

Comportamiento de genotipos cubanos de girasol ante la callogénesis y la germinación de los embriones.

Ana Julia Rodríguez, Arlene Rodríguez, Reynaldo López, Yanisbel Sánchez, Dayamí Pérez, Norma Marrero, Guillermo Brito, Odalys Pérez y Odalys Llorente.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical, “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), calle 2 esq. 1 Stgo. de las Vegas . Cuba.

RESUMEN

La aplicación de métodos biotecnológicos posibilita el apoyo de los programas de mejoramiento convencionales en muchos cultivos; en el caso del girasol (*Helianthus annuus*) esto tiene ciertas limitaciones por ser una de las especies considerada “recalcitrante” para estas técnicas, por lo que reviste gran importancia ampliar el conocimiento de su empleo. En este trabajo se realizó un estudio sobre el comportamiento de la callogénesis de genotipos cubanos de girasol, utilizando diferentes explantes y medios de cultivo; así como, la germinación de los embriones inmaduros a diferentes tiempos de polinización. Para la obtención de callos se utilizó el medio MS modificado con los reguladores del crecimiento BAP, 2, 4-D o AIA. Como explantes se utilizaron ápices, hipocótilos, epicótilos, cotiledones y hojas de plántulas germinadas *in vitro*, en los genotipos Ca 15, C- 83, C-65 y C-113. Para el análisis de la germinación de los embriones se utilizaron los mismos genotipos y un híbrido, a los 9, 12 y 15 días posteriores a la polinización manual. Con respecto al crecimiento de los callos se encontró que los hipocótilos tratados con 5 mg/L de BAP tuvieron un desarrollo de la callogénesis significativamente superior al resto de los tratamientos. En relación con la germinación de los embriones, se determinó que podían ser colectados a partir de los 9 días de polinización, y que cultivados en el medio MS reducido a la mitad, desarrollaron plantas viables que completaron su desarrollo en la fase *in vitro* con las características óptimas para su transferencia al suelo. Esto ofrece la posibilidad de acortar el intervalo generacional y rescatar plantas a partir de cruzamientos incompatibles en los trabajos de mejoramiento de girasol.

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los cuatro cultivos oleaginosos más importantes del mundo, pero los estudios sobre su comportamiento *in vitro* no son abundantes aún. Su mejoramiento mediante la aplicación de métodos biotecnológicos está frenado por la dificultad de regenerar plantas, ya que en esto influye la naturaleza del explante, el contenido hormonal del medio y el genotipo, encontrándose entre las especies consideradas "recalcitrantes" para estas técnicas (Freyssinet y Freyssinet, 1988).

Se han realizado investigaciones al respecto por Greco *et al.*, 1984; Witrzens *et al.*, 1988; Filippone *et al.*, 1992; Geneviève *et al.*, 1995; Nestares *et al.*, 1996; Laparra *et al.*, 1997; Mayor *et al.*, 2001, y se han obtenido algunos logros tanto en la inducción de callos, como en la regeneración y organogénesis utilizando diferentes partes de la planta y varios reguladores del crecimiento.

Por otra parte, el género *Helianthus* comprende otras especies con un amplio rango de rasgos económicamente importantes; sin embargo, su uso en el cruzamiento del girasol está limitado por la pobre compatibilidad sexual y la esterilidad de los híbridos interespecíficos (Laparra *et al.*, 1997). Las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen una alternativa válida con el fin de solucionar este problema. Un ejemplo de ello lo es el cultivo de embriones inmaduros, el cual es un instrumento poderoso en el mejoramiento para el rescate de plantas obtenidas a partir de cruces incompatibles. El cultivo de embriones también puede ser usado para obtener líneas en un período de tiempo relativamente corto; así Aspiroz *et al.*, (1987) obtuvieron embriones F5 en un intervalo de 330 días a partir del cruzamiento inicial. Con ello se logra reducir el intervalo generacional para la obtención de materiales selectos de girasol.

