



GENERACIÓN DE LÍNEAS Y VARIEDADES SINTÉTICAS DE GIRASOL ALTO OLEICAS MEDIANTE SELECCIÓN RECURRENTE Y MOLECULAR

GENERATION OF LINES AND SYNTHETIC HIGH-OLEIC VARIETIES OF SUNFLOWER BY RECURRENT AND MOLECULAR SELECTION

Miguel Hernández-Martínez¹, Ana Paulina Rodríguez-Vera¹,
Micaela de la O-Olán² y Víctor Montero-Tavera^{1*}

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México. ²INIFAP, Campo Experimental Valle de México, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia (montero.victor@inifap.gob.mx)

RESUMEN

El girasol (*Helianthus annuus*) es originario del centro y norte de México, Estados Unidos y el sur de Canadá; sin embargo, la industria aceitera mexicana importa de Argentina, Estados Unidos y Canadá el 95 % del grano. El mercado demanda aceite tipo alto oleico por sus beneficios a la salud y estabilidad durante el freído, por lo que las empresas impulsan agricultura por contrato para su siembra a productores interesados; sin embargo, dado que no se han generado variedades alto oleicas mexicanas, el agricultor debe asumir un alto costo por el uso de semilla híbrida de empresas transnacionales. Por lo anterior, en el presente estudio se planteó como objetivo desarrollar variedades alto oleicas mediante la aplicación de marcadores moleculares asociados con la mutación de Pervenets que origina el genotipo *Ol* y el fenotipo alto oleico; para ello se aplicó el método de mejoramiento denominado selección recurrente entre progenies autofecundadas (SREPA). Con esta metodología se obtuvieron 54 líneas alto oleicas S_4 y variedades sintéticas de ciclo precoz, intermedio y tardío, las que se evaluaron en cuatro municipios y cinco ambientes. Los resultados mostraron rendimiento de hasta 3.4 t ha⁻¹ y porcentaje de aceite oleico entre 90.1 y 93.1 %, comparables con los mejores híbridos comerciales alto oleicos usados como testigos.

Palabras clave: *Helianthus annuus*, ácido oleico, ácido linoleico, F4/R1, Pervenets, SREPA.

SUMMARY

Sunflower (*Helianthus annuus*) is native to Central and Northern Mexico, the United States and Southern Canada; however, the Mexican oil industry imports 95 % of the grain from Argentina, the United States and Canada. The market demands high-oleic type oil for its health benefits and stability during frying, thus, companies promote contract farming for planting to interested producers; however, since high-oleic Mexican varieties have not been generated, the farmer must assume a high cost for the use of hybrid seed from transnational corporations. Therefore, the objective of this study was set to develop high-oleic varieties by applying molecular markers associated to the Pervenets mutation that causes the *Ol* genotype and the high-oleic phenotype. For this purpose, the breeding method called recurrent selection among self-fertilized progenies (SREPA) was applied. With this methodology, 54 high-oleic S_4 lines and synthetic varieties of early, intermediate and late cycle were obtained, which were evaluated in four municipalities and five environments. The results showed yield of up to 3.4 t ha⁻¹ and oleic oil percentage between 90.1 and 93.1%, comparable to the best high oleic commercial hybrids used as controls.

Index words: *Helianthus annuus*, F4/R1, linoleic acid, oleic acid, Pervenets, SREPA.

INTRODUCCIÓN

México es centro de origen y de diversidad del girasol, el cual está constituido por 49 especies (Bye *et al.*, 2009), 12 anuales y 37 perennes, además de 19 subespecies (Rieseberg y Seiler, 1990), todas originarias de América. El hábitat natural del girasol es desde el centro y norte de México (Lentz *et al.*, 2001) hasta el sur de Canadá (Harter *et al.*, 2004). El Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos de México considera que solo se ha colectado el 25 % de la diversidad genética del girasol silvestre (SINAREFI, 2016), lo que demuestra que en México se le ha dado poca importancia a este género, pues debe competir con cultivos básicos e industriales como frijol, maíz y trigo (Hernández, 2011).

Actualmente, el conflicto bélico entre Ucrania y Rusia ha incrementado hasta en 60 % el costo del aceite comestible en el mundo y el costo de la semilla híbrida para siembra, ya que cada uno de esos países aporta el 30 % de la producción mundial. México es deficitario en grano de girasol, por lo que importa el 90 % de Argentina y Estados Unidos. A partir del año 2006 las empresas aceiteras promueven la siembra del cultivo de girasol alto oleico (ANIAME, 2019; Com. Pers.)¹ por su alto contenido de aceite de tipo omega 9; es decir, ácido oleico (Akkaya, 2018). En México, los estados donde se siembra la mayor superficie son Sonora, Jalisco, Guanajuato, Zacatecas, Durango y Tamaulipas (SIAP, 2020) con 12,000 hectáreas sembradas bajo agricultura por contrato. En Guanajuato, durante el periodo 2016-2019, se sembraron 1200 hectáreas con una

¹ANIAME, Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles (2019) Girasol, situación actual mundial y nacional. Boletín bimestral No. 18. Comité Nacional Sistema Producto Oleaginosas. Ciudad de México, México.

cosecha promedio anual de 3180 toneladas de girasol, con un rendimiento de 2.65 t ha⁻¹ (SIAP, 2020). El 30 % de la superficie se siembra bajo riego en el ciclo otoño invierno y el 70 % en primavera-verano bajo condiciones de temporal, en los cuales los rendimientos promedios son de 3.0 y 2.4 t ha⁻¹ para riego y temporal, respectivamente (Hernández, 2011).

