 2.4). Los efectos experimento y experimento por rango no fueron significativos (Tabla 2.4). Además, se obtuvieron resultados similares cuando BIO1, BIO3 y BIO5 fueron incluidas individualmente en el modelo (Tabla 2.5). Para desglosar la interacción latitud por rango observada se realizó una regresión lineal entre la latitud y la germinación para cada uno de los tres rangos. Las poblaciones invasoras de Argentina y nativas mostraron similar dirección del cline (a mayor latitud menor germinación; Fig. 2.3) pero la respuesta a la latitud fue mucho más fuerte en las poblaciones argentinas (Fig. 2.3). Por otro lado, no se observó una regresión significativa entre la germinación y la latitud en el rango de Australia (Fig. 2.3). En cuanto a las variables morfológicas, se observó un efecto significativo de la latitud y de la interacción rango por latitud solo en el largo de los frutos (Tabla 2.4). El largo de los frutos se incrementó con la latitud en las poblaciones australianas ($b=0,018$; $r^2=0,58$; $P=0,0006$) pero la regresión no fue significativa dentro de los rangos Argentina y nativo ($P=0,3548$ y $P=0,1109$, respectivamente).

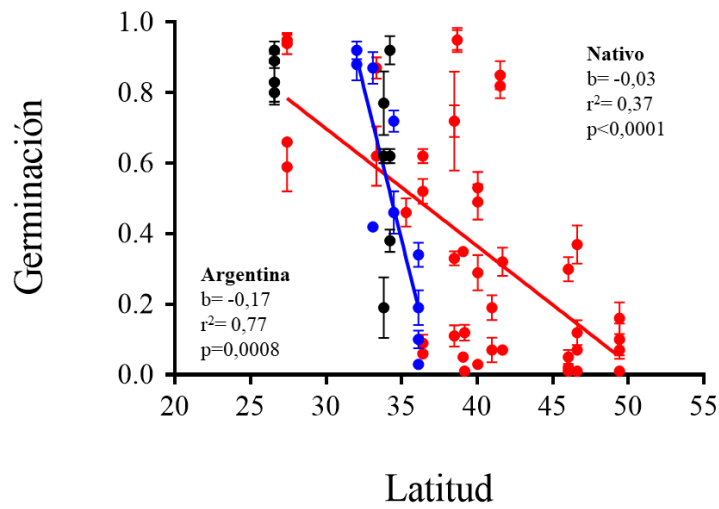


Figura 2.3. Relación entre la latitud y la germinación de los frutos en el girasol nativo y no-nativo. Las poblaciones nativas, argentinas y australianas están representadas por símbolos rojos, azules y negros, respectivamente. Cada punto representa el valor medio y el error estándar de una población. Las líneas roja y azul (poblaciones nativas y argentinas, respectivamente) indican una regresión lineal significativa entre la latitud y la germinación. Se proveen la pendiente (b), los valores r² y p de las regresiones significativas.

Tabla 2.4. Análisis de la varianza para la germinación de los frutos en T1 y T2 bajo tres temperaturas de incubación constantes (10, 20 y 30°C). Los efectos significativos (P<0,05) están indicados en negrita. *Numerador, denominador de los grados de libertad de cada efecto.

Caracter	Germinación del fruto en T1			Germinación del fruto en T2		
Efecto	F	gl*	P	F	gl*	P
Temperatura	24,62	2/66	<0,0001	13,07	2/67	<0,0001
Rango	0,00	1/66	0,9524	2,47	1/67	0,121
Temp*Rango	8,83	2/66	0,0004	8,89	2/67	0,0004
Latitud	3,33	1/66	0,0725	1,09	1/67	0,3001
Lat*Temp	22,05	2/66	<0,0001	11,95	2/67	<0,0001
Lat*Rango	0,07	1/66	0,7936	3,17	1/67	0,0797
Lat*Rango*Temp	6,31	2/66	0,0008	7,91	2/67	0,0001

Tabla 2.5. Análisis de covarianza para los cinco caracteres del fruto usando independientemente BIO1, BIO3 y BIO5 como covariables. Efectos significativos ($P < 0,05$) en negrita. FV: fuente de variación.

Carácter	FV	BIO1		BIO3		BIO5	
		F	P	F	P	F	P
Germinación (T1)							
	Rango	4,3	0,0158	8,74	0,0003	12,33	<0,0001
	Experimento	2,76	0,0991	3,54	0,0625	2,7	0,1029
	Rango*Exp	1,6	0,2062	1,63	0,2010	1,2	0,3038
	BIO	18,6	<0,0001	10,58	0,0015	15,14	0,0002
	BIO*Rango	3,86	0,0237	9,19	0,0002	13,23	<0,0001
Germinación (T2)							
	Rango	2,85	0,0622	3,24	0,0431	7,33	0,0010
	Experimento	0,69	0,4063	2,28	0,1337	0,25	0,6205
	Rango*Exp	0,5	0,6076	0,05	0,953	0,65	0,5221
	BIO	11,25	0,0011	17,04	<0,0001	7,36	0,0077
	BIO*Rango	2,54	0,0836	3,67	0,0287	6,52	0,0021
Peso de los frutos							
	Rango	1,99	0,1426	8,06	0,0006	1,89	0,1577
	Experimento	0,05	0,8244	0,14	0,7078	0,04	0,8352
	Rango*Exp	0,59	0,5572	0,09	0,9181	0,55	0,5807
	BIO	3,76	0,0558	0,17	0,6802	1,39	0,2415
	BIO*Rango	0,99	0,3747	4,43	0,0148	1,16	0,3188
Largo de los frutos							
	Rango	7,97	0,0007	11,45	<0,0001	5,37	0,0063
	Experimento	0,07	0,7872	0,19	0,6624	0,13	0,7228
	Rango*Exp	0,35	0,7044	0,82	0,4417	0,34	0,7126
	BIO	16,09	0,0001	0,1	0,7531	0,95	0,3322
	BIO*Rango	6,77	0,0019	10,27	<0,0001	6,73	0,0019
Ancho de los frutos							
	Rango	2,48	0,0899	4,17	0,0187	0,57	0,5681
	Experimento	0,51	0,4788	1,39	0,2411	0,46	0,4999
	Rango*Exp	0,65	0,5262	0,72	0,4872	0,63	0,5328
	BIO	3,5	0,0647	0,45	0,5027	0	0,9575
	BIO*Rango	1,92	0,1533	3,41	0,0376	1,18	0,3129

Efecto de la temperatura de incubación sobre la expresión de la dormición

Frutos de tres poblaciones invasoras (Argentina) y cuatro nativas fueron incubados a temperatura constante de 10, 20 y 30°C. En ambos tiempos (T1 y T2) se observaron efectos significativos de la temperatura y de las interacciones rango por latitud, rango por temperatura y rango por latitud y temperatura (Tabla 2.4). En promedio, la germinación de los frutos del rango nativo en T1 varió desde cero a 10°C a $0,20 \pm 0,05$ a 20°C (Fig. 2.4A), mientras que la germinación dentro del rango no-nativo varió desde $0,18 \pm 0,04$ a 30°C a $0,54 \pm 0,07$ a 20°C (Fig. 2.4B). En T2, la germinación de los frutos del rango nativo varió desde $0,11 \pm 0,04$ a 30°C a $0,50 \pm 0,04$ a 20°C (Fig. 2.4C), mientras que la germinación dentro del rango no-nativo varió desde $0,13 \pm 0,03$ a 30°C a $0,71 \pm 0,06$ a 20°C (Fig. 2.4D). El efecto de la interacción latitud por rango y temperatura (Tabla 2.4) indica que el efecto de la latitud varió con la temperatura, pero además esta variación fue rango-dependiente. En el rango nativo, tres de las cuatro poblaciones mostraron una dormición muy fuerte a 10°C y 30°C (Fig. 2.4A y C) pero a 20°C se observó una correlación significativa con la latitud ($r = -0,85$; $P < 0,0001$ y $r = -0,78$; $P = 0,0003$ para la germinación en T1 y T2, respectivamente). Dentro del rango no-nativo, se observó un cline similar a 20°C ($r = -0,79$; $P = 0,0041$ y $r = -0,68$; $P = 0,0157$ para la germinación en T1 y T2, respectivamente). Sin embargo, a 10°C este cline se invirtió, la germinación de los frutos se incrementó con la latitud ($r = 0,91$; $P < 0,0001$ y $r = 0,90$; $P < 0,0001$ para la germinación en T1 y T2, respectivamente; Fig. 2.4B y D).

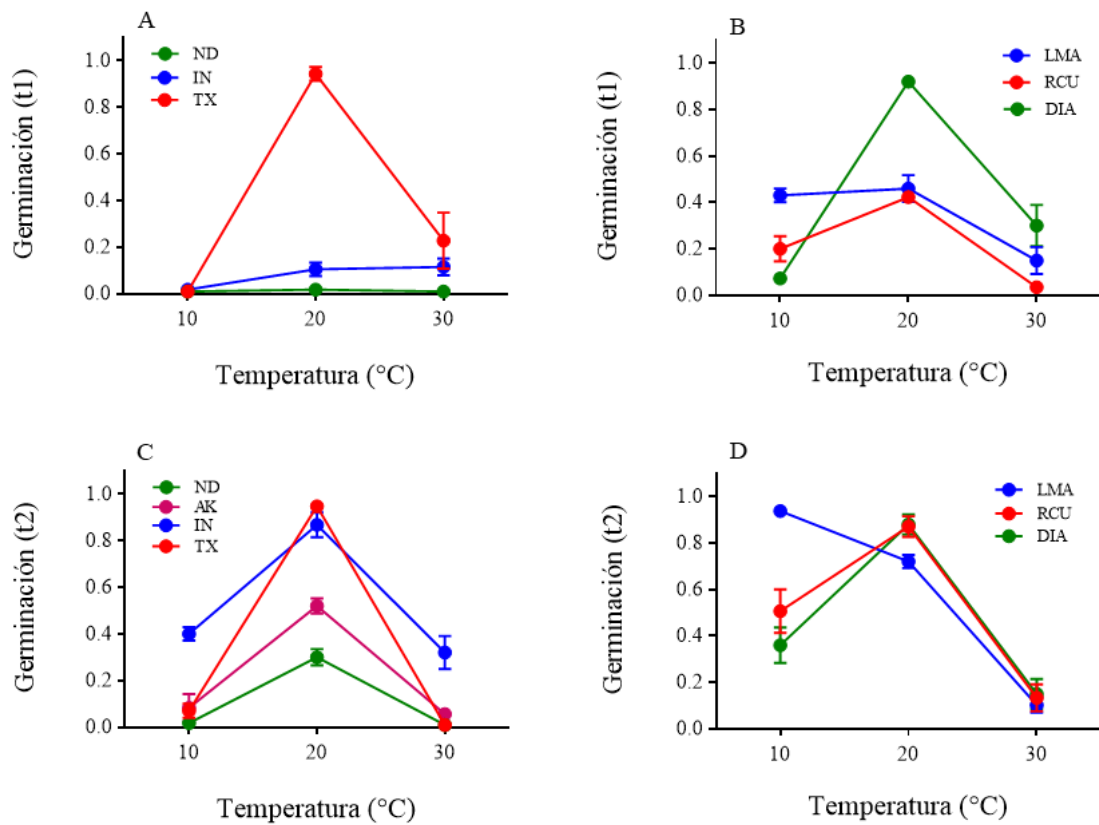


Figura 2.4. Germinación de los frutos de poblaciones nativas e invasoras de girasol incubados en tres temperaturas constantes (10, 20, y 30 °C) en T1 (A y B para nativos e invasores, respectivamente) y T2 (C y D para nativos e invasores, respectivamente).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se revelaron diferencias genéticas para caracteres del fruto entre poblaciones provenientes del rango de distribución nativo y no-nativo de girasol. Los frutos del rango no-nativo mostraron mayor peso, tamaño y germinación (menor dormición) que los frutos del rango nativo (Fig. 2.1). Dichas diferencias en caracteres ecológicamente relevantes podrían haber contribuido al establecimiento, naturalización y/o expansión del girasol silvestre fuera del rango nativo, limitando el uso de tecnologías en el cultivo de girasol debido al flujo génico cultivo-silvestre (Cantamutto y Poverene 2007; Presotto *et al.* 2012). Las diferencias entre rangos en dormición fueron principalmente explicadas por una variación latitudinal de la dormición observada tanto en el rango nativo como en uno de los rangos no-nativos (Tabla 2.3; Fig. 2.3) mientras que las diferencias en el peso y tamaño de los frutos no pudieron ser explicadas por las variables climáticas (Tabla 2.3). En resumen, con el uso de diferentes enfoques complementarios, el presente capítulo aporta evidencia de una evolución adaptativa rápida de la dormición en el girasol argentino en respuesta a las mayores temperaturas encontradas en el rango no-nativo.

Diferencias entre rangos en el peso y tamaño de los frutos

El incremento del tamaño y la germinación de los frutos fueron previamente propuestos como caracteres que promueven la invasión (Buckley *et al.* 2003; Leiblein-Wild *et al.* 2014; Ortman *et al.* 2016). En este capítulo, el peso y tamaño de los frutos fueron consistentemente mayores en el rango no-nativo que en el rango nativo (Fig. 2.1C-E) y tales diferencias no pudieron ser explicadas por diferencias climáticas entre rangos (Tabla 2.3). La divergencia fenotípica del peso y tamaño de los frutos podría ser el resultado de uno o más factores: 1) Selección natural durante el establecimiento, naturalización y/o expansión en el rango no-nativo; 2) Eventos estocásticos (p. ej. introducción de frutos grandes); 3) Flujo génico reciente con el cultivo (Keller y Taylor, 2008; Presotto *et al.* 2012, 2017; Colautti y Lau 2015). Con la excepción de una población nativa con frutos excepcionalmente grandes (IN; Fig. 2.1D y E), todas las poblaciones nativas presentaron frutos más pequeños y livianos que cada una de las poblaciones invasoras (Fig. 2.1D y E). Por lo tanto, al menos con nuestra muestra de poblaciones, el mayor tamaño y peso de los frutos observados en las poblaciones invasoras no puede ser atribuido a la introducción de una población con frutos grandes.

La hibridación cultivo-silvestre es una posible explicación del mayor tamaño de frutos encontrado en el rango no-nativo. El flujo génico entre el girasol cultivado y silvestre ha sido documentado tanto en el rango nativo (Arias y Rieseberg 1994; Snow *et al.* 1998) como en el no-nativo (Ureta *et al.* 2008a, b; Mondon *et al.* 2018). La hibridación cultivo-silvestre produce rápidamente un incremento en el tamaño de los frutos en la progenie híbrida (Presotto *et al.*

2011, 2015, 2017), por lo tanto, sería una forma rápida de incrementar la variabilidad fenotípica sobre la cual la selección puede actuar. Sin embargo, un estudio reciente usando estas mismas poblaciones argentinas no detectó introgresión significativa del cultivo en las poblaciones silvestres (Mondon *et al.* 2018), convirtiendo poco probable esta hipótesis.

Estudios previos han reportado variaciones geográficas en el peso de los frutos, sugiriendo un papel adaptativo para este carácter. Por ejemplo, el peso de los frutos varió a lo largo de un gradiente de aridez (Volis 2009; Konarzewski *et al.* 2012) y con la latitud (Moles y Westoby 2003; Murray *et al.* 2004). En este capítulo, no se identificó ningún cline geográfico en los caracteres morfológicos. Solo hubo una excepción, la relación positiva entre el largo de los frutos y la latitud en Australia, sin embargo, esta relación no fue observada en ninguno de los otros dos rangos y podría ser el resultado de una población con frutos especialmente grandes (WAU) que junto con el bajo número de poblaciones utilizadas podría producir una relación no funcional. La ausencia de variación latitudinal en el peso y tamaño de los frutos ha sido publicada en el girasol nativo (McAssey *et al.* 2016). Por lo tanto, es posible que factores bióticos (p. ej. selección pre-dispersión por pájaros, Presotto *et al.* 2015), factores abióticos no capturados en este estudio y/o mecanismos de compensación con caracteres no medidos (p. ej. tamaño de planta, habilidad para competir) estén actuando sobre el peso y tamaño de los frutos de girasol. Además, es interesante destacar que no se encontró correlación entre el peso de los frutos y su dormición en ninguno de los rangos ($P > 0.46$ y $r^2 < 0.03$), indicando que ambos caracteres pueden evolucionar independientemente.

Evolución adaptativa rápida de la dormición en el girasol argentino

En este capítulo se aporta evidencia de una evolución rápida y adaptativa de la dormición del fruto en el girasol argentino en respuesta a las mayores temperaturas encontradas en el rango no-nativo. Dos líneas de evidencia complementarias soportan esta idea: 1) Las diferencias genéticas entre rangos en dormición son explicadas en gran parte por diferencias en latitud (Tabla 2.3); 2) La dirección del cline latitudinal en Argentina es similar al observado en el rango nativo (es decir, presencia de clines paralelos; Fig. 2.3)

En este capítulo, la mayor germinación de las poblaciones invasoras fue explicada principalmente por un cline latitudinal (Tabla 2.3). Diferencias entre rangos explicadas por clines geográficas ha sido previamente utilizada para inferir evolución dentro del rango no-nativo (post-introducción; Colomer-Ventura *et al.* 2015). Este enfoque asume que la convergencia fenotípica entre rangos es el resultado de una evolución rápida dentro del rango no-nativo. Sin embargo, una mayor germinación de las poblaciones invasoras podría deberse a la introducción de poblaciones pre-adaptadas (Keller y Taylor 2008; Colautti *et al.* 2009; Colautti y Lau 2015), especialmente si la distribución en el rango no-nativa no es amplia, o a

flujo génico reciente con el girasol cultivado (Presotto *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2017). Estudios fenotípicos previos sugieren dos fuentes de introducción independientes en la Argentina: 1) La región suroeste para DIA, involucrando poblaciones desde California a Colorado (Cantamutto *et al.* 2010a) y 2) La región centro-este para el resto de las poblaciones, incluyendo poblaciones desde Nebraska a Ohio (Cantamutto *et al.* 2010a). En este capítulo, se observó una amplia variedad de fenotipos de dormición entre las probables fuentes de introducción (Fig. 2.1A, B), siendo posible la hipótesis de introducción de genotipos pre-adaptados. Sin embargo, la expansión después de una probable única introducción cerca de la población de RCU (Cantamutto *et al.* 2010a, b) y la variación clinal observada (discutido abajo) sugieren que la divergencia en dormición fue post-introducción.

Por otro lado, la presencia de clines geográficos dentro del rango nativo sugiere fuertemente que esos caracteres están bajo selección natural y por lo tanto confieren adaptación local (Montague *et al.* 2008; Konarzewski *et al.* 2012; Colomer-Ventura *et al.* 2015). Aunque la deriva génica en poblaciones muy chicas puede causar la aparición de clines no adaptativos (Colautti y Lau 2015), la evidencia previa sugiere que no hubo cuellos de botella severos durante la introducción del girasol en Argentina (Cantamutto *et al.* 2010a; Garayalde *et al.* 2011; Mondon *et al.* 2018). En este capítulo se demuestra que la dormición en el girasol argentino evolucionó en respuesta a la temperatura, reestableciendo el cline latitudinal observado en el rango nativo (Fig. 2.3). Más aún, las poblaciones argentinas mostraron una variación similar a las poblaciones nativas en dormición en una región de distribución mucho más pequeña, lo cual produjo una clina más fuerte (Fig. 2.3). Por el contrario, no observamos ningún tipo de variación clinal en la dormición del girasol australiano (Fig. 2.3).

La divergencia entre poblaciones de girasol para los niveles de dormición fue previamente reportada, tanto en Argentina (Presotto *et al.* 2014) como en el rango nativo (Brunick 2007) y la importancia adaptativa de tal divergencia fue recientemente evaluada a campo. En un experimento de banco de frutos en el campo, realizado en el límite sur de la distribución del girasol argentino (S 38°41'38"), se observó que la baja dormición de la población DIA resultó en una alta germinación durante el otoño, con la consecuente muerte de la mayoría de las plantas durante el invierno. Por otro lado, la alta dormición de la población BAR le permitió a la población sobrevivir el invierno en estado de fruto dormante y germinar durante la primavera temprana (resultados no publicados). Experimentos de trasplante recíprocos usando los extremos de la distribución de girasol representan un enfoque interesante para detectar el impacto de diferencias fenotípicas en la dormición sobre la aptitud biológica de las poblaciones. Finalmente, dentro del rango nativo se reportó evidencia de adaptación local para un gen asociado a la dormición (el factor de transcripción DELLA; McAssey *et al.* 2016) aunque lamentablemente la dormición no fue registrada en dicho estudio. Futuros estudios que

relacionen la evolución de genes candidatos con datos fenotípicos ayudarán a mejorar la comprensión de las bases moleculares de la adaptación local.

Respuesta diferencial a la temperatura entre el girasol nativo y no-nativo

Además del efecto principal de la temperatura sobre las variaciones en dormición a lo largo de un gradiente latitudinal, la temperatura también puede afectar tanto la expresión de la dormición como la velocidad de germinación de los frutos no dormantes en variaciones mucho más pequeñas, como los microclimas (Batlla y Benech-Arnold 2015; Arana *et al.* 2016; Marcer *et al.* 2018). Cuando los frutos fueron incubados en tres temperaturas distintas (10, 20 y 30°C) la latitud explicó las diferencias en dormición entre rangos pero de una manera más compleja, a través de las interacciones con la temperatura y el rango (Tabla 2.4). A 30°C, la germinación fue muy baja en la mayoría de las poblaciones y contrariamente a lo observado a 20°C no se incrementó después del invierno simulado (T2). En T1, la baja germinación puede ser explicada por una mayor expresión de la dormición en altas temperaturas de incubación, es decir, los frutos germinan en un rango más estrecho de temperaturas (Batlla y Benech-Arnold 2015) mientras que en T2 la inducción de dormición secundaria por altas temperaturas es la causa más probable (Batlla y Benech-Arnold 2015). En T2 a 30°C, todos los frutos germinados fueron registrados en los primeros cuatro días (datos no mostrados), sugiriendo que los frutos con menor dormición primaria (debido al almacenamiento en frío) fueron rápidamente inducidos en dormición secundaria.

A 10°C, se observó que el cline latitudinal fue invertido en las poblaciones argentinas; es decir, a mayor latitud, mayor germinación, tanto en T1 como en T2 (Fig. 2.4). Se sugiere que este comportamiento es resultado de diferencias genéticas en las temperaturas cardinales para la expresión de la dormición (en este caso, la temperatura mínima a la cual se expresa la dormición; Batlla y Benech-Arnold 2015; Arana *et al.* 2016). Por lo tanto, mientras el nivel de dormición expresado a 20°C, explicaría las grandes diferencias en la distribución sobre un gradiente latitudinal (a mayor latitud, mayores niveles de dormición; Burghardt *et al.* 2016), las temperaturas cardinales podrían ajustar la germinación en respuesta a variables microclimáticas, permitiendo una rápida germinación durante la primavera temprana (Arana *et al.* 2016). Aunque la fisiología de la dormición es un proceso ampliamente estudiado, raramente se ha reportado divergencia evolutiva en las temperaturas cardinales (Xia *et al.* 2011; Leiblein-Wild *et al.* 2014; Rosbakh y Poschlod 2015; Arana *et al.* 2016). Por lo tanto, son necesarias futuras investigaciones sobre las bases fisiológicas de la dormición y su relación con la adaptación local. En este sentido, el girasol invasor es un sistema modelo prometedor.

En conclusión, en este capítulo se aporta evidencia de evolución adaptativa rápida de los caracteres del fruto en poblaciones invasoras de girasol. En Argentina, la dormición evolucionó

en respuesta a la temperatura, estableciendo el cline latitudinal observado en el rango nativo y contribuyendo a la adaptación local durante la expansión. Por otro lado, el incremento del tamaño de los frutos de las poblaciones invasoras no pudo ser adjudicado a diferencias climáticas entre rangos, esto podría indicar que dicho carácter juega un rol en la invasión en sí misma aunque el efecto de flujo génico reciente con el cultivo no puede ser descartado. Entre las poblaciones australianas no se encontró evidencia de adaptación local, por lo tanto es necesario un muestreo más amplio para evaluar qué tan común es la evolución rápida en el girasol silvestre. Finalmente, se demostró que los parientes silvestres de los cultivos pueden evolucionar rápidamente en respuesta a las nuevas condiciones abióticas encontradas en el rango no nativo, lo cual es importante en el manejo de las plantas invasoras y en la predicción del riesgo de escape de alelos del cultivo hacia los sistemas naturales.

CAPÍTULO 3

Tolerancia a eventos extremos de temperatura en girasol silvestre y cultivado durante estadios vegetativos tempranos

INTRODUCCIÓN

Las condiciones de estrés abiótico producidas por salinidad, sequía y/o temperaturas extremas son la principal causa de pérdida de rendimiento de los cultivos extensivos en el mundo (IPCC, 2014). El estrés abiótico es capaz de disminuir los rendimientos a través de diferentes vías, como pueden ser: la reducción de la acumulación de biomasa total, reducción de la biomasa particionada a órganos de cosecha (es decir, índice de cosecha) y en los casos más extremos causando mortandad de las plantas cultivadas (Witcombe *et al.* 2008). Existe acuerdo entre las predicciones climáticas acerca del incremento, no solo de la temperatura media sino también de la variabilidad climática en los próximos 50-100 años (Battisti y Naylor 2009; Gornall *et al.* 2010). Una mayor variabilidad climática aumenta la probabilidad de ocurrencia de eventos extremos, como los extremos de temperatura y los períodos extendidos de sequía/inundaciones.

Los eventos extremos pueden ser definidos de acuerdo a dos grandes perspectivas (Diez *et al.* 2012). Primero, poniendo el foco solo en las condiciones climáticas, los eventos extremos pueden ser definidos como episodios climáticos estadísticamente raros (p. ej. temperaturas mayores/menores que el 95% de las temperaturas históricas para un determinado momento). Sin embargo, esta definición dice poco o nada acerca del impacto de los eventos extremos sobre la performance de los organismos. Por esto, siguiendo un criterio focalizado en los organismos, los eventos extremos son aquellos que exceden la capacidad de aclimatación de los organismos, alterando irreversiblemente sus funciones normales. En plantas, los eventos extremos de temperatura podrían afectar la supervivencia, la tasa de crecimiento, la aptitud biológica de las poblaciones naturales y el rendimiento de los cultivos (Deryng *et al.* 2014; Niu *et al.* 2014; Orsenigo *et al.* 2014). En cultivos de verano, temperaturas extremas (p. ej. olas de calor o heladas tardías) pueden afectar dramáticamente la supervivencia de las plantas durante la etapa de implantación (Hniličková *et al.* 2017; Prasad *et al.* 2017), comprometiendo el rendimiento de los cultivos.

La tolerancia al estrés es la habilidad de una planta para mantener el crecimiento, la aptitud biológica o el rendimiento aún en presencia del estrés (Mickelbart *et al.* 2015). En plantas, la tolerancia a temperaturas extremas es comúnmente adquirida después de un período de exposición a temperaturas estresantes, pero no letales, proceso llamado aclimatación

(Thomashow 2010; Mickelbart *et al.* 2015) o tolerancia termo-adquirida (Senthil-Kumar *et al.* 2003; Yeh *et al.* 2012). La duración del proceso de aclimatación puede variar desde horas (Senthil-Kumar *et al.* 2003; Rampino *et al.* 2009) para el estrés por calor a días (Byun *et al.* 2014; Robison *et al.* 2017) para el estrés por heladas o frío. Durante la aclimatación, el nivel de expresión de cientos de genes sensibles al estrés es alterado con el objetivo de preparar a la planta para soportar el estrés (Rampino *et al.* 2009; Thomashow 2010; Jia *et al.* 2016).

En las poblaciones silvestres, la dormición y el momento de germinación son responsables de ubicar las etapas reproductivas en el período más favorable para el crecimiento (Donohue 2014; Arana *et al.* 2016) mientras que, en los cultivos, el manejo de la fecha de siembra determina el ambiente durante las fases reproductivas. En cultivos de verano, para minimizar la ocurrencia de estrés durante la floración, los productores siembran al inicio de la primavera después de la fecha media de la última helada (Andrade 1995) y más recientemente en Argentina, durante el inicio del verano (Bonelli *et al.* 2016; Gambin *et al.* 2016) exponiendo las fases tempranas del cultivo a estrés por frío (o heladas; EF) y calor (EC), respectivamente.

Durante la domesticación, la selección consciente e inconsciente de los primeros agricultores cambió los fenotipos de las plantas cultivadas respecto de sus antecesores silvestres (Hancock 2012; Meyer y Purugganan 2013). Los caracteres típicos de la domesticación incluyen frutos grandes sin dormición, retención de frutos, crecimiento temprano rápido y altos índices de cosecha (Mercer *et al.* 2007; Hancock 2012; Presotto *et al.* 2012). El incremento en la utilización de recursos para crecimiento en los cultivos probablemente redujo la cantidad de recursos destinados a la tolerancia del estrés biótico (Agrawal *et al.* 2015) y abiótico (Koziol *et al.* 2012). La compensación entre el crecimiento y la tolerancia a estrés se ha sugerido como un factor clave en la distribución de especies silvestres (Koehler *et al.* 2012; Oakley *et al.* 2014; Wos y Willi 2015). Por ejemplo, poblaciones adaptadas a altas latitudes mostraron una mayor tolerancia al estrés por heladas y un menor crecimiento, aún en ausencia de estrés mientras que las poblaciones adaptadas a menores latitudes mostraron una selección relajada sobre la tolerancia a heladas, lo que les permitió destinar mayor cantidad de recursos a crecimiento (Koehler *et al.* 2012; Oakley *et al.* 2014). Además, se ha sugerido un rol importante de la compensación entre el crecimiento y la tolerancia a estrés en la evolución del cultivo y de biotipos maleza de girasol (Mayrose *et al.* 2011; Koziol *et al.* 2012; Presotto *et al.* 2017).

Los objetivos del presente capítulo fueron 1) Desarrollar una técnica de alto rendimiento para evaluar la tolerancia a temperaturas extremas (EC y EF), 2) Evaluar el comportamiento de materiales silvestres y cultivados de girasol y 3) Evaluar la existencia de un mecanismo de compensación entre crecimiento y tolerancia a las temperaturas extremas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma

Los frutos de los biotipos utilizados en este capítulo fueron producidos en 2014/15 en un jardín común en el Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, mediante cruzamientos manuales controlados. Una parcela de al menos 30 plantas por biotipo fue asignada aleatoriamente dentro del campo experimental. Cada parcela consistió en dos surcos de 5m de largo y plantas espaciadas a 1m y 0,3m (entre y dentro del surco, respectivamente) logrando una población de 3,3 plantas m⁻². Para la implantación, la dormición de los frutos silvestres se redujo por estratificación, incubando los frutos en una cámara de crecimiento a 5°C durante una semana (ISTA 2004). Frutos pregerminados de las poblaciones silvestres fueron sembrados en bandejas plásticas de 200 celdas de 28x54cm (50cc por celda) y mantenida en invernadero por 30 días a 20-25°C. Los cultivares fueron sembrados manualmente en el jardín común y en V4-V6 (Schneiter y Miller 1981) se ajustó la densidad a 3,3 plantas por m⁻² mediante raleo manual. La siembra/transplante se realizó el 3 de noviembre. Los experimentos fueron regados por goteo diariamente durante todo el ciclo y fertilizados con 80kg ha⁻¹ de fosfato diamónico antes de la siembra y 100kg ha⁻¹ de urea en V4-V6 para lograr un crecimiento óptimo.

En los biotipos silvestres, capítulos de al menos 15 plantas por biotipo fueron cubiertos en R3-R4 (Schneiter y Miller 1981) y polinizados a partir de R5 cada 2-3 días con polen fresco de plantas hermanas. En los materiales cultivados, los frutos de las líneas HA89 y B59 se produjeron cubriendo los capítulos en R3-R4 hasta madurez fisiológica mientras que los frutos de los cultivares HS03 y VDH487 fueron provistos por Advanta Semillas. Para la producción de frutos de los híbridos cultivo-silvestre, se cubrieron capítulos del parental femenino en R3-R4 y durante R5 todas las flores fueron emasculadas diariamente por la mañana y polinizadas por la tarde con polen fresco del parental masculino correspondiente. En los cruzamientos con parental femenino silvestre se utilizaron al menos 10 plantas madre y tres a cinco plantas del cultivo como fuente de polen mientras que en los cruzamientos con parental femenino cultivado se utilizaron de tres a cinco plantas madre y cinco a 10 plantas silvestres como fuente de polen. Todos los capítulos fueron cosechados simultáneamente, 60-80 días después de floración (R5; Schneiter y Miller 1981). Después de la cosecha, los frutos fueron inmediatamente trillados y almacenados en condiciones de temperatura ambiente hasta el inicio de los experimentos.