La obtención de variación somaclonal y el acortamiento de los ciclos de selección serían importantes para apoyar los programas de mejoramiento convencionales del girasol, pero para ello son aspectos fundamentales el establecimiento y desarrollo de los callos, además de la germinación de los embriones inmaduros. A partir de estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar un medio de cultivo adecuado para alcanzar el mejor desarrollo de los callos, que permita realizar estudios posteriores

de regeneración de plantas; así como estudiar la germinación de los embriones, con vistas a conocer su comportamiento en los genotipos cubanos de girasol y que pueda ser empleada en los programas de mejoramiento genético. Esto permitiría contar con una metodología para el rescate de embriones inmaduros y acelerar los ciclos de selección.

MATERIALES Y METODOS

Callogénesis.

Se empleó como material vegetal los ápices y secciones de hipocótilos, epicótilos y hojas procedentes de plántulas de girasol germinadas *in vitro*, en el medio Murashige y Skoog, 1962 (MS). Para la germinación, las semillas maduras sin la testa, fueron desinfectadas con alcohol al 70 % durante 2 min; y posteriormente, con bicloruro de mercurio 0,1 %, durante 5 min. Los explantes del genotipo Caburé-15 fueron colocados en cuatro medios de cultivo MS con diferentes reguladores del crecimiento:

- 1.- 6- bencilaminopurina (BAP) (1 mg/L)
- 2.- BAP (5 mg/L)
- 3.- Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4 -D) (1 mg/L)
- 4.- Ácido indol acético (AIA) (1 mg/L)

Posteriormente se compararon los explantes hipocótilos y los cotiledones en los medios que contenían 5 y 7 mg/L BAP, en los genotipos Cubasol- 83 (C-83), Cubasol- 65 (C-65), Cubasol-113 (C-113), Caburé-15 (Ca-15).

Para la evaluación del crecimiento de los callos se tomaron 8 réplicas por tratamiento en el estudio de la variedad Ca-15 y 10 réplicas en el estudio con los cuatro genotipos. Al mes de cultivo, se evaluó la diferencia del peso fresco de los callos en gramos respecto al peso inicial del explante. Los datos de cada experimento se analizaron de forma independiente, mediante un análisis de varianza para un diseño factorial, empleando el programa estadístico STATITTCF.

También se evaluó el porcentaje de explantes que presentaron raíces adventicias, en el medio que contenía 1 mg/L de AIA.

Germinación de los embriones inmaduros

Se utilizaron los mismos genotipos que los empleados para la callogénesis y un híbrido, colectados a los 9, 12 y 15 días posteriores al comienzo de la autopolinización manual. La desinfección se realizó de igual forma que en el caso de las semillas maduras. La testa y los tegumentos que cubrían los embriones se eliminaron en el momento de la siembra.

Se realizaron dos experimentos para evaluar la germinación en tres medios de cultivo MS con modificaciones. En el primer experimento se utilizaron los medios de cultivo siguientes:

M1: MS (reducido a la mitad) + 20 g/L de sacarosa

M2: MS + 0,05 mg/L de Ácido Naftalén Acético + 0,05 mg/L de Kinetina + 0,01 mg/L de Ácido Giberélico + 30 g/L de sacarosa

M3: MS + 0,5 mg/L de 6-Bencilaminopurina + 0,5 mg/L de Ácido Naftalén Acético +30 g/L de sacarosa

En este experimento se utilizaron embriones de los genotipos Ca-15 y un híbrido, colectados a los 15 días posteriores a la autopolinización manual.

En el segundo experimento se utilizó el medio M1 con embriones de diferentes edades y genotipos según la tabla I:

Tabla I: Genotipos estudiados a los diferentes días posteriores al comienzo de la polinización.

Días posteriores a la polinización	GENOTIPOS
9	C-83, C-113, Ca-15, híbrido
12	C-83, C-65, Ca-.15, híbrido
15	Ca-15, híbrido

A los 10 días de cultivo se realizaron las evaluaciones de la germinación de los embriones en forma cualitativa, mediante una escala de rangos de 0 a 3; se consideró como 0 (no germinación), 1 (cotiledones abiertos o inicio de germinación), 2 (plántula

débil o sin raíz) y 3 (plántula bien germinada y vigorosa). Además, se evaluó el porcentaje de formación de callos. Se utilizaron 6 réplicas por tratamiento en el primer experimento y 10 en el segundo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza, con un diseño completamente aleatorizado y prueba de Duncan al 5 %.

