

Caracterización morfológica y molecular de poblaciones segregantes de girasol provenientes de híbridos comerciales

Morphological and molecular characterization of sunflower segregant populations coming from commercial hybrids

Betzabeth Alezones*, Ana Casanova y Hernán Laurentin

Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Decanato de Agronomía. Departamento de Ciencias Biológicas. Barquisimeto, estado Lara. Venezuela.

*Correo electrónico: betzabeth.alezone@gmail.com

RESUMEN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) representa una alternativa para la obtención de aceite en Venezuela, lo cual es de gran relevancia ante el marcado déficit en la producción nacional. Como en todo proceso agrícola, la semilla es determinante; sin embargo, en el país, el rubro girasol está sustentado en semilla importada. Esto, hace necesario el inicio de un programa nacional de semilla de girasol, el cual requiere de acciones previas dirigidas al mejoramiento genético. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar morfológica y molecularmente tres poblaciones segregantes de girasol provenientes de tres híbridos comerciales, con el fin de determinar su utilidad como poblaciones básicas genéticamente variables para el inicio de ciclos de selección. Se estudiaron 18 variables morfológicas en 120 plantas de cada población segregante, y se utilizaron 5 oligonucleótidos RAPD usando el ADN de 24 plantas en cada población. Mediante la distribución de frecuencias, pruebas de medias y análisis de componentes principales, se determinó la amplia variabilidad morfológica existente dentro de cada población segregante, siendo altura de planta, número de flores radiales en el capítulo y longitud de brácteas del capítulo, los atributos morfológicos más variables. El análisis de coordenadas principales basado en 22 bandas RAPD obtenidas corroboró, la amplia variación dentro de las poblaciones. La variabilidad genética identificada dentro de cada población segregante, las hace candidatas válidas para el inicio de programas de mejoramiento genético, orientados hacia la obtención de cultivares nacionales adaptados a las condiciones de producción venezolana.

Palabras clave: *Helianthus annuus* L., mejoramiento genético, híbrido, RAPD, polinización abierta.

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivation in Venezuela is a suitable alternative to national oil production, which would contribute to overcome a long-time deficit in the country. Seed supply is a critical step in Venezuelan sunflower production, as it is imported; therefore, it is necessary to begin a national seed production program including sunflower breeding programs. The objective of this research was to characterize morphological and molecularly three segregating populations coming from three commercial hybrids, in order to determine its suitability as basic population in future selection schemes. Eighteen morphological variables were recorded on 120 plants coming from three segregating populations, and five RAPD primers were applied using DNA from 24 plants per population. Frequency distribution, mean tests, and principal components analysis revealed a wide morphological variability within each population. Plant height, number of ray flowers, and bract length were the most variable morphological attributes. Principal coordinates analysis based on 22 RAPD fragments also displayed a wide variability within populations. Genetic variability identified by morphological and molecular characterization made segregating populations, coming from commercial hybrids, good candidates to be used as basic population for breeding programs aiming to obtain national cultivars adapted to Venezuelan production conditions.

Key words: *Helianthus annuus* L., plant breeding, hybrid, RAPD, open pollinated

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie cultivada perteneciente a la familia Asteraceae. Es una planta oleaginosa de importancia mundial para la alimentación animal y humana, especialmente por el alto contenido de aceite (40%) que poseen sus aquenios, el cual es considerado uno de los de mayor calidad para el consumo humano y por su composición de ácidos grasos de origen vegetal.

La producción de girasol en Venezuela ha tenido muchos altibajos, no obstante, en los últimos años presentó una tendencia al incremento sostenido en la superficie de siembra, variando desde 30.000 ha en el año 2008, hasta 76.000 ha en el año 2012 (FEDEAGRO, 2014). El alto contenido de aceite que presenta su aquenio, la comprobada adaptación en los llanos del estado Portuguesa y el dominio, que posee el productor, sobre el manejo de este cultivo, hacen del girasol una importante alternativa para contribuir a solventar la grave situación de producción de aceite nacional, la cual no llega a cubrir ni siquiera el 40% de las necesidades del país (MPPAT, 2012), según los datos de consumo del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2013).

La región de los llanos occidentales de Venezuela, adecuada para la producción del girasol, cuenta con una extensión de 3.049.716 ha aptas para su cultivo; se divide en dos sectores: el primero, de alta adaptabilidad con una extensión de 1.945.145 ha, y otro sector, de moderada adaptabilidad, con una extensión de 1.103.561 ha (Ávila, 2009).

La producción de este rubro en el mundo, está basada en la siembra de cultivares híbridos. En el país no existe producción de híbridos nacionales, ni de ningún otro tipo de cultivar, sino, que se cultivan híbridos importados predominantemente de Argentina, materiales que deben ser sometidos a los ensayos de validación agronómica de cultivares (EVAC), dirigidos principalmente al cultivar que pretenda servir de proveedor de semilla para los procesos productivos venezolanos.