La generación de variedades de girasol alto oleicas ha tenido un amplio crecimiento a partir de la obtención por mutagénesis química de la variedad Pervenets (Soldatov, 1976), cuyo gen microsómico *FAD2-1* expresado en semilla lleva un repetido en tándem separado por un espaciador intergénico de 2.67 kpb. El repetido río arriba (*FAD2-1U*) lleva un intrón de 1.69 kpb y el exón 1 en el extremo 5', mientras que el repetido río abajo (*FAD2-1D*) pierde las primeras 1.54 kpb del extremo 5' que incluyen el exón 1 y un fragmento del intrón 1 (Bervillé, 2010; Schuppert *et al.*, 2006), ocasionando que la enzima oleoyl-PC desaturasa ($\Delta 12$ -desaturasa), encargada de la conversión de ácido oleico (18:1) a ácido linoleico (18:2), se traduzca de manera inestable ocasionando la acumulación de ácido oleico (Martínez-Rivas *et al.*, 2001) e incrementando su contenido de 30 a más de 70 % (Lacombe *et al.*, 2004). De esta manera, Pervenets fue la primera variedad de girasol alto oleico estable y se tomó como fuente de la mutación por inserción para generar nuevas variedades alto oleicas. Schuppert *et al.* (2006) y Bilgen *et al.* (2018) desarrollaron marcadores de tipo SSR e INDEL para identificar la mutación de Pervenets y hacer posible la incorporación de esos genotipos en el desarrollo de variedades alto oleicas.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar las primeras variedades de girasol mexicanas alto oleicas a partir de híbridos donadores de la mutación de Pervenets, bajo la hipótesis de que la aplicación del método de mejoramiento selección recurrente entre progenies autofecundadas (SREPA), del método de selección genealógica y la selección asistida por marcadores moleculares (SAM), permite la identificación y selección de genotipos alto oleico con potencial de rendimiento y fitosanidad comparables a los híbridos progenitores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

El material genético se obtuvo a partir de generaciones avanzadas de un híbrido portador de la mutación de Pervenets (Syngenta 3950) mediante la aplicación de selección recurrente entre progenies autofecundadas (SREPA), propuesta por Benítez-Riquelme (2002), en el Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Celaya, Guanajuato. También se hizo selección genealógica combinada entre y dentro de familias (Márquez, 1988) y se empleó selección asistida por marcadores moleculares (SAMM) para formar una población sintética de girasol oleica de ciclo precoz (PSGOC-P), otra de ciclo intermedio (PSGOC-I) y una más de ciclo tardío (PSGOC-T). Como testigos principales se usaron los híbridos comerciales P64H-118 y P64H-133 (precozes), Hornet (de ciclo intermedio) y Syn 3950 (tardío); además, los nuevos materiales genéticos se compararon con las variedades Bienvenido Paisano, Madero 91, Cobalto y Victoria, liberadas por el INIFAP. A continuación, se describe la metodología empleada en tres años para la generación del material genético.

Evaluación del material genético

Ciclo 1

En el ciclo primavera-verano 2020 (P-V), se sembró la F₁ del híbrido alto oleico (AO). Al iniciar la floración se autofecundaron 20 plantas, cuya semilla representó la F₂ que se cosechó en forma individual.

Ciclo 2

En el ciclo otoño-invierno 2020-2021 (O-I) se sembraron 20 semillas de cada autofecundación por surco, a los 25 días de germinada se aplicó selección asistida por marcadores moleculares (SAMM) tomando muestras de tejido foliar de cada planta para identificar al menos 300 plantas alto oleicas en el laboratorio, las cuales una vez identificadas se marcaron en el campo y al inicio de la floración se autofecundaron cubriendo el capítulo e identificando su ciclo de vida (precozes, intermedias y tardías), tomando los datos de días a floración, altura de planta, diámetro de capítulo, fitosanidad (en cada ciclo se seleccionaron segregantes con tolerancia a enfermedades foliares conocidas como 'de fin de ciclo' causadas por *Verticillium dahliae* y *Alternaria helianthis*) y el rendimiento de cada capítulo; posteriormente, en laboratorio se midió el contenido de aceite en porcentaje. Se aplicó una presión de selección del 20 % para seleccionar las 60 mejores precozes, 60 mejores intermedias y 60 mejores tardías; dicha selección fue por el mayor rendimiento, mayor contenido de aceite, sanidad, y por características agronómicas sobresalientes. De la semilla obtenida, una parte se preparó para los ensayos de rendimiento en el siguiente ciclo y otra parte se guardó como semilla remanente.

La identificación molecular de los genotipos alto oleicos se basó en el uso de iniciadores específicos de tipo INDEL

que se alinean con un fragmento del espacio intergénico río arriba de la inserción y con un fragmento del repetido *FAD2-1D* que se encuentra río abajo del sitio de unión del repetido (Scuppert *et al.*, 2006); por ello, los genotipos que poseen la mutación amplifican por PCR un fragmento de 653 pb; en cambio, los fragmentos sin la inserción del repetido no amplifican ningún fragmento.

Los iniciadores usados fueron FAD2-1-F4/FAD2-1-R1, cuyas secuencias son: F4 5'-GTAACGTCTGCGCGCTTGCAGACATCA-3', R1 5'-GGTTTTGCATGAGGGACTCGATCGAGTG-3' (Schuppert *et al.*, 2006). El ADN genómico se extrajo por el método de Doyle y Doyle (1987) a los 25 días después de la germinación. Para las reacciones de PCR se formaron soluciones equimolares del ADN de tejido foliar de cinco plantas establecidas en campo en los primeros tres ciclos de selección (S_1 a S_3), y se usó el ADN genómico de plantas individuales en el último ciclo de selección (S_4). La concentración del ADN se ajustó a 30 ng μL^{-1} . La calidad del ADN se verificó por la relación espectrofotométrica 269/280 y por amplificación de un fragmento del gen constitutivo 26S siguiendo las indicaciones de Montero-Tavera *et al.* (2017). Las reacciones con los iniciadores F4/R1 se llevaron a cabo en volúmenes de 20 μL con las especificaciones de Bilgen (2018), con las únicas modificaciones de emplear 60 ng de ADN y 35 ciclos de reacción. Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5 % teñidos con naranja de acridina.

Ciclo 3

En el ciclo P-V 2021 se sembraron tres ensayos de rendimiento bajo riego, cada uno con las 60 mejores progenies S_1 alto oleicas (precoces, intermedias y tardías), en comparación con los testigos Pioneer 64H-118, Pioneer 64H-133, Cobalto, Syngenta 3950, Madero 91 y Bienvenido Paisano, en un diseño de látice triple. En floración se autofecundó cada progenie para avanzar de S_1 a S_2 . Una vez cosechados los capítulos, se desgranó, se pesó, se ordenó de mayor a menor y se aplicó una presión de selección del 30 % con el fin de seleccionar las de mayor rendimiento de grano y contenido de aceite; es decir, 18 progenies S_2 alto oleicas (precoces, intermedias y tardías). Se verificó por marcadores moleculares que todas las progenies amplificaran el fragmento que identifica el carácter alto oleico y se guardó el remanente de semillas.