En los distintos experimentos fueron utilizadas siete poblaciones silvestres, cinco colectadas en la región central de Argentina (Cantamutto *et al.* 2010a; Casquero *et al.* 2013): Río Cuarto (RCU), Barrow (BRW), Adolfo Alsina (AAL), Diamante (DIA) y Las Malvinas (LMA) y dos

provenientes de Norteamérica: Indiana (IN; PI 468633) e Illinois (IL, PI 435540). El panel cultivado estuvo representado por dos líneas puras (HA89 y B59) y dos cultivares comerciales (HS03 y VDH487, ambos de Advanta Semillas). Además, se incluyó un experimento realizado por el Dr. Alejandro Presotto en el Laboratorio de la Dra. Kristin Mercer (Department of Horticulture and Crop Science, Ohio State University), en el cual se evaluaron un material silvestre (una mezcla de 10 poblaciones colectadas alrededor de Lawrence, Kansas, USA), una línea pura (HA89) e híbridos cultivo-silvestre de primera generación y retrocruzas. Detalle de los genotipos incluidos en cada experimento figuran en la Tabla 3.1. Los frutos utilizados en este último experimento fueron producidos mediante cruzamientos manuales controlados, de manera similar al resto de los experimentos de este capítulo.

Tabla 3.1. Información sobre los tratamientos y biotipos incluidos en cada experimento. AAL, BRW, DIA, LMA y RCU son biotipos invasores colectados en la región central de Argentina (Cantamutto et al 2010; Casquero et al 2013) mientras que IN e IL son poblaciones nativas provistas por el USDA (PI 468633 y 435540, respectivamente). HS03 y VDH487 son cultivares comerciales mientras que HA89 es una línea pública. BCW: retrocruza con el parental silvestre; BCC: retrocruza con el parental cultivado. En los experimentos a campo, la temperatura provista es el promedio de las temperaturas máximas y mínimas (EC y EF, respectivamente) durante el experimento. CC: cámara de crecimiento.

Tipo de estrés	Exp.	Temperatura	Duración; Ambiente	Biotipo silvestre	Biotipo cultivado	Híbrido C-S
Estrés por calor (EC)	1	52 y 54°C	2-3 h; CC	AAL, BRW, DIA, LMA, RCU	HS03, VDH487	-
	2	52°C	3 h; CC	AAL, BRW, DIA, LMA, RCU	HS03, VDH487	-
	3	54°C	3 h; CC	BAR, DIA, BRW	HS03, VDH487	F1, BCW
	4	43.5°C	10 d; Campo	DIA	HS03	F1
Estrés por helada (EF)	1	-2 y -4 °C	2-4 h; CC	AAL, DIA	HA89	-
	2	-4 °C	4 h; CC	AAL, BRW, DIA, IL, IN	HS03, VDH487	-
	3	-4 °C	4 h; CC	DIA, LMA	HS03, VDH487	-
	4	-4 °C	4 h; CC	BRW, DIA, LMA, RCU	B59	-
	5	-4 °C	4 h; CC	BAR, DIA, BRW	HS03, VDH487	F1, BCW, BCC, NH
	6	-2.5 °C	3 h; CC	-	HA89	F1, BCW, BCC
	7	3.8	32 d; Campo	DIA	HS03	F1

Diseño experimental

Estrés por calor: experimentos en cámara de crecimiento

Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar el comportamiento del girasol silvestre y cultivado ante el estrés por calor (EC). El germoplasma silvestre estuvo representado por cinco poblaciones argentinas y el cultivado, por dos cultivares comerciales (Tabla 3.1). El experimento 1 consistió en cuatro tratamientos: EC1 (52°C-2h), EC2 (52°C-3h), EC3 (54°C-2h) y EC4 (54°C-3h) mientras que en el experimento 2 fue utilizado un solo tratamiento (EC2). Todos los genotipos fueron asignados aleatoriamente en tres repeticiones de 20 plantas en bandejas plásticas de 100 celdas (15cc por celda, 54cm x 28cm; Fig. 3.1A). Las bandejas se rellenaron con sustrato comercial GROW-MIX MULTIPRO (Terrafertil) y fueron regadas dos veces al día (8:00h y 20:00h) mediante riego por aspersión automático. Antes del tratamiento de estrés, las plantas recibieron un tratamiento de aclimatación, según Senthil-Kumar *et al.* (2003) con pequeñas modificaciones. La aclimatación consistió en el incremento de la temperatura desde 28°C a 42°C en 4 horas (28°C-1h, 40°C-1h, 42°C-2h) en condiciones de luz constante. La luz en la cámara fue provista por lámparas fluorescentes (220 $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$). Después de esta inducción, las plantas fueron regadas y transferidas a la temperatura del tratamiento.

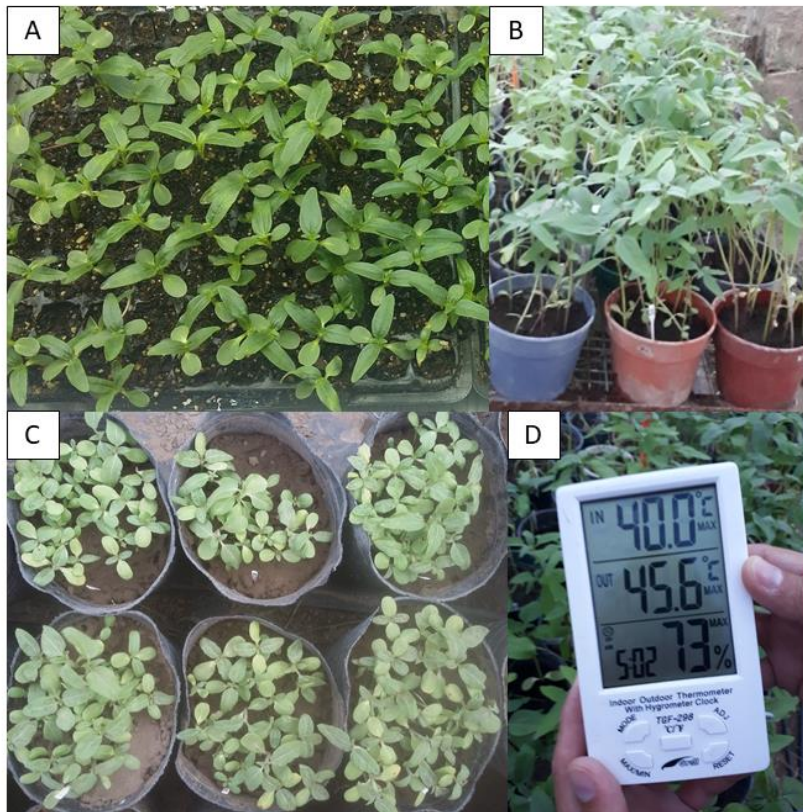


Figura 3.1. Vista de las parcelas en los distintos tipos de experimento: (A) cámara de crecimiento; (B) estrés por calor a campo; (C) estrés por frío a campo y (D) termo-higrómetro de mano utilizado para registrar temperatura y HR.

Estrés por heladas: experimentos en cámara de crecimiento

Se llevaron a cabo cuatro experimentos para evaluar el comportamiento del girasol silvestre y cultivado ante el estrés por heladas (EF). El girasol silvestre y cultivado estuvieron representados por dos a cinco poblaciones silvestres y uno o dos cultivares, respectivamente (Tabla 3.1). En el experimento 1 se utilizaron cuatro tratamientos: EF1 (-2°C-2h), EF2 (-2°C-3h), EF3 (-4°C-3h) y EF4 (-4°C-4h) mientras que solo un tratamiento (EF4: -4°C-4h) fue utilizado en los experimentos 2, 3 y 4 (Tabla 3.1). Todos los genotipos fueron asignados aleatoriamente en tres repeticiones de 20 plantas en bandejas plásticas de 100 celdas (15 cc por celda, 54 cm x 28 cm; Fig. 1A). Las bandejas se rellenaron con sustrato comercial GROW-MIX MULTIPRO (Terrafertil) y fueron regadas dos veces al día (8:00h y 20:00h) mediante riego por aspersión automático. Antes del tratamiento de estrés, las plantas recibieron un tratamiento de aclimatación de cuatro días a 4°C constantes (12 h luz/oscuridad) y luego fueron transferidas a la temperatura del tratamiento. La luz en la cámara fue provista por lámparas fluorescentes ($220 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Estrés por calor: experimento de campo

Se realizó un experimento para evaluar el comportamiento del girasol silvestre, cultivado y sus híbridos silvestre-cultivado a campo. La población silvestre DIA, el cultivar HS03 y sus cruzamientos recíprocos fueron aleatoriamente asignados en seis repeticiones de 12 plantas cada una y dos tratamientos (control y EC). Las plantas fueron establecidas sembrando 12 frutos pregerminados en macetas plásticas de 15 cm de diámetro con una mezcla de suelo arenoso colectado en el campo experimental y sustrato comercial GROW-MIX MULTIPRO (70:30) y se mantuvieron en invernadero hasta el estadio de cuatro hojas. En ese estadio, seis repeticiones por genotipo fueron transferidas a una carpa de calor por 10 días (Fig. 3.1B) mientras que las seis repeticiones restantes por genotipo se mantuvieron en invernadero. La carpa de calor es una estructura fija de 18 metros de largo por 10 metros de ancho y cuatro metros de alto, cubierto con polietileno transparente. Una vez emergidas las plantas, todas las macetas fueron regadas diariamente y no se observaron síntomas de ataques de plagas ni enfermedades. Los valores mínimos y máximos de temperatura y humedad fueron registrados en el invernadero y en la carpa de calor durante 10 días consecutivos. Después del tratamiento, las plantas del tratamiento estrés fueron transferidos nuevamente al invernadero y después de cinco días de recuperación se registró la supervivencia y la biomasa en cada uno de los tratamientos. La temperatura del tratamiento de EC fue significativamente mayor que la del tratamiento control ($T_{\text{MEDIA}}=23,6^{\circ}\text{C}$ y $30,1^{\circ}\text{C}$ para el control y el EC, respectivamente; $T=5,3$; $P<0,0001$; $T_{\text{MÁX}}=28,8^{\circ}\text{C}$ y $43,5^{\circ}\text{C}$ para el control y el EC, respectivamente; $T=13,9$; $P<0,0001$).

Estrés por heladas: experimento de campo

En este experimento, DIA (silvestre), HS03 (cultivado) y sus cruzamientos recíprocos fueron aleatoriamente asignados en seis repeticiones de 26 plantas cada una. Las plantas fueron establecidas sembrando 50 frutos en macetas de 23cm de diámetro (10 litros) en el campo (Fig. 3.1C). La fecha de siembra fue el 20 de abril de 2017. El 12 de junio (tiempo 1), se registró el número de plantas establecidas para cada repetición (en promedio 26 ± 4 plantas por repetición y genotipo); esta fecha fue considerada como el inicio del experimento. El 14 de agosto (tiempo 2) se calculó el número de plantas y la relación entre el tiempo 2 y el tiempo 1 (supervivencia de plantas) para cada repetición y genotipo. Desde el inicio del experimento, las macetas fueron regadas semanalmente y no se observaron síntomas de daños por plagas ni enfermedades. Las temperaturas durante el tiempo 1 y 2 fueron $T_{\text{MEDIA}}=9,9 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{MÁX}}=16,9 \pm 0,7$ y $T_{\text{MÍN}}=3,9 \pm 0,8$. Durante este periodo, se registraron tres días con temperaturas bajo cero ($-2,4^{\circ}\text{C}$, $-0,2^{\circ}\text{C}$ y $-1,2^{\circ}\text{C}$). En el tiempo 1 no hubo plantas con daños visibles por frío y el número mínimo y máximo de plantas por repetición y genotipo fue 19 y 30, respectivamente.

Análisis estadístico

Los análisis de la varianza se realizaron con modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) usando PROC GLIMMIX (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). GLMM fueron seleccionados para incorporar modelos aleatorios cuando fuese necesario y cambiar la distribución de los datos expresados como proporción (Bolker et al. 2009). La significancia de los efectos fijos fue evaluada usando la estimación pseudo verosimilitud Quasi-Newton y reportada con sus valores F y P. Debido a que todos los datos de entrada del presente capítulo están expresados en proporción, los modelos fueron fijados con una distribución Beta en lugar de una normal.

Selección del tratamiento para la evaluación de la tolerancia a temperaturas extremas: se realizó un experimento por estrés (EC y EF), el cual consistió en cuatro tratamientos cada uno (EC1-4, EF1-4; Fig. 3.2A y B). Los efectos tratamiento, tipo de germoplasma (silvestre o cultivado; desde aquí solo tipo) y la interacción tipo por tratamiento fueron considerados fijos. El efecto biotipo anidado dentro de tipo (cultivares dentro del tipo cultivado y poblaciones silvestres dentro de tipo silvestre) fue considerado aleatorio.

Divergencia evolutiva en la respuesta a las temperaturas extremas: dos y cuatro experimentos fueron utilizados para evaluar la respuesta a EC y EF, respectivamente (Tabla 3.1). Los efectos tipo y biotipo anidado dentro de tipo fueron considerados fijos. En los experimentos con más de un tratamiento el efecto tratamiento fue considerado aleatorio. Para evaluar la presencia de compensación entre crecimiento y tolerancia a estrés se utilizó un análisis de covarianza (ANCOVA) siguiendo a Presotto *et al.* (2017): cuando el efecto tipo fue significativo la biomasa previa al estrés fue incluida como covariable. Si el efecto de la covariable es

significativo y explica el efecto tipo (reduciendo la suma de cuadrados de dicho efecto) la compensación entre crecimiento y tolerancia a estrés es evidente. En los experimentos de campo, los efectos tratamiento, tipo y la interacción tipo por tratamiento fueron considerados fijos en EC mientras que solo el efecto tipo fue considerado fijo en EF.

Relación entre el porcentaje de alelos de cultivo y la tolerancia a temperaturas extremas: se realizó un experimento para cada estrés (EC y EF). Los efectos tipo y biotipo dentro de tipo (acá silvestre, cultivo y cultivo-silvestre) fueron considerados fijos. Además, se utilizó el análisis regresión lineal para evaluar la relación entre el porcentaje de alelos del cultivo y la biomasa previo al estrés y la supervivencia. El porcentaje de alelos del cultivo fue: 0, poblaciones silvestres; 25, retrocruza de los híbridos cultivo-silvestre con el parental silvestre; 50, híbridos cultivo-silvestre de primera o segunda generación; 75, retrocruza de los híbridos cultivo-silvestre con el parental cultivado y 100, cultivares o líneas cultivadas.

RESULTADOS

Selección del tratamiento para la evaluación de la tolerancia a temperaturas extremas

Estrés por calor: Se encontraron diferencias significativas para la supervivencia de plantas entre tratamientos ($F=7,84$; $P=0,0002$). La supervivencia de las plantas disminuyó a medida que aumentó la intensidad del tratamiento (Fig. 3.2A) desde $0,97\pm 0,01$ (EC1) a $0,44\pm 0,08$ (EC4). Los tratamientos de intensidad intermedia (EC2 y EC3) produjeron valores de supervivencia intermedios y muy similares entre sí ($0,70\pm 0,07$). Por otro lado, se observó un efecto tipo significativo ($F=13,78$; $P=0,0138$) pero no así interacción tipo por tratamiento ($F=0,62$; $P=0,606$) indicando una respuesta similar a los cambios de tratamiento entre germoplasma cultivado y silvestre. La supervivencia fue mucho mayor en el cultivo que en el silvestre en tres de los cuatro tratamientos (Fig. 2B). Por lo tanto, tres de los cuatro tratamientos (EC2-EC4) fueron útiles para discriminar materiales silvestres y cultivados.

Estrés por helada: Se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre tratamientos ($F=25,3$; $P<0,0001$). La supervivencia fue similarmente alta en los tratamientos a -2°C ($\sim 0,90$ para EF1 y EF2; Fig. 3.1C), sin embargo, esta disminuyó con el aumento de la intensidad ($0,55\pm 0,07$ y $0,29\pm 0,07$ para EF3 y EF4, respectivamente; Fig. 3.2C). En este experimento, no se observaron efectos significativos del tipo ($F=1,32$; $P=0,4555$) y de la interacción tipo por tratamiento ($F=2,29$; $P=0,1011$). Sin embargo, el tratamiento más intenso (EF4: -4°C -4h) permitió discriminar materiales silvestres y cultivados (Fig. 3.2D).

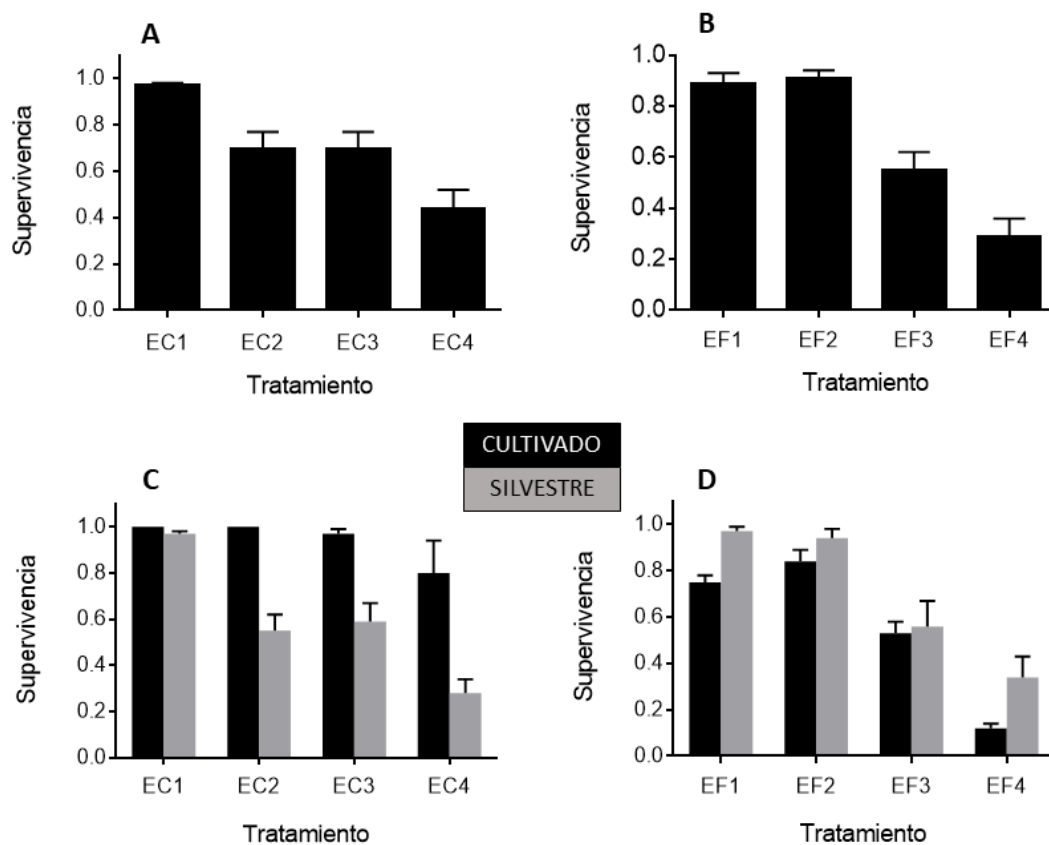


Figura 3.2. Tratamiento óptimo para la evaluación de la tolerancia a temperaturas extremas en girasol cultivado y silvestre. Supervivencia en función de la intensidad de tratamiento de EC (A) y EF (B). Supervivencia en función de la intensidad del EC (C) y EF (D) para materiales silvestres y cultivados. EC1: 52°C-2 h; EC2: 52°C-3 h; EC3: 54°C-2h; EC4: 54°C-3h. EF1: -2°C-2h; EF2: -2°C-3h; EF3: -4°C-3h; EF4: -4°C-4h. Todos los tratamientos fueron aplicados después de un tratamiento de inducción (28°C-1h, 40°C-1h, 42°C-4h para EC y 4 días a 4°C constante para EF).

Divergencia evolutiva en la respuesta a temperaturas extremas

Estrés por calor: Se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre materiales silvestres y cultivados (Fig. 3.3A). Los cultivares mostraron mayor tolerancia al estrés por calor que las poblaciones silvestres ($0,94 \pm 0,18$ vs. $0,60 \pm 0,32$ en el experimento 1 y $0,64 \pm 0,35$ vs. $0,29 \pm 0,26$ en el experimento 2, para cultivo y silvestre, respectivamente). Además, no se encontró efecto biotipo anidado dentro de tipo significativo ($F=1,34$; $P=0,2565$ y $F=0,22$; $P=0,9491$) indicando que no hubo diferencias en la tolerancia a estrés térmicos dentro de los materiales cultivados ni silvestres. Cuando la biomasa previa al estrés fue incluida como covariable, explicó las diferencias entre el cultivo y el silvestre en el experimento 2 (efecto tipo: $F=0,13$; $P=0,7262$) pero no así en el experimento 1 (efecto tipo: $F=15,11$; $P=0,0002$).

Estrés por helada: Se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre materiales cultivados y silvestres en dos de los cuatro experimentos (Fig. 3.3B). Las poblaciones silvestres mostraron una mayor tolerancia al EF que los materiales cultivados en todos los experimentos (Fig. 3.3B). Además, en el experimento 1 se observó efecto significativo del biotipo anidado dentro de tipo ($F=11,42$; $P=0,0020$) indicando diferencias en la tolerancia de las dos poblaciones silvestres incluidas en este experimento (AAL= $0,64 \pm 0,10$ y DIA= $0,79 \pm 0,07$). Cuando la biomasa fue incluida como covariable, se observó efecto significativo del tipo de germoplama en dos de los tres experimentos ($F=9,76$; $P=0,0261$ y $F=5,61$; $P=0,042$ para los experimentos 2 y 4, respectivamente). El experimento 1 no fue incluido debido a que no se registró la biomasa.

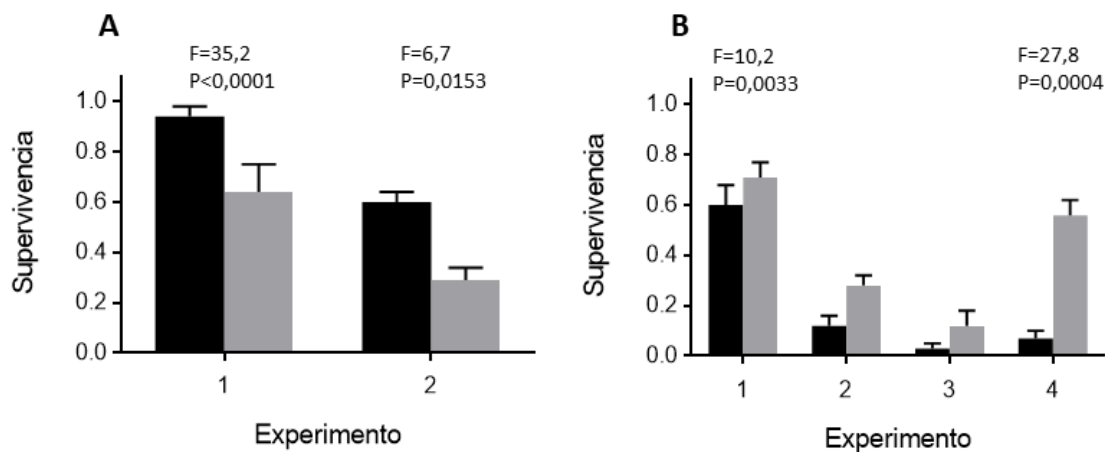


Figura 3.3. Diferencias entre tipo de germoplasma en la tolerancia a temperaturas extremas. A: girasol cultivado y silvestre bajo estrés por calor (54°C-3h). B: girasol cultivado y silvestre bajo estrés por helada (-4°C-4h). Ambos tratamientos fueron aplicados después de un período de aclimatación (28°C-1h, 40°C-1h, 42°C-4h para EC y 4 días a 4°C constantes para EF). Los valores F y P son provistos para los experimentos con efecto tipo significativo. Barras negras y grises representan la media del girasol cultivado y silvestre, respectivamente.

Relación entre el porcentaje de alelos del cultivo y la tolerancia a temperaturas extremas

Estrés por calor: En el experimento en cámara de crecimiento no se encontraron diferencias significativas entre tipo ($F=1,77$; $P=0,1892$). Sin embargo, tanto la biomasa como la supervivencia ante el EC fueron intermedios en los híbridos cultivo-silvestre respecto de sus parentales. Los materiales cultivados mostraron una mayor tolerancia al EC que los híbridos cultivo-silvestre y los materiales silvestres ($0,92\pm 0,03$, $0,79\pm 0,05$ y $0,72\pm 0,07$, respectivamente). Además, cuando se analizó la regresión lineal entre el porcentaje de alelos del cultivo y ambas, biomasa y supervivencia, se observó una regresión positiva y significativa entre estas variables (Fig. 3.4A y B). En el experimento de campo, usando la biomasa acumulada como *proxy* de la aptitud, observamos diferencias significativas entre tipo ($F=13,88$; $P=0,0002$) pero no se observaron efectos significativos del tratamiento ni de la interacción tipo por tratamiento ($F=0,06$; $P=0,8125$ y $F=0,29$; $P=0,7508$, respectivamente). Por lo tanto, en nuestro experimento en condiciones de campo el estrés por calor no afectó ni la supervivencia ni la acumulación de biomasa.

Estrés por helada: En los experimentos en cámara de crecimiento no se encontraron diferencias significativas entre tipo ($F=0,57$; $P=0,5717$). Sin embargo, las poblaciones silvestres mostraron una mayor tolerancia al estrés por helada que los materiales cultivados y que los híbridos cultivo-silvestre ($0,49\pm 0,02$, $0,39\pm 0,04$, y $0,39\pm 0,05$, respectivamente). El porcentaje de alelos del cultivo explicó las diferencias en la supervivencia en el experimento realizado en EEUU pero no así en el de Argentina (Fig. 3.4C y D, respectivamente). En el experimento a campo, se encontró efecto significativo del tipo de germoplasma ($F=15,24$; $P<0,0001$). La supervivencia fue mucho mayor en la población silvestre que en el cultivar ($0,85\pm 0,09$ y $0,13\pm 0,02$, respectivamente), los híbridos cultivo-silvestre mostraron un comportamiento intermedio a sus parentales ($0,68\pm 0,09$).

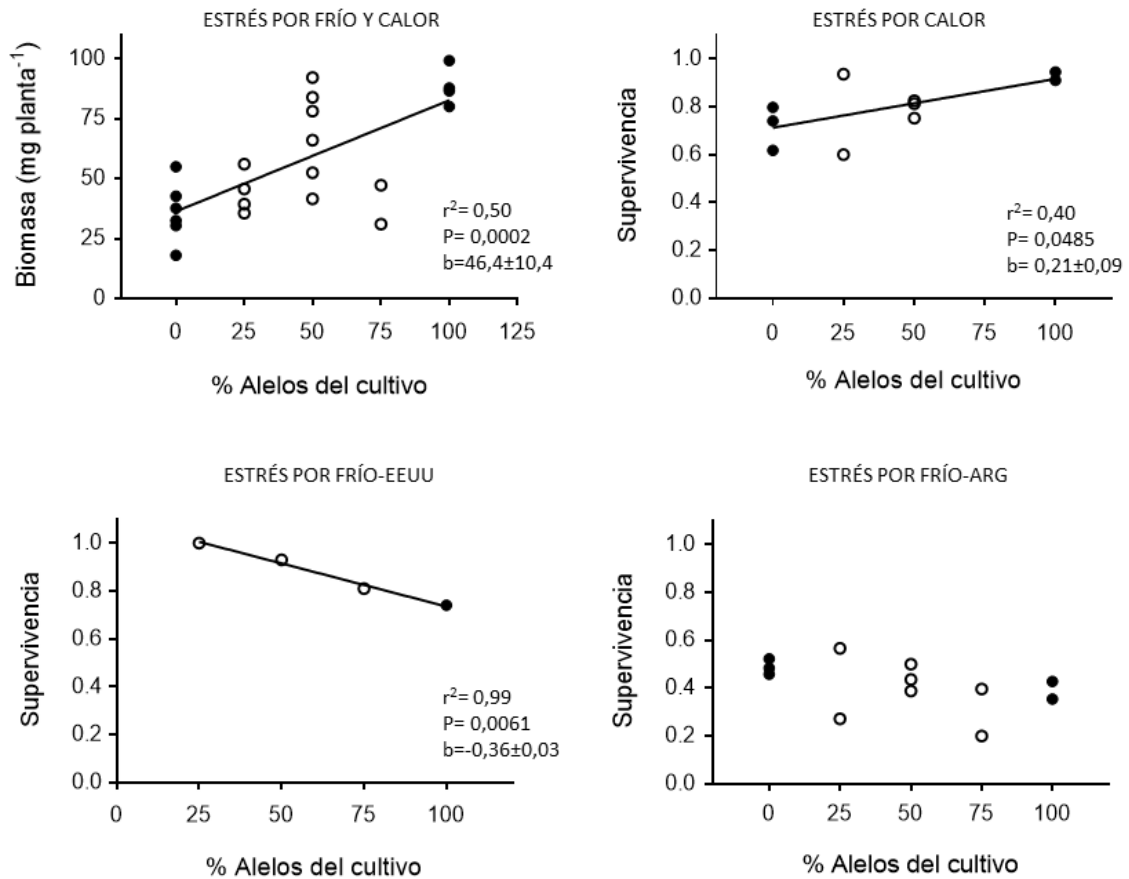


Figura 3.4. Relación entre el porcentaje de alelos del cultivo y la biomasa previo al estrés (A) y la supervivencia (B-D) en los experimentos en cámara de crecimiento. Cada punto representa el valor medio de un genotipo; los círculos llenos corresponden a genotipos silvestres y cultivados mientras que los círculos vacíos corresponden a los híbridos cultivo-silvestre. El porcentaje de alelos del cultivo: 0, poblaciones silvestres; 25, retrocruza de los híbridos cultivo-silvestre con el parental silvestre; 50, híbridos cultivo-silvestre de primera o segunda generación; 75, retrocruza de los híbridos cultivo-silvestre con el parental cultivado y 100, cultivares o líneas cultivadas. Los valores de r^2 , P y b (pendiente) son provistos para las regresiones lineales significativas. En el experimento de EEUU no se incluyó una población silvestre (C).

DISCUSIÓN

En este capítulo se aporta evidencia de diferencias genéticas en la tolerancia a temperaturas extremas entre materiales silvestres y cultivados de girasol, tanto en condiciones controladas como en experimentos de campo. El girasol cultivado mostró mayor tolerancia al estrés por calor que el girasol silvestre a través de los experimentos (Fig. 3.2C y 3.3A). Por el contrario, en condiciones de estrés por helada, los materiales silvestres mostraron una mayor tolerancia que los cultivados (Fig. 3.2D y 3.3B). Finalmente, no observamos compensación entre el crecimiento en ausencia de estrés y la tolerancia a temperaturas extremas, lo cual facilitaría la introgresión de la tolerancia a temperaturas extremas en ambos sentidos, con implicancias tanto en el mejoramiento como en la predicción de flujo génico cultivo-silvestre.

Desarrollo de una técnica de alto rendimiento para la evaluación de la tolerancia a temperaturas extremas

Con las disminuciones drásticas en los costos de genotipado y la disponibilidad de chips de SNPs para la mayoría de los cultivos, la evaluación fenotípica representa el cuello de botella en los actuales programas de mejoramiento para tolerancia a estrés (Zhu *et al.* 2008; Fan *et al.* 2016; Anderson *et al.* 2016). En este capítulo se desarrolló una técnica de fenotipado de alto rendimiento para evaluar la tolerancia a temperaturas extremas. Para la evaluación del EC, se adaptó la técnica TIR (Senthil-Kumar *et al.* 2003, 2007) para evaluar la tolerancia en el estadio de 2-4 hojas (Fig. 3.1A) y para el EF, se desarrolló un protocolo similar (tratamiento de aclimatación antes del estrés). Con esta técnica, se pudo controlar la intensidad del estrés (Fig. 3.2A y B) y descubrir diferencias genéticas tanto en la tolerancia a EC como a EF (Fig. 3.2C-D, 3.3A y B). Independientemente de las diferencias entre genotipos observados en cada tipo de estrés, tanto el girasol cultivado como el silvestre mostraron capacidad para enfrentar el estrés después de un período de aclimatación, es decir, presentaron una termotolerancia adquirida (Senthil-Kumar *et al.* 2003; Yeh *et al.* 2012).