Por tal motivo, es imperativo realizar las pruebas regionales de rigor (Soto, 2005) con el fin de determinar los materiales con mayor potencial de

rendimiento para las condiciones de producción venezolana; lo que permitiría una solución coyuntural y a corto plazo, en cuanto a la falta de suplencia de semilla nacional de girasol. La estrategia a seguir como solución a largo plazo a este problema estructural, requiere necesariamente del inicio de programas de mejoramiento genético orientados hacia la obtención de cultivares nacionales.

Acquaah (2012) señala que el primer paso en un programa de mejoramiento genético es la generación de variabilidad. Como punto de partida, lo idóneo es usar poblaciones segregantes, en las que se expresa toda la variabilidad genética contenida en un cruzamiento particular. Por definición, el material cosechado de un híbrido es una población segregante, es decir, la cosecha de aquenios de un híbrido comercial de girasol, puede utilizarse como fuente de germoplasma con una alta variabilidad genética, constituyendo la población básica a partir de la cual iniciar ciclos de selección en un programa de mejoramiento genético de este cultivo. Sin embargo, es necesario realizar la caracterización de tal variabilidad para incrementar la eficiencia del mismo.

De acuerdo al artículo 5, aparte 3, de la legislación propuesta por la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV, 1978), el uso del germoplasma derivado de un cultivar como fuente de variación para la obtención de otros cultivares, no requiere la autorización del obtentor.

La caracterización busca determinar la identidad de los individuos de la manera más confiable posible, para posteriormente (entre otros objetivos) hacer análisis de variabilidad genética (Laurentin, 2011). La caracterización puede basarse tanto en rasgos morfológicos, como en marcadores moleculares. La morfológica se basa en caracteres de alta heredabilidad, es decir, características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente (Hintum, 1995).

Los caracteres a evaluar son recopilados en los llamados descriptores (Abadie y Berretta, 2010). Aunque, para superar completamente la desventaja que para la caracterización morfológica representa la influencia ambiental, se utiliza la caracterización molecular, especialmente la de ADN, que es la identificación de una serie

de segmentos de ADN de distinta longitud que representan la identidad de un individuo. Ambas caracterizaciones no son excluyentes, puesto que muestran facetas diferentes de la diversidad (Abadie y Berretta, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica y molecularmente las poblaciones segregantes provenientes de tres híbridos comerciales de girasol, para determinar su potencial como fuente de germoplasma para el inicio de programas de mejoramiento genético orientados hacia la obtención de cultivares adaptados a las condiciones de producción de girasol en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se escogieron al azar tres de los nueve híbridos que estuvieron disponibles comercialmente en el año 2011. Aquenios de los híbridos comerciales de girasol: Contiflor 17, Aguará 6 y Ramson 3, que fueron cosechados directamente de siembras comerciales para obtener semilla de tres poblaciones segregantes.

Caracterización morfológica

El estudio se realizó en la Estación Experimental Miguel Luna Lugo, en la localidad de Tarabana, municipio Palavecino del estado Lara, Decanato de Agronomía de la Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado (UCLA), latitud norte 10°01'25" y longitud oeste 69°16'44", con altitud de 510 m.s.n.m., entre los meses mayo y agosto del año 2012. Según el esquema de clasificación climática de Holdridge, el clima del lugar corresponde a un bosque seco tropical con una provincia de humedad subhúmeda.

Se estableció un ensayo de campo bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y tres tratamientos representados por las tres poblaciones segregantes. Cada unidad experimental estuvo constituida por tres hileras de 25 m de longitud y una separación entre ellas de 1,20 m. Adicionalmente se sembró una hilera de cada uno de los híbridos con fines de comparación entre poblaciones segregantes e híbridos de los cuales provenían.

La siembra se realizó manualmente espaciando las semillas a 25 cm. Dentro de cada unidad experimental se tomaron aleatoriamente 10 plantas por cada una de las hileras que la constituyen (30 plantas por unidad experimental) para un total de 120 plantas por cada tratamiento. En cada una de ellas se evaluaron las 18 variables que se indican en el Cuadro 1, de la forma como es indicado en el descriptor de girasol del IBPGR (1985).

Caracterización molecular

La caracterización molecular se hizo sobre 24 individuos de cada población segregante, cuyas hojas se tomaron 30 días luego de la germinación de plantas escogidas al azar utilizadas en la caracterización morfológica. Adicionalmente, como una forma de estimar la variabilidad relativa de las poblaciones segregantes con respecto a los híbridos, se agregaron dos individuos de cada uno de dichos cultivares, es decir, la caracterización molecular se hizo sobre 78 individuos. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), y su purificación se logró con acetato de amonio.

Para verificar la pureza del ADN y hacer una estimación cualitativa de su concentración, se realizó una separación electroforética en geles de 0,8% (p/v) de agarosa ultra pura disuelta en buffer TBE (Trisborato, EDTA 0,5 M, pH 8). La electroforesis se dio a 60 V constantes por 80 min, se tiñó con bromuro de etidio y se observó el resultado a través de iluminación bajo luz ultravioleta.