Ciclo 4

En el ciclo O-I 2021-2022 con la semilla remanente

de las 18 mejores progenies S_2 (precoces intermedias y tardías) seleccionadas, se establecieron tres lotes aislados diferenciados por fecha (cada 10 días); cada lote constó de tres fajas, en cada faja se sembraron seis progenies S_2 con 20 plantas en surcos de 5 m de largo y 0.80 m de ancho. Para recombinar los materiales al iniciar la floración se recolectó polen de cada faja y se polinizaron las fajas complementarias. Se eliminaron plantas no deseables o atípicas y a la cosecha de cada capítulo se tomaron 50 semillas para formar tres poblaciones: población sintética de girasol oleica de ciclo precoz (PSGOC-P), de ciclo intermedio (PSGOC-I) y tardía (PSGOC-T), generando una variedad sintética precoz, una intermedia y otra tardía. En paralelo, se avanzaron las selecciones oleicas de S_2 a S_3 (18 de cada ciclo) por medio de un tercer ciclo de autofecundación, para posteriormente integrar tres ensayos con genotipos precoces, intermedios y tardíos, participando las líneas oleicas S_3 y las tres variedades sintéticas oleicas.

Ciclo 5

En el ciclo P-V 2022 se establecieron por segundo año consecutivo tres ensayos uniformes de rendimiento: el de genotipos precoces (18 genotipos S_3 precoces y la PSGOC-P), el ensayo de genotipos intermedios (18 genotipos S_3 y la PSGOC-I) y el ensayo de genotipos tardíos (18 genotipos S_3 y la PSGOC-T). En cada ensayo se incluyeron los testigos comerciales; el diseño fue bloques completos al azar con tres repeticiones con parcela útil de un surco de 5 m de largo por 0.80 m de ancho. Se usaron cuatro localidades de evaluación: en Celaya, Guanajuato los tres ensayos se evaluaron bajo condiciones de riego y temporal, en esta localidad se avanzaron los 18 genotipos de S_3 a S_4 de cada ensayo y se realizó caracterización varietal con base en las directrices de examen de la UPOV TG/81/6 (UPOV, 2000); la segunda localidad fue en el municipio de Apaseo el Alto, Guanajuato, donde se estableció el ensayo de genotipos precoces bajo condiciones de temporal; la tercera localidad fue Jerécuaro, Guanajuato, donde se estableció el ensayo de genotipos intermedios bajo condiciones de temporal; la cuarta localidad fue Acámbaro, Guanajuato, donde se sembró el ensayo de genotipos tardíos bajo condiciones de temporal. A los 25 días de establecidos los ensayos en Celaya se colectó tejido foliar para verificar por marcadores moleculares la característica de alto oleico en todos los genotipos evaluados.

De los resultados de las evaluaciones de las localidades se seleccionó por rendimiento, sanidad y porcentaje de aceite de al menos 38 % y, dentro de este porcentaje, que más del 90 % del contenido de aceite fuera ácido oleico.

Manejo agronómico de los ensayos y lote de caracterización varietal

La preparación del terreno se hizo con labranza tradicional. La distancia entre plantas fue de 25 cm. La fórmula de fertilización fue 80-40-00 en temporal y en riego, con un calendario de riegos a los 0-35-70-110 días después de la siembra. Las malezas se controlaron mediante el herbicida Premerling (trifluralina) de pre-emergencia con dosis de 2.0 L ha⁻¹. Para el control de plagas se aplicó cipermetrina en dosis de 1.0 L ha⁻¹.

Variables medidas en lotes de ensayos

Las variables medidas para seleccionar los mejores genotipos fueron días a la germinación (DG), medida como el número de días a partir de la siembra en húmedo hasta la emergencia de los cotiledones sobre la superficie del suelo; días a floración (DF), medida como el número de días a partir de la siembra en húmedo hasta el inicio de la floración en el tercio exterior de la inflorescencia o capítulo; altura de planta (AP) en cm, tomada con regla métrica desde el cuello del tallo sobre la superficie del suelo hasta la parte media del capítulo o inflorescencia; diámetro de capítulo (DC) en cm, medido con regla métrica de 50 cm en la parte media del capítulo; días a madurez fisiológica (DMF), medida como el número de días a partir de la siembra en húmedo hasta que el envés del capítulo adquirió un color amarillo y las brácteas un color blanco; rendimiento de

grano (RG) en g, medido en báscula de precisión como el peso de la semilla desgranada de la parcela útil; contenido de aceite (CA), expresado como el porcentaje de aceite total con respecto al peso de grano. Las determinaciones de ácidos grasos las hizo la compañía Aceites del Mayo S.A. de C.V. empleando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard®, HP-5890, Palo Alto, California, EUA).

Variables agroclimáticas consideradas en ensayos

Durante el desarrollo del cultivo se monitorearon las temperaturas máximas, mínimas y precipitación con una estación meteorológica establecida en el INIFAP, Campo Experimental Bajío en Celaya, Guanajuato (20.579511, -100.820516).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el segundo año del cultivo se inició la primera selección asistida y se identificaron 300 segregantes alto oleicas a partir de 20 autofecundaciones F₂ (Figura 1). Durante el avance generacional por autofecundación hasta S₄ solamente se seleccionaron como positivos oleicos aquellos genotipos que amplificaron un alto número de copias del fragmento que identifica la mutación de Pervenets en tres repeticiones, suponiendo que los homocigotos para la mutación (dos copias) amplifican por PCR un número mayor de copias del fragmento que los heterocigotos (una copia), para tener una alta probabilidad