Implicancias para el mejoramiento del cultivo

La estación de crecimiento de los cultivos anuales está determinada por el período libre de heladas de cada región. La fecha media de la última helada limita la fecha de floración de los cultivos invernales (p. ej. trigo) y la fecha de siembra de los cultivos de verano (p. ej. maíz, soja y girasol). El supuesto de que los cultivos de verano no pueden tolerar el estrés por heladas desalentó los esfuerzos del mejoramiento en la mejora de este carácter. Sin embargo, recientemente se han reportado algunos casos exitosos de tolerancia a heladas en girasol (Cabello *et al.* 2012; Hniličková *et al.* 2017), maíz (Li *et al.* 2016) y soja (Robison *et al.* 2017), utilizando principalmente medidas indirectas de tolerancia a estrés (p. ej. fuga de electrolitos después de la exposición a bajas temperaturas, cambios en la expresión de genes relacionados con estrés por heladas en especies modelo). En este capítulo, se aporta evidencia sobre la tolerancia a EF en girasol silvestre tanto en condiciones controladas como a campo. Además, la mayor tolerancia de las poblaciones silvestres no fue explicada por diferencias en la biomasa, es decir, no observamos la compensación entre crecimiento y tolerancia a estrés presente en otras especies (Koehler *et al.* 2012; Cabello *et al.* 2014). A partir de estos resultados, se propone el uso de germoplasma silvestre para la mejora de la tolerancia a heladas en girasol cultivado. En este sentido, identificar las bases moleculares de la tolerancia a EF facilitará la introgresión de este carácter en el germoplasma cultivado y probablemente aumentará la utilidad del germoplasma silvestre por parte de los mejoradores.

Por otro lado, se observó una tolerancia a EC extremo dentro del germoplasma cultivado tanto en condiciones controladas como a campo. En cámara de crecimiento, se necesitaron temperaturas de hasta 54°C para producir disminuciones en la supervivencia de plantas (Fig. 3.2C y 3.3A) mientras que a campo, 10 días consecutivos de estrés por calor ($T_{\text{MEDIA}} = 30,1 \pm 0,7^\circ\text{C}$ y $T_{\text{MAX}} = 43,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$) no afectaron ni la supervivencia ni la acumulación de biomasa. Esta tolerancia al EC natural del girasol cultivado podría explicar el desplazamiento exitoso del cultivo hacia áreas marginales de producción en la Argentina (Hall *et al.* 2013), como su uso como fuente de genes/alelos de tolerancia a estrés en la mejora biotecnológica (Cabello *et al.* 2014, 2017).

Implicancias para la evolución de malezas

La baja aptitud biológica de los híbridos cultivo-silvestre relativa a sus parentales silvestres es una de las principales barreras del flujo génico cultivo-silvestre (Mercer *et al.* 2007; Presotto *et al.* 2012). Sin embargo, esta diferencia en la aptitud entre híbridos cultivo-silvestre y silvestre puede reducirse e incluso desaparecer bajo algunas condiciones de estrés (p. ej. aplicación de herbicidas, competencia interespecífica; Mercer *et al.* 2007, 2014) haciendo que la introgresión del cultivo sea altamente dependiente del ambiente. En este capítulo, los híbridos cultivo-

silvestre mostraron un comportamiento intermedio en la supervivencia de plantas respecto a sus parentales, tanto en EC (Fig. 3.4B) como EF (Fig. 3.4C).

En el girasol silvestre la dormición y los requerimientos de germinación son responsables de la supervivencia de las poblaciones durante el invierno (Weiss *et al.* 2013; Presotto *et al.* 2014). Sin embargo, en poblaciones naturales la germinación temprana durante la primavera es un carácter positivamente seleccionado (Kost *et al.* 2015; Arana *et al.* 2016), por lo tanto es esperable encontrar tolerancia a las heladas primaverales. En este sentido, la menor tolerancia a EF observada en los híbridos cultivo-silvestre (Fig. 3.4C) podría reducir las posibilidades de introgresión en ambientes naturales. Por el contrario, en ambientes agrícolas, en los cuales se favorecen caracteres asociados a un rápido crecimiento (Casquero *et al.* 2013; Presotto *et al.* 2017), una mayor tolerancia al EC junto con el mayor crecimiento observado en los híbridos (Fig. 3.4A) podría ser positivamente seleccionada aumentando las posibilidades de introgresión de alelos del cultivo en poblaciones silvestres. Además, la mayor tolerancia al EC de los híbridos podría facilitar la expansión del girasol silvestre en áreas más calurosas. Por lo tanto, previendo ambientes más calurosos y erráticos debido al cambio climático, se deben considerar los efectos de las temperaturas extremas y las diferencias en tolerancia a las mismas entre taxones para mejorar la predicción del riesgo de flujo génico cultivo-silvestre con sus implicancias ecológicas.

CAPÍTULO 4

Efecto del estrés por calor sobre caracteres reproductivos en girasol silvestre y cultivado: evidencia de adaptación local dentro del germoplasma silvestre

INTRODUCCIÓN

Existe un consenso general en las predicciones climáticas acerca de un incremento, no solo en las temperaturas medias sino también en la variabilidad climática en los próximos 50-100 años (Battisti y Naylor 2009; Gornall *et al.* 2010; IPCC 2014). Esto producirá un aumento en la frecuencia y severidad del estrés por calor (EC) en la mayoría de las regiones agrícolas. El EC afecta el rendimiento de los cultivos de manera directa, p. ej., exponiendo etapas claves del crecimiento a temperaturas supra-óptimas, e indirecta, p. ej., incrementando la probabilidad de ocurrencia de déficit hídrico por el aumento en la evapotranspiración e incrementando la agresividad de las malezas, plagas y enfermedades (Fuhrer 2003; Debaeke *et al.* 2017). Por el contrario, el aumento en las concentraciones de CO₂, la expansión del área agrícola hacia latitudes más altas y el incremento en la duración de la estación de crecimiento podrían atenuar tales efectos negativos (Ainsworth y Long, 2005; Lobell *et al.* 2015; Debaeke *et al.* 2017). Aunque el EC afecta a los cultivos durante la fase vegetativa disminuyendo las tasas fotosintéticas, aumentando la evapotranspiración y acelerando las tasas de desarrollo, los cultivos son particularmente sensibles al EC durante las fases reproductivas (Wahid *et al.* 2007; Jha *et al.* 2014; Prasad *et al.* 2017).

Entre las fases reproductivas, la floración es la etapa más sensible a breves períodos de EC (Hatfield y Prueger 2015; Prasad *et al.* 2017). Se ha observado que la viabilidad del polen es especialmente sensible al EC, siendo los tejidos femeninos menos sensibles (Hatfield y Prueger 2015; Driedonks *et al.* 2016; Mesihovic *et al.* 2016). En varias especies cultivadas se reportaron reducciones en el número de frutos debido a una menor viabilidad del polen, incluyendo legumbres, cereales de invierno y verano y oleaginosas (Barnabás *et al.* 2008; Rattalino Edreira *et al.* 2011; Devasirvatham *et al.* 2012; Jha *et al.* 2014; Kalyar *et al.* 2014; van der Merwe *et al.* 2015). Por otro lado, el efecto de temperaturas supra-óptimas sobre los rendimientos es bien capturado en los modelos de simulación de cultivos utilizados para evaluar el impacto del calentamiento global (Gourdji *et al.* 2013). Sin embargo, el efecto de breves períodos de EC ha sido menos explorado y usualmente no está bien cuantificado en los modelos actuales,

subestimando así las pérdidas futuras en los rendimientos debido al cambio climático (Gourdji *et al.* 2013; Lobell *et al.* 2015).

La adaptación de los cultivos al estrés por calor debería combinar prácticas de manejo como cambios en la fecha de siembra y ajustes en la fenología con mayor tolerancia genética al estrés de los nuevos cultivares. Tanto en especies modelos como cultivadas, varios genes involucrados en la respuesta al EC han sido descubiertos (Hu *et al.* 2009; Yeh *et al.* 2012, Barah *et al.* 2013) mejorando la comprensión de las bases genéticas de la tolerancia al EC. Sin embargo, la mayoría de los estudios fueron realizados en fases vegetativas tempranas (Yeh *et al.* 2012) y por lo tanto deben ser validados en fases reproductivas. En este sentido, la falta de técnicas a campo para la evaluación fenotípica surge como el principal cuello de botella en el mejoramiento genético del EC (Jha *et al.* 2014).

Debido a la selección y a la deriva génica durante la domesticación y el mejoramiento moderno, los cultivares sufrieron una reducción en la variabilidad genética, lo cual atenta contra futuras ganancias genéticas en la tolerancia a estrés (Hajjar y Hodgkin 2007; Dempewolf *et al.* 2014). Los parientes silvestres de los cultivos constituyen la principal reserva de variabilidad genética para el mejoramiento (Guarino y Lobell 2011; Warschefsky *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2017). Estos han sido utilizados para aumentar exitosamente la tolerancia a estreses bióticos y tienen potencial para mejorar la tolerancia a estreses abióticos de los nuevos cultivares (Hajjar y Hodgkin 2007; Warschefsky *et al.* 2014). Además de la mayor variabilidad genética, los parientes silvestres poseen adaptación local al estrés, es decir, fueron seleccionados en ambientes con un determinado estrés por cientos de años. Se ha reportado evidencia de adaptación local al estrés, principalmente en especies modelo pero también en parientes silvestres (Baruah *et al.* 2009; Zuther *et al.* 2012; Barah *et al.* 2013; Kang *et al.* 2013; Wolfe y Tonsor 2014;).

En girasol, investigaciones previas demostraron que breves períodos de EC durante el llenado de frutos tiene un impacto negativo en la mayoría de los componentes de rendimiento como son el número y peso de los frutos, el rendimiento en aceite y la composición de ácidos grasos (Rondanini *et al.* 2003; van der Merwe *et al.* 2015). Sin embargo, el efecto de breves períodos de EC durante la floración, que representa el período crítico para la determinación del rendimiento (Andrade 1995; Andrade *et al.* 2005), no ha sido explorado. Moriondo *et al.* (2011) evaluaron la incidencia en el rendimiento de breves períodos de EC utilizando dos modelos climáticos futuros (ambos de calentamiento global pero incluyendo o no breves episodios de EC durante la floración). La inclusión de breves períodos de EC durante la floración incrementó las pérdidas de rendimiento estimadas desde un 13% hasta un 34% y la probabilidad de ocurrencia de bajos rendimientos desde un 7% hasta un 23%, remarcando la fuerte incidencia sobre el rendimiento de breves períodos de EC en el período crítico.

Recientemente, un estudio detallado de la distribución de 36 taxones emparentados del género *Helianthus* (Kantar *et al.* 2015) identificó poblaciones adaptadas a ambientes extremos, las cuales probablemente tienen caracteres útiles para el mejoramiento del girasol cultivado. Aún más importante para el mejoramiento es que el *pool* génico primario (*H. annuus* silvestre) se encuentra en estos ambientes extremos, indicando que este probablemente tiene caracteres y alelos útiles para el mejoramiento de la tolerancia a estrés abiótico en el girasol cultivado (Kantar *et al.* 2015). Sin embargo, el girasol silvestre posee varias estrategias de adaptación al estrés, las cuales no son útiles para el mejoramiento, p. ej., incremento en la dormición de los frutos, mayor ramificación y producción de pequeños capítulos (Whitney *et al.* 2010). Por lo tanto, la tolerancia al EC de las poblaciones silvestres debe ser evaluada junto los materiales cultivados usando técnicas comunes de fenotipado.

Los objetivos de este capítulo fueron: 1) Desarrollar una técnica de alto rendimiento para la evaluación de la tolerancia al EC durante la floración (R5) en condiciones de campo; 2) Explorar la variabilidad genética en la tolerancia al EC en materiales silvestres y cultivados y 3) Evaluar la existencia de adaptación local al EC dentro del germoplasma silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma

El girasol cultivado estuvo representado por tres cultivares comerciales (HS03, VDH487 y PAR1000) evaluados dos años (2015/16 y 2016/17). El girasol silvestre estuvo representado por 11 poblaciones en el año 1 (2015/16): seis nativas (AR, IL, IN, ND, NM y TX) y cinco invasoras (BRW, DIA y LMA de Argentina y SAU y WAU de Australia). En el año 2 (2016/17) el girasol silvestre estuvo representado por 12 poblaciones nativas (AK, CA, CO, IN, IO, MI, ND, MO, OH, OK, SA y TX) y ocho poblaciones invasoras (AAL, BRW, DIA, LMA y RCU de Argentina y EAU, SAU y WAU de Australia). La Tabla 4.1 provee información de cada población utilizada en este capítulo. Los cultivares fueron provistos por los semilleros de Argentina. Las poblaciones silvestres de Argentina fueron colectadas por el grupo de trabajo, en la región central del país (Cantamutto *et al.* 2010a), mientras que las poblaciones invasoras de Australia y las poblaciones nativas fueron provistas por USDA.

Tabla 4.1. Poblaciones silvestres utilizadas en el presente capítulo y su ubicación. El superíndice indica el año del experimento en el cual la población fue incluida. Se detallan la ciudad más cercana (Argentina) o el estado (Australia, Canadá y Estados Unidos) del que proviene cada población y el número de registro. Se indica el número de identificación de las poblaciones colectadas en la región central de Argentina, depositadas en el Banco de Germoplasma de Girasol del INTA y de las poblaciones no-nativas Australianas y nativas provistas por el USDA. *Población agrestal colectada en un lote de maíz.

Población	Estado/ciudad	ID/USDA PI	Rango	Latitud	Longitud	Altitud
SA ^{1,2}	SASKATCHEWAN	592321	Nativo	49,4	-104,3	671
MO ^{1,2}	MONTANA	531035	Nativo	46,6	-108,5	1058
ND ^{1,2}	DAKOTA DEL NORTE	586888	Nativo	46,0	-98,4	428
IO ²	IOWA	613779	Nativo	41,7	-96,0	305
IL ¹	ILLINOIS	435540	Nativo	41,5	-88,1	178
MI ²	MISURI	613789	Nativo	40,0	-95,3	291
OH ²	OHIO	649853	Nativo	39,2	-84,5	213
CO ²	COLORADO	468621	Nativo	39,1	-108,6	1405
CA ²	CALIFORNIA	413131	Nativo	38,7	-121,8	17
IN ^{1,2}	INDIANA	468633	Nativo	38,5	-87,3	144
BRW ^{1,2}	BARROW	*	No-nativo	-38,2	-60,1	161
AAL ²	ADOLFO ALSINA	839	No-nativo	-37,2	-62,6	134
AK ²	ARKANSAS	613727	Nativo	36,4	-93,7	433
OK ²	OKLAHOMA	468483	Nativo	35,3	-99,6	561
LMA ^{1,2}	LAS MALVINAS	835	No-nativo	-34,5	-68,2	611
SAU ^{1,2}	AUSTRALIA MERIDIONAL	653586	No-nativo	-34,2	140,6	37
WAU ^{1,2}	AUSTRALIA OCCIDENTAL	664685	No-nativo	-33,8	121,9	20
NM ¹	NUEVA MEXICO	468470	Nativo	33,3	-104,5	1096
RCU ²	RIO CUARTO	832	No-nativo	-33,1	-64,2	389
AR ^{1,2}	ARIZONA	613731	Nativo	32,7	-114,6	39
DIA ^{1,2}	DIAMANTE	834	No-nativo	-32,0	-60,4	86
TX ^{1,2}	TEXAS	613728	Nativo	27,4	-97,8	13
EAU ²	NUEVA GALES DEL SUR	653582	No-nativo	-26,6	148,9	340

Diseño experimental

Los experimentos fueron conducidos en jardín común en el Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. Tres repeticiones de los cultivares se asignaron aleatoriamente en tres bloques. Debido a la baja disponibilidad de frutos de la mayoría de las poblaciones silvestres fue utilizada, solo una parcela (repetición) por población silvestre y éstas fueron aleatoriamente asignadas en uno de los tres bloques. Por lo tanto, el experimento consistió en 20 parcelas el año 1 (nueve del cultivo-3 cultivares por 3 repeticiones- y 11 para cada una de las poblaciones silvestres) y 29 parcelas en el año 2 (nueve del cultivo y 20 de poblaciones silvestres). Los tratamientos control y EC fueron aplicados sobre plantas elegidas al azar dentro de cada una de las parcelas. Para evaluar si las poblaciones silvestres podían tener un sesgo debido a su posición en el jardín común, se utilizó el rendimiento de los materiales cultivados en condiciones control para evaluar el efecto bloque. Como no se encontró efecto bloque, cada planta (silvestre o cultivada) fue utilizada como repetición, con bajo riesgo de efecto de pseudo-repetición. Cada parcela consistió en tres surcos de 2m de largo y plantas espaciadas a 1m y 0,3m (entre y dentro del surco, respectivamente) logrando una población de 3,3 plantas m⁻². La dormición de los frutos silvestres fue removida por estratificación, incubando los frutos en una cámara de crecimiento a 5°C durante una semana (ISTA 2004). Frutos pregerminados de las poblaciones silvestres fueron sembrados en bandejas plásticas de 200 celdas de 28x54cm (50cc por celda) y mantenida en invernadero por 30 días a 20-25°C. Los cultivares fueron sembrados manualmente en el jardín común y en V4-V6 (Schneiter y Miller 1981) se ajustó la densidad a 3,3 plantas por m⁻² mediante raleo manual. La siembra se realizó el 23 y el 14 de noviembre para los años 1 y 2, respectivamente. Los experimentos fueron regados por goteo y fertilizados con 80kg ha⁻¹ de fosfato diamónico antes de la siembra y 100kg ha⁻¹ de urea en V4-V6 para lograr un crecimiento óptimo. Los datos fueron colectados de 220 y 230 capítulos (individuos en girasol cultivado) en los años 1 y 2, respectivamente.

Descripción del tratamiento

El EC durante la floración fue impuesto tapando capítulos (solo capítulos secundarios en plantas silvestres) con bolsas de papel negras (6x19cm y 12x43cm, para los capítulos silvestres y del cultivo, respectivamente). Esto incrementó la temperatura del aire alrededor del capítulo por una mayor absorción de la radiación. Bolsas blancas y negras fueron utilizadas para los tratamientos control y EC, respectivamente (Fig. 4.1A). Los tratamientos fueron aplicados sobre plantas elegidas de manera aleatoria dentro de cada una de las parcelas (Fig. 4.1A y B). Los capítulos fueron cubiertos en la etapa R4 (cuando la inflorescencia comienza a abrirse y las flores liguladas son visibles; Fig. 4.1B) durante siete días consecutivos para cubrir el período R5 completo (Schneiter y Miller 1981). Los tratamientos control y EC fueron impuestos simultáneamente para evitar diferencias en las condiciones ambientales durante el llenado, no

atribuibles al tratamiento. En el caso de los materiales cultivados, la sincronización de la fenología facilitó la aplicación de los tratamientos el mismo día mientras que en las poblaciones silvestres, debido a la floración escalonada, los tratamientos se aplicaron durante dos a tres semanas (ver resultados). Para evitar diferencias en las condiciones ambientales no impuestas por el tratamiento, cada vez que se cubrieron los capítulos se usó el mismo número de sobres blancos y negros dentro de cada biotipo. El momento y la duración del estrés fueron elegidos de acuerdo con el período crítico para la determinación del rendimiento en girasol (floración; de R5 a R6; Andrade 1995) y al número mínimo de días con EC considerado como ola de calor (De Boeck *et al.* 2010). Por lo tanto, el EC se aplicó durante la floración, momento en que se definen el diámetro del capítulo, el número de frutos y su peso potencial.

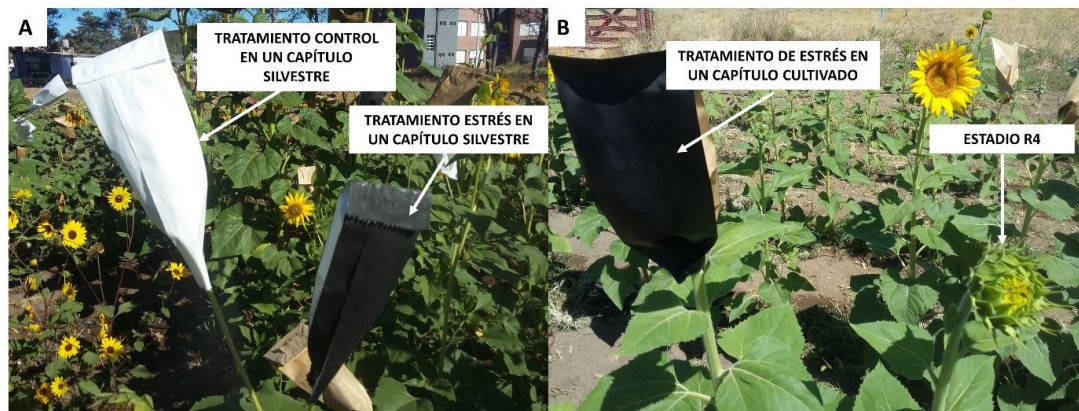


Figura 4.1. A: Bolsas de papel utilizadas para los tratamientos control y estrés por calor (EC). B: Los capítulos fueron cubiertos en R4 con bolsas blancas y negras para los tratamientos control y EC, respectivamente. A los 7 días de iniciados los tratamientos, los sobres negros fueron reemplazados por sobres blancos hasta la cosecha.

Debido a la autoincompatibilidad, los capítulos de las plantas silvestres fueron polinizados manualmente con plantas hermanas del mismo tratamiento (control y EC) para asegurar que los tejidos masculinos y femeninos estuvieran bajo la misma condición. Para asegurar la polinización de todas las flores, los capítulos fueron polinizados a los tres, cinco y siete días de iniciado el tratamiento. Después de los siete días, las bolsas negras fueron reemplazadas por bolsas blancas del mismo tamaño hasta la cosecha. Para medir el grado del EC, se registró la temperatura de las bolsas control y EC, usando un termómetro infrarrojo de mano (Scout 1, INF155), en momentos aleatorios durante el día. Se registraron 36 y 39 pares de lecturas (control y EC) en los años 1 y 2, respectivamente. Cada lectura fue el promedio de dos lecturas en ambas caras de la bolsa de papel. Además, se registraron la temperatura y humedad relativa del aire dentro de las bolsas usando un termo-higrómetro de mano (TA298) en distintos momentos durante el día. Dieciocho lecturas fueron registradas simultáneamente en los tratamientos control y EC durante nueve días. La cosecha de los capítulos se realizó en R9 (Schneiter y Miller, 1981) en los materiales cultivados y cuando la ramificación que sostiene el capítulo se tornó color marrón en los biotipos silvestres. Todos los caracteres reproductivos: número y peso de los frutos, diámetro y rendimiento del capítulo fueron registrados después de la cosecha sobre capítulos secados a temperatura ambiente durante un mes. El diámetro del capítulo (cm) fue el promedio de dos medidas opuestas, el peso de los frutos (mg) fue el peso de 50 frutos en cada capítulo, el rendimiento fue el peso total de los frutos por capítulo (mg capítulo^{-1}) y el número de frutos fue estimado como el cociente entre rendimiento y peso individual de los frutos. Cuando el número de frutos fue inferior a 50, los frutos fueron contados y el peso estimado como la relación entre el rendimiento y el número de frutos. Además, cuando el número de frutos fue inferior a 10, el peso de los frutos estimados no fue incluido en los análisis. Solo se consideraron los frutos llenos.

Análisis estadístico

Para el análisis de la varianza se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) mediante PROC GLIMMIX (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC). Los GLMM fueron elegidos debido a que son la herramienta recomendada para analizar datos sin distribución normal y con efectos aleatorios (Bolker *et al.* 2009). Debido a la distribución natural no-normal de las proporciones, todos los modelos fueron ajustados usando la distribución Beta en lugar de la normal (Bolker *et al.* 2009; Montesinos-Navarro *et al.* 2012). La significancia de los efectos fijos fue evaluada usando la estimación pseudo verosimilitud Quasi-Newton y reportada con sus valores F y P. Por otro lado, la significancia de los efectos aleatorios fue evaluada removiendo de a uno cada factor aleatorio y comparando la pseudo verosimilitud del residual con test χ^2 (Bolker *et al.* 2009; Montesinos-Navarro *et al.* 2012) usando la opción COVTEST GLM (SAS University edition; SAS Institute Inc., Cary, NC).

Todos los datos fueron transformados con la raíz cuadrada para mejorar la homocedasticidad. Todas las medias en el texto son reportadas con su error estándar.

Efecto del EC sobre el rendimiento y sus componentes: Se realizó un GLMM para cada carácter. Los efectos del año (1 y 2), el tratamiento (control y EC) y grupo (cultivado, nativo, no-nativo) junto con las interacciones fueron considerados fijos. El efecto del biotipo anidado dentro del grupo fue considerado aleatorio. Debido a que cada planta representó una repetición, no fue posible cuantificar el efecto repetición ni sus interacciones. El porcentaje de la varianza explicada por cada efecto fue calculado usando el valor F de cada efecto.

Tolerancia al EC en los germoplasmas silvestre y cultivado: Debido a las grandes diferencias en los cuatro caracteres reproductivos asociadas a la domesticación (Tabla 4.2), se estandarizó la respuesta al EC como el cociente entre el valor bajo EC de cada repetición y el valor medio del biotipo en condiciones de control. Para obtener el valor medio del tratamiento control de cada biotipo, se realizaron dos GLMM, una para el grupo cultivado y el otro para el grupo silvestre (nativas e invasoras) incluyendo solo los datos del tratamiento control. Los efectos año, biotipo e interacción biotipo por año fueron considerados fijos. Si los efectos año e interacción biotipo por año no fuesen significativos ($P > 0,05$), se utilizaría un único valor medio como control. Si el efecto del año y/o su interacción con el biotipo fuesen significativo/s, entonces un valor medio del control sería calculado para cada biotipo y año. Por lo tanto, la tolerancia al EC varió comúnmente entre 0 (sin frutos cuajados por el EC) y 1 (sin efecto del EC). En el GLMM, los efectos año, tipo e interacción año por tipo fueron considerados fijos. Cuando la interacción año por tipo fue significativa, se realizaron cuatro contrastes ortogonales, contrastando cultivo vs. silvestres (nativo y no-nativo), cultivo vs. nativos, cultivo vs. no-nativos y nativos vs. no-nativos.

Tabla 4.2. Media \pm error estándar para los cuatro caracteres reproductivos (DC, PF, NF y REND) en cada uno de los tres grupos (Cultivados, Nativos e Invasores), en condiciones control y de EC y en los Años 1 y 2. n: número de muestras usadas para cada estimación. DC: diámetro del capítulo (cm); PF: peso de los frutos (mg fruto⁻¹); NF: número de frutos (número capítulo⁻¹) y REND: rendimiento del capítulo (mg).

Año	Grupo	Carácter	n	Control	n	Estrés por calor
1	Cultivado	DC	19	17,7 \pm 0,7	25	15,0 \pm 0,7
1	Cultivado	PF	19	82,4 \pm 4,2	25	93,2 \pm 4,2
1	Cultivado	NF	19	1125,7 \pm 73,1	25	130,5 \pm 39,0
1	Cultivado	REND	19	93553,9 \pm 8217,9	25	12467,9 \pm 3748,9
1	Invasores	DC	43	4,2 \pm 0,2	45	3,9 \pm 0,2
1	Invasores	PF	43	17,6 \pm 1,3	45	21,1 \pm 1,7
1	Invasores	NF	43	151,1 \pm 19,5	45	97,6 \pm 17,9
1	Invasores	REND	43	2852,3 \pm 2,7	45	1443,9 \pm 341,6
1	Nativos	DC	69	3,1 \pm 0,2	47	3,0 \pm 0,3
1	Nativos	PF	69	11,5 \pm 1,5	47	20,6 \pm 2,4
1	Nativos	NF	69	132,5 \pm 14,1	47	84,7 \pm 19,6
1	Nativos	REND	69	1394,2 \pm 204,8	47	1046,6 \pm 264,2
2	Cultivado	DC	20	16,3 \pm 0,6	22	13,4 \pm 0,7
2	Cultivado	PF	20	67,7 \pm 3,8	22	88,9 \pm 19,6
2	Cultivado	NF	20	1049,9 \pm 72,5	22	519,2 \pm 60,4
2	Cultivado	REND	20	69834 \pm 5439,6	22	33129,1 \pm 4177,4
2	Invasores	DC	38	4,6 \pm 0,2	43	3,9 \pm 0,2
2	Invasores	PF	38	15,0 \pm 1,0	43	15,8 \pm 0,1
2	Invasores	NF	38	252,9 \pm 19,1	43	121,7 \pm 16,8
2	Invasores	REND	38	3951,3 \pm 482,4	43	1894,2 \pm 275,3
2	Nativos	DC	62	3,4 \pm 0,1	64	2,9 \pm 0,1
2	Nativos	PF	62	10,2 \pm 0,7	64	9,7 \pm 0,7
2	Nativos	NF	62	133,4 \pm 10,2	64	59,0 \pm 7,2
2	Nativos	REND	62	1398,3 \pm 175,3	64	580,0 \pm 88,0

Datos climáticos y PCA de las variables climáticas: Se obtuvieron 19 variables climáticas biológicamente relevantes de la base de datos BIOCLIM (Hijmans *et al.* 2005) para cada una de las 23 poblaciones geo-referenciadas incluidas en este capítulo. Además, a partir de estas se calcularon y agregaron cuatro variables relacionadas a la temperatura (temperaturas medias y máximas durante la primavera y el verano) y dos relacionadas a las precipitaciones (cantidad de precipitaciones durante la primavera y el verano) para reflejar mejor las condiciones climáticas durante la estación de crecimiento del girasol. Debido a la alta correlación entre variables, se realizaron correlaciones múltiples y, para todas aquellas comparaciones con $r > 0,90$, una variable del par fue removida del análisis. Esto se realizó para evitar la redundancia en los análisis y para facilitar la interpretación de los resultados. A partir de esta remoción, 13 variables BIOCLIM representaron los datos climáticos de entrada para el análisis de componentes principales (PCA) (Tabla 4.3). El PCA se utilizó para producir PCs que expliquen la variación multivariada en las variables ambientales. Para separar los efectos de las temperaturas y las precipitaciones, se realizaron dos PCAs, uno con siete variables relacionadas a la temperatura y el otro con seis variables asociadas a las precipitaciones (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Variables BIOCLIM utilizadas en los análisis de componentes principales (PCA). Las variables para cada una de las poblaciones fueron obtenidas usando el software DIVA-GIS 7.5 (Hijmans *et al.* 2005).

Variable	Descripción
<i>BIOCLIM temperatura</i>	
BIO1	Temperatura media anual
BIO2	Temperatura máxima del mes más caluroso
BIO3	Temperatura mínima del mes más frío
BIO4	Temperatura media durante la primavera
BIO5	Temperatura media durante el verano
BIO6	Temperatura máxima durante la primavera
BIO7	Temperatura máxima durante el verano
<i>BIOCLIM agua</i>	
BIO8	Precipitación anual
BIO9	Precipitación del mes más húmedo
BIO10	Precipitación del mes más seco
BIO11	Estacionalidad de la precipitación (CV)
BIO12	Precipitación durante la primavera
BIO13	Precipitación durante el verano

Adaptación local dentro del germoplasma silvestre: Para evaluar la presencia de adaptación local, se compararon dos modelos, el modelo nulo (sin covariables) y el modelo completo (con los PCs ambientales como covariables). Los efectos año, tipo e interacción año por tipo fueron considerados fijos tanto en el modelo nulo como el completo. Se evaluó la significancia del PC1 y PC2 de cada uno de los dos PCA pero solo los PCs con efecto significativo permanecieron en el modelo. Si las diferencias en la tolerancia al EC observadas en modelo nulo se reducen o desaparecen en el modelo completo, tales diferencias pueden ser atribuidas a diferencias en el ambiente local de cada población (Colautti *et al.* 2009). En este caso, una correlación entre la respuesta al EC y el PC significativo determinará la fuerza y dirección del cline. Además, si el efecto del PC ambiental es significativo pero las diferencias entre nativos y no-nativos persisten, esto indica que, aunque existe un cline en la tolerancia al EC (efecto PC significativo) las diferencias entre tipos se deben a factores no incluidos en el PCA.