El pH de los medios fue ajustado a 5,7-5,8 y se añadieron 7 g/L de agar. La esterilización se realizó en una autoclave a una presión de 1,2 atm. durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 14 horas luz y $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ de temperatura en todos los casos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Callogénesis

Se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo y entre los explantes, así como en las interacciones medio-explante en ambos experimentos. También las interacciones medio-genotipo y explante-genotipo al tener en cuenta los cuatro genotipos con dos explantes y dos medios de cultivo, mostraron diferencias significativas, no así al tener en cuenta las tres variables (Tablas II y III).

Tabla II: Análisis de varianza con el genotipo Ca-15, cuatro explantes y cuatro medios de cultivo.

	S.C.	G.L	C.M.	D.E.	C.V.
MEDIO	12,66	3	4,22*	-	-
EXPLANTE	3,85	3	1,28*	-	-
M x E	3,40	9	0,38*	-	-
ARROR	11,27	112	0,10	0,32	70,3 %

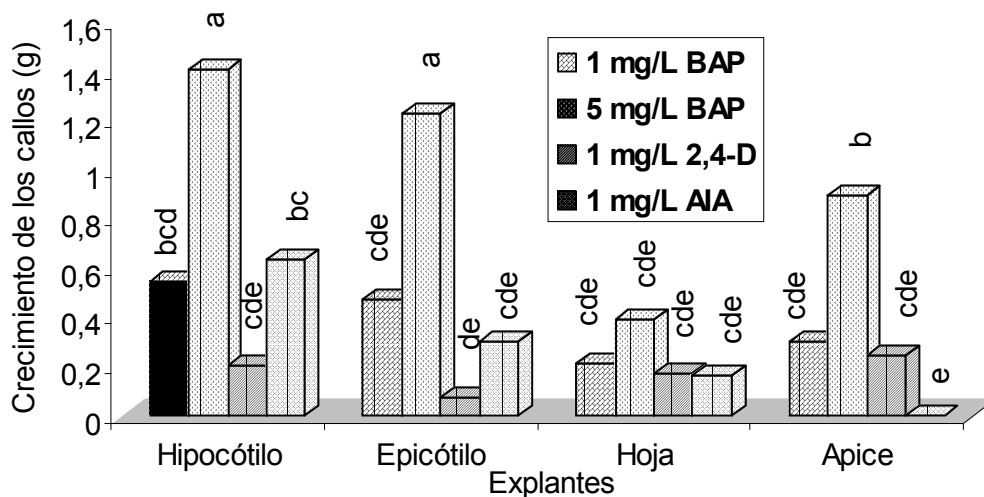
Tabla III: Análisis de varianza con cuatro genotipos, dos explantes y dos medios

de cultivo.

	S.C.	G.L.	C.M.	D.E.	C.V
MEDIO	2,99	1	2,99*	-	-
EXPLANTE	2,94	1	2,94*	-	-
GENOTIPO	0,82	3	0,27 NS	-	-
M x E	3,69	1	3,69*	-	-
M x G	7,13	3	2,38*	-	-
E x G	2,13	3	0,71*	-	-
M x E x G	0,95	3	0,32 NS	-	-
ERROR	11,27	144	0,23	0,48	43,2 %

Al analizar la interacción medio-explante con el genotipo Ca-15, se pudo observar mayor crecimiento de los callos en el medio que contenía 5 mg/L de BAP que en los medios restantes, en todos los explantes estudiados, con excepción de las hojas en que no hubo diferencias significativas, aunque tuvieron mayor valor (Fig. 1).