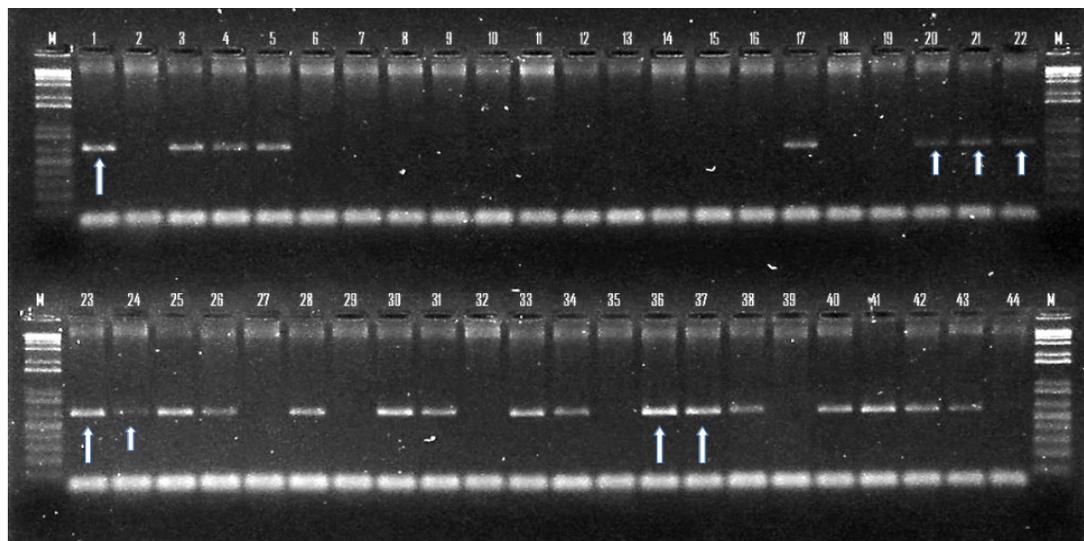


Figura 1. Gel de agarosa que muestra fragmentos amplificados de individuos segregantes para el carácter alto oleico. Las flechas señalan el fragmento de 653 pb asociado con la mutación de Pervenets, las flechas largas indican que los individuos con amplificación similar a la señalada se seleccionaron para su avance generacional, las flechas cortas indican que individuos con amplificación similar, o sin amplificación, se descartaron. El primero y último carril contienen el marcador de peso molecular 1 kb Plus.

de que ese alelo se encontrara en estado homocigótico en todas las plantas (Figura 2); de esta manera, se seleccionaron los genotipos alto oleicos, quedando finalmente 40 de ciclo precoz, 33 de ciclo intermedio y 35 de ciclo tardío. Los genotipos así identificados pueden emplearse como progenitores alto oleicos o desarrollarlos como variedades alto oleicas.

Genéticamente, la mutación de Pervenets se ha reportado como un carácter dominante, recesivo o codominante, dependiendo del fondo genético del girasol estudiado (Lacombe y Bervillé, 2000); sin embargo, se comporta como un carácter codominante con respecto a la biosíntesis de ácido oleico, estimada como la proporción de ácido oleico con respecto al contenido total de ácidos grasos, por lo que para la mayor producción oleica se requiere su presencia en estado homocigótico; por esta razón, es posible asignar tres fenotipos a la presencia o ausencia de la mutación: alto oleico cuando la mutación se encuentra en estado homocigótico, medio oleico si se encuentra en estado heterocigótico y linoleico en ausencia de la mutación.

Estos fenotipos podrían corresponder a los tres fenotipos observados por electroforesis en los geles de agarosa: una banda con alto número de copias del fragmento amplificado es el estado homocigótico de la mutación, una banda con número bajo de copias es el estado heterocigótico y la ausencia de banda indica la ausencia de la mutación (Figura 1). Dado que la alta producción de ácido oleico requiere el estado homocigótico de la mutación, se debe tener precaución de sembrar el girasol alto oleico separado de lotes que contengan girasol no oleico, con el fin de evitar polinización cruzada, ya que la alta producción de ácido oleico se podría perder en solo una generación.

El gen oleato desaturasa 2 codifica para la enzima microsómica 1-acyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfolina $\Delta 12$ -desaturasa, que es la responsable de la conversión de ácido oleico a ácido linoleico (Martínez-Rivas *et al.* 2001). La secuencia de este gen contiene dos exones y un intrón. La mutación de Pervenets es una inserción que se localiza justo después del espaciador intergénico y contiene un fragmento del intrón y un fragmento del exón 2. Esta característica permitió el desarrollo de marcadores de tipo ISSR e INDEL dirigidos particularmente a la identificación del exón repetido; entre los marcadores más utilizados se encuentran los de tipo RAPD OP-AC10765 y OP-F15690 identificados por Dehmer y Friedt (1998), el RFLP $\Delta 12$ HOS identificado por Lacombe y Bervillé (2001), los de tipo INDEL (F1 a F14 y R1 a R13) desarrollados por Schuppert *et al.* (2006), así como el SSR N1-3F/N1-1R desarrollado por Bervillé *et al.* (2009); sin embargo, el marcador más útil ha sido el fragmento de 653 pb amplificado por los iniciadores específicos F4/R1 de Schuppert *et al.* (2006). En este trabajo se probaron varios de ellos (datos no mostrados), pero F4/R1 fueron los únicos iniciadores que permitieron discriminar inequívocamente genotipos alto oleicos de genotipos linoleicos.

La metodología aplicada permitió obtener las variedades sintéticas de ciclo precoz, intermedio y tardío que se nombraron PSGOC-P, PSGOC-I y PSGOC-T, respectivamente.