RESULTADOS

Condiciones ambientales durante la estación de crecimiento

Las parcelas de los materiales cultivados alcanzaron la etapa de floración (R5) alrededor del 25 de enero (año 1) y 19 de enero (año 2). Para estas fechas, todos los capítulos de ambos tratamientos, control y EC, habían sido tapados con bolsas de papel blancas y negras, respectivamente. Por lo tanto, las condiciones ambientales para el grupo cultivo durante floración fueron los valores medios de las variables climáticas de los siete días posteriores a esa fecha (Tabla 4.4). Por otro lado, la floración típicamente escalonada del grupo silvestre comenzó el 14 de diciembre en el año 1 y el 22 de diciembre en el año 2 y se extendió hasta el 17 y 8 de febrero en las poblaciones más precoces, en los años 1 y 2, respectivamente. Sin embargo, los tratamientos fueron aplicados desde el 14 de enero hasta el 9 de febrero (año 1) y desde el 25 de enero hasta el 27 de febrero (año 2), por lo tanto las condiciones ambientales para el grupo silvestre durante floración fueron los valores medios de este período (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Media y error estándar de las variables ambientales registradas para la estación completa de crecimiento y la etapa de floración. Los valores en negrita indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre años usando una prueba t. Las temperaturas media y máxima del tratamiento de EC fueron obtenidas sumando $9,4^{\circ}\text{C}$ a los valores del control. Los datos climáticos diarios fueron obtenidos del Aeródromo de Bahía Blanca (S $38^{\circ}44'48''$; W $62^{\circ}9'36''$).

Variable	Año	
	1	2
<i>Estación de crecimiento</i>		
N (número de datos)	160	137
Temperatura media ($^{\circ}\text{C}$)	$20,4 \pm 0,3$	$22,3 \pm 0,3$
Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$)	$29,2 \pm 0,3$	$31,3 \pm 0,4$
Humedad relativa (%)	$60,6 \pm 0,9$	$52,4 \pm 1,4$
Precipitaciones acumuladas (mm)	297,2	323,8
<i>Floración</i>		
N (número de datos)	27	34
Temperatura media ($^{\circ}\text{C}$)	$22,7 \pm 0,6$	$23,8 \pm 0,6$
Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$)	$31,2 \pm 0,7$	$33,2 \pm 0,7$
Temperatura media (EC, $^{\circ}\text{C}$)	32,1	33,2
Temperatura máxima (EC, $^{\circ}\text{C}$)	40,6	42,6
Humedad relativa (%)	$63,5 \pm 2,4$	$56,0 \pm 2,6$
Precipitaciones acumuladas (mm)	104,1	149,1

La temperatura media durante la floración fue similar para los grupos silvestre y cultivado, tanto en el año 1 ($22,7\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y $20,6\pm 0,8^{\circ}\text{C}$, respectivamente; $t=-1,63$, $P=0,1122$) como en el año 2 ($24,0\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ y $24,1\pm 1,7^{\circ}\text{C}$, respectivamente; $t=0,07$, $P=0,9466$), sin embargo la temperatura máxima media durante la floración fue mayor para el grupo silvestre en el año 1 ($31,2\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ y $28,0\pm 1,1^{\circ}\text{C}$, respectivamente; $t=-2,28$, $P=0,0147$) y menor (aunque estadísticamente no significativa) en el año 2 ($32,4\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ y $34,6\pm 1,8^{\circ}\text{C}$, respectivamente; $t=1,33$, $P=0,0963$). Durante el ciclo completo y el período de floración, el año 2 fue más caluroso y seco que el año 1 (Tabla 4.3). Sin embargo, la temperatura registrada por el termómetro infrarrojo manual (medida en momentos aleatorios durante el día) fue significativamente superior en el año 1 que en el año 2, tanto para el control ($30,7\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ vs. $25,5\pm 1,0^{\circ}\text{C}$; $t=4,11$, $P=0,0001$) como para el EC ($40,0\pm 0,9^{\circ}\text{C}$ vs. $35,0\pm 1,2^{\circ}\text{C}$; $t=2,72$, $P=0,0084$). A pesar de esto, el incremento de temperatura del tratamiento de EC respecto al control no varió entre años ($9,3\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ y $9,5\pm 0,8^{\circ}\text{C}$ para los años 1 y 2, respectivamente; $t=-0,96$; $P=0,3406$), por esto las diferencias entre tratamientos fueron combinadas (75 valores) y la temperatura del tratamiento de EC fue estimada sumando $9,4^{\circ}\text{C}$ a la temperatura registrada. Además, la HR durante el día fue menor en el tratamiento de EC respecto al control ($24,4\pm 2,1\%$ y $29,2\pm 2,9\%$, respectivamente) aunque tales diferencias no fueron significativas ($t=1,34$; $P=0,1907$). Es importante destacar que las mediciones de HR fueron registradas durante el día. El valor medio de HR durante el tratamiento fue $54,7\pm 3,5\%$ y mostró una correlación significativa con los valores medidos en el control y EC ($n=9$, $P=0,0476$, $r=0,67$ y $n=9$, $P=0,0304$, $r=0,71$, respectivamente).

Efecto del estrés por calor sobre el rendimiento y sus componentes

Cuando se analizaron los datos no estandarizados, el EC redujo significativamente el diámetro del capítulo (DC), número de frutos (NF) y rendimiento del capítulo (REND) ($F=77,4$, $P<0,0001$; $F=312,6$, $P<0,0001$; $F=464,3$; $P<0,0001$, respectivamente) y aumentó el peso de los frutos (PF) ($F=7,24$, $P=0,0076$). A pesar de las grandes diferencias entre grupos para las cuatro variables reproductivas (Tabla 4.2), el efecto tratamiento explicó la mayor parte de las diferencias observadas en el NF y REND (64% y 50% del total de la variación, respectivamente). El efecto grupo explicó la mayor parte de la variación observada en el PF (~80%) mientras que la combinación de los efectos grupo y tratamiento explicaron la mayor parte de la variación en el DC (41% y 49,7%, respectivamente). Además, se observó efecto significativo de la interacción Grupo por Tratamiento en el DC, NF y REND ($F=6,74$, $P=0,0013$; $F=66,07$, $P<0,0001$; $F=174,4$, $P<0,0001$, respectivamente) lo que sugiere una respuesta diferencial al EC entre grupos. Además, se observó interacción año*tratamiento y año*tratamiento*grupo en NF ($F=18,5$, $P<0,0001$; $F=21,6$, $P<0,0001$, respectivamente) y REND ($F=64,0$, $P<0,0001$; $F=40,1$, $P<0,0001$, respectivamente) indicando que las reducciones en estos caracteres causadas por el EC variaron entre años y además esta variación fue diferente

para los dos grupos. Por otro lado, no se observaron interacciones año*tratamiento ni año*tratamiento*grupo en el PF ($F=0,6$, $P=0,4324$; $F=2,5$, $P=0,0794$, respectivamente) ni en DC ($F=0,1$, $P=0,7744$; $F=0,2$, $P=0,8257$, respectivamente).

Tolerancia al EC en el germoplasma silvestre y cultivado

Cuando se analizaron los caracteres estandarizados (EC/control), se observaron efectos significativos año, grupo y año*grupo para NF ($F=6,37$, $P=0,0124$; $F=5,1$, $P=0,0070$; y $F=7,1$, $P=0,0010$, respectivamente) y REND ($F=15,6$, $P=0,0001$; $F=4,4$, $P=0,0133$; y $F=3,3$, $P<0,0383$, respectivamente). No se encontraron efectos significativos para el PF ni DC (todos los $P>0,1$), indicando una respuesta al EC similar entre silvestre y cultivado. En el año 1, se observó una mayor tolerancia en el grupo silvestre respecto del cultivado para el NF ($0,47\pm 0,06$ vs. $0,15\pm 0,04$, respectivamente) y REND ($0,34\pm 0,05$ vs. $0,15\pm 0,05$, respectivamente). La mayor parte de las diferencias fueron explicadas por la diferencia entre los grupos cultivo e invasores, siendo intermedio el grupo nativos (Fig. 4.2). En el año 2, se observó un comportamiento muy superior del cultivo respecto del año 1 tanto para NF como REND (Fig. 4.2). Al igual que en el año 1, el grupo invasor mostró una mayor tolerancia que los grupos cultivo y nativo pero solo se observaron diferencias significativas entre los grupos silvestres y entre el cultivo y nativo para NF y REND (Fig. 4.2).

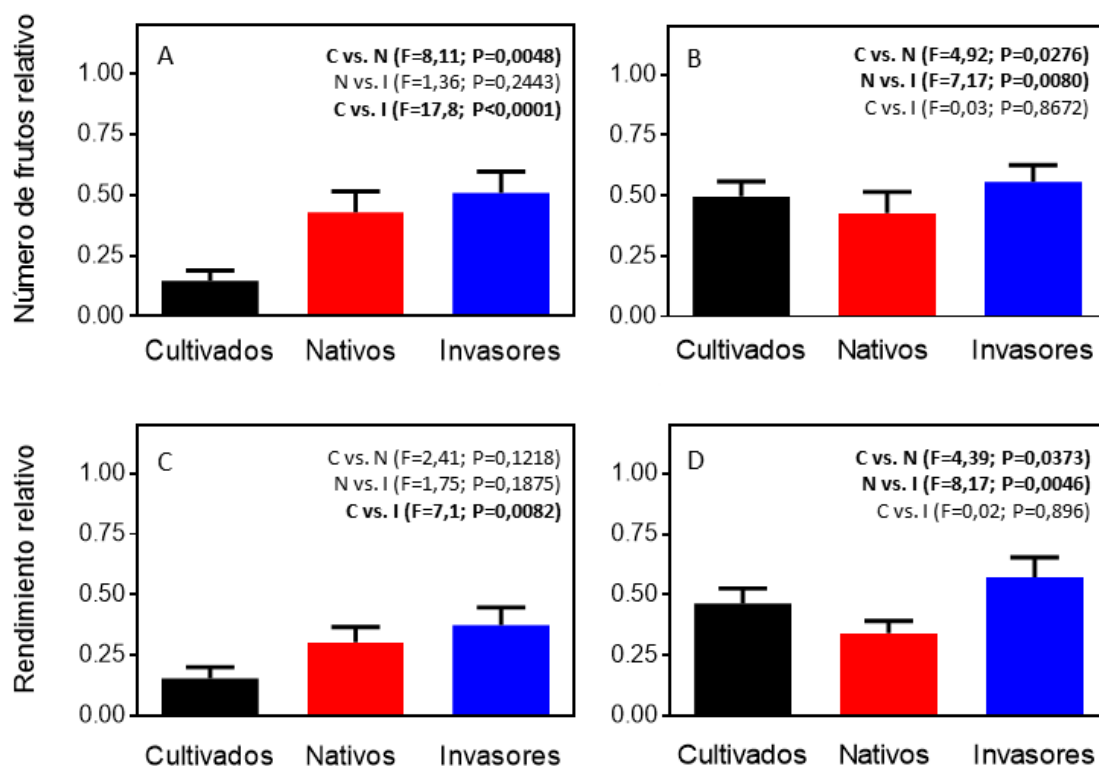


Figura 4.2. Número de frutos (A y B) y rendimiento (C y D) relativos (estrés respecto al control) en los grupos cultivados, nativos e invasores para los años 1 (A y C) y 2 (B y D). Las barras representan los valores medios de cada grupo. Las barras de error estándar indican variabilidad dentro de cada grupo. Dentro de cada año y variable, los grupos fueron comparados usando tres contrastes ortogonales. Los contrastes significativos se muestran en negrita.

PCA de las variables climáticas

El PCA de las variables relacionadas con la temperatura dio como resultado dos variables compuestas designadas *PC1temp* y *PC2temp*, las cuales capturaron 79,8% y 17,5% del total de la variación, respectivamente (Fig. 4.3A). El PCA de las variables relacionadas con las precipitaciones dio como resultado dos variables compuestas designadas *PC1agua* y *PC2agua*, las cuales capturaron 74,4% y 18,8% del total de la variación, respectivamente (Fig. 4.3B). El *PC1temp* estuvo representado por valores positivos de todas las variables relacionadas con la temperatura (Tabla 4.2) con coeficientes desde 0,31 a 0,41 (Tabla 4.4), es decir, cuanto más grandes los valores de *PC1temp*, más caluroso el ambiente. El *PC2temp* estuvo representado por valores positivos de BIO2, BIO5 y BIO7, asociados con la temperatura máxima del mes más caluroso y las temperaturas media y máxima del verano (Tabla 4.4). El *PC1agua* estuvo representado por valores positivos de todas las variables asociadas a la cantidad de precipitaciones (Tabla 4.2) con coeficientes desde 0,41 a 0,47 (Tabla 4.4) mientras que el *PC2agua* estuvo principalmente representado por la estacionalidad de las precipitaciones (BIO11, coeficiente de 0,76; Tabla 4.2). Por lo tanto, a mayores valores de *PC1agua*, mayor disponibilidad de agua en el ambiente y cuanto mayor el *PC2agua*, mayor la estacionalidad de las precipitaciones, especialmente debido a veranos secos.

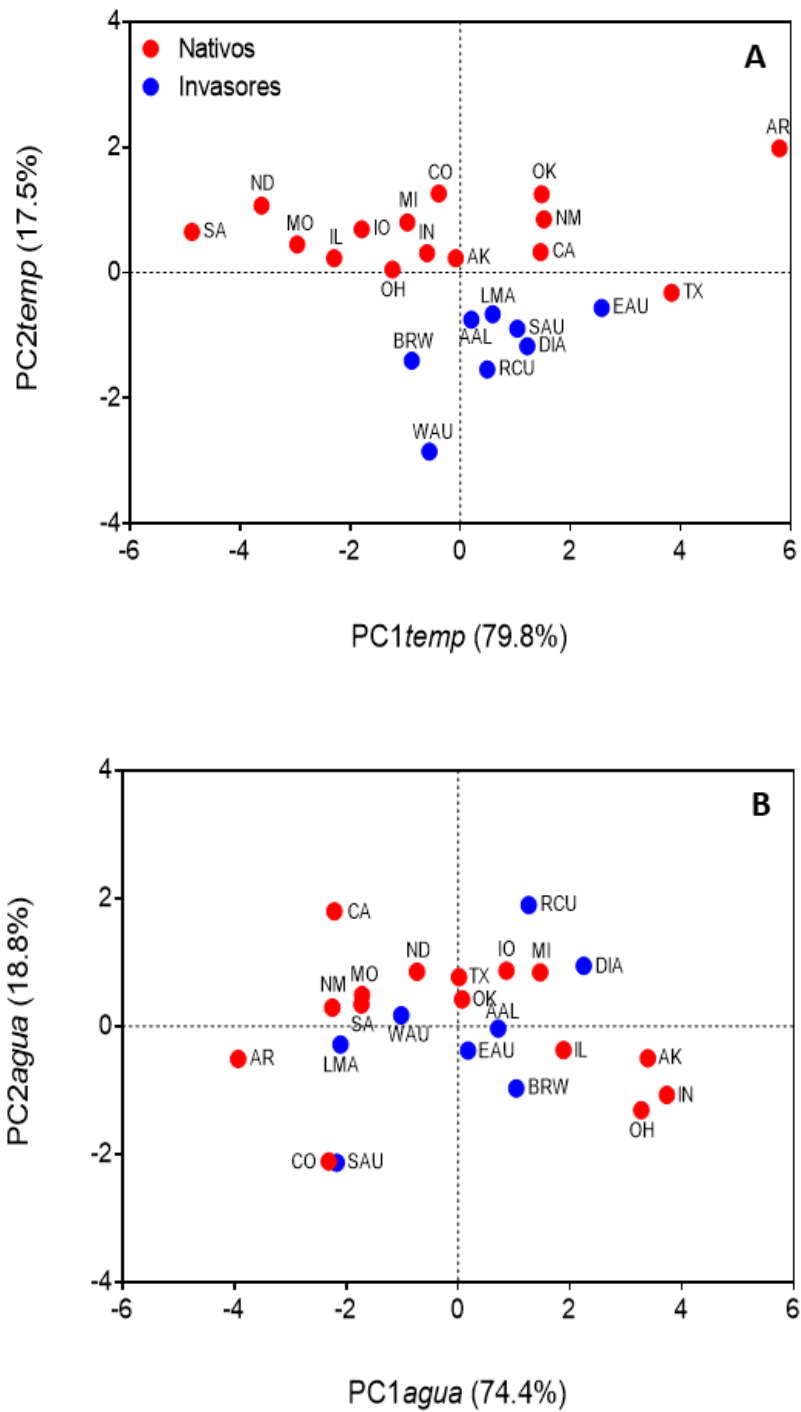


Figura 4.3. Variabilidad climática de los ambientes locales de poblaciones nativas y no-nativas de girasol. Ambos ejes representan el primero y el segundo eje resultante del PCA de las siete variables asociadas a la temperatura (A) y las seis asociadas a las precipitaciones (B).

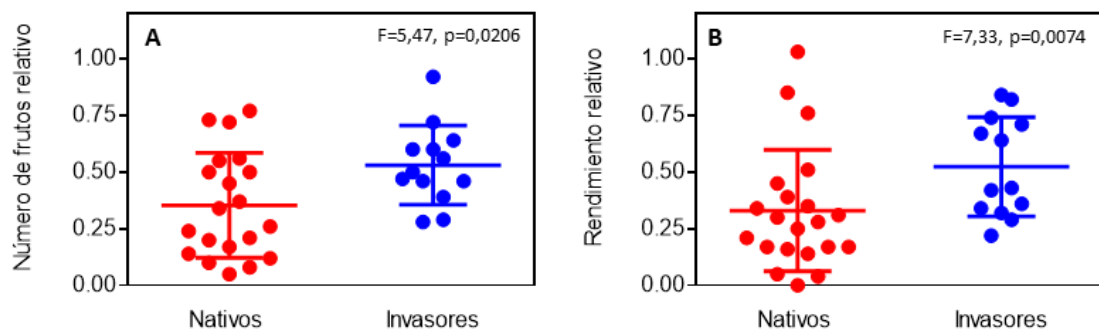


Figura 4.4 Número de frutos (A) y rendimiento (B) relativos en los grupos nativos y no-nativos. Cada punto corresponde al valor medio de tolerancia al EC dentro de cada año. Se incluyeron los datos de ambos años. La línea horizontal mayor representa el valor medio del Grupo. Las barras representan el desvío estándar. Los valores F y P son del efecto Grupo en el modelo nulo (GLMM sin covariables ambientales).

La comparación entre girasoles nativos e invasores revela adaptación al estrés por calor

Los grupos nativos e invasores fueron comparados para los dos caracteres con efecto grupo significativo (NF y REND). En el modelo nulo, no se encontraron efectos significativos del año ni interacción año*grupo para NF ni REND (Tabla 4.5). El grupo invasor mostró una mayor tolerancia al EC que el Nativo tanto para NF como para REND (Fig. 4.4). En el modelo completo, el PC1agua fue el único PC significativo tanto para NF como para REND (Tabla 4.5) y las diferencias entre nativos e invasores fueron mayores (Tabla 4.5). Por lo tanto, a mayor cantidad de precipitaciones en el ambiente local de la población, mayor la tolerancia a EC, tanto para NF como REND (Fig. 4.5). Además, la mayor tolerancia al EC del grupo invasores (aún después de controlar por PCagua) sugiere que otros factores además del cline ambiental están involucrados en su mayor tolerancia al EC.

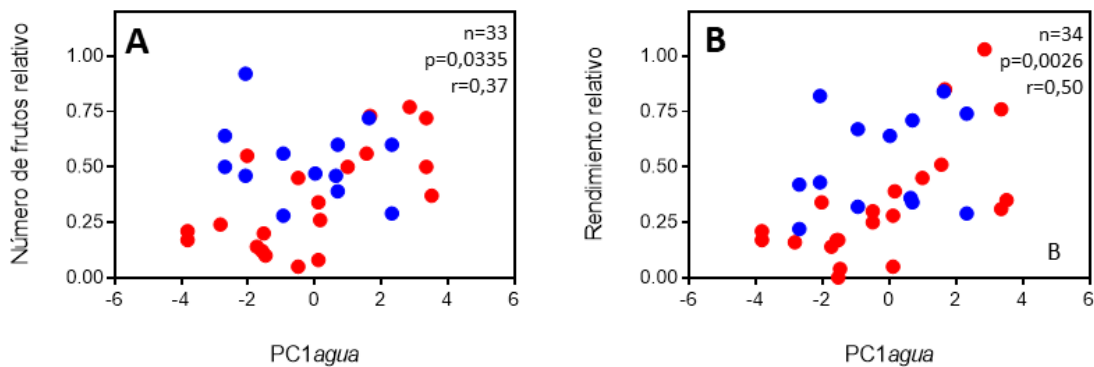


Figura 4.5. Relación entre el PC1agua y el número de frutos (A) y rendimiento (B) relativos. El PC1agua representa el primer eje del PCA de las seis variables asociadas a las precipitaciones (Tabla 4.2). Cada punto es el valor medio de una población dentro de cada año. Los puntos rojos y azules representan a las poblaciones nativas e invasoras, respectivamente. Se muestran los valores n, p y r de la correlación de Pearson.

Tabla 4.5. Análisis de la varianza y covarianza para el número de frutos y el rendimiento, con y sin los PCs de las variables ambientales como covariables (modelo nulo y completo, respectivamente). Análisis de covarianza previos, incluyendo los cuatro PCs de las variables ambientales (*PC1temp* y *PC2temp*; *PC1agua* y *PC2agua*) fueron realizados y solo se incluyó el PC con efecto significativo (*PC1agua* en ambos casos). Efectos significativos ($P < 0,05$) en negrita. G.l: grados de libertad; den g.l: denominador de los grados de libertad.

Carácter	Efecto fijo	Modelo simple				Modelo completo			
		g.l.	den g.l.	F	P	g.l.	den g.l.	F	P
Número de frutos	Año	1	165	0,08	0,7779	1	164	0,17	0,6848
	Rango	1	165	5,47	0,0206	1	164	7,02	0,0088
	Año*Rango	1	165	0,28	0,5949	1	164	0,10	0,7508
	<i>PC1agua</i>	1	164	14,14	0,0002				
Rendimiento	Año	1	192	3,46	0,0645	1	191	1,90	0,1701
	Rango	1	192	7,33	0,0074	1	191	9,75	0,0021
	Año*Rango	1	192	0,69	0,4080	1	191	0,33	0,5657
	<i>PC1agua</i>	1	191	21,12	<0,0001				

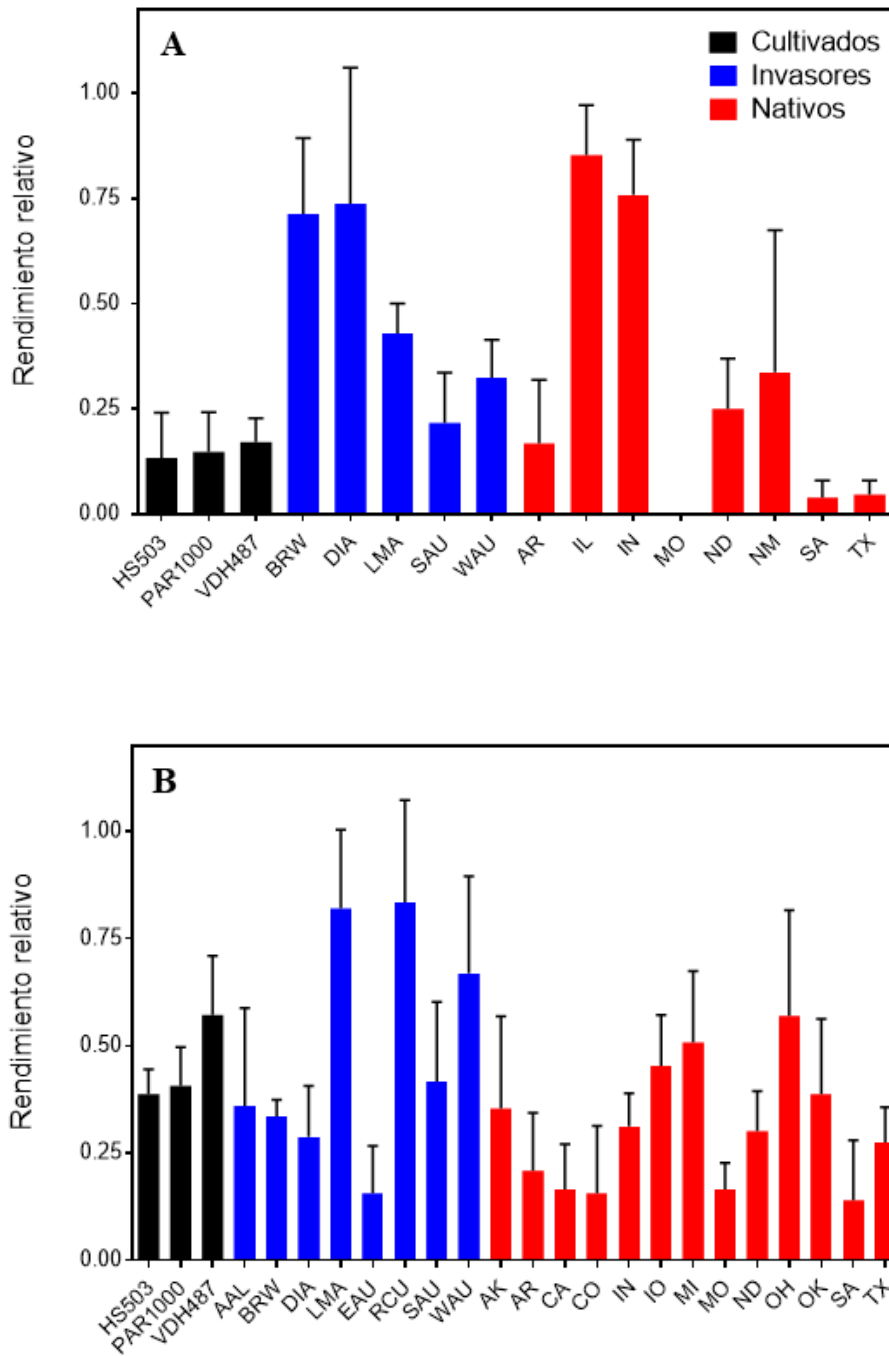


Figura 4.6. Rendimiento relativo de cada uno de los biotipos utilizados en el presente capítulo en los años 1 (A) y 2 (B). Las barras representan el valor medio del biotipo dentro de cada año. Las barras de error estándar indican variabilidad dentro de cada biotipo. La población MO en el año 1 falló completamente el cuajado de frutos.

Mayores valores de los caracteres reproductivos explican la mayor tolerancia al EC de las poblaciones invasoras

Para evaluar si la tolerancia al EC puede ser predicha por los valores reproductivos en condiciones sin estrés, se compararon los grupos nativos e invasores para los cuatro caracteres reproductivos registrados en este capítulo y las variables con diferencias entre grupos fueron correlacionadas con la tolerancia al EC. Los invasores mostraron mayores valores de DC (F=929, P=0,0063), NF (F=14,3, P=0,0013), PF (F=6,84, P=0,0166) y REND (F=15,1, P=0,0009) que los nativos. Además, cuando los PCs ambientales fueron incluidos como covariables el PC1agua fue el único significativo para tres de las cuatro variables. Debido a que las cuatro variables mostraron diferencias significativas entre nativos e invasores, se realizó un PCA para los cuatro caracteres, el cual dio como resultado una variable compuesta designada PC1rep, la cual explicó el 82,4% de la variación total. PC1rep estuvo representado por valores positivos de las cuatro variables reproductivas (coeficientes de 0,53, 0,47, 0,46 y 0,54 para el DC, PF, NF y REND, respectivamente). Dentro del grupo nativos se observó una fuerte correlación entre el PCrep y la tolerancia al EC para NF (r=0,64, n=23, P=0,0012) y REND (r=0,62, n=23, P=0,0017). Sin embargo, no se observó correlación significativa entre estas dos variables dentro del grupo invasores (r=-0,08, P=0,8221 y r=-0,04, P=0,9134 para REND y NF, respectivamente).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se desarrolló una técnica de alto rendimiento para la evaluación de la tolerancia al EC durante la fase más sensible (floración) en condiciones de campo. El uso de carpas de calor y de calentadores infrarrojos son técnicas prometedoras para la evaluación a campo de la tolerancia al EC en la fase crítica de los cultivos, la floración (Rattalino Edreira *et al.* 2011; Prasad y Djanaguiraman 2015; Siebers *et al.* 2015, 2017). Sin embargo, la principal limitante de esas técnicas es la escala de los experimentos, que permite la evaluación de pocos genotipos simultáneamente. Por el contrario, con la presente técnica utilizada, se pudo evaluar una amplia variedad de genotipos silvestres y cultivados e identificar poblaciones candidatas para el mejoramiento de la tolerancia al EC. Además, esta técnica permitió la evaluación simultánea de grupos muy divergentes como lo son los materiales cultivados y silvestres. Sin embargo, de este enfoque surge una limitación: la humedad producida por las bolsas de papel podría limitar el uso de esta técnica fuera de las regiones áridas y semiáridas. La viabilidad del polen de girasol disminuye en condiciones de alta HR (p. ej. >85-90%). En regiones húmedas, las mañanas con rocío y los días lluviosos durante floración pueden afectar la eficiencia de la técnica propuesta en este capítulo. Por esto, para superar esta limitación se recomienda cubrir

los capítulos en las horas cercanas al mediodía y durante la tarde, momentos en que la HR es baja y la radiación alta. De esta manera se evitarían los momentos más húmedos del día (amanecer y noche) sin afectar el incremento de temperatura durante el día.

Tolerancia al estrés por calor en los germoplasmas silvestre y cultivado

La tolerancia al EC del girasol cultivado para REND varió desde 13% a 17% en el año 1 y de 39% a 52% en el año 2. Debido a que el año 2 fue más caluroso y seco que el año 1 (Tabla 4.3), otros factores además que la temperatura, estuvieron involucrados en la variación de la tolerancia al EC observada en el grupo cultivado. Por ejemplo, la mayor HR en el año 1 (Tabla 4.3) sumada a las condiciones de humedad impuestas por las bolsas de papel podría incrementar la severidad del tratamiento de EC. Por lo tanto, la combinación de EC y alta HR podría haber afectado nuestros resultados, afectando diferencialmente al grupo cultivado en el año 1. A pesar de esto, la HR durante el día fue similar para ambos tratamientos (control y EC) y mucho menor a los valores de HR usados en experimentos de EC en condiciones controladas (65-85%; Pradhan *et al.* 2012, Pradhan y Prasad 2015; Prasad y Djanaguiraman 2015; Valluru *et al.* 2016).

Al igual que en este capítulo, reducciones severas en el rendimiento (>60%) debido al EC en fases reproductiva fueron reportadas en otros cultivos, como garbanzo (Devasirvatham *et al.* 2012), maíz (Rattalino Edreira *et al.* 2011) y trigo (Prasad y Djanaguiraman 2015). En contraste, Siebers *et al.* (2015, 2017) observaron disminuciones menores en el rendimiento (~10%) debido al EC en maíz y soja, respectivamente. Tales diferencias son probablemente el resultado de las temperaturas utilizadas para el tratamiento de EC: ~30°C en los experimentos de Sieber y ~40°C en el resto.

Se identificaron al menos cinco poblaciones silvestres en el año 1 (BRW, DIA, LMA, IL, y IN) y dos en el año 2 (LMA y RCU) que claramente mostraron una mayor tolerancia al EC que el grupo cultivado, la mayor parte de estas fueron poblaciones invasoras (Fig. 4.6). Es interesante remarcar que todas estas poblaciones tolerantes al EC mostraron fuerte evidencia de introgresión con el cultivo, tanto a nivel morfológico (Cantamutto *et al.* 2010a; Casquero *et al.* 2013) como genómico (Mondon *et al.* 2018), lo que sugiere un rol de la hibridación cultivo-silvestre en la tolerancia al EC. A pesar de la menor tolerancia al EC del cultivo, la hibridación de taxones diferentes produce fenotipos transgresores (extremos) que pueden ser seleccionados. En especies anuales del género *Helianthus*, la selección sobre fenotipos transgresores, generados por hibridación, ha facilitado la colonización de ambientes extremos, como los desiertos y los ambientes salinos (Rieseberg *et al.* 2003, 2007). A pesar de esto, el rol de la hibridación cultivo-silvestre en la tolerancia a EC debe ser evaluado en futuros experimentos.

