



Citogenética clásica y molecular en girasol

Rocco, M.1, 2, Hopp, E.1, Poggio, L.2
1 Instituto de Biotecnología-CICV y A-CNIA-INTA Castelar
2 Laboratorio de Citogenética y Evolución-FCEN-UBA y CIGEN (CONICET-CIC-UNLP)

Introducción:

El girasol cultivado posee $2n=34$ cromosomas, postulándose un número básico $x=17$. Se propone que $x=17$ sería un número básico derivado siendo Vigueira ($x=8$) y otro género desconocido ($x=9$) sus probables progenitores. Tratamiento con soluciones diluidas de colchicina que revelan homeologías crípticas apoyaron la hipótesis de un origen poliploide. Los rearrreglos estructurales han sido importantes en la especiación del género. Distintas especies difieren en una o más translocaciones recíprocas e inversiones paracéntricas y pericéntricas. Los rearrreglos podrían actuar como mecanismos de aislamiento reproductivo y podría tener algún tipo de valor adaptativo manteniendo supergenes. Los estudios meióticos en híbridos han sido una importante herramienta para analizar las relaciones interespecíficas en el género.

La complejidad taxonómica del género, se debe fundamentalmente a la hibridación natural y al intercambio interespecífico de genes por retrocruzamientos repetidos (introgresión), fenómenos que no sólo aumentan la variación genética en ciertas especies, sino que también permiten a estas especies ampliar su rango de distribución. *H. annuus* ha expandido su rango de distribución por introgresión con especies nativas adaptadas localmente.

La variación en el tamaño del genoma es significativo entre muchas especies del género y entre cultivares del girasol. En distintos genotipos de *H. annuus* se han citado: 4.9 - 9.9 pg. Estas diferencias deben ser analizadas para conocer su causa y probable significado adaptativo.

En el género hay pocos análisis cariotípicos completos y no ha sido posible detectar en ellos los rearrreglos que diferencian a muchas de las especies. Los marcadores citológicos que se han utilizado han permitido agrupar cromosomas pero aun no ha sido posible identificar cromosomas individuales. Aunque el bandeo cromosómico puede, en algunos casos, ayudar a este reconocimiento, es de suma importancia realizar mapeo físico mediante hibridación in situ (FISH) utilizando como sonda secuencias de ADN repetido, oligonucleótidos sintéticos y/o bandas RAPDs de girasol o especies relacionadas. Este método ha dado excelentes resultados en trigo, centeno, maíz, y otras especies de interés económico.

Objetivos: Realizar estudios cromosómicos clásicos y moleculares en distintas variedades de girasol y especies silvestres relacionadas con la finalidad de caracterizarlas y obtener marcadores cromosómicos que permitan individualizar grupos de cromosomas o cromosomas individuales y obtener mapas físicos útiles en programas de mejoramiento y en estudios evolutivos y filogenéticos.

Para cumplir con estos objetivos se realizaron a) cariotipos convencionales

(Feulgen y bandeo fluorescente) en distintas variedades de girasol cultivado; b) luego de optimizar para girasol técnicas de hibridación in situ (FISH, GISH), aplicadas en otros cultivos, se utilizaron las mismas para localizar, en distintos cromosomas, secuencias presentes en clones genómicos que contribuyan a la elaboración de un mapa genético y físico del girasol y permitan detectar afinidades intra e interespecíficas

Materiales y Métodos

Materiales

Se utilizaron semillas de cinco variedades de girasol cultivado (*Helianthus annuus* L) y una especie silvestre (*Helianthus petiolaris*). Dos variedades cultivadas Paraíso 20 y Paraíso 30 son dos híbridos simples no relacionados entre sí. Las otras líneas utilizadas fueron Charata INTA, Confitura y V 94.

Métodos

a) Se utilizaron ápices meristemáticos de raíces previamente germinadas y pretratadas con colchicina 0,05%, fijadas en Mezcla de Farmer y conservadas en freezer a -20°C . Para facilitar la realización de los extendidos cromosómicos se trataron los ápices radiculares con una solución enzimática de celulosa y pectinasa.

b) Se realizaron estudios de morfología de cromosomas mitóticos mediante técnicas citogenéticas convencionales (Feulgen) y de bandeo cromosómico DAPI

c) Hibridación in situ; Se utilizaron como sondas 1) pTa71: sonda de 9kb proveniente de *Triticum aestivum* conteniendo las secuencias 18s, 5.8s y 26s de ADN ribosomal (Gerlach & Bedbrook 1979); 2) sondas generadas por PCR utilizando primers específicos para la secuencia a amplificar.