Fig. 1.- Interacción medio-explante en el crecimiento de los callos de girasol



En estudios anteriores Greco *et al.*, (1984) también utilizaron los reguladores BAP y 2,4 -D, donde observaron formación de callos, en diferentes porcentajes en dependencia de la concentración de los mismos. Por otra parte Antonova *et al.*, (1990), emplearon 2,4 -D para los trabajos de embriogénesis, y precisaron que el medio óptimo de inducción contenía 1 mg/L de dicha auxina, siendo en nuestro caso este regulador uno de los que menor incremento del crecimiento produjo. Witrzens *et al.*, (1988) encontraron que el AIA estimuló el crecimiento de los callos, pero no se reflejó en que medida.

Cuando se analizó el crecimiento teniendo en cuenta el tipo de explante empleado, se pudo apreciar (Fig.1) que el hipocótilo mostró el mayor valor sin diferencias significativas con el epicótilo, aunque tuvo una tendencia a alcanzar valores superiores .

Resultados similares obtuvieron Lupi *et al.*, (1987) cuando encontraron la mejor respuesta de los callos en los hipocótilos al estudiar una sola variedad. Por otra parte Greco *et al.*, (1984) emplearon BAP solo o combinado en diferentes tipos de concentraciones y explantes, hallando en la concentración de 5 mg/L a diferencia de estos resultados, el mayor porcentaje de formación de callos en los ápices (100 %) seguidos por los cotiledones (97 %) y en tercer lugar los hipocótilos (83 %); en el caso de los hipocótilos lograron la mejor respuesta a la inducción de callos y regeneración de brotes a partir de los segmentos medios.

Con relación a la presencia de raíces adventicias, estas fueron observadas sólo en el medio que contenía AIA en diferentes porcentajes, de acuerdo al tipo de explante, así se pudo apreciar en el hipocótilo (35 %), epicótilo (23 %) y hoja (11 %). La ocurrencia de raíces adventicias también fue encontrada por Lupi *et al.* (1987) en cotiledones cultivados en presencia del mismo regulador, así como por Liu (1992) en hipocótilos.

En el caso de los ápices no se produjo desarrollo de callos, pero si el crecimiento de plántulas, donde se apreció el 75 % de enraizamiento y un promedio de 4,1 nudos por planta. Al cultivar estos nudos en el mismo medio de cultivo hubo desarrollo de plántulas, pero algo pequeñas. En este aspecto debe profundizarse para su posible uso en la propagación de materiales de interés, ya que aunque los meristemas apicales también han sido utilizados por otros autores para la propagación con diferentes reguladores del crecimiento (Lupi *et al.* (1987) y se ha logrado la micropropagación a

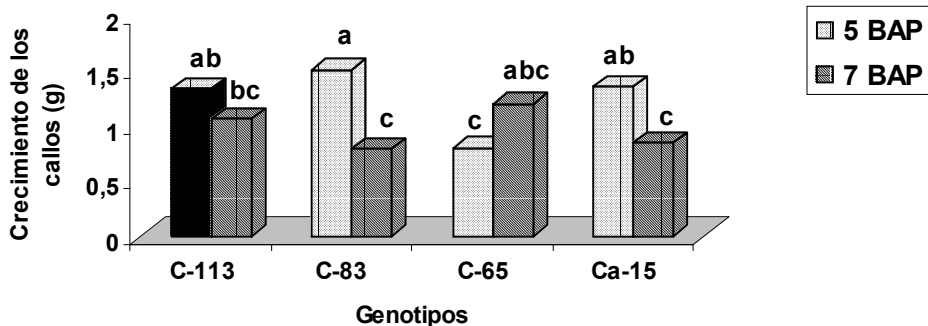
través de cotiledones maduros (Zorzoli *et al.*, 1996), el empleo de ápices también puede ser otra vía para estos fines.

Otro aspecto que se debe señalar, es la ocurrencia de algunas plántulas con inflorescencia, cuestión encontrada también por otros autores (Greco *et al.*, 1984; Nestares *et al.*, 1996; Paterson, 1984 y Zorzoli *et al.*, 1996). Según Greco *et al.*, (1984) la floración *in vitro* de ápices regenerados a partir de callo derivado de diferentes tejidos (segmentos de cotiledones, hojas, hipocótilos y ápices), o directamente de estos tejidos, pudiera ser útil en estudios fisiológicos de la floración. Sin embargo, otros autores lo ven como un aspecto indeseable y han reducido la floración prematura al emplear un fotoperíodo de 11 horas (Zorzoli *et al.*, 1994).