De los tres caracteres evaluados asociados al rendimiento, DC y PF fueron muy poco afectados por el EC, mientras que las diferencias entre poblaciones tolerantes y susceptibles al EC fue la mayor capacidad de cuajar frutos en condiciones de EC de las primeras ($r_{NF-REND}=0,86$, $n=33$, $P<0,0001$). La fuerte correlación entre el NF y el REND está comúnmente asociada a procesos empíricos más que funcionales (Sinclair y Jamieson 2006), es decir, los recursos disponibles para la planta (nitrógeno, carbono, agua, luz) determinan el rendimiento y el número de frutos cuajados es solo un ajuste consecuente de ese rendimiento. A pesar de esto, breves períodos de EC podrían no afectar la acumulación de biomasa pero sí resultar en un bajo número de frutos cuajados (Jha *et al.* 2014). En este capítulo, el EC se aplicó solo sobre los capítulos, simulando un breve período de EC, por lo tanto, el NF final no fue consecuencia de cambios en la disponibilidad de recursos por planta sino de la capacidad de los tejidos reproductivos para sobrevivir y completar el cuajado de frutos. Queda por responder si esta tolerancia al EC de los tejidos reproductivos se debe a una menor esterilidad del polen y/o a un menor aborto de los óvulos fertilizados en condiciones de EC. Por ejemplo, genotipos de garbanzo tolerantes al EC mostraron una mayor fijación de vainas debido a mayores niveles de viabilidad del polen (Devasirvatham *et al.* 2012). Por otra parte, en arroz silvestre, se encontró un carácter que permite cambiar el pico de floración desde las horas cercanas al mediodía hasta la mañana temprano, evitando así las horas más calurosas del día. Este carácter fue exitosamente introgresado en líneas élite de arroz, incrementando la tolerancia al EC de las mismas (Hirabayashi *et al.* 2015; Bheemanahalli *et al.* 2017) y representa un ejemplo interesante de un carácter silvestre introgresado en el germoplasma cultivado, el cual podría ser explorado en el girasol silvestre.

La comparación entre girasoles nativos e invasores revela adaptación al estrés por calor

Las poblaciones invasoras comúnmente presentan mayor tamaño, mayor partición a estructuras reproductivas y aptitud biológica que sus contrapartes nativas (van Kleunen *et al.* 2010; Felker-Quinn *et al.* 2013; Turner *et al.* 2013;). Utilizando técnicas biogeográficas, se observó que los girasoles invasores mostraron una mayor tolerancia al EC que los nativos en NF y REND (Fig. 4.4A y B), aún cuando las diferencias en condiciones climáticas locales fueron controladas. Además, se encontró una fuerte correlación positiva entre la cantidad de precipitaciones del ambiente local y la tolerancia al EC (Fig. 4.5) lo que evidencia adaptación local, pero no se encontró correlación entre la temperatura del ambiente local y la tolerancia al EC. La ausencia de correlación entre las variables asociadas a la temperatura y la tolerancia al EC podría ser explicada por las distintas estrategias utilizadas por el girasol silvestre para enfrentar el EC. Por ejemplo, bajos niveles de dormición junto con una floración temprana previa a los meses más calurosos y una alta producción de pequeños capítulos para escalonar la producción de frutos podrían ser caracteres adaptativos en ambientes extremos como Arizona, Nueva México y

Texas, orientados más a evitar el calor extremo que a tolerarlo. Apoyando esta idea, se encontró evidencia de selección sobre estos caracteres durante la colonización de ambientes extremos en especies silvestres de girasol (Ludwig *et al.* 2004; Whitney *et al.* 2010). Otro punto a destacar es que en el presente capítulo no se evaluó el comportamiento de las poblaciones en condiciones de temperatura supra-óptima durante el ciclo (p. ej., 2-4°C por encima del control) sino el comportamiento ante un evento extremo de EC (siete días consecutivos con temperaturas máximas de ~40°C). Por lo tanto, aunque los eventos extremos de EC ocurrirán con mayor probabilidad en climas calurosos, no está claro si la frecuencia de tales eventos está capturada en los PCs climáticos de este capítulo o si tales eventos pueden actuar como agentes de selección natural.

La correlación positiva observada entre los caracteres reproductivos en condiciones control y la tolerancia al EC ayuda a explicar por qué los invasores toleran más el EC que los nativos y por qué la tolerancia al EC está correlacionada con el PC1*agua* (Fig. 4.5). Primero, los invasores mostraron mayores valores de todos los caracteres reproductivos que los nativos y tales diferencias no fueron explicadas por el ambiente local. La hibridación entre poblaciones previamente aisladas por distancia y más probablemente entre poblaciones silvestres y el cultivo durante la introducción en ambientes no-nativos son las causas más probables del incremento en los valores de caracteres reproductivos (van Kleunen *et al.* 2015; Mesgaran *et al.* 2016; Mondon *et al.* 2018;). Una amplia variabilidad fenotípica y molecular en el girasol invasor de Argentina (Cantamutto *et al.* 2010a; Garayalde *et al.* 2011) hace que la hibridación sea un escenario probable. Segundo, debido a que el PC1*agua* explicó tanto la variación en los caracteres reproductivos como la tolerancia al EC, esta última correlación podría ser empírica y no funcional. En este contexto, un enfoque basado en los caracteres reproductivos de las poblaciones y no en su ambiente local sería recomendable para futuras actividades de pre-mejoramiento en girasol.

Finalmente, el incremento en la tolerancia al EC encontrado en los girasoles invasores amplía la base genética del germoplasma silvestre y convierte a estas poblaciones en un recurso valioso para los programas de mejoramiento actuales y futuros. Esto demanda su conservación *in-situ* y *ex-situ*, independientemente del monitoreo por su condición de especie invasora. Además, es necesario focalizarse en las actividades pre-mejoramiento, p. ej. construcción de poblaciones segregantes, caracterización molecular de la tolerancia a EC e introgresión de caracteres de tolerancia en líneas élite, para aumentar la utilidad del gemoplasma silvestre por parte de los mejoradores.

CAPÍTULO 5

Diversidad genética y estructura poblacional del girasol silvestre en Argentina: rastros genéticos del proceso de invasión

INTRODUCCIÓN

Reconstruir las rutas de invasión de las especies no-nativas es un factor clave para entender por qué solo una pequeña fracción de las especies introducidas se convierte en invasoras y para diseñar mejores estrategias de prevención y control de estas (Estoup y Guillemaud 2010; Keller *et al.* 2012; Fraimout *et al.* 2017). Durante las introducciones, son esperables reducciones dramáticas en el tamaño poblacional, debido a que solo unos pocos individuos son introducidos o se establecen, especialmente en las introducciones accidentales. En estos casos, es esperable que la deriva génica y el efecto fundador (cuello de botella genético) sean las principales fuerzas que actúen sobre la estructura genética de las poblaciones introducidas (Nei *et al.* 1975; Dlugosch y Parker 2008; Szűcs *et al.* 2017a). Este efecto fundador disminuiría la variabilidad genética de las poblaciones introducidas respecto a sus contrapartes nativas, comprometiendo así el potencial de adaptación al nuevo ambiente (Estoup *et al.* 2016; Szűcs *et al.* 2017a; Vahsen *et al.* 2018). A pesar de estas predicciones, al menos tres características deben ser consideradas: 1) Una fracción pequeña de individuos podría contener la mayor parte de la variabilidad genética de la población original (especialmente en plantas alógamas); 2) La varianza aditiva es mucho menos afectada por cuellos de botella demográficos que la diversidad genética estimada a través de marcadores moleculares neutros, 3) Una baja diversidad genética no impide necesariamente la capacidad invasora de una población (Dlugosch y Parker 2008; Uller y Leimu 2011; Dlugosch *et al.* 2015; Estoup *et al.* 2016).

Por otro lado, introducciones múltiples seguidas de hibridación (definida aquí como el cruzamiento de genomas históricamente aislados; Keller *et al.* 2014) podría atenuar, e incluso revertir, la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones invasoras, incrementado el tamaño de la población fundadora (efecto demográfico) y/o creando nuevas combinaciones genéticas (efecto genético) (Dlugosch *et al.* 2015; Szűcs *et al.* 2017a; van Boheemen *et al.* 2017). Cada vez más evidencia sugiere que los cuellos de botella y la hibridación, debido a introducciones múltiples, comúnmente coexisten en las invasiones biológicas, siendo la estructura genética de las poblaciones invasoras resultado de la fuerza relativa de cada proceso (cuello de botella/hibridación) (Dlugosch y Parker 2008; Colautti *et al.* 2017; Fraimout *et al.* 2017). Por ejemplo, una serie de estudios recientes exploró la importancia relativa de la presión

de propágulos (tamaño y número) durante la introducción, la composición genética de las poblaciones fundadoras (endogámicas o exogámicas) y la evolución adaptativa sobre el establecimiento y la expansión del insecto modelo *Triboleum castaneum* demostrando que cada uno de los tres factores puede conducir independientemente a una invasión exitosa (Szűcs *et al.* 2017b,a; Vahsen *et al.* 2018). Esto indica no solo que los tres factores deben ser considerados en las evaluaciones del riesgo de invasión de una especie sino también que algunas combinaciones (p. ej. alta presión de propágulos e hibridación) pueden conducir a invasiones muy rápidas.

Tradicionalmente, las rutas de invasión fueron inferidas usando métodos directos, basados en registros históricos de presencia/ausencia de especies no-nativas (p. ej. colecciones de herbarios, revisiones bibliográficas) y/o datos de intercepción (p. ej. controles de cuarentena). Estos datos son comúnmente escasos, desuniformes tanto en tiempo como espacio y muchas veces erróneos (Estoup y Guillemaud 2010). Actualmente, los métodos indirectos, basados en las relaciones genéticas entre individuos y poblaciones de los rangos nativo y no-nativo (inferidas con el uso de marcadores moleculares), nos dan mucha más información que los métodos directos (Cristescu 2015). Además, el reciente desarrollo de modelos basados en aproximaciones bayesianas computacionales (ABC) (Guillemaud *et al.* 2010; Cornuet *et al.* 2014; Cabrera y Palsbøll 2017) ha mejorado nuestra capacidad de inferir rutas de invasión complejas usando datos genéticos, pero también datos históricos (Lombaert *et al.* 2010; Barker *et al.* 2017; Hargrove *et al.* 2017; van Boheemen *et al.* 2017). Con los modelos ABC es posible comparar estadísticamente los escenarios más probables (inferidos por ejemplo, de análisis genéticos clásicos o de datos históricos, morfológicos, etc.), calcular los parámetros demográficos para el escenario más probable (tamaño efectivo de las poblaciones y tiempo desde la introducción/expansión, duración de los cuellos de botella, etc.) y cuantificar el nivel de confianza con el cual se elige un escenario por sobre los demás (Guillemaud *et al.* 2010; Cornuet *et al.* 2014; Cabrera y Palsbøll 2017). Por lo tanto, estos modelos aparecen como un excelente complemento de los métodos tradicionales para dilucidar las rutas de invasión.

El primer paso en la reconstrucción de una ruta de invasión es la identificación de la población fuente. En el rango nativo, especialmente en especies de amplia distribución, la variabilidad intraespecífica suele estar espacialmente estructurada en grupos genéticos, los cuales no son introducidos aleatoriamente en el nuevo rango (muestreo no aleatorio; Keller y Taylor 2008), siendo el primer condicionante de la estructura genética de las poblaciones introducidas, pero también de la distribución fenotípica de las mismas. Una vez que la fuente es identificada, se puede hacer una serie de preguntas ecológicas y evolutivas acerca del proceso de invasión, por ejemplo: ¿Hubo una pérdida significativa de la variabilidad genética durante la introducción y/o expansión en el rango no-nativo? ¿Qué caracteres fenotípicos cambiaron después de la introducción? ¿Existen diferencias climáticas entre el ambiente nativo e introducido? Además

de aclarar los procesos genéticos y ecológicos asociados a la invasión, la identificación de la fuente geográfica tiene implicancias prácticas directas como la introducción de enemigos naturales para el control biológico y la identificación de los vectores de introducción.

La región central de EEUU es el rango nativo histórico del girasol silvestre, mientras que la expansión hacia el sur (sur de Texas) y hacia el oeste (California) es considerada más reciente (~500 años; Rieseberg *et al.* 2007; Owens *et al.* 2016). Estudios genéticos previos mostraron, en general, una baja estructura poblacional en el rango nativo (Mandel *et al.* 2011; Baute *et al.* 2016), lo cual dificultaría la identificación de la fuente geográfica. Sin embargo, también se reportó un cierto grado de diferenciación genética, posiblemente debido al aislamiento por distancia dentro de la región central de EEUU y también estructura genética entre las regiones sur y oeste, respecto a la región central de EEUU (Baute *et al.* 2016; Owens *et al.* 2016). En la región central de Argentina, el girasol silvestre fue probablemente introducido en la provincia de Córdoba ~70 años atrás y desde allí se expandió y naturalizó en al menos seis provincias (Cantamutto *et al.* 2008, 2010a, b; Poverene *et al.* 2008). Los modelos multivariados, basados en conexiones de rutas, sugieren el transporte accidental por camiones de carga y maquinaria agrícola como el principal vector de dispersión (Cantamutto *et al.* 2010b). Por otro lado, la alta variabilidad fenotípica encontrada, en comparación con poblaciones nativas, sugiere alta variabilidad genética y la presencia de múltiples introducciones (Cantamutto *et al.* 2010a).

En este capítulo se estudió la variabilidad genética y la estructura poblacional del girasol silvestre de Argentina y se reconstruyó la ruta de invasión más probable utilizando análisis genéticos clásicos y modelos ABC. Para esto se utilizaron 14 marcadores SSR nucleares, tres marcadores SSR del cloroplasto y 23 variables morfológicas y fenológicas en seis poblaciones de Argentina y nueve poblaciones de EEUU. Los objetivos específicos del capítulo fueron: 1) Determinar la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones de Argentina; 2) Identificar la fuente geográfica dentro del rango nativo y 3) Reconstruir la ruta de invasión más probable. Se identificó la fuente geográfica de la introducción inicial y se demostró que las poblaciones invasoras retuvieron la mayor parte de la variabilidad genética presente en el rango nativo, como resultado de una alta presión de propágulos durante la introducción inicial y de múltiples introducciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones utilizadas y genotipado

Se colectaron muestras de ADN de 115 individuos pertenecientes a 15 poblaciones distribuidas a lo largo de Estados Unidos (rango nativo) y la región central de Argentina (rango no-nativo). Dentro del rango nativo, se seleccionaron nueve poblaciones de tres regiones geográficas; sur de EEUU: Nueva México (NM), Texas (TX) y Oklahoma (OK); oeste de EEUU: California (CA), Colorado (CO) y Nevada (NV) y centro de EEUU: Indiana (IN), Iowa (IO) y Dakota del Norte (ND). De la región central de Argentina se utilizaron seis poblaciones: Adolfo Alsina (AAL), Colonia Barón (BAR), Diamante (DIA), Las Malvinas (LMA), Media Agua (MAG) y Río Cuarto (RCU). La localización geográfica de cada población se encuentra en la Tabla 2.1, excepto para las poblaciones AAL (Latitud: -37,3; Longitud: -63,0), MAG (Latitud: -32,0; Longitud: -68,5) y NV (Latitud: 39,6; Longitud: -119,3).

El ADN genómico fue extraído de tejido foliar deshidratado en sílica gel proveniente de plantas creciendo en un jardín común, usando la técnica CTAB (CYMMYT, 2006). Cada individuo fue genotipado usando 14 marcadores SSR nucleares (nSSR) y tres marcadores SSR del cloroplasto (cpSSR), elegidos de una amplia base de marcadores y previamente utilizados en Mandel *et al.* (2011) y Wills *et al.* (2005), respectivamente. Los marcadores nucleares fueron elegidos basados en su neutralidad (no mostraron evidencias de selección durante la domesticación ni el mejoramiento moderno) y su distribución en el genoma (un marcador en 14 de los 17 grupos de ligamiento del girasol) mientras que los tres cpSSR fueron seleccionados por la presencia de polimorfismo dentro de *H. annuus* (Wills *et al.* 2005; Wills y Burke 2006).

El genotipado de SSR se realizó usando el protocolo de Schuelke (2000), que consiste en adherir un pequeño fragmento universal (M13) marcado radiactivamente a cada cebador *forward*. Las condiciones de PCR fueron las utilizadas en Mandel *et al.* (2011). Cada producto de PCR fue diluido 1:30 en agua y visualizado usando un mini secuenciador automático (ABI 3130xl DNA; Applied Biosystems, Foster City, CA) con el marcador interno GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) incluido en cada muestra para una mejor determinación del tamaño de los fragmentos. Los alelos fueron registrados usando el software GeneMarker v. 2.6.3 (SoftGenetics, State College, PA).

Análisis de genética poblacional

Para los nSSR, las medidas de diversidad genética, incluyendo el número promedio y efectivo de alelos por locus, la heterocigosis observada y esperada, el índice de información de Shannon y diversidad genética no sesgada de Nei, fueron calculados a nivel de población y de rango (EEUU y ARG) usando GenAleEx v.6.5 (Peakall y Smouse 2012). Para los cpSSR, las medidas de diversidad genética, incluyendo el número promedio y efectivo de haplotipos, la riqueza de haplotipos, la diversidad genética y el número de haplotipos privados fueron calculados a nivel de población y de rango usando Haplotype Analysis v.1.05 (Eliades y Eliades 2009).

La estructura poblacional fue evaluada realizando un análisis de la varianza molecular (AMOVA), implementado en GenAleEx, el cual particiona de manera jerárquica la variación genética y estima el F_{ST} de Wright. En el AMOVA, las fuentes de variación fueron el rango (ARG y EEUU), las poblaciones dentro de cada rango y los individuos dentro de cada población. Además del AMOVA, se calculó el F_{ST} para cada una de las combinaciones de pares entre poblaciones. La significancia estadística (hipótesis nula= no existen diferencias genéticas) tanto del AMOVA como de los F_{ST} apareados, fue determinada realizando 10000 permutaciones.

El agrupamiento bayesiano, usando el software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000), se utilizó para asignar cada genotipo individual a un grupo. Para este análisis, se implementó el modelo *admixture* con las frecuencias alélicas correlacionadas y el resto de los parámetros fueron dejados con los valores *default* del software. Se realizaron 10 corridas independientes para cada valor K (1-15; el mínimo indica un solo grupo y el máximo, cada población pertenece a un grupo distinto) con 100000 simulaciones MCMC y un período de *burn-in* de 50000 simulaciones. El número de grupos (K) óptimo fue elegido basado en el método de Evanno *et al.* (2005). Las 10 repeticiones del STRUCTURE fueron alineadas con el software CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg 2007) y graficadas con *distrupt* (Rosenberg 2004) usando el servidor CLUMPAK (Kopelman *et al.* 2015). La estructura poblacional también fue investigada utilizando un análisis de coordenadas principales (PCo), basado en la matriz de distancia genética de Nei, construida con los 14 nSSR. Finalmente, para comparar la estructura genética de los genomas del cloroplasto (cpSSR) y del núcleo (nSSR), se realizó un AMOVA basado en las distancias Φ_{ST} . El uso de esta matriz de distancia, al no considerar la variabilidad dentro de cada individuo, permite la comparación de genotipos haploides y diploides y marcadores dominantes y codominantes. De manera similar, para evaluar las diferencias en flujo génico a través del polen y semillas entre rangos, se realizó un AMOVA para cada rango y tipo de marcadores (nSSR y cpSSR).

Estructura poblacional basada en variables morfológicas

Para el análisis de la estructura poblacional, basado en datos morfológicos, se utilizaron 19 variables morfológicas y cuatro variables fenológicas previamente utilizadas en Cantamutto *et al.* (2010a) (Tabla 5.1). Las variables fueron registradas en jardín común en el Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, durante dos años consecutivos (2004/05 y 2005/06) sobre al menos 10 plantas de cada población. El análisis discriminante se utilizó para maximizar la variación entre poblaciones, independientemente de su procedencia (nativas o invasoras) con el objetivo de identificar grupos genéticos basados en la morfología.

Análisis ABC con DIYABC

Para reconstruir la ruta de invasión más probable del girasol silvestre en Argentina se utilizaron modelos ABC en el software DIYABC (Cornuet *et al.* 2014). ABC permite establecer un ranking de escenarios, basado en la probabilidad posterior aproximada de cada uno de estos. Para esto, los datos observados son comparados con un gran número de datos simulados (escenarios con distintas combinaciones de parámetros históricos y demográficos) y la ocurrencia de cada escenario entre los datos simulados más cercanos a los datos observados permite la estimación de su probabilidad posterior (Estoup y Guillemaud 2010; Guillemaud *et al.* 2010; Barrès *et al.* 2012; Cabrera y Palsbøll 2017). Debido a que el número de escenarios crece exponencialmente con el número de poblaciones, se compararon solo los escenarios más probables, basados en datos históricos y en el análisis de genética de poblaciones. En el primer análisis ABC se compararon cuatro escenarios, incluyendo las seis poblaciones argentinas y la fuente de introducción más probable (IO). En el segundo análisis ABC, se evaluó la posibilidad de una introducción independiente en AAL, incluyendo solo RCU, AAL, BAR y LMA.

Para la construcción de cada escenario fueron incluidas todas las variables genéticas implementadas en DIYABC (Cornuet *et al.* 2014), calculadas a partir de los 14 marcadores nSSR. Debido a que los tiempos de divergencia en nuestros escenarios son recientes, para los parámetros históricos se eligió una distribución log-uniforme que favorece valores cercanos al mínimo. En el primer análisis, los valores mínimos del tiempo de introducción en RCU y DIA fueron elegidos en base a registros históricos: 70 años para RCU (registro de 1947; Bauer 1991) y 60 años para DIA (registro de 1960 en el herbario del Instituto de Botánica Darwinion). Los valores mínimos y máximos del resto de los parámetros históricos fueron 10 y 150 años con la condición de que estos deben ser menores al tiempo de introducción en RCU. En el segundo análisis, los valores mínimo y máximo de los parámetros históricos fueron ajustados a 10 y 100 años, respectivamente. La probabilidad posterior de cada escenario fue calculada utilizando un análisis discriminante sobre las variables genéticas utilizando un enfoque directo y uno logístico (Cornuet *et al.* 2014).

Tabla 5.1. Variables morfológicas utilizadas para el análisis discriminante de las 15 poblaciones (seis argentinas y nueve de Estados Unidos). Las variables fueron registradas en un jardín común y extraídas de Cantamutto *et al.* 2010a.

Variable	Unidad
Altura de planta al inicio de floración	cm
Diámetro del tallo a mitad de altura	cm
Altura inserción del capítulo	cm
Número de capítulos	.
Ancho de la hoja	cm
Largo de la hoja	cm
Tamaño de la hoja (Ancho*largo)	cm ²
Largo del pecíolo	cm
Relación largo hoja/pecíolo	.
Forma de la hoja (Largo/ancho)	cm ²
Número de hojas	.
Número de flores liguladas	.
Ancho de lígulas	cm
Largo de lígulas	cm
Número de filarias	.
Largo de filarias	cm
Ancho de filarias	cm
Relación largo/ancho de las filarias	.
Diámetro del capítulo	cm
Días a 10% floración	días
Días de 10% a 50% de floración	días
Días de 50% a 100% floración	días
Duración ciclo total	días

RESULTADOS

Diversidad genética dentro de las poblaciones

El número efectivo de alelos (N_E) en los 14 nSSR varió desde 1,31 a 3,47 por locus, con un promedio de 2,54 (Tabla 5.2). Dentro de las poblaciones, el A_E promedio varió desde 1,80 a 3,23 y las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre rangos (EEUU: A_E promedio = 2,41; ARG: A_E promedio: 2,47; prueba t, $t=1,90$, $P=0,0805$). De manera similar, el índice de información de Shannon (I) y la heterocigosis no sesgada (uH_E) no mostraron diferencias entre rangos (EEUU: I y $uH_E= 0,89$ y $0,55$; ARG: I y $uH_E: 1,03$ y $0,57$; prueba t, $t=2,01$, $P=0,0652$ y $t=0,45$, $P=0,6634$ para I y uH_E , respectivamente). Cuando las variables genéticas fueron comparadas entre regiones geográficas definidas previamente, las poblaciones ARG mostraron mayor variabilidad genética que cada una de las tres regiones de EEUU y la región central de EEUU mostró mayor variabilidad genética que las regiones Sur y Oeste (Tabla 5.2). Estos resultados indican que las poblaciones invasoras retuvieron la mayor parte de la variabilidad genética observada en el rango nativo.

Estructura poblacional

Se encontró moderada a fuerte estructura genética entre poblaciones ($F_{ST}=0,225$; $P<0,0001$) y muy baja estructura entre rangos (F_{ST} entre ARG y EEUU= $0,027$; $P<0,0001$; ~3% de la variación total). Los F_{ST} apareados variaron desde 0,036 a 0,368 (Tabla 5.3) y todos los valores fueron significativamente distintos de cero (todos los $P<0,001$ con excepción de RCU-IO, $P=0,027$). Dentro de Argentina, DIA claramente se separó del resto de las poblaciones (F_{ST} promedio= $0,289$; $0,232-0,321$; Tabla 5.3) pero también de las poblaciones de EEUU (F_{ST} promedio= $0,307$; $0,234-0,368$; Tabla 5.3). Por otro lado, el resto de las poblaciones de Argentina mostraron los menores valores de F_{ST} con las poblaciones de la región central de EEUU (F_{ST} promedio= $0,143$; $0,036-0,214$; Tabla 5.3), lo que sugiere que esta región es la fuente de introducción geográfica más probable. Es interesante que las poblaciones RCU de Argentina e IO de EEUU mostraron el valor más bajo de F_{ST} (Tabla 5.3) sugiriendo estas poblaciones como la introducción inicial y la fuente de introducción, respectivamente. Dentro de EEUU, las poblaciones de la región central mostraron una baja estructura (F_{ST} promedio= $0,099$; $0,083-0,123$; Tabla 5.3) mientras que las poblaciones dentro de las regiones Sur y Oeste mostraron una estructura intrarregional mucho mayor (región Sur: F_{ST} promedio= $0,284$; $0,238-0,320$; región Oeste: F_{ST} promedio= $0,220$; $0,200-0,228$; Tabla 5.3).

Tabla 5.2. Diversidad genética, basada en 14 SSR nucleares y tres SSR del cloroplasto, de poblaciones de *H. annuus* provenientes EEUU y Argentina (ARG). Las poblaciones TX y NM mostraron un alelo nulo para el locus 2 en 9 de los 10 individuos, por lo tanto, fueron excluidas del análisis de cpSSR. Ne: Número efectivo de alelos; I: índice de información de Shannon; Ho: heterocigosis observada; He: heterocigosis esperada; uHe: heterocigosis no sesgada; Hap_E: número efectivo de haplotipos; Hap_R: riqueza de haplotipos; Hap_D: diversidad genética de los haplotipos; Hap_{PR}: número de haplotipos privados. Después del nombre de cada población, se indica entre paréntesis el número de plantas utilizado en los análisis moleculares.

Rango	Región	Población	SSR del núcleo					SSR del cloroplasto			
			Ne	I	Ho	He	UHe	Hap _E	Hap _R	Hap _D	Hap _{PR}
EEUU	Oeste	CA (5)	2,23	0,78	0,49	0,47	0,52	1,00	0,00	0,00	0
EEUU	Oeste	CO (7)	2,44	0,87	0,37	0,47	0,52	1,00	0,00	0,00	1
EEUU	Oeste	NV (10)	2,42	1,00	0,37	0,54	0,57	1,92	0,98	0,53	0
EEUU	Centro	IN (6)	2,64	0,98	0,27	0,52	0,57	1,00	0,00	0,00	0
EEUU	Centro	IO (6)	2,52	0,94	0,27	0,51	0,56	2,57	1,83	0,73	1
EEUU	Centro	ND (5)	2,92	1,02	0,56	0,57	0,67	1,47	1,00	0,40	1
EEUU	Sur	NM (5)	1,80	0,61	0,24	0,39	0,44
EEUU	Sur	OK (6)	2,38	0,89	0,33	0,50	0,55	1,00	0,00	0,00	0
EEUU	Sur	TX (5)	2,37	0,90	0,49	0,50	0,57
ARG	Argentina	AAL (10)	2,90	1,07	0,41	0,52	0,55	1,92	0,98	0,53	1
ARG	Argentina	BAR (10)	3,01	1,13	0,37	0,57	0,61	2,27	1,56	0,62	1
ARG	Argentina	DIA (10)	2,43	0,86	0,38	0,47	0,50	3,52	2,29	0,81	1
ARG	Argentina	LMA (10)	2,57	0,92	0,32	0,49	0,52	1,22	0,50	0,20	2
ARG	Argentina	MAG (10)	2,30	0,96	0,28	0,52	0,55	4,26	2,73	0,86	3
ARG	Argentina	RCU (10)	3,23	1,23	0,45	0,63	0,67	2,45	1,54	0,67	1
EEUU (55)			5,40	1,82	0,37	0,75	0,76	5,74	7,00	0,84	5
ARG (60)			5,20	1,72	0,36	0,72	0,72	9,57	13,02	0,91	12

Tabla 5.3. Estimaciones de F_{ST} apareados basadas en 10000 permutaciones para las 15 poblaciones utilizadas en el presente capítulo, basados en 14 marcadores SSR nucleares. Los mayores valores se indican en verde y los menores en rojo. Todas las comparaciones fueron estadísticamente significativas $P < 0,05$. Todos los $P < 0,001$, excepto $P = 0,027$ para la comparación RCU-IO.

	Argentina						Oeste de EEUU			Centro de EEUU			Sur de EEUU		
	AAL	BAR	DIA	LMA	MAG	RCU	CA	CO	NV	IN	IO	ND	NM	OK	TX
AAL															
BAR	0,179														
DIA	0,321	0,274													
LMA	0,172	0,213	0,320												
MAG	0,212	0,138	0,300	0,262											
RCU	0,164	0,112	0,232	0,188	0,159										
CA	0,271	0,197	0,368	0,293	0,225	0,197									
CO	0,217	0,165	0,305	0,243	0,211	0,180	0,228								
NV	0,295	0,221	0,361	0,321	0,243	0,219	0,200	0,233							
IN	0,165	0,145	0,249	0,204	0,140	0,104	0,200	0,214	0,242						
IO	0,185	0,103	0,234	0,181	0,161	0,036	0,201	0,223	0,244	0,083					
ND	0,204	0,070	0,271	0,214	0,137	0,098	0,180	0,156	0,215	0,123	0,090				
NM	0,274	0,187	0,308	0,329	0,262	0,171	0,313	0,270	0,339	0,244	0,236	0,171			
OK	0,262	0,246	0,350	0,221	0,263	0,221	0,283	0,263	0,317	0,265	0,242	0,202	0,320		
TX	0,258	0,196	0,318	0,280	0,235	0,178	0,200	0,175	0,219	0,180	0,182	0,186	0,238	0,294	

El análisis con STRUCTURE sugiere la presencia de tres grandes grupos genéticos ($K=3$; Fig. 5.1 y 5.3). Los tres grupos genéticos están presentes tanto en el rango nativo (EEUU) como no-nativo (ARG), sugiriendo introducciones múltiples. Dentro de EEUU, los individuos de las regiones central y oeste fueron asignados principalmente a los grupos 1 (Q_1 promedio= 0,80) y 2 (Q_2 promedio= 0,79), respectivamente (Fig. 5.1). Sin embargo, las poblaciones de la región sur fueron asignadas a diferentes grupos (Fig. 5.1). En Argentina, los individuos de RCU fueron claramente asignados al grupo 1 (9/10 individuos con $Q>0,95$) mientras que los individuos de las poblaciones AAL y LMA fueron asignados al grupo 3 (18/20 individuos con $Q>0,88$). Por otro lado, los individuos de las poblaciones BAR, DIA y MAG mostraron un claro origen híbrido entre los dos principales grupos genéticos (1 y 2; Fig. 5.1 y 5.3). Es importante destacar que no encontramos individuos del grupo genético 2 en Argentina, lo que sugiere que la hibridación ocurrió en el rango nativo. El PCoA separa claramente DIA del resto de las poblaciones (Fig. 5.2A) y, en menor medida, la región Oeste (especialmente NV) del resto de las regiones (Fig. 5.2A y B). Al igual que en el análisis con STRUCTURE, el PCoA no separa las poblaciones del sur de EEUU del resto (Fig. 5.2B y C) y sugiere un tercer grupo genético para las poblaciones OK, AAL y LMA (Fig. 5.2C).