La generación de nuevas variedades alto oleicas se ha centrado en la alta proporción de ácido oleico en comparación con los ácidos linoleico y linoléico, considerando que una variedad oleica contiene 70 % o más de ácido oleico, aunque pueden existir variaciones debidas al fondo genético de los materiales o al ambiente,

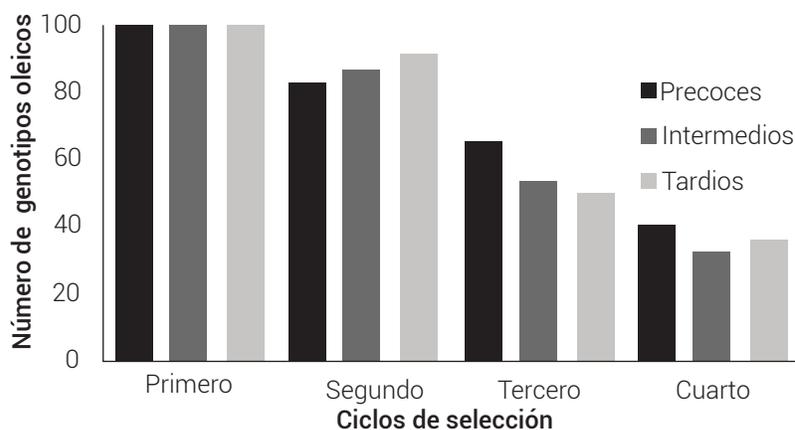


Figura 2. Selección de genotipos alto oleicos a través de cuatro ciclos de selección molecular. Los genotipos seleccionados al final del cuarto ciclo tienen alta probabilidad de ser homocigóticos para el carácter alto oleico por el tipo de selección que se aplicó.

sobre todo en las temperaturas nocturnas (Alberio *et al.*, 2018). En este trabajo se obtuvieron proporciones de ácido oleico de hasta 93 % en la variedad sintética precoz y 92 % en líneas avanzadas, lo que las hace comparables con las variedades denominadas ultraoleicas, que contienen alrededor de 95 % de ácido oleico (Alberio *et al.*, 2016). La línea avanzada Ha-AO-186 fue sobresaliente, ya que es precoz (73 días a floración), la de mejor rendimiento entre las líneas precoces (2825 kg ha⁻¹) y alta productora de ácido oleico (91.2 %).

La literatura dedicada al estudio del girasol alto oleico presta poca atención al rendimiento de grano de las variedades alto oleicas en diferentes condiciones de cultivo (Attia *et al.*, 2021; Ebrahimian *et al.*, 2019; Sing *et al.*, 2022). La cantidad total de aceite oleico que se obtiene de un lote productivo depende del porcentaje de ácido oleico, pero también de la cantidad de grano cosechada (Göksoy *et al.*, 2020). En esta investigación se identificaron líneas avanzadas precoces, intermedias y tardías con mayor rendimiento, tanto en riego como temporal, que los testigos comerciales (Cuadros 1, 2 y 3).

Paralelamente a la formación de variedades sintéticas, se avanzaron generacionalmente las líneas alto oleicas hasta S₄, las cuales se evaluaron por su contenido de aceite y rendimiento. Los resultados se muestran en los Cuadros 1 a 4.

En el Cuadro 1 se muestran las cinco mejores líneas de girasol de ciclo precoz (Ha-AO-186, Ha-AO-184, Ha-AO-107, Ha-AO-132 y Ha-AO-16); son alto oleicas, presentaron promedio de rendimiento de 2300 kg ha⁻¹, son similares en precocidad, días a floración (DF), diámetro de capítulo (DmC) y altura de planta (AP), pero superan en rendimiento a los mejores testigos (Pioneer 64H-118 y Cobalto). La variedad sintética PSGOC-P obtuvo un rendimiento promedio de 2149 kg ha⁻¹, situándose dentro del primer grupo estadístico.

En el Cuadro 2 se muestra el resultado del rendimiento de grano del ensayo de variedades alto oleicas de ciclo intermedio en tres ambientes de evaluación, así como las características agronómicas promedio de las cinco mejores variedades (Ha-AO-72, Ha-AO-90, Ha-AO-117, Ha-AO-214 y Ha-AO-156), que presentan rendimiento de 2500 a 2700 kg ha⁻¹, comparables con los mejores testigos híbridos como Syngenta 3950 y Cobalto. La variedad sintética precoz (PSGOC-I) obtuvo un promedio de rendimiento de 2408 kg ha⁻¹ y se encuentra dentro del primer grupo estadístico.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de rendimiento de grano en los tres ambientes de evaluación; destacan

seis variedades tardías (Ha-AO-206, Ha-AO-24, Ha-AO-25, Ha-AO-56, Ha-AO-75 y Ha-AO-104) con rendimiento de 2600 a 2800 kg ha⁻¹, similar a los de Syngenta 3950, Syngenta 3965 y Hornet, que fueron los mejores testigos híbridos; además, la variedad sintética tardía PSGOC-T obtuvo un promedio de rendimiento de 2488 kg ha⁻¹, por lo que se encuentra en el primer grupo estadístico.

En el Cuadro 4 se muestra el contenido de aceite y el porcentaje de ácido oleico de las cinco mejores variedades precoces, intermedias y tardías. Se observa que el contenido de aceite es mayor de 40 % y de este, más de 90 % es ácido oleico. Las variedades sintéticas presentaron valores ligeramente más altos en porcentaje de aceite total y porcentaje de aceite tipo oleico. También se muestran los valores de al menos un testigo híbrido comercial (T).

Los resultados demuestran que las líneas de girasol alto oleico son competitivas respecto a los testigos empleados, por lo que se han sometido al ensayo de caracterización varietal de acuerdo al descriptor TG/81/6 de la UPOV, para su registro ante el SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas) y su posible liberación.

CONCLUSIONES

Los métodos de mejoramiento SREPA, selección genealógica y selección asistida permitieron la identificación y selección de líneas avanzadas y variedades sintéticas precoces, intermedias y tardías, con buen rendimiento y alto contenido de ácido oleico. Tanto las líneas obtenidas como las variedades sintéticas fueron superiores a los testigos en contenido de aceite, porcentaje de ácido oleico y rendimiento de grano con valores hasta de 43.8 %, 93.6 % y 3450 kg ha⁻¹, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento proporcionado por el INIFAP a través del proyecto "Recursos genéticos de girasol: Generación de variedades alto oleico y forrajeras para el Centro de México".

BIBLIOGRAFÍA

- Alberio C., N. G. Izquierdo, T. Galella, S. Zuil, R. Reid, A. Zambelli and L. A. N. Aguirrezábal (2016) A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments. *European Journal of Agronomy* 73:25-33, <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.10.003>
- Alberio C., L. A. N. Aguirrezábal, N. G. Izquierdo, R. Reid, S. Zuil and A. Zambelli (2018) Effect of genetic background on the stability of sunflower fatty acid composition in different high oleic mutations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98:4074-4084, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8924>

Cuadro 1. Rendimiento de grano de 18 variedades oleicas de ciclo precoz, la PSGOC-P y testigos en tres ambientes en P-V 2022.