Tanto los hipocótilos como los cotiledones han sido empleados con diferentes objetivos en el cultivo *in vitro*, así Wingender *et al.*, (1996) emplearon hipocótilos de diferentes genotipos para la obtención de protoplastos y posteriormente brotes. Fisher y Hahne (1992) también obtuvieron protoplastos mediante el empleo de hipocótilos y cotiledones, y Zorzoli *et al.*, (1996) utilizaron cotiledones maduros para la micropropagación de líneas e híbridos de girasol.

Teniendo en cuenta la interacción medio-genotipo (Fig. 2), se apreció que en los genotipos C-83 y el Ca-15 hubo un incremento del crecimiento de los callos significativamente superior en el medio donde se añadieron 5 mg/L de BAP, mientras que en los genotipos restantes no se presentaron diferencias significativas entre medios. Cuando se analizaron los genotipos en cada medio independientemente se apreció que el C-65 en el medio constituido por 5 mg/L de BAP presentó un crecimiento significativamente inferior contrastantemente. En el medio que contenía 7 mg/L de BAP, aunque no hubo diferencias entre genotipos, se observó que presentó un valor superior al resto, o sea, que al parecer responde mejor a concentraciones mayores de dicho regulador del crecimiento.

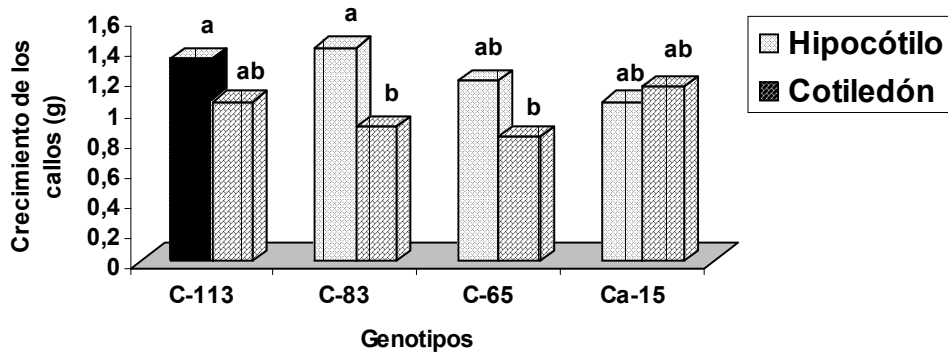
Fig. 2- Interacción medio-genotipo en el crecimiento de los callos de girasol



Para muchas especies ha sido reportado que la respuesta a las condiciones de cultivo es afectada por el genotipo. En girasol Witrzens *et al.* (1988), encontraron que el genotipo tuvo efecto sobre el crecimiento de los callos obtenidos a partir de embriones inmaduros, así como sobre la capacidad de regenerar de los cultivos. También Nestares *et al.* (1998) reportaron dependencia del genotipo en la habilidad de regenerar y plantearon que éste ejerció un efecto pronunciado sobre la respuesta morfogénica del girasol.

Con relación a la interacción genotipo-explante (Fig. 3), se evidenció que sólo hubo diferencia significativa entre hipocótilos y cotiledones en el genotipo C-83, donde el mayor crecimiento de los callos se produjo en el explante hipocótilo, lo que evidencia la influencia del genotipo también en este caso. En el resto de los genotipos no hubo diferencias significativas entre explantes, aunque hubo tendencia al incremento del crecimiento de los callos obtenidos a partir de los hipocótilos en el caso de los genotipos C-113 y C-65. Al analizar los explantes separadamente, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos.