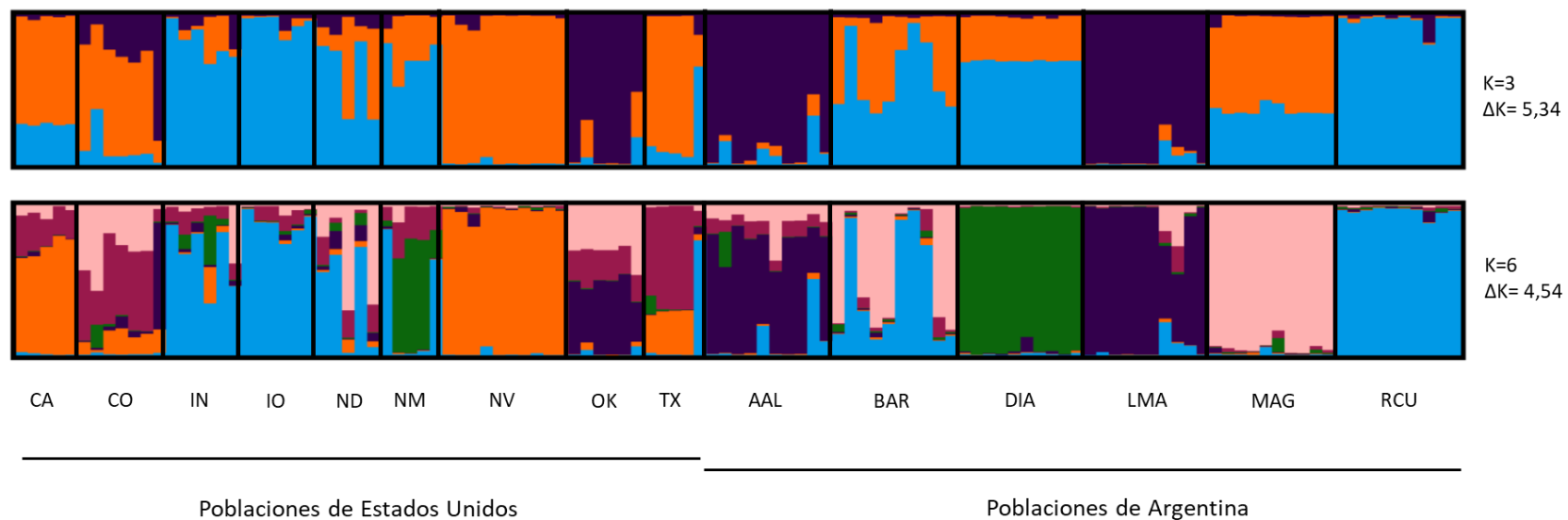


Figura 5.1. Análisis bayesiano de la estructura genética para $K=3$ y $K=6$ basado en 14 SSR nucleares. Los valores de K y ΔK se indican a la derecha del gráfico, los individuos son ordenados según el rango y la población de las cuales provienen.

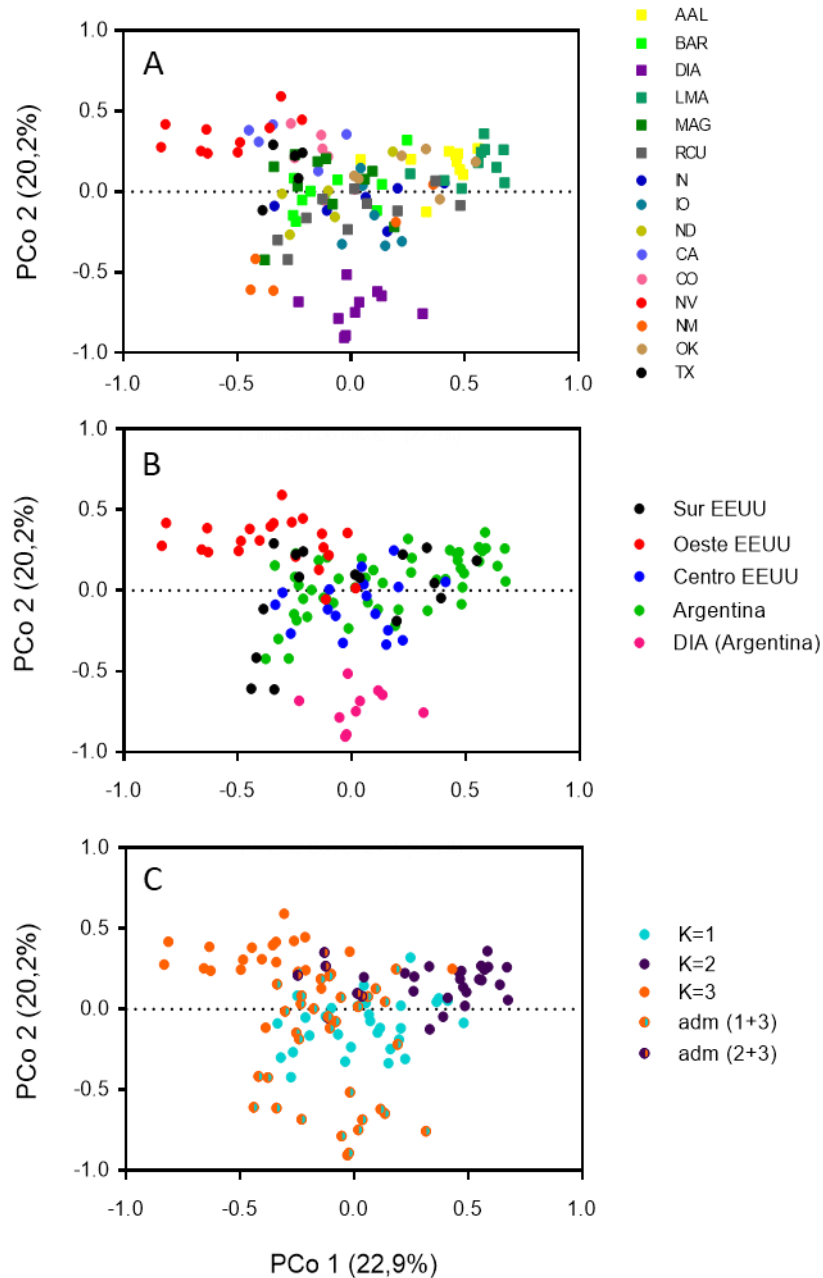


Figura 5.2. Análisis de coordenadas principales de la estructura genética. La distancia genética se calculó para cada individuo en base al genotipo de 14 SSR nucleares. Los individuos son coloreados según la población (A), la región (B) o el grupo genético según análisis con STRUCTURE (C).

Diversidad genética en el genoma del cloroplasto

El número de alelos por locus en los tres cpSSR fue tres, cuatro y ocho (NTCP7, NTCP30 y NTCP39, respectivamente) lo cual dio como resultado 20 haplotipos. Dentro de las poblaciones, el número efectivo de haplotipos (H_{apE}) varió desde 1,00 a 4,26 (Tabla 5.2; Fig. 5.3), aunque el mismo varió dramáticamente entre rangos (EEUU: H_{apE} promedio=1,42, 1,00-2,57; ARG: H_{apE} promedio=2,61, 1,22-4,26; prueba t, $t=2,44$, $P=0,0328$). De manera similar, las poblaciones de Argentina mostraron valores muy superiores de riqueza haplotípica (EEUU: H_{apR} promedio=0,54, 0,00-1,83; ARG: H_{apR} promedio=1,60, 0,50-2,73; prueba t, $t=2,45$, $P=0,0324$) y diversidad genética (EEUU: H_{apD} promedio=0,24, 0,00-0,73; ARG: H_{apD} promedio=0,61, 0,20-0,86; prueba t, $t=2,42$, $p=0,342$) que las poblaciones de EEUU. La mayoría de los haplotipos (12 de 20) estuvieron presentes en frecuencias muy bajas (<5%) mientras que los haplotipos 15, 17 y 19 fueron los más comunes (9,8%, 15,7% y 10,8%, respectivamente). De estos, los haplotipos 15 y 19 solo fueron encontrados en poblaciones de EEUU (haplotipo 15: fijado en IN y 4 de 5 individuos en ND; haplotipo 19: fijado en CA y OK) mientras que el haplotipo 17 estuvo presente en tres poblaciones: NV en EEUU (6 de 10) y BAR (6 de 10) y RCU (4 de 9) de Argentina. Cabe destacar que todas las poblaciones de Argentina presentaron al menos un haplotipo privado (Tabla 5.2; Fig. 5.3), indicando la gran diversidad haplotípica dentro de las poblaciones invasoras.

Para comparar la estructura de los genomas nuclear y del cloroplasto, se realizaron AMOVAs basados en las distancias Φ_{ST} . Para los nSSR, se encontró variación significativa dentro de las poblaciones ($\Phi_{ST}=0,290$, $P<0,0001$) y entre poblaciones ($\Phi_{ST}=0,286$, $P<0,0001$), pero no entre rangos ($\Phi_R=0,005$, $P=0,075$). Los rangos nativo y no-nativo mostraron valores de Φ_{ST} muy similares (Fig. 5.4) lo que indica similar diferenciación genética entre poblaciones. Para los cpSSR, se encontró variación significativa dentro de las poblaciones ($\Phi_{ST}=0,831$, $P<0,0001$) y entre las poblaciones ($\Phi_{ST}=0,836$, $P<0,0001$), pero no entre rangos ($\Phi_R=-0,029$, $P=0,956$). Sin embargo, la estructura poblacional fue muy diferente dentro de cada rango (Fig. 5.4): las poblaciones de Argentina mostraron una variación intra-poblacional mucho mayor que las poblaciones de EEUU (Fig. 5.4), indicando mayor nivel de flujo génico por semillas en Argentina.

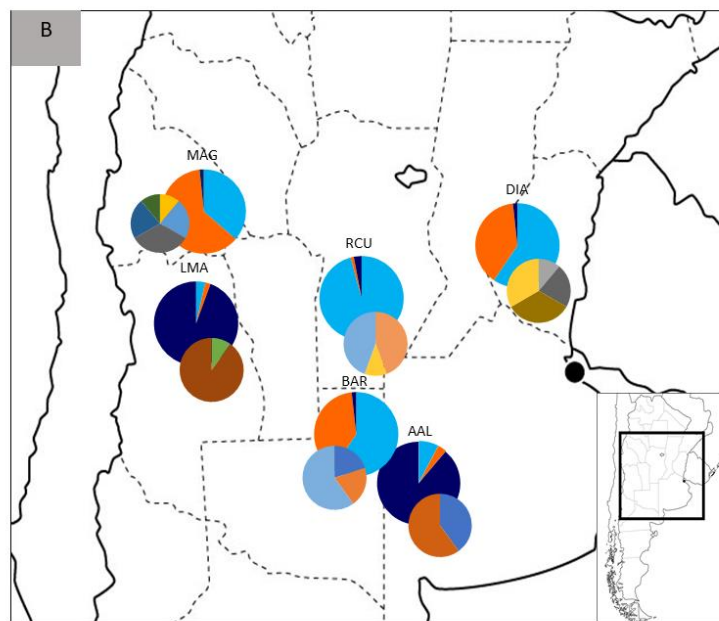
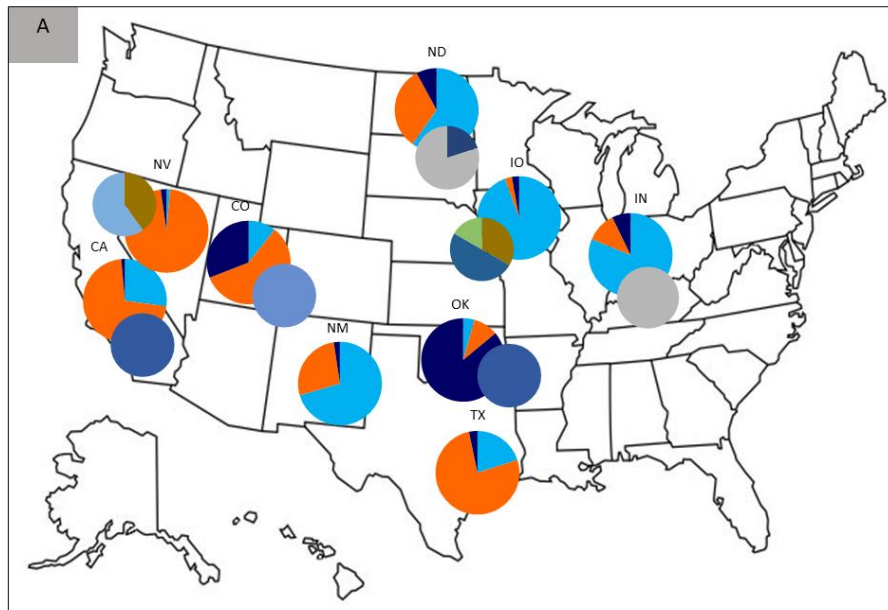


Figura 5.3. Distribución geográfica de los grupos genéticos y los haplotipos en Estados Unidos (A) y Argentina (B). Los gráficos muestran la contribución de cada grupo genético basada en el análisis con STRUCTURE (círculos grandes) y la contribución de cada haplotipo (círculos pequeños). Las poblaciones nativas NM y TX presentaron un alelo nulo para uno de los tres cpSSR y fueron excluidas del análisis de haplotipos.

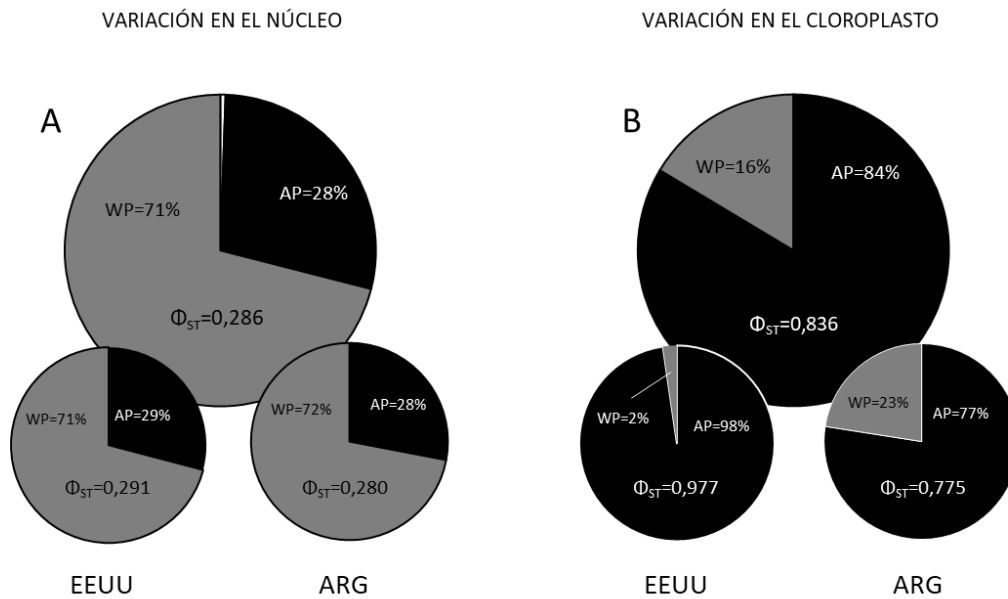


Figura 5.4. Partición de la variación genética para los 14 SSR nucleares (A) y los tres SSR del cloroplasto (B). WP: variación dentro de las poblaciones; AP: variación entre poblaciones.

Variación morfológica en Argentina y Estados Unidos

El análisis discriminante basado en 23 variables morfológicas y fenológicas, indica una baja estructura poblacional pero claramente separa DIA y en menor medida CA del resto de las poblaciones (Fig. 5.5A). A pesar de la baja estructura poblacional, se observa un claro patrón regional (Fig. 5.5B). Dentro de EEUU, el eje Can1 separa las poblaciones del sur respecto a las del centro, mientras que el eje Can2 separa la región Oeste de la región Central de EEUU (Fig. 5.5B). Las poblaciones de Argentina (aun excluyendo a DIA) mostraron una alta variabilidad fenotípica, distribuyéndose a lo largo del eje Can2 (Fig. 5.5B). Reforzando los datos genéticos, RCU mostró una morfología muy similar a IO (Fig. 5.5A) mientras que el resto de las poblaciones mostraron una morfología intermedia entre las tres regiones de EEUU (Fig. 5.5B). La estructura basada en datos morfológicos estuvo bien explicada por la estructura genética (Fig. 5.5C), los tres grupos genéticos están bien delimitados y las poblaciones con origen híbrido mostraron morfología intermedia (p. ej. BAR) o transgresiva (p. ej. ND, CA y DIA; Fig. 5.5C).

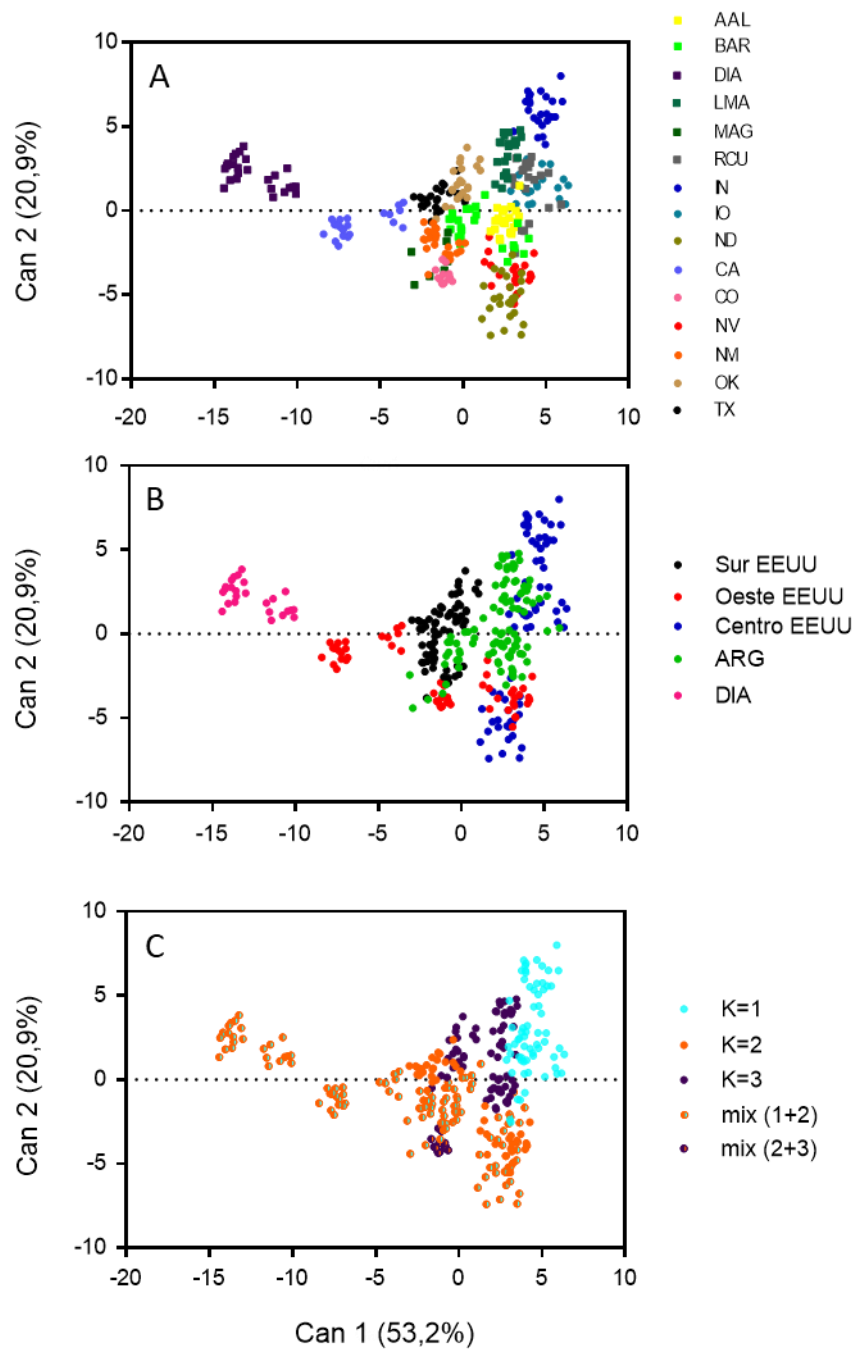


Figura 5.5. Análisis discriminante de la estructura genética basado en 19 variables morfológicas y cuatro variables fenológicas. Los individuos son agrupados según la población (A), la región (B) o el grupo genético según análisis con STRUCTURE (C).

Los modelos ABC sugieren introducciones múltiples en Argentina

En el primer análisis, se compararon dos modelos principales, uno que asume la expansión de todas las poblaciones desde RCU después de su introducción desde IO (modelo *mainland-island*; escenarios 1 y 4; Fig. 5.6A y D) y el otro que asume una expansión lineal desde RCU hasta LMA (modelo *linear-stepping*; escenarios 2 y 3; Fig. 5.6B y C), los cuales incluyen (escenarios 3 y 4) o no (escenarios 1 y 2) introducciones independientes en MAG y DIA. El enfoque directo sugiere los escenarios 3 y 4 como los más probables (escenario 3: 0,42; [0,00-0,85; 95% intervalo de confianza]; escenario 4: 0,39; [0,00-0,82]). El enfoque logístico sugiere ampliamente que el escenario 3 es el más probable (0,89; [0,88-0,90]). El escenario 3 propone un modelo de expansión lineal desde RCU hasta LMA y una introducción independiente, tanto en MAG como en DIA (Fig. 5.6C). Los parámetros demográficos del escenario más probable figuran en la Tabla 5.4.

En el segundo análisis, los escenarios comparados fueron: una expansión lineal desde RCU hasta LMA, sin incluir cuellos de botella genéticos en cada paso (escenario 1; Fig. 5.7A) o incluyéndolos (escenario 2; Fig. 5.7B), un evento de hibridación entre RCU y una población no muestreada (fantasma) que dio lugar a BAR (escenario 3; Fig. 5.7C) y una introducción independiente en AAL, previo a su expansión a LMA (escenario 4; Fig. 5.7D). Los escenarios 3 y 4 tuvieron similares probabilidades usando el enfoque directo (escenario 3: 0,484; [0,046-0,922]; escenario 4: 0,498; [0,060-0,936]), sin embargo, el escenario 4 fue el más probable usando el enfoque logístico (0,965; [0,958-0,972]). Este escenario propone una introducción independiente en AAL (Fig. 5.7D). Los parámetros demográficos del escenario más probable figuran en la Tabla 5.4.

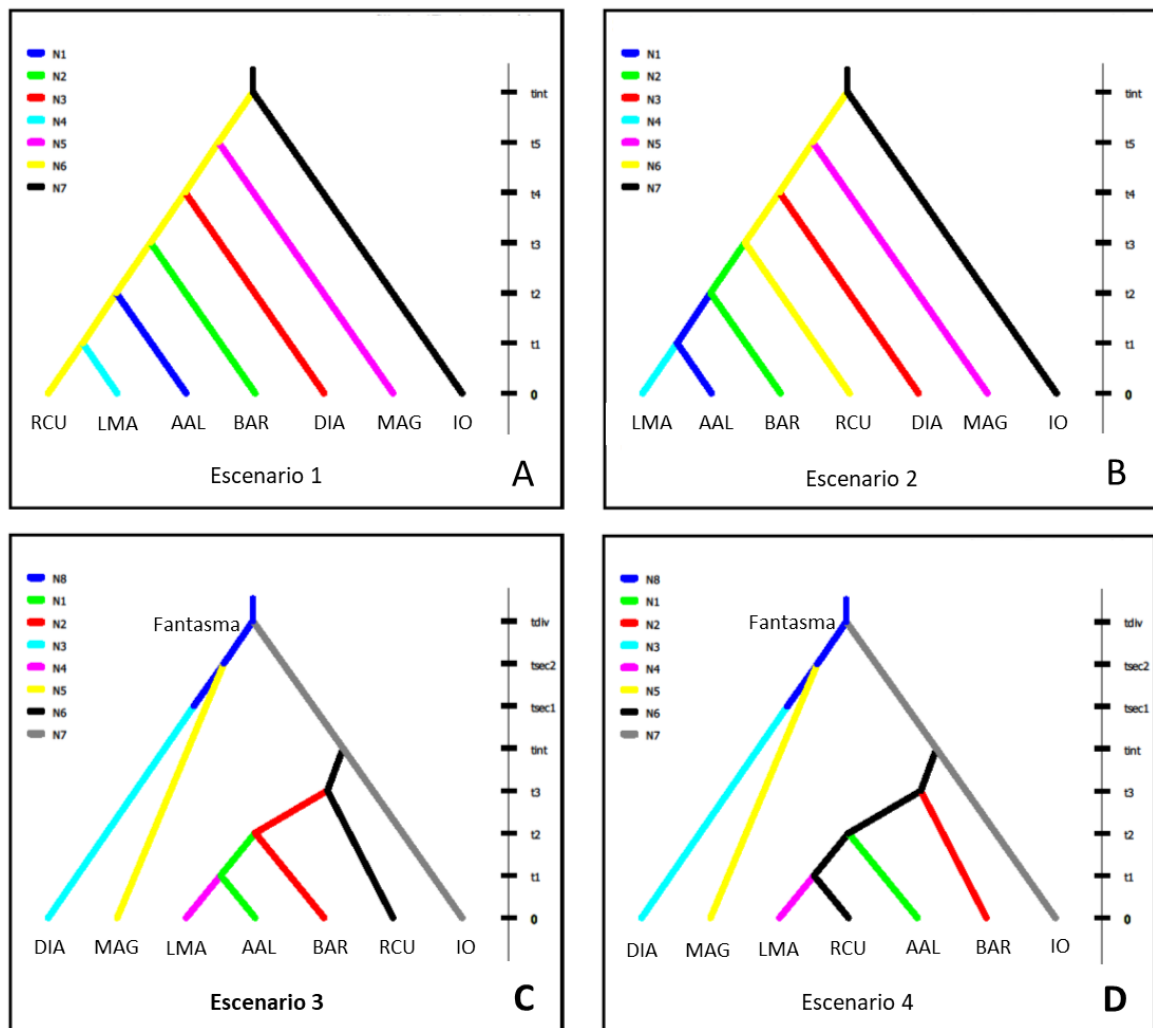


Figura 5.6 Escenarios de invasión del modelo ABC 1 evaluados en DIYABC. A: modelo *main-island*, asume que después de la introducción en RCU todas las poblaciones surgieron de esta. B: modelo *linear-stepping*, asume que MAG y DIA surgieron de RCU pero que la expansión desde RCU hasta LMA fue lineal, donde cada población destino fue fuente de la siguiente. C: modelo *linear-stepping* con introducciones independientes en MAG y RCU desde una población no incluida (fantasma). D: modelo *main-island* con introducciones independientes en MAG y RCU desde una población no incluida (fantasma). El escenario más probable está resaltado en negrita.

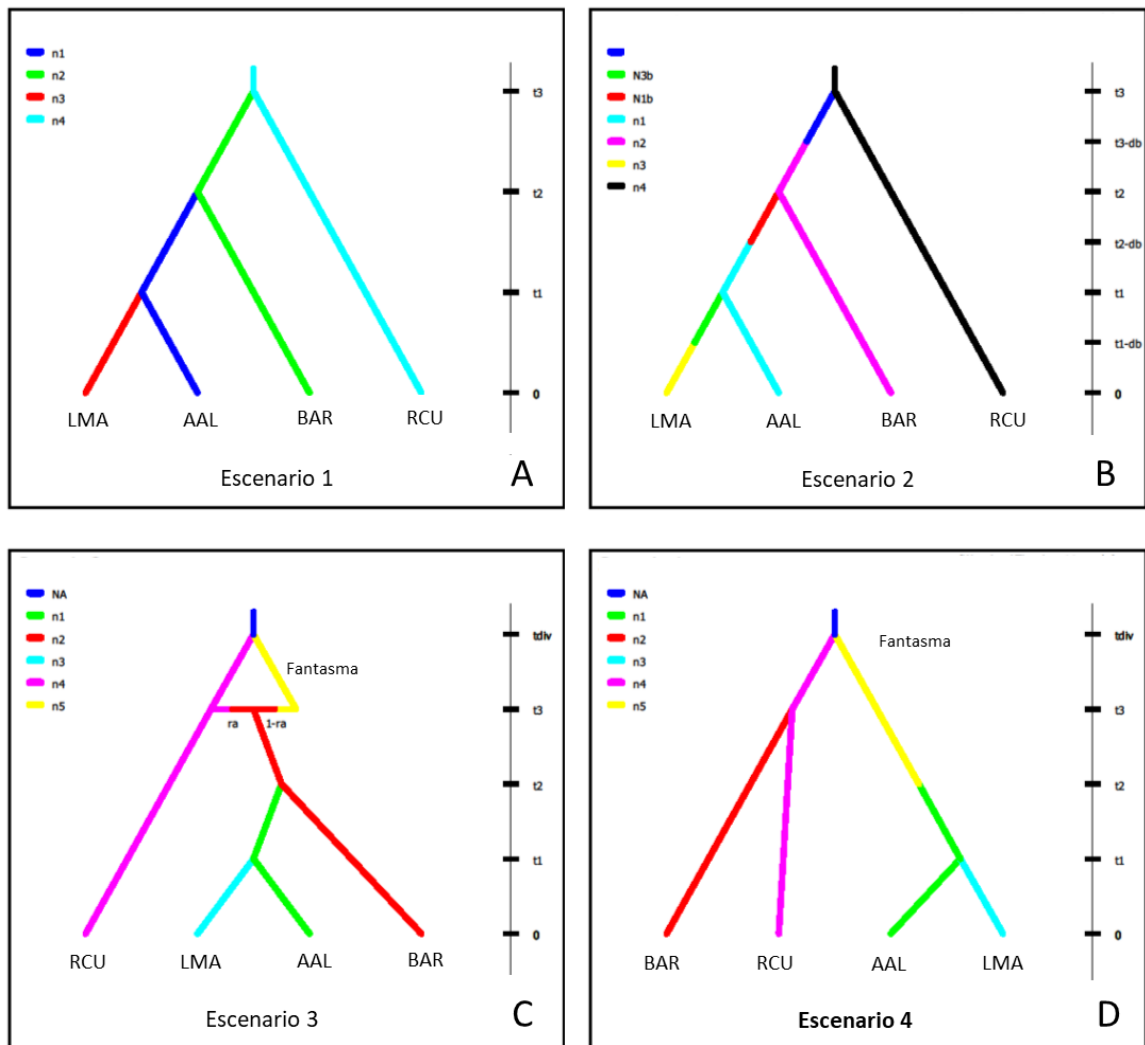


Figura 5.7. Escenarios de invasión del modelo ABC 2 evaluados en DIYABC. A: modelo *linear-stepping* desde RCU a LMA. B: modelo *linear-stepping* incluyendo un cuello de botella en cada evento. C: modelo *linear-stepping* incluyendo un evento de hibridación con una población fantasma. D: modelo *linear-stepping* incluyendo una introducción independiente en AAL. El escenario más probable está resaltado en negra.

Tabla 5.4. Parámetros demográficos previos y estimados para el escenario más probable en los modelos 1 y 2 (Fig. 5.6C y 5.7D, respectivamente). El tamaño efectivo de cada población se indica como número de individuos (N) mientras que el tiempo de cada evento (t) está indicado como generaciones antes del presente (en este caso años por ser una especie anual).

Modelo	Descripción del parámetro		Distribución	Valores previos	Parámetros estimados	
					Media	I.C. 95%
1	Población efectiva de AAL	N1	Uniforme	10-1000	389	134-855
	Población efectiva de BAR	N2	Uniforme	10-1000	495	209-899
	Población efectiva de DIA	N3	Uniforme	10-1000	331	39-458
	Población efectiva de LMA	N4	Uniforme	10-1000	241	24-495
	Población efectiva de MAG	N5	Uniforme	10-1000	635	30-588
	Población efectiva de RCU	N6	Uniforme	10-1000	632	660-984
	Población efectiva de IO	N7	Uniforme	10-10000	513	255-941
	Población efectiva (fantasma)	N8	Uniforme	10-10000	3300	1080-6670
	Evento fundador en LMA	t1	Log-uniforme	10-150	68	17-147
	Evento fundador en AAL	t2	Log-uniforme	10-150	76	77-140
	Evento fundador en BAR	t3	Log-uniforme	10-150	87	87-143
	Introducción inicial en Argentina	tint	Log-uniforme	70-150	111	81-147
	Introducción secundaria en DIA	tsec1	Log-uniforme	60-150	82	64-99
	Introducción secundaria en MAG	tsec2	Log-uniforme	10-150	55	14-96
2	Población efectiva de AAL	N1	Uniforme	10-1000	222	77-418
	Población efectiva de BAR	N2	Uniforme	10-1000	393	159-699
	Población efectiva de LMA	N3	Uniforme	10-1000	77	22-135
	Población efectiva de RCU	N4	Uniforme	10-1000	678	408-977
	Población efectiva (fantasma)	N5	Uniforme	10-10000	3832	713-8820
	Evento fundador en LMA	t1	Log-uniforme	10-100	24	10-69
	Evento fundador en AAL	t2	Log-uniforme	10-100	31	12-56
	Evento fundador en BAR	t3	Log-uniforme	10-100	59	45-98
	Divergencia entre RCU y fantasma	tdiv	Log-uniforme	10-10000	814	146-1340

DISCUSIÓN

La historia de invasión del girasol silvestre en Argentina fue previamente descrita, utilizando principalmente datos históricos y ecológicos, sugiriendo una única introducción en Río Cuarto y una expansión desde ese punto (Poverene *et al.* 2008; Cantamutto *et al.* 2010a, b). En este capítulo, usando datos de marcadores SSR, aportamos evidencia genética que soporta a RCU como el punto de introducción inicial y además identificamos su fuente geográfica, dentro de la región central de EEUU (Fig. 5.1; 5.2A y 5.3). Se comprobó, además, que el girasol invasor de Argentina retuvo la mayor parte de la variabilidad genética presente en el rango nativo de la especie, lo que ayuda a explicar la alta variabilidad morfológica previamente observada (Cantamutto *et al.* 2010a) pero también la habilidad para adaptarse rápidamente a nuevos ambientes durante la invasión (Capítulos 2 y 4). Finalmente, usando datos de marcadores SSR del genoma del cloroplasto, identificamos altos niveles de flujo génico por semilla (Fig. 5.4), lo que sugiere que la hibridación entre poblaciones previamente aisladas fue importante en la adaptación durante la expansión en Argentina y además advierte sobre la incidencia del transporte accidental (por camiones de carga y maquinaria agrícola) en la dispersión de especies invasoras en la Argentina.