Todas estas secuencias de ADN serán marcadas con digoxigenina o biotina, por los métodos de nick-translation o random primer siguiendo las instrucciones de los

fabricantes. Una vez estimado el rendimiento de la marcación se procederá a la realización de la hibridación in situ cuyos principales pasos son:

preparación y marcado de la sonda
reacción de hibridación entre la sonda y el ADN blanco
remoción de la sonda que no hibridó o que se unió de manera inespecífica
detección visual de los sitios de hibridación.

Resultados y Conclusiones

Se analizó el cariotipo de las variedades Paraíso 20, Paraíso 30, Charata INTA, Confitura y V 94 encontrándose un cariotipo similar, consistente en 8 pares de cromosomas m, 4 pares sm y 5 pares st (Figura 1)

El bandeo DAPI mostró muy pocas bandas útiles para caracterizar cromosomas o genomas a nivel intraespecífico o entre especies relacionadas al girasol cultivado (Figura 1)

Las técnicas de citogenética molecular (FISH, GISH) revelaron ser potencialmente útiles para la caracterización cromosómica en un gran número de especies vegetales. Se demostró que, con un adecuado tratamiento enzimático de las raíces se pudieron obtener preparaciones adecuadas para realizar estas técnicas en girasol con los siguientes resultados:

1) Todas las variedades de *Helianthus annuus* estudiadas poseen 3 pares de cromosomas con constricción secundaria que son distinguibles por su tamaño y morfología. (Fig. 1) Con la técnica de FISH utilizando como sonda pTa 71 de *Triticum aestivum* (Gerlach & Bedbrook, 1979) se encontraron 6 señales conspicuas de hibridación. (Fig. 2, A-D) En la variedad confitero las señales presentaron diferencias en la intensidad pues dos señales son notoriamente más débiles, sugiriendo que poseen un menor número de copias de las secuencias repetidas que conforman la región rDNA. (Figura 2, E-F). Es interesante señalar que estas secuencias son altamente conservadas ya que las señales fueron muy intensas utilizando como sonda un ADN de un grupo taxonómico relativamente poco emparentado

2) Se realizó FISH con una secuencia repetida cuya localización cromosómica era desconocida (clon 785). Se observó que la misma se distribuye en forma no homogénea sobre casi todos los cromosomas de girasol (Figura 3, A-B) Utilizando alta exigencia de hibridación en los experimentos de hibridación in situ, esta sonda promete ser un marcador citológico de utilidad en cromosomas metafásicos. En este estudio hemos podido corroborar que algunos cromosomas de igual tamaño y morfología presentan distribución diferencial de estas secuencias, las cuales serían útiles para su reconocimiento (Fig. 3, C-E)

3) La especie *H. petiolaris* es muy afín al girasol, ya que las líneas de girasol cultivadas con aloplasmia androestéril poseen las mitocondrias que confieren esterilidad masculina por cruzamiento interespecífico seguido de introgresión de *H. petiolaris*. Con la finalidad de analizar la afinidad molecular a nivel de ADN repetido entre ambas especies se realizaron experimentos de GISH utilizando ADN genómico marcado de *H. petiolaris* sobre cromosomas de girasol. Se observó una señal de hibridación sobre todos los cromosomas.

(Figura 4) Sin embargo esta señal es más débil en algunos sectores y brazos cromosómicos, sugiriendo que aunque existe una elevada afinidad entre ambas especies hay zonas que evidencian divergencia, ocurrida probablemente durante el proceso de domesticación del girasol.

La búsqueda de marcadores cromosómicos en girasol es necesaria para resolver problemas taxonómicos, filogenéticos y evolutivos. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que distintas secuencias de ADN repetido o ADN genómico permitirán realizar una identificación más precisa de los cromosomas de girasol. Estos estudios serán de utilidad para analizar la distribución espacial de los distintos genomas en el núcleo, analizar el origen del girasol y su afinidad con especies silvestres relacionadas, detectar la composición genómica remanente en híbridos interespecíficos en el marco de programas de mejoramiento, localización de transgenes e introgresión en prácticas biotecnológicas y de interés agronómico.