No.	Línea	Riego (kg ha ⁻¹) Celaya	Temporal (kg ha ⁻¹)		Promedio (kg ha ⁻¹)	D.F. (días)	D.C. (cm)	A.P. (m)
			Celaya	Apaseo				
17	Ha-AO-186	2825 a	2090 a	2220 a	2378 a	73 b	26 ab	1.82 abcd
16	Ha-AO-184	2810 a	2105 a	2170 a	2361 a	72 b	27 a	1.78 bcdef
10	Ha-AO-107	2776 a	2120 a	2128 a	2341 a	72 b	26 ab	1.77 cdef
12	Ha-AO-132	2756 a	2128 a	2055 ab	2313 a	73 b	27 a	1.74 ef
21	P64H-118 (T)	2725 a	1710 def	2010 ab	2148 ab	72 b	26 ab	1.79 bcde
1	Ha-AO-16	2690 ab	2158 a	2190 a	2346 a	70 c	25 abc	1.82 abcd
25	Cobalto (T)	2650 ab	1658 ef	1820 ab	2036 ab	78 a	25 abc	1.78 bcdef
6	Ha-AO-48	2615 ab	2000 abc	2035 ab	2216 ab	70 c	24 bcd	1.79 bcde
23	Madero 91 (T)	2600 ab	1800 bcde	1953 ab	2117 ab	72 b	25 abc	1.81 abcd
7	Ha-AO-52	2580 ab	2026 abc	2000 ab	2202 ab	70 c	26 ab	1.78 bcdef
14	Ha-AO-154	2555 ab	2025 abc	2054 ab	2211 ab	71 b	25 abc	1.84 ab
15	PSGOC-P	2545 ab	1984 abc	1920 ab	2149 ab	70 c	25 abc	1.86 a
13	Ha-AO-149	2524 ab	1960 abcd	1913 ab	2132 ab	71 b	24 bcd	1.86 a
22	P64H-133 (T)	2510 ab	1784 cde	1821 ab	2038 ab	70 c	24 bcd	1.81 abcd
18	Ha-AO-211	2495 ab	1942 abcd	1980 ab	2139 ab	71 b	23 cd	1.82 abcd
2	Ha-AO-17	2470 ab	1920 abcd	1905 ab	2098 ab	72 b	23 cd	1.84 ab
3	Ha-AO-40	2420 ab	1920 abcde	1890 ab	2076 ab	73 b	24 bcd	1.86 a
4	Gir-AO-42	2314 b	1780 cde	1825 ab	1973 ab	73 b	23 cd	1.82 abcd
24	B. Paisano (T)	2312 b	1795 cde	1825 ab	1977 ab	72 b	22 d	1.84 ab
5	Gir-AO-47	2311 b	1525 f	1690 b	1842 b	72b	25 abc	1.83 abc
19	Gir-AO-49	2311 b	1520 f	1685 b	1838 b	74 b	24 bcd	1.81 abcd
20	Hornet (T)	2306 b	1520 f	1720 b	1848 b	78 a	23 cd	1.76 def
8	Gir-AO-58	2300 b	1515 f	1680 b	1831 b	71 b	25 abc	1.79 bcde
9	Gir-AO-68	2290 b	1510 f	1655 b	1818 b	71 b	24 bcd	1.72 f
11	Gir-AO-114	2285 b	1500 f	1701 b	1828 b	68 c	22 d	1.68 f
Media testigos (T)		2517	1711	1858	2027	72	72	24
Tukey 5 %		410	250	400	410		3.7	2.1

Medias con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales. T.: testigo, D.F.: días a floración, D.C.: diámetro de capítulo, A.P.: altura de planta.

Cuadro 2. Rendimiento de grano de 18 variedades oleicas de ciclo intermedio, la PSGOC-I y testigos en tres ambientes en P-V 2022.

No.	Línea	Riego (kg ha ⁻¹) Celaya	Temporal (kg ha ⁻¹)		Promedio (kg ha ⁻¹)	D.F. (días)	D.C. (cm)	A.P. (m)
			Celaya	Apaseo				
5	Ha-AO-72	3310 a	2139 a	2700 a	2716 a	79 ab	26 bc	1.88 abc
6	Ha-AO-90	3270 a	2220 a	2745 a	2745 a	80 a	28 a	1.82 cdef
24	Hornet (T)	3235 a	1628 cd	2000 bcd	2287 ab	78 abc	26 bc	1.91 a
7	Ha-AO-117	3190 a	2100 ab	2640 a	2643 ab	80 a	27 ab	1.82 cdef
18	Ha-AO-214	3165 a	2000 abc	2508 a	2557 abc	77 bcd	25 cd	1.78 ef
20	Syn 3950 (T)	3075 ab	2010 abc	2540 a	2541 abc	80 a	26 bc	1.76 f
21	Victoria (T)	3040 ab	2055 abc	2540 a	2545 abc	78 abc	27 ab	1.92 a
25	Cobalto (T)	3010 ab	1625 cd	2310 a	2315 abcd	79 ab	25 cd	1.81 def
13	Ha-AO-156	2965 abc	2099 ab	2500 a	2521 abc	77 bcd	25 cd	1.79 ef
12	Ha-AO-151	2930 abc	1995 abc	1995 bcd	2306 abcd	79 ab	26 bc	1.92 a
16	Ha-AO-180	2910 abc	1990 abc	2420 a	2440 abc	75 def	24 d	1.88 abc
1	Ha-AO-22	2875 abc	1950 abc	2402 a	2409 abc	79 ab	27 ab	1.76 f
9	PSGOC-I138	2856 abc	1960 abc	2408 a	2408 abc	79 ab	27 ab	1.78 ef
10	Ha-AO-145	2842 abc	1954 abc	2010 bcd	2268 abcd	76 cde	24 d	1.82 cdef
22	Madero 91 (T)	2828 abc	1810 abcd	2015 bcd	2217 abcd	75 def	26 bc	1.86 abcd
14	Ha-AO-157	2620 bc	1700 bcd	2005 bcd	2108 cd	77 bcd	26 bc	1.79 ef
2	Ha-AO-33	2610 bc	1518 d	2000 bcd	2042 cd	78 abc	26 bc	1.81 def
3	Ha-AO-34	2608 bc	1520 d	1800 cd	1976 d	77 bcd	26 bc	1.89 ab
23	B. Paisano (T)	2502 c	1800 abcd	1814 cd	2038 c	75 def	24 d	1.92 a
4	Ha-AO-66	2501 c	2140 a	1810 cd	2150 b	76 cde	26 bc	1.83 bcde
8	Ha-AO-137	2500 c	1510 d	1795 cd	1935 d	78 abc	26 bc	1.81 def
11	Ha-AO-150	2490 c	1510 d	1792 cd	1930 d	74 ef	25 cd	1.77 ef
15	Ha-AO-179	2485 c	1410 d	1625 d	1840 d	76 cde	26 bc	1.79 ef
17	Ha-AO-202	2482 c	1405 d	1622 d	1836 d	74 ef	24 d	1.86 abcd
19	Ha-AO-68	2478 c	1400 d	1615 d	1831 d	73 f	24 d	1.88 abc
	Media testigos (T)	2946	1821	2203	2323	77	77	25
	Tukey 5 %	535	420	480	540		2.0	1.9