Estructura poblacional del rango nativo

El primer paso para identificar la fuente geográfica de las poblaciones invasoras es definir la estructura poblacional en el rango de distribución nativo (Keller y Taylor 2008; Abbott *et al.* 2013), especialmente en especies de amplia distribución. En girasol, estudios previos reportaron una baja estructura poblacional entre poblaciones de EEUU (Mandel *et al.* 2011; Baute *et al.* 2016), con algún grado de diferenciación entre las poblaciones de la región central (rango ancestral de la especie) y las regiones de los extremos oeste y sur de EEUU (es decir, del rango expandido de la especie; Rieseberg *et al.* 1990, 2007; Dorado *et al.* 1992; Baute *et al.* 2016; Owens *et al.* 2016). En el presente capítulo, se observó una moderada a alta estructura genética dentro de EEUU (Fig. 5.1; Tabla 5.3), la cual puede ser explicada por la estrategia de muestreo utilizada. Esta consistió en elegir tres poblaciones de cada una de las tres regiones definidas previamente (central, oeste y sur), que presentaban diferencias geográficas y morfológicas, para maximizar las posibilidades de encontrar la fuente geográfica de introducción. Probablemente, el muestreo de un mayor número de poblaciones de la región central hubiese generado menores valores de estructura poblacional (basado en los valores bajos de F_{ST} hallados dentro de la región central; Tabla 5.3). A pesar de esto, la estimación global de la estructura genética en EEUU fue muy similar a la reportada recientemente usando marcadores SNP ($F_{ST}=0,22$ y $0,21$, respectivamente; McAssey *et al.* 2016).

Dos de los tres grupos genéticos mostraron un claro patrón geográfico (K1 y K2 para las regiones central y oeste, respectivamente; Fig. 5.1; 5.2D y 5.3), lo cual es consistente tanto con la diferenciación genética propuesta durante la colonización del oeste de EEUU (Dorado *et al.* 1992; Baute *et al.* 2016; Owens *et al.* 2016) como con la diferenciación morfológica previamente (y aquí) reportada (Cantamutto *et al.* 2010a; Fig. 5.5C). Por otro lado, el grupo genético 3 estuvo conformado por solo una población de EEUU (OK; Fig. 5.1), mientras que las otras dos poblaciones del sur fueron asignadas a los grupos genéticos 1 y 2 (Fig. 5.1). Oklahoma representa el extremo sur del rango de distribución ancestral de la especie (Heiser *et al.* 1969; Rieseberg *et al.* 2007), lo cual hace posible que el aislamiento por distancia sea responsable de su diferenciación genética respecto de las poblaciones del centro de EEUU (Baute *et al.* 2016; McAssey *et al.* 2016). Los datos morfológicos apoyan esta idea (Fig. 5.5; Cantamutto *et al.* 2010a). Por otro lado, las poblaciones NM y TX están distribuidas fuera del rango ancestral (Heiser *et al.* 1969; Rieseberg *et al.* 2007) y probablemente representan eventos de colonización más recientes. Esto explicaría por qué a pesar de su distribución más al sur que OK, estas poblaciones aún no se diferenciaron genéticamente de su fuente de introducción (Fig. 5.1). En este sentido, son necesarios experimentos que incluyan un mayor número de poblaciones nativas para confirmar la presencia de un tercer grupo genético en EEUU.

Diversidad genética de las poblaciones nativas e invasoras

Durante la introducción y expansión fuera del rango nativo, las poblaciones invasoras comúnmente experimentan cuellos de botella demográficos, los cuales pueden afectar negativamente su diversidad genética y por lo tanto su potencial evolutivo (Dlugosch y Parker 2008; Dlugosch *et al.* 2015). Grandes pérdidas de variabilidad genética durante las invasiones son comúnmente reportadas en animales (Uller y Leimu 2011; Yang *et al.* 2012), mientras que en plantas, dicha pérdida parecería ser más la excepción que la regla (Bossdorf *et al.* 2005; Xu *et al.* 2010; Uller y Leimu 2011; Keller *et al.* 2012). En este capítulo, no encontramos evidencia de cuellos de botella genéticos durante la invasión en Argentina (Tabla 5.2). La alta variabilidad genética de las poblaciones invasoras podría ser explicada por una alta presión de propágulos durante la introducción inicial (Lockwood *et al.* 2005; Simberloff 2009; Szűcs *et al.* 2017a) y/o por múltiples introducciones, seguido de hibridación, de poblaciones espacialmente separadas en el rango nativo (Keller y Taylor 2008; Dlugosch *et al.* 2015; Colautti *et al.* 2017; Szűcs *et al.* 2017a). Aquí, encontramos que ambos procesos (alta presión de propágulos durante la introducción inicial e introducciones múltiples) contribuyeron con la alta variabilidad genética observada en Argentina y que estos dos procesos fueron importantes en diferentes etapas de la invasión.

Primero, durante la introducción inicial en RCU, la alta similitud entre RCU e IO (tanto genética como morfológica; Tabla 5.3; Fig. 5.1; 5.2A; 5.3 y 5.5A) junto con la alta variabilidad

genética en ambas genomas (nuclear y del cloroplasto; Tabla 5.2) indica que la introducción única de un alto número de individuos es el escenario más probable. La presión de propágulos es uno de los mejores predictores de una invasión exitosa (Lockwood *et al.* 2005; Simberloff 2009; Szűcs *et al.* 2017a). Esta alta presión de propágulos durante la introducción inicial probablemente ayudó a superar los efectos negativos que afectan especialmente a poblaciones pequeñas (deriva génica, depresión endogámica). Además de la alta presión de propágulos, la naturalización exitosa en Río Cuarto podría haber sido facilitada por la adaptación previa a los ambientes disturbados (Heiser *et al.* 1969; Alexander y Schrag 2003; Pace *et al.* 2015), por las condiciones climáticas benignas encontradas en Argentina (climas templados, suelos con altos niveles de materia orgánica, Alpert *et al.* 2000; Rouget y Richardson 2003) y por la ausencia de enemigos naturales. Identificada la fuente de introducción geográfica, el rol de la presión de propágulos, la adaptación previa y la evolución rápida sobre el establecimiento del girasol podrían ser evaluados experimentalmente.

La presencia en Argentina de dos de los tres grupos genéticos encontrados en EEUU (Fig. 5.1 y 5.3) junto con la alta variabilidad morfológica (Cantamutto *et al.* 2010a; Fig. 5.5) son indicadores de introducciones múltiples (lo cual es soportado por los modelos ABC, discutidos abajo). Las introducciones múltiples son una característica común en las invasiones biológicas, incrementando comúnmente la diversidad genética de los invasores (Dlugosch y Parker 2008; Uller y Leimu 2011; Dlugosch *et al.* 2015). Además, las introducciones múltiples son el primer paso para la hibridación en el rango introducido. Se ha sugerido que la hibridación post introducción cataliza la capacidad invasora de las especies introducidas incrementando su diversidad genética, y por lo tanto ayudando a evitar efectos fundadores negativos (Szűcs *et al.* 2017a), creando nuevas combinaciones genéticas sobre las cuales la selección puede actuar (Lexer *et al.* 2004; Ellstrand y Schierenbeck 2006; Rieseberg *et al.* 2007; Schierenbeck y Ellstrand 2009) y generando poblaciones con vigor híbrido para caracteres asociados a la invasión (Keller *et al.* 2014; van Kleunen *et al.* 2015). En Argentina, en la década del 1960, se introdujeron deliberadamente poblaciones silvestres de *H. annuus*, *H. petiolaris*, *H. argophyllus* y *H. debilis* para su utilización como variedades interespecíficas con mayor resistencia a enfermedades (Bauer 1991; Bertero de Romano y Vázquez 2003; Castaño 2017). Estas variedades fueron localmente seleccionadas y ampliamente cultivadas en Argentina durante décadas y aunque el escape directo desde estaciones experimentales no fue comprobado (Cantamutto *et al.* 2010b), estas variedades podrían haber contribuido con el proceso de invasión, por ejemplo, a través de la introgresión de alelos localmente seleccionados (Currat *et al.* 2008).

En este capítulo, no se encontró evidencia directa de hibridación post introducción, las grandes diferencias genéticas entre poblaciones de Argentina parecerían ser explicadas por

introducciones independientes (p. ej. RCU vs. AAL y LMA). Sin embargo, la presencia de poblaciones híbridas (BAR, MAG y DIA) sugiere que la hibridación entre los dos principales grupos genéticos encontrados en Norteamérica (Fig. 5.1 y 5.3) ocurrió en algún momento previo o posterior a la introducción y fue importante en el proceso de invasión. Es interesante destacar que las dos poblaciones a las cuales no se pudo asignar un origen (DIA y MAG; Fig. 5.1) mostraron valores inusualmente altos de diversidad haplotípica (Tabla 5.2), sugiriendo que las mismas representan nuevas combinaciones genéticas como resultado de la hibridación de múltiples genotipos históricamente aislados. Otra posibilidad, especialmente en DIA, es el escape de poblaciones ornamentales y/o cultivadas, introducidas por inmigrantes europeos, muy numerosos en la provincia de Entre Ríos. Estos fueron los primeros en introducir girasol cultivado en Argentina a fines del siglo XIX para consumo personal, alimento de aves y para uso ornamental (Bertero de Romano y Vázquez 2003; Castaño 2017). Esta posibilidad podría ser evaluada en el futuro incluyendo variedades ornamentales de Europa como potenciales fuentes de introducción.

Reconstrucción de la ruta de invasión con modelos ABC

En el presente capítulo, utilizando comparaciones múltiples de F_{ST} y análisis de agrupamiento bayesiano, se obtuvieron conclusiones similares acerca de la introducción inicial en Río Cuarto desde Iowa y sobre la estructura poblacional general, tanto dentro de EEUU como Argentina (Tabla 5.3; Fig. 5.1 y 5.3). Para reconstruir la ruta de invasión completa y estimar los parámetros demográficos asociados a la invasión (p. ej. los momentos de introducción/expansión), se utilizaron modelos ABC con el software DIYABC (Guillemaud *et al.* 2010; Cornuet *et al.* 2014). Los resultados con modelos ABC sugieren fuertemente introducciones múltiples en Argentina. En el primer análisis, incluyendo todas las poblaciones de Argentina junto con la fuente de introducción (IO), el escenario más probable fue una expansión lineal desde RCU hasta LMA junto con introducciones independientes en MAG y DIA (Fig. 5.6C). El momento de introducción en RCU fue estimado 110 años atrás (Tabla 5.4), coincidiendo con el primer registro histórico en la provincia de Córdoba (1907 en Los Cocos). Además, las introducciones independientes en DIA y MAG habrían ocurrido aproximadamente 82 y 55 años atrás, respectivamente (Tabla 5.4). Aunque no existen registros históricos de la población MAG para comparar con los valores estimados, el primer registro histórico en DIA es una colección de herbario de 1960 (58 años atrás), lo cual se acerca al momento estimado por el modelo.

Respecto de la introducción inicial en Río Cuarto, es importante destacar que el escenario más probable es la introducción deliberada de girasol silvestre para uso forrajero en la década del 1940 (Bauer 1991), mucho después de los primeros registros históricos. Hugo Bauer, uno de los primeros mejoradores de girasol en Argentina, señala que en 1947 una población de girasol

silvestre proveniente de Río Cuarto fue introducida como parental en el programa de mejoramiento de INTA Manfredi para incrementar la variabilidad y la tolerancia a enfermedades del girasol cultivado y que esa población estaba siendo utilizada como forrajera experimental (Bauer 1991). Este es el primer y más sólido registro de la presencia de girasol silvestre en Río Cuarto, aunque no hay certeza si esta población fue introducida en ese momento o ya se encontraba naturalizada.

En el segundo análisis, el escenario más probable incluye una introducción independiente en Adolfo Alsina (AAL, Fig. 5.7D). En este escenario, dicha introducción ocurrió 33 años atrás desde una fuente que se separó de RCU hace aproximadamente 800 años (Tabla 5.4), indicando claramente que la divergencia ocurrió en el rango nativo (introducción independiente). Por otro lado, la expansión de RCU a BAR ocurrió 60 años atrás (~1957; Tabla 5.4), una década después de la introducción más probable en RCU (Bauer 1991).

Importancia de la dispersión accidental del girasol invasor de Argentina

El transporte accidental con la maquinaria agrícola fue propuesto como el principal agente de dispersión del girasol silvestre en Argentina (Cantamutto *et al.* 2010b; Casquero *et al.* 2013) como así también de otras especies y cultivos en el mundo (Michael *et al.* 2010; Allnutt *et al.* 2013; Hecht *et al.* 2014). Aquí surge evidencia genética de altos niveles de flujo génico por semillas; las poblaciones de Argentina mostraron una diversidad en el genoma del cloroplasto muy superior a las poblaciones de EEUU (Tabla 5.2; Fig. 5.4). En Argentina, desde los últimos 20 años, la maquinaria agrícola (sembradoras, fumigadores y cosechadoras) es compartida por los productores mediante un sistema de contratación del servicio de siembra, fumigación y/o cosecha (Binimelis *et al.* 2009). Esto implica que los prestadores de servicio cada año recorran el país, arrastrando accidentalmente semillas de especies silvestres y cultivadas. Este tipo de dispersión mediada por el hombre está bien documentado en el caso de dispersión de malezas resistentes a herbicidas (Binimelis *et al.* 2009; Michael *et al.* 2010; Pandolfo *et al.* 2018) y cultivos transgénicos (Allnutt *et al.* 2013; Hecht *et al.* 2014; Nishizawa *et al.* 2016), sin embargo, el mismo ha recibido menor atención en especies invasoras. Además, en el caso de girasol silvestre, debido a su presencia y preferencia por ambientes disturbados no agrícolas (banquinas, baldíos, canales de riego) (Heiser *et al.* 1969; Poverene *et al.* 2008), el transporte accidental por maquinarias de la construcción, como motoniveladoras y retroexcavadoras, debería ser tenido en cuenta.

CONSIDERACIONES FINALES

Los principales resultados y conclusiones de esta tesis son provistos debajo de cada una de las cinco hipótesis inicialmente planteadas.

El efecto materno influye sobre los caracteres del fruto, especialmente en el comportamieto de los híbridos entre taxones altamente divergentes, como los materiales silvestres y cultivados.

Los frutos de las poblaciones silvestres y los materiales cultivados difirieron ampliamente en todos los caracteres del fruto evaluados y el fenotipo de los híbridos cultivo-silvestre fue similar al del parental femenino. Sin embargo, la fecundación con polen del cultivo cambió significativamente la germinación en la dirección del cultivo. Los caracteres morfológicos y anatómicos de los frutos asociados a la domesticación correlacionaron fuertemente con las diferencias observadas en la dormición de híbridos cultivo-silvestre. Actualmente, se están realizando experimentos de campo para evaluar la importancia ecológica y evolutiva de los efectos materno y de hibridación en híbridos cultivo-silvestre.

Los caracteres del fruto son importantes en la adaptación local en el rango nativo, lo que da como resultado variaciones clinales. La adaptación rápida de las poblaciones no-nativas puede detectarse a través de cambios genéticos en estos caracteres en respuesta a la introducción en nuevos ambientes.

Se observó una variación latitudinal en la dormición en el rango nativo de la especie. A mayor latitud, mayor dormición. Las poblaciones invasoras mostraron un mayor tamaño y peso de los frutos y una menor dormición. Las variaciones en dormición entre rangos fueron, en gran parte, explicadas por diferencias en latitud entre rangos mientras que no se encontraron variables climáticas asociadas a las variaciones en peso y tamaño de los frutos. En el rango no-nativo (Argentina), donde las variaciones en latitud son mucho menores, se observó una variación paralela en la dormición, a mayor latitud, mayor dormición, indicando una evolución rápida de los niveles de dormición en respuesta a los ambientes encontrados durante la introducción y expansión en Argentina. En este capítulo detectamos evolución rápida en un carácter de importancia adaptativa como es la dormición, el cuál posiblemente contribuyó con la rápida expansión del girasol silvestre en Argentina. A partir de estos resultados sugerimos la búsqueda de variabilidad genética en caracteres de importancia adaptativa pero también de interés agronómico como la tolerancia a estrés de tipo abiótico (tolerancia a temperaturas extremas y sequía) y biótico (plagas y enfermedades) dentro de las poblaciones invasoras de Argentina.

Debido a la fuerte presión de selección por mayor crecimiento en condiciones artificialmente benignas durante la domesticación, los materiales cultivados presentan mayor crecimiento en ausencia de estrés y menor tolerancia a estrés, como las temperaturas extremas.

Se encontraron grandes diferencias en la tolerancia a temperaturas extremas entre materiales silvestres y cultivados. Como esperábamos, las poblaciones silvestres mostraron una mayor tolerancia a heladas. Por otro lado, los materiales cultivados mostraron una mayor tolerancia al estrés por calor. Las diferencias en crecimiento en ausencia de estrés no explicaron las diferencias en la tolerancia a heladas ni a calor, indicando que la introgresión de la tolerancia a estrés podría ocurrir sin costos en el crecimiento temprano, lo que facilitaría la introgresión de la tolerancia a estrés por heladas en el germoplasma cultivado, pero también la introgresión de la tolerancia a estrés por calor en las poblaciones silvestres. A partir de estos resultados sugerimos avanzar en la identificación de las bases moleculares de la tolerancia a temperaturas extremas para facilitar su introgresión en el germoplasma cultivado y evaluar la aptitud relativa de los híbridos cultivo-silvestre en condiciones de estrés por calor para mejorar la predicción de la introgresión de alelos del cultivo en estas condiciones.

Debido a la adaptación local, los materiales silvestres son más tolerantes al estrés por calor durante estadios reproductivos que los materiales cultivados. Los materiales silvestres presentan una variación clinal en la tolerancia a estrés por calor, a mayores temperaturas en el ambiente local, mayor tolerancia y viceversa.

Las poblaciones silvestres mostraron una mayor tolerancia al estrés por calor que los materiales cultivados. La variación en la tolerancia a estrés dentro del germoplasma silvestre no fue explicada por variaciones en las temperaturas del ambiente local sino por variaciones en las precipitaciones. Poblaciones provenientes de ambientes con mayor disponibilidad de agua fueron más tolerantes al estrés por calor. Además, las poblaciones invasoras fueron más tolerantes al estrés que las nativas, aún cuando los resultados fueron corregidos por variaciones en el ambiente local, indicando que las primeras son una nueva fuente de tolerancia a estrés para el mejoramiento del cultivo. Creemos que avanzar en actividades de pre-mejoramiento como la construcción de poblaciones cultivo-silvestres segregantes en la tolerancia a estrés y la introgresión de la tolerancia en líneas elite fomentará el uso del germoplasma silvestre por parte de los mejoradores de girasol.

La diversidad genética de las poblaciones no-nativas es menor respecto de las nativas debido a los cuellos de botella demográficos durante la introducción y expansión en el rango no-nativo. Las poblaciones no-nativas presentaran menor estructura poblacional que las nativas por los menores tiempos de divergencias.

Las poblaciones invasoras de Argentina retuvieron la mayor parte de la variabilidad genética presente en el rango nativo de la especie, como resultado tanto de una alta presión de propágulos durante la introducción inicial como de introducciones múltiples. Esta alta variabilidad genética nos ayuda a explicar la invasión exitosa en la región central de Argentina, pero también la alta variabilidad encontrada en caracteres adaptativos (como la dormición) y de interés agronómico (como la tolerancia a temperaturas extremas). Finalmente, aportamos evidencia genética de altos niveles de flujo génico por semilla, lo que pone en evidencia la necesidad de aplicar medidas de control para evitar futuras dispersiones. Estos resultados son el primer paso para la identificación de caracteres y genes asociados al proceso de invasión.

REFERENCIAS

- Abbott R, Albach D, Ansell S, et al. 2013.** Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**:229–246.
- Adler L, Wikler K, Wyndham F, Linder C, Schmitt J. 1993.** Potential for persistence of genes escaped from canola: germination cues in crop, wild, and crop-wild hybrid *Brassica rapa*. *Functional Ecology*, **7**:736–745.
- Agrawal A, Hastings A, Bradburd G, Woods E, Züst T, Harvey J, Bukovinszky T. 2015.** Evolution of Plant Growth and Defense in a Continental Introduction. *The American Naturalist* **186**:1-15.
- Ainsworth EA, Long SP. 2005.** What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist*, **165**:351–372.
- Alexander HM, Emry DJ, Pace BA, Kost MA, Sparks KA, Mercer KL. 2014.** Roles of maternal effects and nuclear genetic composition change across the life cycle of crop-wild hybrids. *American Journal of Botany*, **101**:1176–1188.
- Alexander HM., Schrag AM. 2003.** Role of soil seed banks and newly dispersed seeds in population dynamics of the annual sunflower. *Journal of Ecology*, **91**:987–998.
- Allnutt T, Blackburn J, Copeland J, et al. 2013.** Estimates of genetically modified oilseed in shared farming machinery. *Annals of Applied Biology*, **162**:119–130.
- Alpert P, Bone E, Holzapfel C. 2000.** Invasives, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **3**:52–66.
- Anderson JE, Kono TJY, Stupar RM, Kantar MB, Morrell PL. 2016.** Environmental Association Analyses Identify Candidates for Abiotic Stress Tolerance in *Glycine soja*, the Wild Progenitor of Cultivated Soybeans. *G3; Genes/Genomes/Genetics* **6**:835–843.
- Andrade A, Riera N, Lindstrom L, et al. 2015.** Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biology*, **17**:351–360.
- Andrade FH 1995.** Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *Field Crops Research*, **41**, 1–12.
- Andrade FH, Sadras VO, Vega CR, Echarte L. 2005.** Physiological Determinants of Crop Growth and Yield in Maize, Sunflower and Soybean. *Journal of Crop Improvement*, **14**:51–101.

- Arana MV, Gonzalez-Polo M, Martinez-Meier A, et al. 2016.** Seed dormancy responses to temperature relate to *Nothofagus* species distribution and determine temporal patterns of germination across altitudes in Patagonia. *New Phytologist* **209**:507–520.
- Arias, DM, Rieseberg, L.H. 1994.** Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:655-660.
- Bagavathiannan MV, Van Acker RC. 2008.** Crop ferality: Implications for novel trait confinement. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **127**:1–6.
- Barah P, Jayavelu ND, Mundy J, Bones AM. 2013.** Genome scale transcriptional response diversity among ten ecotypes of *Arabidopsis thaliana* during heat stress. *Frontiers in plant science*, **4**:532.
- Barker BS, Andonian K, Swope SM, et al. 2017.** Population genomic analyses reveal a history of range expansion and trait evolution across the native and invaded range of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*). *Molecular Ecology* **26**:1131–1147.
- Barnabás B, Jäger K, Fehér A. 2008.** The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*, **31**:11–38.
- Barrès B, Carlier J, Seguin M, et al. 2012).** Understanding the recent colonization history of a plant pathogenic fungus using population genetic tools and Approximate Bayesian Computation. *Heredity* **109**:269–279.
- Baruah AR, Ishigo-Oka N, Adachi M et al. 2009.** Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica*, **165**:459–470.
- Baskin CC, Baskin JM. 2014.** Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 2nd edn. San Diego, CA, USA: Academic/Elsevier.
- Baskin JM., Baskin CC. 2004.** A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, **14**:1–16.
- Batlla D, Benech-Arnold RL. 2015.** A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Science Research* **25**:147–158.
- Battisti DS, Naylor RL. 2009.** Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science* **323**:240–244.
- Bauer HA. 1991.** Cuarenta años en el mejoramiento del girasol (*Helianthus annuus* L.) en Argentina 1947-1987. *Helia*, **14**:63–68

- Baute GJ, Owens GL, Bock DG, Rieseberg LH. 2016.** Genome-wide genotyping-by-sequencing data provide a high-resolution view of wild helianthus diversity, genetic structure, and interspecies gene flow. *American Journal of Botany*, **103**:2170–2177.
- Bertero de Romano A, Vázquez AN. 2003.** Origin of the argentine sunflower varieties. *Helia*, **26**:127-136.
- Bheemanahalli R, Sathishraj R, Manoharan M et al. 2017.** Is early morning flowering an effective trait to minimize heat stress damage during flowering in rice? *Field Crops Research*, **203**:238–242.
- Binimelis R, Pengue W, Monterroso I. 2009.** “Transgenic treadmill”: Responses to the emergence and spread of glyphosate-resistant johnsongrass in Argentina. *Geoforum* **40**:623–633.
- Blackman BK, Scascitelli M, Kane NC, et al. 2011.** Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**:14360–14365.
- Bodrone MP, Rodríguez MV, Arisnabarreta S, Batlla D. 2017.** Maternal environment and dormancy in sunflower: The effect of temperature during fruit development. *European Journal of Agronomy*, **82**:93–103.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ et al. 2009.** Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **24**:127–135.
- Bonelli LE, Monzon JP, Cerrudo A, Rizzalli RH, Andrade FH. 2016.** Maize grain yield components and source-sink relationship as affected by the delay in sowing date. *Field Crops Research*, **198**:215–225.
- Bossdorf O, Auge H, Lafuma L, et al. 2005.** Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, **144**:1–11.
- Brunick RL 2007.** Seed dormancy in domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.): types, longevity and QTL discovery. Ph.D. dissertation, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.
- Buckley YM, Downey P, Fowler SV, et al. 2003.** Are Invasives Bigger? A global study of seed size variation in two invasive shrubs. *Ecology* **84**:1434–1440.
- Burghardt LT, Metcalf CJ, Donohue K. 2016.** A cline in seed dormancy helps conserve the environment experienced during reproduction across the range of *Arabidopsis thaliana*. *American Journal of Botany*, **103**:47–59.

- Burke JM, Tang S, Knapp SJ, Rieseberg LH. 2002.** Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* **161**:1257–1267.
- Buswell JM, Moles AT, Hartley S. 2011.** Is rapid evolution common in introduced plant species? *Journal of Ecology*, **99**:214–224.
- Byun YJ, Koo MY, Joo HJ, Ha-Lee YM, Lee DH. 2014.** Comparative analysis of gene expression under cold acclimation, deacclimation and reacclimation in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum*: **152**:256–274.
- Cabello JV., Arce AL, Chan RL. 2012.** The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis-related and glucanase proteins. *Plant Journal* **69**:141–153.
- Cabello JV, Giacomelli JI, Gómez MC, Chan RL. 2017.** The sunflower transcription factor HaHB11 confers tolerance to water deficit and salinity to transgenic Arabidopsis and alfalfa plants. *Journal of Biotechnology* **257**:35–46.
- Cabello JV, Lodeyro AF, Zurbriggen MD. 2014.** Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **26**:62–70.
- Cabrera AA, Palsbøll PJ. 2017.** Inferring past demographic changes from contemporary genetic data: A simulation-based evaluation of the ABC methods implemented in diyabc. *Molecular Ecology Resources*, **17**:1-17.
- Cantamutto M, Poverene M, Peinemann N. 2008.** Multi-scale analysis of two annual *Helianthus* species naturalization in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **123**:69–74.
- Cantamutto M, Poverene M. 2007.** Genetically modified sunflower release: Opportunities and risks. *Field Crops Research*, **101**:133–144.
- Cantamutto M, Presotto A, Fernandez Moroni I, Alvarez D, Poverene M, Seiler G. 2010a.** High infraspecific diversity of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) naturally developed in central Argentina. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **205**:306–312.
- Cantamutto M, Torres L, Presotto A, Gutierrez A, Ureta S, Poverene M. 2010b.** Migration pattern suggested by terrestrial proximity as possible origin of wild annual *Helianthus* populations in central Argentina. *Biological Invasions*, **12**: 541–551.
- Casquero M, Presotto A, Cantamutto M. 2013.** Exofertility in sunflower (*Helianthus annuus* L.): A case study of intraspecific/interbiotype interference promoted by human activity. *Field Crops Research*, **142**:95–101.

- Castaño FD. 2017.** The sunflower crop in Argentina: past, present and potential future. *Oilseeds and fats Crops and Lipids*, **25**:D105.
- Chiang GC, Barua D, Dittmar E, Kramer EM, Rubio de Casas R, Donohue K. 2013.** Pleiotropy in the wild: the dormancy gene *DOG1* exerts cascading control on life cycles. *Evolution*, **67**:883–893.
- CIMMYT, Centro internacional de mejoramiento de maíz trigo. 2006.** Protocolos de laboratorio. Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT, Tercera edición. CIMMYT, México, D.F.
- Colautti RI, Alexander JM, Dlugosch KM, et al. 2017.** Invasions and extinctions through the looking glass of evolutionary ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **372**:1-12.
- Colautti RI, Barrett SCH. 2013.** Rapid adaptation to climate facilitates range expansion of an invasive plant. *Science*, **342**:364–366.
- Colautti RI, Lau JA. 2015.** Contemporary evolution during invasion: Evidence for differentiation, natural selection, and local adaptation. *Molecular Ecology*, **24**:1999–2017.
- Colautti RI, Maron JL, Barrett SC. 2009.** Common garden comparisons of native and introduced plant populations: Latitudinal clines can obscure evolutionary inferences. *Evolutionary Applications*, **2**:187–199.
- Colomer-Ventura F, Martínez-Vilalta J, Zuccarini P, Escolà A, Armengot L, Castells E. 2015.** Contemporary evolution of an invasive plant is associated with climate but not with herbivory. *Functional Ecology*, **29**:1475–1485.
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, et al. 2014.** DIYABC v2.0: A software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* **30**:1187–1189.
- Cristescu ME. 2015.** Genetic reconstructions of invasion history. *Molecular Ecology*, **24**:2212–2225.
- Croce M, Parodi E. 2013.** The turf-forming alga *Gelidium crinale* (Florideophyceae, Rhodophyta) on Atlantic Patagonian coasts. *Botanica Marina*, **56**:131-141.
- Cronn R, Brothers M, Klier K, Bretting PK, Wendel JF. 1997.** Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**: 532-545.
- Currat M, Ruedi M, Petit RJ, Excoffier L. 2008.** The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution*, **62**:1908-1920.