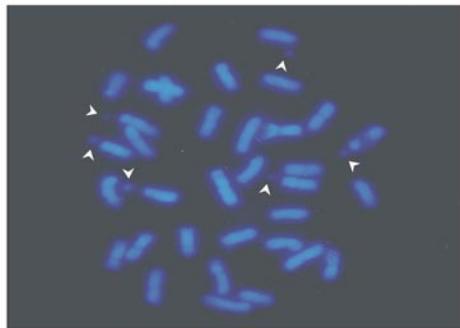
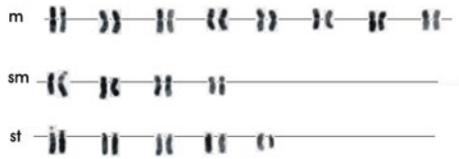
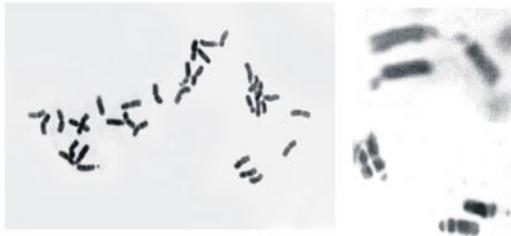


FIGURA 1

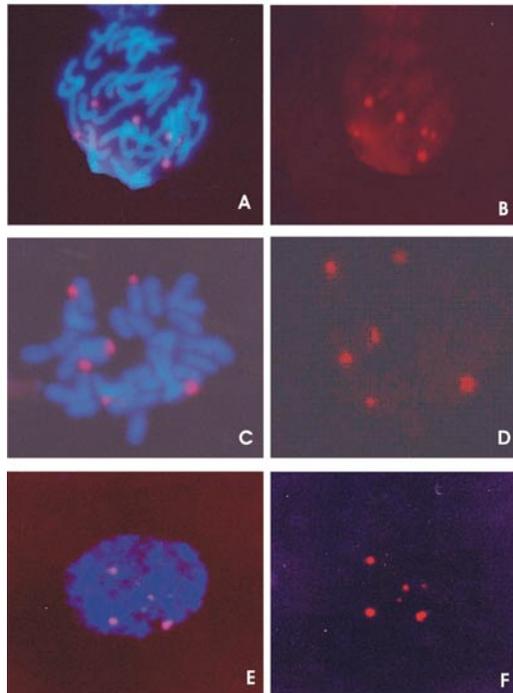


FIGURA 2

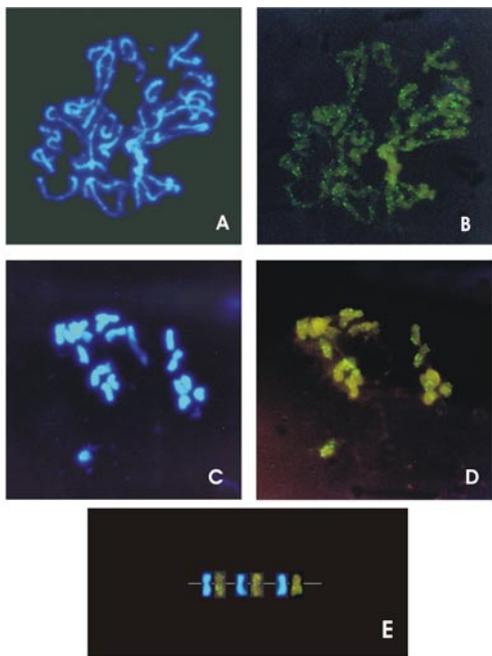


FIGURA 3

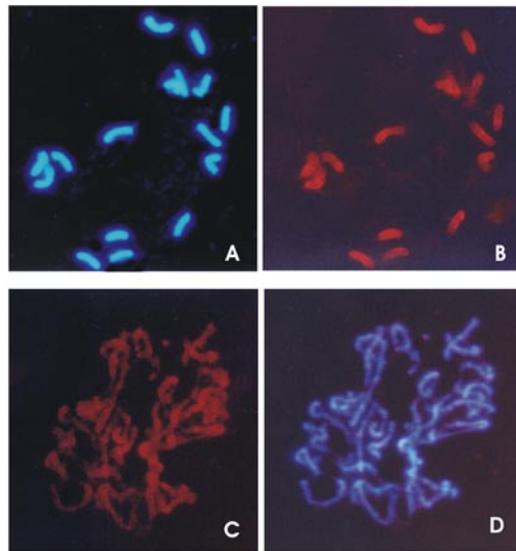


FIGURA 4