Con el ADN obtenido, se procedió a generar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos de anclaje al azar con una longitud de diez bases, para lograr los RAPD (random amplified polymorphic DNA, o ADN polimórfico amplificado al azar).

Las reacciones de amplificación se hicieron para cada una de las 78 plantas en tubos de PCR, con un volumen final de 18 µl, conteniendo 4 µl de buffer 5X de PCR (Promega, Madison, EE. UU.); 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 2 µl de dNTP 2 mM; 1 µl de uno de los oligonucleótidos, 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U µl⁻¹; 8,7 µl de agua destilada libre de nucleasa; 2 µl de la suspensión de ADN.

Cuadro 1. Variables tomadas del descriptor del IBPGR (1985) para caracterizar tres poblaciones segregantes de girasol.

Variables	Categorías	Observaciones
Caracteres vegetativos		
1) Forma de la hoja	1) Oblonga. 2) Lanceolada. 3) Triangular. 4) Acorazonada. 5) Redondeada	Tomada en la séptima hoja de abajo hacia arriba
2) Forma de la sección transversal de la hoja	3) Cóncava. 5) Convexa. 7) Plana	Tomada en la séptima hoja de abajo hacia arriba
3) Forma de la base de la hoja	1) Aguda. 3) Deltoide. 5) Acorazonada. 7) Auriculadas.	Tomada en la séptima hoja de abajo hacia arriba
4) Ángulo de las nervaduras laterales de las hojas	3) Agudo. 5) Recto. 7) Obtuso	Tomado en la séptima hoja de abajo hacia arriba
5) Pecíolo	0. Ausente. 1) Extremadamente corto. 3) Corto. 5) Medio. 7) Largo. 9) Extremadamente largo	Tomado en la séptima hoja de abajo hacia arriba
6) Altura de la planta	1) Enano (menos de 40 cm). 2) Extremadamente pequeña (40-80 cm). 3) Pequeña (80-120 cm). 4) Pequeña a mediana (120-160 cm). 5) Media (160-200 cm). 6) Mediana a alta (200-240 cm). 7) Alta (240-280 cm). 8) Alta a extremadamente alta (280-320 cm). 9) Extremadamente alta (más de 320 cm)	Medida en floración plena
7) Ramificación	0) Ausente. 1) Presente	Se determinó observando la planta en toda su extensión
8) Tipo de ramificación	0) Ramificación basal. 1) Ramificación en la punta. 2) Totalmente ramificada con capítulo central. 3) Totalmente ramificada sin capítulo central.	Se determinó en plantas con ramificación presente
9) Ángulo del capítulo	1) 0°; 2) 45°; 3) 90°; 4) 135°; 5) 180°; 6) 225°.	Se determinó al momento de la madurez, respecto a una línea horizontal imaginaria
10) Forma del capítulo	1) Cóncavo. 2) Plano. 3) Convexo. 4) Deforme.	Se determinó al momento de la madurez
11) Longitud de la bráctea en el capítulo	Medida en cm.	Se midió la longitud de 5 brácteas por cada capítulo (planta) seleccionado; se reportó el promedio

..!... continúa

.../... continuación Cuadro 1.

Variables	Categorías	Observaciones
Caracteres de inflorescencia, fruto y semilla		
12) Pubescencia en las brácteas del capítulo	1) Ausente. 3) Escasa. 5) Intermedia. 7) Densa	Se determinó mediante la apreciación general de la pubescencia en las brácteas
13) Arreglo de las brácteas	1) Convergente. 2) Puentes paralelos. 3) Rendondeado. 4) Ondulado.	Se determinó mediante la apreciación general de las brácteas
14) Número de flores radiales	Número de flores	Se determinó contando el número de flores radiales
15) Color de las flores radiales	1) Marfil. 2) Amarillo pálido. 3) Naranja. 4) Púrpura. 5) Rojo. 6) Multicolor	Se determinó mediante la apreciación general del color de las flores radiales
16) Forma de la semilla	1) Alargada. 2) Ovoide alargada. 3) Ovoide ancha. 4) Redondeada	Se determinó mediante la apreciación general de la forma de un lote de semillas
17) Moteado de la semilla	0) Ausente. 1) Presente	Se determinó mediante la apreciación general del moteado en un lote de semillas
18) Posición de las bandas en la semilla	1) Marginal. 2) Lateral. 3) Tanto marginal como lateral	Se determinó mediante la apreciación general de la posición de las bandas en un lote de semillas