Medias con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales. T: testigo, D.F.: días a floración, D.C.: diámetro de capítulo, A.P.: altura de planta.

Cuadro 3. Rendimiento de grano de 18 variedades oleicas de ciclo tardío, la PSGOC-T y testigos en tres ambientes en P-V 2022.

No.	Línea	Riego (kg ha ⁻¹) Celaya	Temporal (kg ha ⁻¹)		Promedio (kg ha ⁻¹)	D.F. (días)	D.C. (cm)	A.P. (m)
			Celaya	Apaseo				
18	Ha-AO-206	3450 a	2050 a	2.755 ab	2751 a	85 ab	27 ab	1.85 abc
1	Ha-AO-24	3412 a	2120 a	2874 a	2802 a	86 a	26 abc	1.88 ab
25	Syn 3950 (T)	3392 a	1510 b	2310 b	2404 ab	86 a	28 a	1.91 a
2	Ha-AO-25	3340 a	2048 a	2752 ab	2713 ab	82 abcd	26 abc	1.81 bcde
8	Ha-AO-56	3310 a	1975 a	2705 abc	2663 ab	83 abcd	26 abc	1.92 ab
10	Ha-AO-75	3280 ab	2010 a	2754 ab	2681 abc	84 abc	27 ab	1.88 ab
12	Ha-AO-104	3258 abc	2000 a	2700 abc	2652 abc	83 abcd	25 bcd	1.78 bcde
15	Ha-AO-125	3222 abc	1910 a	2650 abc	2594 abc	84 abc	25 bcd	1.81 bcde
24	Syn 3965 (T)	3201 abc	1530 b	2330 bc	2353 abc	85 ab	25 bcd	1.82 bcde
17	Ha-AO-204	3189 abc	1950 ab	2665 abc	2601 abc	81 bcd	25 bcd	1.72 e
22	Hornet (T)	3164 abcd	1930 ab	2621 abcd	2571 abc	74 f	23 d	1.74 de
3	Ha-AO-30	3142 abcd	1810 ab	2545 abcd	2499 abc	81 bcd	25 bcd	1.76 cde
14	PSGOC-T	3110 abcd	1855 ab	2500 abcd	2488 abc	81 bcd	24 cd	1.88 ab
13	Ha-AO-109	3080 abcd	1686 ab	2225 cd	2330 abc	82 abcd	26 abc	1.79 bcde
9	Ha-AO-63	3020 abcd	1685 ab	2222 cd	2309 abc	84 abc	26 abc	1.91 a
23	Victoria (T)	2750 bcd	1670 ab	2200 cd	2206 b	75 ef	24 cd	1.84 abcd
11	Ha-AO-80	2740 bcd	1630 b	2220 cd	2196 b	82 abcd	27 ab	1.94 a
5	Ha-AO-39	2725 cd	1529 b	2120 d	2124 c	81 bcd	24 cd	1.85 abc
6	Ha-AO-43	2720 cd	1530 b	2120 d	2123 c	80 cd	24 cd	1.92 a
21	B. Paisano (T)	2720 cd	1850 ab	2102 d	2224 b	74 f	23 d	1.84 abcd
7	Ha-AO-33	2635 d	1500 b	2108 d	2081 c	80 cde	24 cd	1.72 e
4	Ha-AO-34	2630 d	1508 b	2105 d	2081 c	79 de	23 d	1.78 bcde
16	Ha-AO-140	2628 d	1510 b	2108 d	2082 c	80 cd	24 cd	1.86 abc
20	P64H-133 (T)	2624 d	1810 ab	2110 d	2181 bc	72 f	24 cd	1.86 abc
19	Ha-AO-144	2620 d	1685 ab	2105 d	2136 c	86 a	27 ab	1.88 ab
Media testigos (T)		2,975	1716	2278	2323	78	25	1.84
Tukey 5 %		545	468	520	505	4.1	2.5	10.1

Medias con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales. T.: testigo, D.F.: días a floración, D.C.: diámetro de capítulo, A.P.: altura de planta.

Cuadro 4. Porcentaje de aceite oleico (% O) contenido dentro del porcentaje total de aceite (% Ac) en las cinco mejores variedades oleicas precoces, intermedias y tardías, en comparación con las variedades sintéticas.