- De Boeck HJ, Dreesen FE, Janssens IA, Nijs I. 2010.** Climatic characteristics of heat waves and their simulation in plant experiments. *Global Change Biology*, **16**:1992–2000.
- de la Vega AJ, DeLacy IH, Chapman SC. 2007.** Changes in agronomic traits of sunflower hybrids over 20 years of breeding in central Argentina. *Field Crops Research*, **100**:73–81.
- Debaeke P, Casadebaig P, Flenet F, Langlade N. 2017.** Sunflower crop and climate change: vulnerability, adaptation, and mitigation potential from case-studies in Europe. *Oilseeds and fats Crops and Lipids*, **24**:D102.
- Dempewolf H, Baute G, Anderson J, Kilian B, Smith C, Guarino L. 2017.** Past and Future Use of Wild Relatives in Crop Breeding. *Crop Science*, **57**:1070-1082.
- Dempewolf H, Eastwood RJ, Guarino L, Houry CK, Muller JV, Toll J. 2014.** Adapting Agriculture to Climate Change: A Global Initiative to Collect, Conserve, and Use Crop Wild Relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, **38**:369–377.
- Deryng D, Conway D, Ramankutty N, Price J, Warren R. 2014.** Global crop yield response to extreme heat stress under multiple climate change futures. *Environmental Research Letters* **9**:1-13.
- Devasirvatham V, Gaur PM, Mallikarjuna N, Tokachichu RN, Trethowan RM, Tan DK. 2012.** Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. *Functional Plant Biology*, **39**:1009–1018.
- Diez JM, D’Antonio CM, Dukes JS, et al. 2012.** Will extreme climatic events facilitate biological invasions? *Frontiers in Ecology and the Environment* **10**:249–257.
- Dlugosch KM, Anderson SR, Braasch J, et al. 2015.** The devil is in the details: Genetic variation in introduced populations and its contributions to invasion. *Molecular Ecology* **24**:2095–2111.
- Dlugosch KM, Parker IM. 2008.** Founding events in species invasions: Genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**:431–449.
- Dominguez CP, Battla D, Rodríguez MV, Windauer LB, Gerbaldo M, Benech-Arnold RL. 2016.** Pericarp-imposed dormancy in sunflower: Physiological basis, impact on crop emergence, and removal at an industrial scale. *Crop Science*, **56**:716–726.
- Dong SS, Xiao MQ, Rong J, et al. 2011.** No effect of transgene and strong wild parent effects on seed dormancy in crop-wild hybrids of rice: Implications for transgene persistence in wild populations. *Annals of Applied Biology*, **159**:348–357.

- Donohue K, de Casas RR, Burghardt L, Kovach K, Willis CG. 2010.** Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **41**:293–319.
- Donohue K, Dorn L, Griffith C, et al. 2005.** Niche construction through germination cueing: life-history responses to timing of germination in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **59**:771–785.
- Donohue K. 2014.** Why ontogeny matters during adaptation: Developmental niche construction and pleiotropy across the life cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution*, **68**:32–47.
- Dorado O, Rieseberg LH, Arias DM. 1992.** Chloroplast DNA introgression in southern California sunflowers. *Evolution*, **46**:566–572.
- Driedonks N, Rieu I, Vriezen WH. 2016.** Breeding for plant heat tolerance at vegetative and reproductive stages. *Plant Reproduction*, **29**:67–79.
- Eliades NG, Eliades DG. 2009.** User's Manual HAPLOTYPE ANALYSIS Software for Analysis of Haplotype Data.
- Ellstrand NC, Heredia SM, Leak-Garcia JA, et al. 2010.** Crops gone wild: evolution of weeds and invasives from domesticated ancestors. *Evolutionary Applications*, **3**:494–504.
- Ellstrand NC, Meirmans P, Rong J, et al. 2013.** Introgression of crop alleles into wild or weedy populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **44**:325–345.
- Ellstrand NC, Prentice HC, Hancock JF. 1999.** Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **30**:539–563.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA. 2006.** Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Euphytica*, **148**:35–46.
- Estoup A, Guillemaud T. 2010.** Reconstructing routes of invasion using genetic data: Why, how and so what? *Molecular Ecology*, **19**:4113–4130.
- Estoup A, Ravigné V, Hufbauer R, et al. 2016.** Is There A Genetic Paradox of Biological Invasion? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **47**:51–72.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, **14**:2611–2620.
- Fan Y, Zhou G, Shabala S, et al. 2016.** Genome-Wide Association Study Reveals a New QTL for Salinity Tolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science*, **7**:1–10.

- Felker-Quinn E, Schweitzer JA, Bailey JK. 2013.** Meta-analysis reveals evolution in invasive plant species but little support for Evolution of Increased Competitive Ability (EICA). *Ecology and Evolution*, **3**:739–751.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006.** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, **171**:501–523.
- Fraimout A, Debat V, Fellous S, et al. 2017.** Deciphering the routes of invasion of *Drosophila suzukii* by Means of ABC Random Forest. *Mol Biol Evol* **34**:980–996.
- Fuhrer J. 2003.** Agroecosystem responses to combinations of elevated CO₂, ozone, and global climate change. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **97**:1–20.
- Gambin BL, Coyos T, Di Mauro G, Borrás L, Garibaldi LA. 2016.** Exploring genotype, management, and environmental variables influencing grain yield of late-sown maize in central Argentina. *Agricultural Systems*, **146**:11–19.
- Gandhi, SD, Heesacker AF, Freeman CA., Argyris J, Bradford K, Knapp S. 2005.** The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**:619–629.
- Garayalde AF, Poverene M, Cantamutto M, Carrera AD. 2011.** Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: An approach for conservation and breeding programmes. *Annals of Applied Biology*, **158**:305–317.
- Gardarin A, Colbach N. 2015.** How much of seed dormancy in weeds can be related to seed traits? *Weed Research*, **55**:14–25.
- Gornall J, Betts R, Burke E, et al. 2010.** Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **365**: 2973–2989.
- Gourdji SM, Sibley AM, Lobell DB. 2013.** Global crop exposure to critical high temperatures in the reproductive period: historical trends and future projections. *Environmental Research Letters*, **8**:1-10.
- Guarino L, Lobell DB. 2011.** A walk on the wild side. *Nature Climate Change*, **1**:374–375.
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, et al (2010)** Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity*, **104**:88-99.
- Hajjar R, Hodgkin T. 2007.** The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, **156**:1–13.
- Hall AJ, Feoli C, Ingaramo J, Balzarini M. 2013.** Gaps between farmer and attainable yields across rainfed sunflower growing regions of Argentina. *Field Crops Research*, **143**:119–129.

- Hancock JF. 2012.** Plant evolution and the origin of crop species Ed J.F. Hancock. Wallingford: CABI.
- Hargrove JS, Weyl OLF, Austin JD. 2017.** Reconstructing the introduction history of an invasive fish predator in South Africa. *Biological Invasions*, **19**:2261–2276.
- Harter AV, Gardner KA, Falush D, Lentz DL, Bye RA, Rieseberg LH. 2004.** Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature*, **430**:201–205.
- Hatfield JL, Prueger JH. 2015.** Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, **10**:4–10.
- Hecht M, Oehen B, Schulze J, et al. 2014.** Detection of feral GT73 transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) along railway lines on entry routes to oilseed factories in Switzerland. *Environment and Pollution Research*, **21**:1455–1465.
- Heiser CB, Smith DM, Clevenger SB, Martin WC. 1969.** The North American sunflowers (*Helianthus*). *Memories of the Torrey Botanical Club*, **22**:1-37
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005.** Very high-resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**:1965–1978.
- Hirabayashi H, Sasaki K, Kambe T et al. 2015.** QEMF3, a novel QTL for the early-morning flowering trait from wild rice, *Oryza officinalis*, to mitigate heat stress damage at flowering in rice, *O. sativa*. *Journal of Experimental Botany*, **66**:1227–1236.
- Hniličková H, Hejník V, Němcová L, et al. 2017.** The effect of freezing temperature on physiological traits in sunflower. *Plant, Soil and Environment*, **63**: 375–380.
- Hu W, Hu G, Han B. 2009.** Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, **176**:583–590.
- Huang X, Schmitt J, Dorn L, et al. 2010.** The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: Strong selection on QTLS for seed dormancy. *Molecular Ecology*, **19**:1335–1351.
- Huxley J. 1938.** Clines: An Auxiliary Taxonomic Principle. *Nature*, **142**:219-220.
- IPCC 2014.** Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- ISTA-International Seed Testing Association. 2004.** International Rules for Seed Test-ing. Glattbrugg, Switzerland.

- Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007.** CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**:1801–1806.
- Jha UC, Bohra A, Singh NP. 2014.** Heat stress in crop plants: Its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. *Plant Breeding*, **133**:679–701.
- Jia Y, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Gong Z, Yang S. 2016.** The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, **212**:345–353.
- Kalyar T, Rauf S, Teixeira Da Silva JA, Shahzad M. 2014.** Handling sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations under heat stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **60**:655–672.
- Kang J, Zhang H, Sun T, et al. 2013.** Natural variation of C-repeat-binding factor (CBFs) genes is a major cause of divergence in freezing tolerance among a group of *Arabidopsis thaliana* populations along the Yangtze River in China. *New Phytologist*, **199**:1069–1080.
- Kantar MB, Sosa CC, Khoury CK, et al. 2015.** Ecogeography and utility to plant breeding of the crop wild relatives of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Frontiers in Plant Science*, **6**:1–11.
- Keller SR, Fields PD, Berardi AE, Taylor DR. 2014.** Recent admixture generates heterozygosity-fitness correlations during the range expansion of an invading species. *Journal of Evolutionary Biology*, **27**:616–627.
- Keller SR, Gilbert KJ, Fields PD, Taylor DR. 2012.** Bayesian inference of a complex invasion history revealed by nuclear and chloroplast genetic diversity in the colonizing plant, *Silene latifolia*. *Molecular Ecology*, **21**:4721–4734.
- Keller SR, Taylor DR. 2008.** History, chance and adaptation during biological invasion: Separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters*, **11**:852–866.
- Koehler K, Center A, Cavender-Bares J. 2012.** Evidence for a freezing tolerance-growth rate trade-off in the live oaks (*Quercus* series *Virentes*) across the tropical-temperate divide. *New Phytologist* **193**:730–744.
- Konarzewski TK, Murray BR, Godfree RC. 2012.** Rapid development of adaptive, climate-driven clinal variation in seed mass in the invasive annual forb *Echium plantagineum* L. *PLoS ONE* **7**(12): e49000.
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al. 2015.** CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across *K*. *Molecular Ecology Resources*, **15**:1179–1191.

- Kost MA, Alexander HM, Jason Emry D, Mercer KL. 2015.** Life history traits and phenotypic selection among sunflower crop-wild hybrids and their wild counterpart: Implications for crop allele introgression. *Evolutionary Applications* **8**:510–524.
- Koziol L, Rieseberg LH, Kane N, Bever JD. 2012.** Reduced drought tolerance during domestication and the evolution of weediness results from tolerance-growth trade-offs. *Evolution*, **66**:3803–3814.
- Kronholm I, Picó FX, Alonso-Blanco C, Goudet J, de Meaux J. 2012.** Genetic basis of adaptation in *Arabidopsis thaliana*: Local adaptation at the seed dormancy QTL DOG1. *Evolution* **66**:2287-2302.
- Leiblein-Wild MC, Kaviani R, Tackenberg O. 2014.** Germination and seedling frost tolerance differ between the native and invasive range in common ragweed. *Oecologia*, **174**:739–750.
- Lexer C, Lai Z, Rieseberg LH. 2004.** Candidate gene polymorphisms associated with salt tolerance in wild sunflower hybrids: Implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *New Phytologist*, **161**:225–233.
- Li C, Zhou A, Sang T. 2006.** Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. *New Phytologist*, **170**:185–194.
- Li Z, Hu G, Liu X, et al. 2016.** Transcriptome Sequencing Identified Genes and Gene Ontologies Associated with Early Freezing Tolerance in Maize. *Frontiers in Plant Science*, **7**:1–14.
- Lobell DB, Hammer GL, Chenu K, Zheng B, Mclean G, Chapman SC. 2015.** The shifting influence of drought and heat stress for crops in northeast Australia. *Global Change Biology*, **21**:4115–4127.
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T. 2005.** The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**:223–228.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet J-M, et al. 2010.** Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE* **5**(3)e9743.
- Ludwig F, Rosenthal DM, Johnston JA, et al. 2004.** Selection on leaf ecophysiological traits in a desert hybrid *Helianthus* species and early-generation hybrids. *Evolution*, **58**:2682–2692.
- Mandel JR, Dechaine JM, Marek LF, Burke JM. 2011.** Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **123**:693–704.

- Mandel JR, Ramsey AJ, Iorizzo M, Simon PW. 2016.** Patterns of gene flow between crop and wild carrot, *Daucus carota* (*Apiaceae*) in the United States. *PLoS ONE* **11**:(9) e0161971.
- Mantese AI, Medan D, Hall AJ 2006.** Achene structure, development and lipid accumulation in sunflower cultivars differing in oil content at maturity. *Annals of Botany*, **97**:999–1010.
- Marcer A, Vidigal DS, James PM, et al. 2018.** Temperature fine-tunes Mediterranean *Arabidopsis thaliana* life-cycle phenology geographically. *Plant Biology*, **20**:148-156.
- Maron JL, Vilà M, Bommarco R, Elmendorf S, Beardsley P. 2004.** Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs*, **74**:261–280.
- Mayrose M, Kane NC, Mayrose I, Dlugosch KM, Rieseberg LH. 2011.** Increased growth in sunflower correlates with reduced defences and altered gene expression in response to biotic and abiotic stress. *Molecular Ecology*, **20**:4683–4694.
- McAssey EV, Corbi J, Burke JM. 2016.** Range-wide phenotypic and genetic differentiation in wild sunflower. *BMC Plant Biology*, **16**:1-11.
- Mercer KL, Emry DJ, Snow AA, Kost MA, Pace BA, Alexander HM. 2014.** Fitness of crop-wild hybrid sunflower under competitive conditions: implications for crop-to-wild introgression. *PLoS ONE*, **9**:(10): e109001.
- Mercer KL, Shaw RG, Wyse DL. 2006.** Increased seed germination of diverse crop-wild hybrid sunflower seeds. *Ecological Applications*, **16**:845–854.
- Mercer KL, Andow DA, Wyse DL, Shaw RG. 2007.** Stress and domestication traits increase the relative fitness of crop-wild hybrids in sunflower. *Ecology Letters*, **10**:383–393.
- Mesgaran MB, Lewis MA, Ades PK, et al. 2016.** Hybridization can facilitate species invasions, even without enhancing local adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**:10210–10214.
- Mesihovic A, Iannaccone R, Firon N, Fragkostefanakis S. 2016.** Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant Reproduction*, **29**:93–105.
- Meyer RS, Purugganan MD. 2013.** Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics*, **14**:840–852.
- Michael PJ, Owen MJ, Powles SB. 2010.** Herbicide-Resistant Weed Seeds Contaminate Grain Sown in the Western Australian Grainbelt. *Weed Science*, **58**:466–472.
- Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J. 2015.** Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*, **16**:237–251.

- Moles AT, Westoby M. 2003.** Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography*, **30**:105–128.
- Mondon A, Owens GL, Poverene M, Cantamutto M, Rieseberg LH. 2018.** Gene flow in Argentinian sunflowers as revealed by genotyping by sequencing data. *Evolutionary Applications*, **11**:193-204.
- Montague JL, Barrett SC, Eckert CG. 2008.** Re-establishment of clinal variation in flowering time among introduced populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*, *Lythraceae*). *Journal of Evolutionary Biology*, **21**:234–245.
- Montesinos-Navarro A, Picó FX, Tonsor SJ. 2012.** Clinal variation in seed traits influencing life cycle timing in *Arabidopsis Thaliana*. *Evolution*, **66**:3417–3431.
- Montesinos-Navarro A, Wig J, Xavier Pico F, Tonsor SJ. 2011.** *Arabidopsis thaliana* populations show clinal variation in a climatic gradient associated with altitude. *New Phytologist*, **189**:282–294.
- Moran EV, Alexander JM. 2014.** Evolutionary responses to global change: Lessons from invasive species. *Ecology Letters*, **17**:637–649.
- Moriondo M, Giannakopoulos C, Bindi M. 2011.** Climate change impact assessment: the role of climate extremes in crop yield simulation. *Climatic Change*, **104**:679–701.
- Muller MH., Latreille M, Tollon C. 2011.** The origin and evolution of a recent agricultural weed: population genetic diversity of weedy populations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Spain and France. *Evolutionary applications*, **4**:499–514.
- Murray BR, Brown AH, Dickman CR, Crowther MS. 2004.** Geographical gradients in seed mass in relation to climate. *Journal of Biogeography*, **31**:379–388.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975.** The Bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**:1–10
- Nishizawa T, Nakajima N, Tamaoki M, et al. 2016.** Fixed-route monitoring and a comparative study of the occurrence of herbicide-resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.) along a Japanese roadside. *GM Crops and Food*, **7**:20–37.
- Niu S, Luo Y, Li D, et al. 2014.** Plant growth and mortality under climatic extremes: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, **98**:13–19.
- Oakley CG, Ågren J, Atchison RA, Schemske DW. 2014.** QTL mapping of freezing tolerance: Links to fitness and adaptive trade-offs. *Molecular Ecology*, **23**:4304–4315.
- Oracz K., Bouteau H.E.M., Farrant J.M., et al. 2007.** ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal*, **50**:452–465.

- Orsenigo S, Mondoni A, Rossi G, Abeli T. 2014.** Some like it hot and some like it cold, but not too much: plant responses to climate extremes. *Plant Ecology*, **215**:677–688.
- Ortmans W, Mahy G, Monty A. 2016.** Effects of seed traits variation on seedling performance of the invasive weed, *Ambrosia artemisiifolia* L. *Acta Oecologica* **71**:39–46.
- Owens GL, Baute GJ, Rieseberg LH. 2016.** Revisiting a classic case of introgression: hybridization and gene flow in Californian sunflowers. *Molecular Ecology*, **25**:2630–2643.
- Pace BA, Alexander HM, Emry JD, Mercer KL 2015.** Seed fates in crop-wild hybrid sunflower: crop allele and maternal effects. *Evolutionary Applications*, **8**:121–132.
- Pandey A.K., Dhakal M.R. 2001.** Phytomelanin in compositae. *Current Science*, **80**:933–940.
- Pandolfo CE, Presotto A, Torres-Carbonell F, Ureta S, Poverene M, Cantamutto M. 2018.** Transgene escape and persistence in an agroecosystem: the case of glyphosate-resistant *Brassica rapa* L. in central Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, **7**:6251–6264.
- Peakall R, Smouse PE. 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**:2537–2539.
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, et al. 2001.** Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **84**:1–20.
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D. 2005.** Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, **52**:273–288.
- Postma FM, Ågren J. 2016.** Early life stages contribute strongly to local adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**:7590–7595.
- Poverene M, Cantamutto M, Seiler GJ. 2008.** Ecological characterization of wild *Helianthus annuus* and *Helianthus petiolaris* germplasm in Argentina. *Plant Genetic Resources*, **7**:42–49.
- Pradhan GP, Prasad PV, Fritz AK, Kirkham MB, Gill BS. 2012.** High temperature tolerance in *Aegilops* species and its potential transfer to wheat. *Crop Science*, **52**:292–304.
- Pradhan GP, Prasad PV. 2015.** Evaluation of Wheat chromosome translocation lines for high temperature stress tolerance at grain filling stage. *PLoS ONE* **10**(2): e0116620.
- Prasad PV, Bheemanahalli R, Krishna JS. 2017.** Field crops and the fear of heat stress. Opportunities, challenges and future directions. *Field Crops Research*, **200**:114–121.
- Prasad PV, Djanaguiraman M. 2015.** Response of floret fertility and individual grain weight of wheat to high temperature stress: Sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Functional Plant Biology*, **41**:1261–1269.

- Prentis PJ, Wilson JRU, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ. 2008.** Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, **13**:288–294.
- Presotto A, Fernández-Moroni I, Poverene M, Cantamutto M. 2011.** Sunflower crop-wild hybrids: Identification and risks. *Crop Protection*, **30**:611–616.
- Presotto A, Hernández F, Díaz M, et al. 2017.** Crop-wild sunflower hybridization can mediate weediness throughout growth-stress tolerance trade-offs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **249**:12–21.
- Presotto A, Pandolfo C, Poverene M, Cantamutto M. 2015.** Can achene selection in sunflower crop–wild hybrids by pre-dispersal seed predators hasten the return to phenotypically wild sunflowers? *Euphytica*, **3**:453-462.
- Presotto A, Poverene M, Cantamutto M. 2014.** Seed dormancy and hybridization effect of the invasive species, *Helianthus annuus*. *Annals of Applied Biology*, **164**:373–383.
- Presotto A, Ureta MS, Cantamutto M, Poverene M. 2012.** Effects of gene flow from IMI resistant sunflower crop to wild *Helianthus annuus* populations. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **146**:153–161.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**:945–959.
- Prohens J, Gramazio P, Plazas M, et al. 2017.** Introgressiomics: a new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change. *Euphytica*, **213**:1-19.
- Purugganan M.D., Fuller D.Q. 2009.** The nature of selection during plant domestication. *Nature*, **457**:843–848.
- Rampino P, Mita G, Pataleo S, De Pascali M, Di Fonzo N, Perrotta C. 2009.** Acquisition of thermotolerance and HSP gene expression in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, **66**: 257–264.
- Rattalino-Edreira JI, Budakli-Carpici E, Sammarro D, Otegui ME. 2011.** Heat stress effects around flowering on kernel set of temperate and tropical maize hybrids. *Field Crops Research*, **123**:62–73.
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Dane-Panetta F, West CJ. 2000.** Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, **6**:93–107.
- Rieseberg LH, Beckstrom-Sternberg S, Doan K. 1990.** *Helianthus annuus* ssp. *texanus* has chloroplast DNA and nuclear ribosomal RNA genes of *Helianthus debilis* ssp. *cucumerifolius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**:593–597.

- Rieseberg LH, Kim SC, Randell RA, et al. 2007.** Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers. *Genetica*, **129**:149–165.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, et al. 2003.** Major ecological transitions in wild sunflower facilitated by hybridization. *Science*, **301**:1211–1216.
- Roach D. 1987.** Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**:209–235.
- Robison J, Arora N, Yamasaki Y, et al. 2017.** *Glycine max* and *Glycine soja* are capable of cold acclimation. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **203**:553–561.
- Rodríguez MV, Bodrone MP, Castellari MP, Batlla D. 2018.** Effect of storage temperature on dormancy release of sunflower (*Helianthus annuus*) achenes. *Seed Science Research*, **28**:101–111.
- Rogers CE, Kreitner GL. 1983.** Phytomelanin of sunflower achenes: a mechanism for pericarp resistance to abrasion by larvae of the sunflower moth (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Environmental Entomology*, **12**:277–285.
- Rondanini D, Savin R, Hall AJ. 2003.** Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling. *Field Crops Research* **83**:79–90.
- Rosbakh S, Poschlod P. 2015.** Initial temperature of seed germination as related to species occurrence along a temperature gradient. *Functional Ecology*, **29**:5–14.
- Roselló P.L., Vigliocco A.E., Andrade A.M., et al. 2016.** Differential hormonal and gene expression dynamics in two inbred sunflower lines with contrasting dormancy level. *Plant Physiology and Biochemistry*, **102**:133–140.
- Rosenberg NA. 2004.** DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**:137–138.
- Rouget M, Richardson DM. 2003.** Inferring Process from Pattern in Plant Invasions: A Semimechanistic Model Incorporating Propagule Pressure and Environmental Factors. *The American Naturalist*, **162**:713–724.
- Schierenbeck KA, Ellstrand NC. 2009.** Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions* **11**:1093–1105.
- Schneiter AA, Miller JF. 1981.** Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, **21**:901–903.
- Schuelke M. 2000.** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**:233–234.

- Seiler GJ, Gulya TJ, Kong G, Thompson S, Mitchell J. 2007.** Collection of wild naturalized sunflowers from the land down under. *Proceedings of the 30th sunflower research workshop. National Sunflower Association*, Fargo, ND.
- Seiler GJ, Gulya TJ. 2016.** *Sunflower: Overview* 2nd ed. Elsevier Ltd.
- Seiler GJ. 2015.** Comparison of fatty acid composition of oil from original and regenerated populations of wild *Helianthus* species. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation* **13**:83-89.
- Senthil-Kumar M, Kumar G, Srikanthbabu V, Udayakumar M. 2007.** Assessment of variability in acquired thermotolerance: Potential option to study genotypic response and the relevance of stress genes. *Journal of Plant Physiology*, **164**:111–125.
- Senthil-Kumar M, Srikanthbabu V, Mohan-Raju B, Ganeshkumar, Shivaprakash N, Udayakumar M. 2003.** Screening of inbred lines to develop a thermotolerant sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: A novel approach by exploiting residual variability. *Journal of Experimental Botany*, **54**:2569–2578.
- Shu K., Meng Y.J., Shuai H.W., et al. 2015.** Dormancy and germination: How does the crop seed decide? *Plant Biology*, **17**:1104–1112.
- Siebers MH, Slattery RA, Yendrek CR et al. 2017.** Simulated heat waves during maize reproductive stages alter reproductive growth but have no lasting effect when applied during vegetative stages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **240**:162–170.
- Siebers MH, Yendrek CR, Drag D. et al. 2015.** Heat waves imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative stress. *Global Change Biology*, **21**:3114–3125.
- Simberloff D. 2009.** The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **40**:81–102.
- Sinclair TR, Jamieson PD. 2006.** Grain number, wheat yield, and bottling beer: An analysis. *Field Crops Research*, **98**:60–67.
- Snow AA, Moran-Palma P, Rieseberg LH, Wszelaki A, Seiler GJ. 1998.** Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, *Asteraceae*). *American Journal of Botany*, **85**:794–801.
- Szűcs M, Melbourne BA, Tuff T, et al. 2017a.** Genetic and demographic founder effects have long-term fitness consequences for colonising populations. *Ecology Letters*, **20**:436–444.

- Szűcs M, Vahsen ML, Melbourne BA, et al. 2017b.** Rapid adaptive evolution in novel environments acts as an architect of population range expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**:13501-13506.
- Thomashow MF. 2010.** Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant physiology*, **154**:571–577.
- Todesco M, Pascual MA, Owens GL, et al. 2016.** Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, **9**:892–908.
- Turner KG, Hufbauer RA, Rieseberg LH. 2013.** Rapid evolution of an invasive weed. *New phytologist*, **202**:309–21.
- Uller T, Leimu R. 2011.** Founder events predict changes in genetic diversity during human-mediated range expansions. *Global Change Biology*, **17**:3478–3485.
- Ureta MS, Cantamutto M, Carrera A, Delucchi C, Poverene M. 2008a.** Natural hybrids between cultivated and wild sunflowers (*Helianthus* spp.) in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **55**:1267–1277.
- Ureta MS, Carrera AD, Cantamutto MA, Poverene MM. 2008b.** Gene flow among wild and cultivated sunflower, *Helianthus annuus* in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **123**:343–349.
- Vahsen ML, Shea K, Hovis CL, et al. 2018.** Prior adaptation, diversity, and introduction frequency mediate the positive relationship between propagule pressure and the initial success of founding populations. *Biol Invasions*, **20**:2451–2459.
- Valluru R, Reynolds MP, Davies WJ, Sukumaran S 2016.** Phenotypic and genome-wide association analysis of spike ethylene in diverse wheat genotypes under heat stress. *New phytologist*, **214**:271–283.
- van Boheemen LA, Lombaert E, Nurkowski KA, et al. 2017.** Multiple introductions, admixture and bridgehead invasion characterize the introduction history of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe and Australia. *Mol Ecol* **26**:5421–5434.
- van der Merwe R, Labuschagne MT, Herselman L, Hugo A. 2015.** Effect of heat stress on seed yield components and oil composition in high- and mid-oleic sunflower hybrids. *South African Journal of Plant and Soil*, **32**:121–128.
- van Kleunen M, Röckle M, Stift M. 2015.** Admixture between native and invasive populations may increase invasiveness of *Mimulus guttatus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **282**:20151487.

- van Kleunen M, Weber E, Fischer M. 2010.** A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecology Letters*, **13**:235–245.
- Vanhala TK, Stam P. 2006.** Quantitative trait loci for seed dormancy in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**:1013–1019.
- Volis S. 2009.** Seed-related traits and their adaptive role in population differentiation in *Avena sterilis* along an aridity gradient. *Israel Journal of Plant Sciences*, **57**:79–90.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad M. 2007.** Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, **61**:199–223.
- Warschefsky E, Penmetza RV, Cook DR, von Wettberg EJ. 2014.** Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany*, **101**:1791–1800.
- Warwick SI, Stewart CN. 2005.** Crops come from wild plants – How domestication, transgenes, and linkage together shape ferality. In: Gressel, J. (Ed.), *Crop Ferality and Volunteerism*. CRC Press, Boca-Raton, pp. 9–29.
- Weiss AN, Primer SB, Pace BA, Mercer KL. 2013.** Maternal effects and embryo genetics: germination and dormancy of crop–wild sunflower hybrids. *Seed Science Research* **23**:241–255.
- Whitney KD, Randell RA, Rieseberg LH. 2010.** Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus*. *New phytologist*, **187**:230–9.
- Willis CG, Baskin CC, Baskin JM, et al. 2014.** The evolution of seed dormancy: Environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*, **203**:300–309.
- Wills DM, Burke JM. 2006.** Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity*, **97**:403–408.
- Wills DM, Burke JM. 2007.** Quantitative trait locus analysis of the early domestication of sunflower. *Genetics*, **176**:2589–2599.
- Wills DM, Hester ML, Liu A, Burke JM. 2005.** Chloroplast SSR polymorphisms in the Compositae and the mode of organellar inheritance in *Helianthus annuus*. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**:941–947.
- Witcombe JR, Hollington PA, Howarth CJ, Reader S, Steele KA. 2008.** Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **363**:703–716.

- Wolfe MD, Tonsor SJ. 2014.** Adaptation to spring heat and drought in northeastern Spanish *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **201**:323–334.
- Wos G, Willi Y. 2015.** Temperature-Stress Resistance and Tolerance along a Latitudinal Cline in North American *Arabidopsis lyrata*. *PLOS ONE* **10**: e0131808.
- Xia HB, Xia H, Ellstrand NC, Yang C, Lu BR. 2011.** Rapid evolutionary divergence and ecotypic diversification of germination behavior in weedy rice populations. *New Phytologist*, **191**:1119–1127.
- Xu CY, Julien MH, Fatemi M, et al. 2010.** Phenotypic divergence during the invasion of *Phyla canescens* in Australia and France: Evidence for selection-driven evolution. *Ecology Letters*, **13**:32–44.
- Yang XM, Sun JT, Xue XF, et al. 2012.** Invasion genetics of the western flower thrips in China: Evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. *PLoS ONE*, **7**:(4)e34567
- Yeh CH, Kaplinsky NJ, Hu C, Charng YY. 2012.** Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science*, **195**:10–23.
- Zhang H, Mittal N, Leamy LJ, Barazani O, Song BH. 2017.** Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, **10**:5–24.
- Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J. 2008.** Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *The Plant Genome Journal*, **1**:5-20.
- Zuther E, Schulz E, Childs LH, Hinch DK. 2012.** Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant, Cell and Environment*, **35**:1860–1878.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA EN EL TRANCURSO DE ESTA TESIS

Publicaciones en revistas científicas

Hernández, F.; M. Poverene; A. Garayalde; A. Presotto. Re-establishment of latitudinal clines and local adaptation within the invasive range reveal rapid evolution of seed traits in Argentinean sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biological invasions*, en revisión.

Hernández, F.; M. Poverene; A. Presotto. 2018. Heat stress effects on reproductive traits in crop and wild sunflower (*Helianthus annuus* L.): evidence for local adaptation within wild sunflower. *Euphytica*, 214:146.

Hernández, F.; L.I. Lindström; E. Parodi; M. Poverene; A. Presotto. 2017. The role of domestication and maternal effects on seed traits of crop-wild sunflower hybrids (*Helianthus annuus*). *Annals of Applied Biology*, 171:237-251.

Presotto A.; **F. Hernández;** M. Díaz; et al. 2017. Crop-wild sunflower hybridization can mediate weediness throughout growth-stress tolerance trade-offs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 249:12-21.

Publicaciones en congresos

Hernández F.; H. Irazabal; A. Presotto; M. Poverene. 2017. Evidencia de adaptación local al estrés por calor en girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.). Presentación oral. XLVI Congreso Argentino de Genética, 1-4 de octubre 2017. Catamarca, Argentina.

Presotto, A.; **F. Hernández;** I. Fernández-Moroni; et al. 2016. Efecto de la introgresión del girasol cultivado en una población de *H. annuus* silvestre. XVI Congreso Latinoamericano de Genética, 9-12 de octubre 2016. Montevideo, Uruguay.

Hernández F.; A. Presotto; M. Poverene. 2015. Respuesta al estrés térmico en estadios tempranos en germoplasma silvestre y cultivado de *Helianthus annuus* L. XLIV Congreso Argentino de Genética, 13-16 de septiembre dl 2015. Mar del Plata, República Argentina. Página 105.

Artículos de extensión y partes de libro

Hernández, F. 2018. Sobrevivir o invadir: el dilema de una especie no nativa. Caso estudio; en: Biología de *Helianthus annuus* L. y *Helianthus petiolaris* Nutt. Malezas e Invasoras de la Argentina. TOMO III: Edición de la Universidad Nacional del Sur. 2016. ISBN 978-987-1907-70-0.

Hernández F. 2017. The role of domestication and maternal effects on sunflower seed traits. Artículo invitado, *Science Trends*. <https://sciencetrends.com/role-domestication-maternal-effects-sunflower-seed-traits/>.