Las reacciones de PCR se dieron en un termociclador modelo Px2 (Thermo, Madison, EE. UU.) programado para un primer paso de desnaturalización a 93 °C por 2 min, seguido de 45 ciclos, cada uno de ellos consistiendo en un paso de desnaturalización a 93 °C por 1 min, un paso de alineación del oligonucleótido a 36 °C por 1 min y un paso de extensión de la molécula formada a 72 °C por 1 min. Finalmente, se programó una extensión a 72 °C por 5 min.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis, (las 78 muestras por cada oligonucleótido utilizado), en geles de 1,5% de agarosa ultra pura disuelta en buffer TBE 1X

durante 80 min a 60 V. Para tal fin, se utilizaron 10 µl de la muestra; adicionalmente, se colocó un marcador de fragmentos de PCR (Promega), para tener un estimado del tamaño de las bandas generadas.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio durante 15 min. Posteriormente, el exceso de bromuro de etidio se eliminó mediante lavado con agua destilada por 15 min. Las bandas se observaron bajo luz ultra violeta (UV) y la imagen fue digitalizada mediante un sistema de fotodocumentación VisiDoc-It (UVP, Cambridge, Reino Unido).

Análisis estadístico

Para los datos morfológicos se calculó el promedio, desviación estándar, valores mínimos y máximos y coeficiente de variación para cada variable cuantitativa. Las variables cualitativas se describieron mediante distribución de frecuencias.

Se probaron las hipótesis de promedios iguales para todos los tratamientos (las tres poblaciones segregantes). Para las variables evaluadas, se realizó el análisis de varianza, previa comprobación de los supuestos estadísticos; y comparándose además los promedios de los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Para aquellas variables en las que no se cumplieron los supuestos del análisis de varianza, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis. Todos estos análisis se hicieron con el programa estadístico Statistix for Windows versión 8.0.

Por último, con la finalidad de visualizar las similitudes de los genotipos evaluados y de determinar las características más discriminantes, se efectuó un análisis de componentes principales. Para esto se construyó una matriz con los valores de cada variable dentro de cada planta evaluada, la cual se estandarizó dentro de cada variable, mediante la resta del valor promedio de ésta y su división entre la desviación estándar.

Sobre esta matriz se determinaron las correlaciones existentes entre variables, obteniéndose una nueva variable. En esta última se calcularon los autovalores y autovectores, lo que permitió una proyección ortogonal de los autovectores en un espacio bidimensional. Este análisis se logró con el programa estadístico NTSYS v. 1,72.

En relación a la caracterización molecular, a partir de los datos obtenidos, se elaboró una matriz binaria con presencia (1) o ausencia (0) de una banda para cada individuo. Se realizó el análisis de ordenación de coordenadas principales, para lo cual se obtuvo la correlación entre las bandas. Posteriormente, la matriz de similitud fue doblemente centrada, obteniendo los autovalores y autovectores, los que finalmente se proyectaron en un espacio bidimensional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

La evaluación de caracteres morfológicos fue uniforme, encontrándose todas las plantas evaluadas de cada híbrido en solo 1 categoría para cada variable. Los híbridos difirieron en el pecíolo, altura de planta, longitud y pubescencia de las brácteas en el capítulo y todas las características relacionadas con la semilla, es decir, se pudieron diferenciar los tres híbridos con base en los atributos morfológicos, lo cual pudo lograrse tomando una planta de cada híbrido debido a la uniformidad genética de cada uno.

En las poblaciones segregantes, de todos los caracteres morfológicos evaluados, solo el color de flores radiales no presentó variación, siendo amarillo para las 120 plantas de cada población. En el Cuadro 2 se reporta la distribución de frecuencias de las 11 variables cualitativas nominales, observándose plantas con todas las categorías que definen los 10 caracteres morfológicos que identificó la variación, a excepción del arreglo de las brácteas del capítulo, en la cual no hubo plantas en la categoría de arreglo redondeado. Estos resultados permiten señalar que efectivamente se está expresando una amplia variación genética en las poblaciones segregantes.

La uniformidad genética que originalmente se indica en los híbridos, se perdió completamente al observar los resultados en las poblaciones segregantes, pues no hubo forma de distinguir, con base en los caracteres morfológicos, en las tres poblaciones evaluadas. Kholghi *et al.* (2010) reportaron una amplia variación morfológica en poblaciones mejoradas de girasol.

La prueba de Kruskal y Wallis resultó en ausencia de diferencias significativas ($P > 0,05$) entre poblaciones para los 11 caracteres cualitativos nominales. De estos caracteres, los relacionados con la ramificación son los más evidentes en cuanto a la aparición de la variabilidad que estos pueden tener, ya que el girasol cultivado nunca es ramificado. Ávila (2009) indica que la ramificación del tallo constituye un carácter negativo en los cultivares de girasol.

Cuadro 2. Distribución de frecuencias de variables cualitativas nominales evaluadas sobre tres poblaciones segregantes provenientes de tres híbridos comerciales de girasol.