Variedades precoces			Variedades intermedias			Variedades tardías		
Variedad	% Ac	% O	Variedad	% Ac	% O	Variedad	% Ac	% O
Ha-AO-186	42.8	91.2	Gir-AO-72	42.0	91.6	Gir-AO-206	42.9	92.4
Ha-AO-184	42.5	90.1	Gir-AO-90	43.3	90.0	Gir-AO-24	43.0	90.6
Ha-AO-107	41.9	92.0	Gir-AO-117	42.2	92.3	Gir-AO-25	42.5	90.2
Ha-AO-132	43.0	92.1	Gir-AO-214	43.1	91.8	Gir-AO-56	43.2	91.8
Ha-AO-16	42.2	90.1	Gir-AO-156	41.9	90.4	Gir-AO-75	41.9	90.0
PSGOC-P	43.5	93.1	PSGOC-I	43.8	93.3	PSGOC-T	44.0	93.6
P64H-133 T	40.0	89.2	Hornet T	42.5	88.0	Syn 3950 T	42.0	91.4

Akkaya M. R. (2018) Prediction of fatty acid composition of sunflower seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology* 55:2318-2325, <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3150-x>

Attia Z., C. S. Pogoda, S. Reinert, N. C. Kane and B. S. Hulke (2021) Breeding for sustainable oilseed crop yield and quality in a changing climate. *Theoretical and Applied Genetics* 134:1817-1827, <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03770-w>

Benítez-Riquelme I. (2002) Selección recurrente con progenies endogámicas de especies autóгамas: eficiencia de campo. *Agrociencia* 36:55-65.

Bervillé A., S. Lacombe, S. Veillet, C. Granier, S. Leger and P. Jouve (2009) Method of selecting sunflower genotypes with high oleic acid content in seed oil. U.S. Patent Application No. 11/587,956. Alexandria, Virginia, USA.

Bervillé A. (2010) Oil composition variations. In: Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. J. Hu, G., Seiler and C. Kole (eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp:253-277.

Bilgen B. B. (2018) An optimized PCR protocol with newly designed primers for reliable molecular selection of high oleic type sunflower. *Mediterranean Agricultural Sciences* 31:55-60, <https://doi.org/10.29136/mediterranean.368382>

Bilgen B. B., S. Daneshvar, G. Evcı, V. Pekcan, M. I. Yılmaz and Y. Kaya (2018) Determination of high oleic type and broomrape resistant sunflower hybrids by DNA markers. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics* 4:22-30.

Bye R., E. Linares y D. L. Lentz (2009) México: centro de origen de la domesticación del girasol. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 12:5-12.

Dehmer K. J. and W. Friedt (1998) Development of molecular markers for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Industrial Crops and Products* 7:311-315, [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00063-0)

Doyle J. J. and J. L. Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Ebrahímian E., S. M. Seyyedi, A. Bybordi and C. A. Damalas (2019) Seed yield and oil quality of sunflower, safflower, and sesame under different levels of irrigation water availability. *Agricultural Water Management* 218:149-157, <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.03.031>

Göksoy A., L. Ö. Akar, S. Yanikoğlu and S. Kizik (2020) Heterosis and combining ability through line x tester analysis for yield, oil and high oleic acid characters in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turkish Journal of Field Crops* 25:122-130, <https://doi.org/10.17557/tjfc.685709>

Harter A. V., K. A. Gardner, D. Falush, D. L. Lentz, R. A. Bye and L. H. Rieseberg (2004) Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature* 430:201-205, <https://doi.org/10.1038/nature02710>

Hernández M. M. (2011) Cultivos Alternativos para Guanajuato. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. Celaya, Guanajuato, México.

Lacombe S. and A. Bervillé (2000) Problems and goals in studying oil composition variation in sunflower. In: Proceedings of the 15th International Sunflower Conference. International Sunflower Association. Paris, France. pp:1-10.

Lacombe S. and A. Bervillé (2001) A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus. *Molecular Breeding* 8:129-137, <https://doi.org/10.1023/A:1013358711651>

Lacombe S., F. Kaan, Y. Griveau and A. Bervillé (2004) The Pervenets high oleic mutation: methodological studies. *Helia* 27:41-53, <https://doi.org/10.2298/HEL0440041L>

Lentz D. L., M. E. D. Pohl, K. O. Pope and A. R. Wyatt (2001) Preshistoric sunflower (*Helianthus annuus* L.) domestication in Mexico. *Economic Botany* 55:370-376, <https://doi.org/10.1007/BF02866560>

Márquez S. F. (1988) Genotecnia Vegetal II. Métodos, Teoría, Resultados. AGT Editor, S. A. México, D. F. 665 p.

Martínez-Rivas J. M., P. Sperling, W. Lühs and E. Heinz (2001) Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* 8:159-168, <https://doi.org/10.1023/A:1013324329322>

Montero-Tavera V., M. A. Escobedo-Landín, J. A. Acosta-Gallegos, J. L. Anaya-Lopez, and J. E. Ruiz-Nieto (2017) 26S: Novel reference gene from leaves and roots of common bean for biotic stress expression studies based on PCR. *Legume Research* 40:429-433, <https://doi.org/10.18805/lr.v0i0F.7859>

Rieseberg L. H. and G. J. Seiler (1990) Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*). *Economic Botany* 44:79-91, <https://doi.org/10.1007/BF02860477>

Schuppert G. F., S. Tang, M. B. Slabaugh and S. J. Knapp (2006) The sunflower high-oleic mutant *Ol* carries variable tandem repeats of *FAD2-1*, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Molecular Breeding* 17:241-256, <https://doi.org/10.1007/s11032-005-5680-y>

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020) Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México, México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Diciembre 2023).

- SINAREFI, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (2016)** Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Tlalnepantla, Estado de México. 88 p.
- Singh V. K., P. I. Bhojar, Anu and V. Sharma (2022)** Application of genomics and breeding technologies to increase yield and nutritional qualities of rapeseed-mustard and sunflower. *In: Technologies in Plant Biotechnology and Breeding of Field Crops*. Kamaluddin, U. Kiran and M. Z. Abdin (eds.). Springer. Singapore. pp:103-131, https://doi.org/10.1007/978-981-16-5767-2_6
- Soldatov K. I. (1976)** Chemical mutagenesis in sunflower breeding. *In: Proceedings of the 7th International Sunflower Conference*. Krasnodar, USSR. 27 June-3 July 1976. International Sunflower Association. Vlaardingen, The Netherlands. pp:352-357.
- UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants (2000)** Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Document TG/81/6. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Geneva, Switzerland. 49 p.