Categorías	Población segregante del híbrido			
	Aguará 6	Contiflor 17	Ramson 3	
Forma de la hoja	1	0	0	1
	2	6	6	7
	3	10	11	10
	4	21	23	22
	5	3	0	0
Forma de la sección transversal de la hoja	3	25	23	17
	5	0	3	5
	7	15	14	18
Forma de la base de la hoja	1	9	11	8
	3	5	4	6
	5	15	21	21
	7	11	4	5
Ramificación	0	22	22	19
	1	18	18	21
Tipo de ramificación	0	20	22	18
	1	1	1	1
	2	3	6	5
	3	16	13	16
Forma del capítulo	1	10	9	15
	2	17	15	15
	3	8	12	7
	4	5	4	3
Arreglo de brácteas	1	5	8	7
	2	1	2	1
	3	0	0	0
	4	24	30	32
Color de flores radiales	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	40	40	40
	4	0	0	0
	5	0	0	0
	6	0	0	0
Forma de la semilla	1	3	0	6
	2	15	16	8
	3	20	16	15
	4	2	8	11
Moteado de la semilla	0	15	8	9
	1	25	32	31
Posición de las bandas de la semilla	1	10	0	6
	2	20	29	27
	3	10	11	7

Cantamutto *et al.* (2010) señalan que el girasol híbrido incluye líneas parentales que poseen ramificación, lo cual no se expresa en la primera generación del cultivo de la semilla híbrida, ya que el genotipo de la madre no posee ramificación. Sin embargo, en generaciones posteriores aparecen individuos ramificados.

En las poblaciones segregantes evaluadas se expresó la variabilidad en el atributo morfológico de la ramificación, que aparecieron plantas ramificadas desde la base, lo cual según Cantamutto *et al.* (2010) es propio de las especies silvestres emparentadas con el girasol.

El Cuadro 3 muestra la distribución de frecuencias de los cuatro caracteres cualitativos ordinales evaluados. En estas variables también se observa la aparición de plantas en la mayoría de categorías

que definen estos caracteres, diferenciándose de los híbridos que les dieron origen los cuales estuvieron, cada uno, ubicados en solo una categoría de cada variable. De igual forma que con los caracteres nominales, en los ordinales se observó una amplia variabilidad entre las plantas evaluadas, siendo similar entre poblaciones segregantes, a tal punto de ser indistinguibles mediante la prueba de Kruskal y Wallis, la cual resultó con diferencias no significativas ($P > 0,05$) para todos los caracteres.

El Cuadro 4 señala la estadística descriptiva de las variables cuantitativas evaluadas. En promedio sobre las tres poblaciones segregantes, los coeficientes de variación para altura de la planta, longitud de brácteas y número de flores radiales fue de 28, 20 y 24%, respectivamente; estos caracteres poligénicos expresan una amplia variabilidad en las poblaciones mencionadas.

Cuadro 3. Distribución de frecuencias de variables cualitativas ordinales evaluadas sobre tres poblaciones segregantes provenientes de tres híbridos comerciales de girasol.

Categorías	Población segregante del híbrido			
	Aguará 6	Contiflor 17	Ramson 3	
Ángulo de nervadura lateral de hojas	3	15	17	16
	5	4	5	8
	7	21	18	16
	0	0	0	0
	1	1	4	3
Pecíolo	3	0	0	0
	5	12	16	10
	7	0	0	0
	9	27	20	27
	1	0	0	0
Ángulo del capítulo	2	5	7	3
	3	12	15	21
	4	16	11	15
	5	7	7	1
	6	0	0	0
Pubescencia de brácteas en el capítulo	1	0	0	0
	3	10	5	9
	5	15	23	19
	7	15	12	12

Cuadro 4. Estadística descriptiva para variables cuantitativas evaluadas sobre tres poblaciones segregantes provenientes de tres híbridos comerciales de girasol.

		Población segregante del híbrido		
		Aguara 6	Contiflor 17	Ramson 3
Altura de la planta	Media	98,44	100,57	101,13
	Coefficiente de variación	24,29	28,84	31,22
	Valor mínimo	50,00	48,80	47,30
	Valor máximo	137,70	189,20	160,70
Longitud de las brácteas	Media	3,63	3,84	3,55
	Coefficiente de variación	17,85	22,56	19,34
	Valor mínimo	2,10	2,76	2,62
	Valor máximo	5,20	7,22	5,40
Número de flores radiales	Media	37,51	36,35	38,28
	Coefficiente de variación	22,25	23,83	25,99
	Valor mínimo	21,00	17,00	20,00
	Valor máximo	56,00	53,00	58,00

Los amplios coeficientes de variación dentro de las poblaciones son indicativos de la inexistencia de alguna identidad genética particular, y por el contrario, revelan la amplia variabilidad genética existente, lo que es mayor dentro de los mencionados grupos, al ser comparada con la variabilidad entre poblaciones.

Esto trae como consecuencia la inexistencia de diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) entre poblaciones según la prueba de Tukey. La variabilidad fenotípica que se está dando en estas características poligénicas, podría ser indicio de variabilidad genética en otras tantas características determinadas por varios genes.

La Figura 1 muestra la totalidad de las plantas evaluadas en un espacio bidimensional obtenido mediante análisis de componentes principales, que permite explicar el 33% de la variación observada entre plantas, destacando que éstas no se agrupan según el híbrido del cual provengan. Se observa que individuos de una población segregante están al lado de individuos

de otra, siendo la cercanía entre puntos lo que indica la similitud entre individuos.

Por ejemplo, individuos de la población segregante proveniente de Aguará 6, se parecen más a individuos, tanto de Ramson 3 como de Contiflor 17, que a plantas de la misma población segregante proveniente de Aguará 6. Es decir, las poblaciones provenientes de los tres híbridos de girasol evaluados, no tienen una identidad genética particular que permita agruparlos y diferenciarlos de los otros híbridos.

El Cuadro 5 permite visualizar que dentro y entre poblaciones segregantes, las variables que mejor explican la variación determinada fueron: altura de la planta, longitud de las brácteas y número de flores radiales, respecto al primer eje. En el segundo eje, la variación puede ser explicada mayormente por la ramificación y el tipo de ramificación. Estos resultados indican que la mayor variabilidad no solo se dio en algunas de las características que permitieron diferenciar a los híbridos (altura de planta y longitud de brácteas), sino que a éstas se sumaron otras variables.

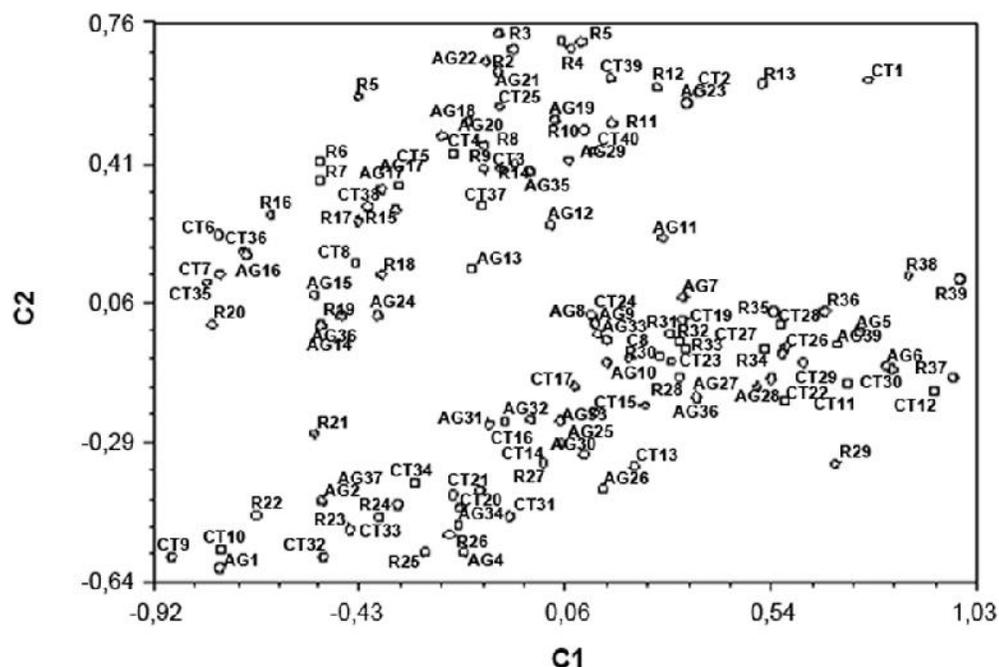


Figura 1. Gráfico bidimensional del agrupamiento de 120 plantas provenientes de 3 híbridos comerciales de girasol, basado en la evaluación de 18 caracteres morfológicos. Cada planta identificada por: AG= Aguará 6; CT= Contiflor 17; R= Ramson 3, seguida de un número.

Cuadro 5. Autovectores del análisis de componentes principales.

Variables	Eje1	Eje2	Eje3	Eje4
Forma de sección transversal de hoja	0,02	0,15	0,19	0,00
Forma de la hoja	0,53	0,26	0,34	-0,21
Forma de base de hoja	0,50	0,24	0,45	-0,01
Ángulo de nervaduras laterales	0,08	0,06	0,31	-0,49
Pecíolo	0,54	0,48	-0,16	0,14
Altura de planta	0,80	0,28	-0,07	0,10
Ángulo del capítulo	0,58	-0,20	-0,16	-0,35
Forma del capítulo	-0,34	0,06	-0,07	-0,44
Ramificación	-0,37	0,85	0,07	-0,06
Tipo de ramificación	-0,31	0,87	0,07	-0,07
Longitud de brácteas	0,81	-0,08	-0,13	-0,10
Pubescencia de brácteas	-0,12	0,06	0,01	0,57
Forma de brácteas	-0,18	0,03	-0,27	-0,51
Número de flores radiales	0,75	0,06	-0,03	0,12
Forma de la semilla	0,07	-0,02	-0,22	-0,37
Moteado de la semilla	-0,00	0,19	-0,68	-0,05
Posición de bandas en semilla	0,07	0,22	-0,81	0,12

La amplia variabilidad manifestada en este trabajo, aún cuando podría ser considerada indeseable, en lo que concierne a calidad de semilla para procesos productivos, es de gran importancia en lo referente a mejoramiento genético como fuente de germoplasma para iniciar procesos de selección.

El inicio de un programa de mejoramiento genético solo es posible cuando existe variación genotípica en la población para las características de interés, puesto que la variación genética constituye la materia prima del mejoramiento genético (Laurentin, 2011). En trabajos anteriores se ha descrito el valor que pueden tener las generaciones segregantes de híbridos comerciales como fuente de germoplasma, especialmente para obtener líneas androestériles (Carvalho y Toledo, 2008).

Caracterización molecular

Se obtuvo un total de 22 bandas RAPD amplificadas mediante los iniciadores OPA-19, OPK-05, OPM-04, OPB-07 (sin bandas al utilizar el iniciador OPM-20). Los iniciadores OPM-04 y OPA-19 lograron la amplificación de 6 bandas, mientras que OPK-05 y OPB-07 de 5 bandas. Todas las bandas fueron polimórficas y estuvieron en un rango de tamaño entre 200 y 1250 pares de bases. No se observaron bandas únicas (Cuadro 6).

El promedio de bandas obtenidas por iniciador fue de 5,5. El oligonucleótido OPM-20, que no logró amplificar ADN en el presente trabajo, fue utilizado

exitosamente en otra caracterización molecular en girasol (Fernández *et al.*, 2010). La similitud promedio dentro de las poblaciones segregantes provenientes de Aguara 6, Contiflor 17 y Ramson 3, fue de 0,31; 0,28 y 0,19, respectivamente, mientras que en promedio entre los individuos de cada uno de los híbridos fue 0,93, siendo indicio de la amplia variabilidad genética que expresan las poblaciones segregantes con respecto a los híbridos que les dieron origen.

El análisis de coordenadas principales representado en un espacio bidimensional y basado en los RAPD obtenidos (Figura 2), explicó el 45% de la variabilidad genética total. Según los autovectores (no reportados), las bandas generadas por el oligonucleótido OPM-04, resultaron tener el menor poder discriminante, mientras que 12 bandas generadas por OPB-07, OPA-19 y OPK-05 (cuatro cada uno) contribuyen en aproximadamente la misma magnitud a discriminar las plantas evaluadas.

De forma análoga a lo que ocurrió al ser reportada la caracterización morfológica, la caracterización mediante RAPD no permite discriminar entre poblaciones segregantes, la variabilidad identificada dentro de poblaciones es mucho mayor que la variabilidad entre poblaciones, impidiendo que plantas de una misma población segregante, se agrupen de forma similar, diferenciándose de las plantas de otras poblaciones segregantes.

Cuadro 6. Número de bandas totales, número de bandas polimórficas y tamaño de bandas para cada uno de los iniciadores utilizados.

Oligonucleótidos		Número de bandas	Número de bandas polimórficas	Tamaño de bandas			
				Mayor a 1000 pb	Entre 750 y 1000 pb	Entre 500 y 750 pb	Entre 200 y 500 pb
Nombre	Secuencia						
OPA-19	CAAACGTCGG	6	6	1	1	3	1
OPK-05	TCTGTCGAGG	5	5	1	1	2	1
OPM-04	GGCGGTTGTC	6	6	2	2	2	0
OPB-07	GGTGACGCAG	5	5	0	2	1	2

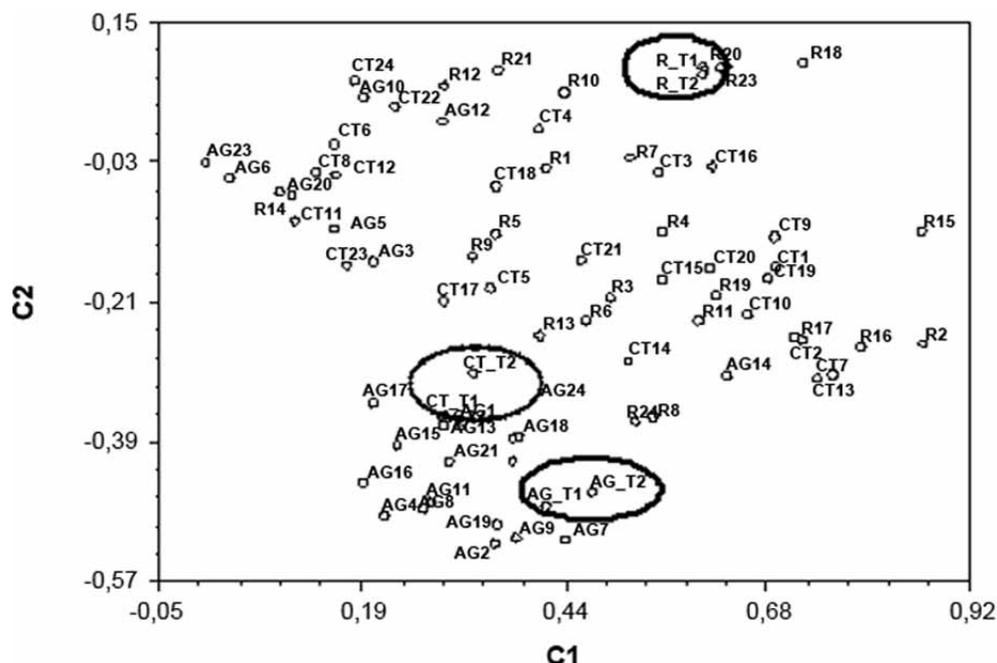


Figura 2. Gráfico bidimensional del agrupamiento de 78 plantas de poblaciones segregantes provenientes de 3 híbridos comerciales de girasol basado en 22 bandas RAPD por: AG= Aguará 6; CT= Contiflor 17; R= Ramson 3, seguida de un número. Dentro de los óvalos los dos testigos de cada híbrido comercial.

CONCLUSIONES

La caracterización morfológica y molecular coinciden en mostrar una amplia variabilidad genética dentro de las poblaciones segregantes generadas por cada uno de tres híbridos comerciales de girasol.

La condición indispensable para el inicio de programas de mejoramiento genético, que es la obtención de una población con amplia variabilidad genética, está cubierta en la población segregante de híbridos comerciales. Por tal razón, una estrategia válida para programas de mejoramiento genético en el cultivo del girasol, es la utilización de la semilla cosechada de híbridos comerciales como fuente de germoplasma, bien sea, para la obtención de padres cuyo cruzamiento generaría nuevas poblaciones o usándolas directamente como población básica.

Esta estrategia permitiría la obtención a mediano plazo de cultivares venezolanos (variedades de polinización

abierta, o eventualmente nuevos híbridos), adaptados a las condiciones agroecológicas de producción en el país, lo cual sería un aporte importante en la creación de sistemas de producción de semilla nacional de girasol.

LITERATURA CITADA

- Abadie T. y A. Berretta. 2010. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. In: PROCISUR (Eds.). Estrategia en los recursos fitogenéticos para los países del cono sur PRO CISUR/IICA. Montevideo, Uruguay. pp. 85- 97.
- Acquaah G. 2012. Principles of plant genetics and breeding. Segunda Edición. Editorial Wiley-Blackwell. 758 p.
- Ávila J. 2009. Manual para el cultivo del girasol. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Portuguesa. Maracay, Venezuela. 53 p.

- Cantamutto M., M. Poverene, A. Presotto, I. Fernández, A. Gutiérrez, S. Ureta y M. Casquero. 2010. ¿Está domesticado el girasol? *Ciencia Hoy* 20:20-29
- Carvalho C. and J. Toledo. 2008. Extracting female inbred lines from commercial sunflower hybrids. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43:1.159-1.162
- Dellaporta, S., J. Wood and J. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: versión II. *Plant Mol Biol. Rep.* 1:19-21.
- FEDEAGRO. 2014. Estadísticas agropecuarias. Disponible en línea: www.fedeagro.org. [Feb. 11, 2014].
- Fernández H., E. Soto, E. Salazar y M. Betancourt. 2010. Análisis RAPD entre y dentro de poblaciones derivadas de girasol silvestre x cultivado. *Agronomía Trop.* 60(3):263-269.
- Hintum T. 1995. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. **In:** Hodgkin, T., Brown, A., Hintum, T, Morales, E. (Eds.). *Core collections of plant genetic resources* pp. 23-24. John Wiley and Sons. New York, EE. UU.
- IBPGR. 1985. Descriptors for cultivated and wild sunflower. *AGPG./85/54*, Roma.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). 2013. Estadísticas sociales. Consumo de alimentos. Disponible en línea: <http://www.ine.gob.ve>. [May. 17, 2013].
- Kholghi M., I. Bernousi, R. Darvishzadeh, A. Pirzad and H. Hatami. 2010. Collection, evaluation and classification of Iranian confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations using multivariate statistical techniques. *African Journal of Biotechnology* 10:5.444-5.451.
- Laurentin H. 2011. *Genética Agrícola*. Editorial Académica Española. Saarbrücken, Alemania. 233 p.
- Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (MPPAT). 2012. Memoria y cuenta del Ministerio del Poder Popular para Agricultura y Tierras, 2010. Caracas, Venezuela.
- Soto E. 2005. El cultivo del girasol en Venezuela. *Revista Digital CENIAP Hoy* 9.
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). 1978. *Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales*. Ginebra, Suiza. Disponible en línea: <http://www.upov.int/export/sites/upov/upovlex/es/conventions/1978/act1978.pdf>. [Jun. 03, 2014].