Fig. 3- Interacción genotipo-explante en el crecimiento de los callos de girasol



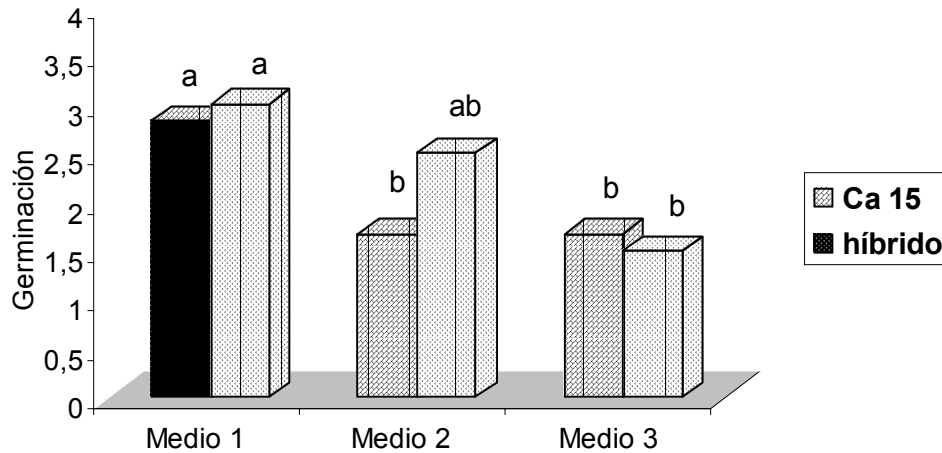
Germinación de los embriones inmaduros.

Se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo a los 15 días posteriores a la polinización, donde se apreció que los genotipos Ca-15 y el híbrido tuvieron valores significativamente superiores en el medio M1 con relación al M3. En el caso de la variedad Ca-15, los medios M2 y M3 reportaron los peores resultados y en el híbrido, aunque entre los medios M1 y M2 no se presentaron diferencias significativas y a su vez entre el M2 y M3 tampoco, si se constata que hay un decremento del 1 al 3 (Fig. 4).

Los reguladores del crecimiento empleados en el medio M2 habían sido utilizados por Bohorova *et al.*, (1985) con otras condiciones de cultivo, en el primer reporte de cultivo de embriones exitoso con híbridos interespecíficos de *Helianthus*, donde demostraron que se podrían obtener plantas de interés para estudios citogenéticos del género.

Fig. 4.- Germinación de los embriones inmaduros de girasol en tres medios de

cultivo y dos genotipos.

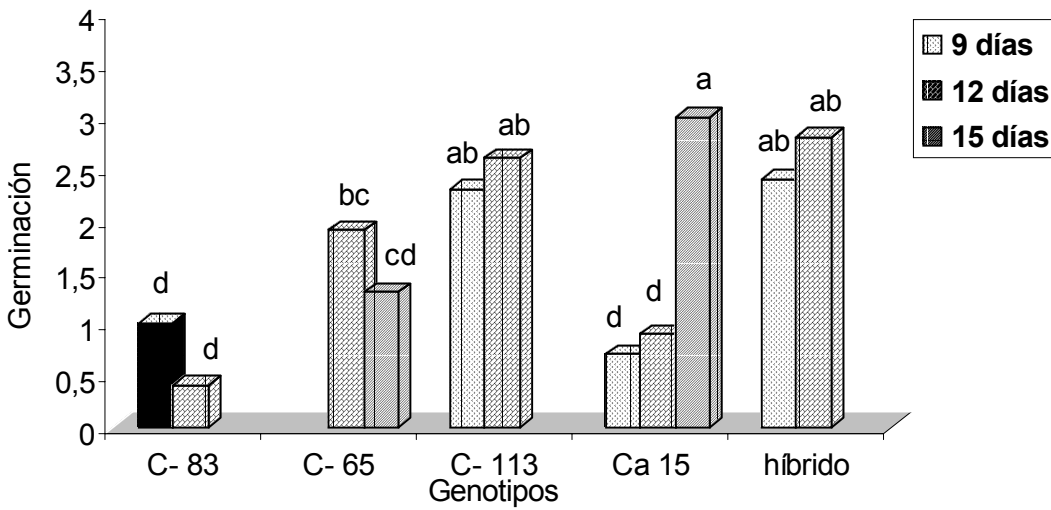


El medio M3 tuvo el inconveniente de formar callos en la base de la plántula en un 67 % de los casos para la variedad Ca-15 y un 33 % para el híbrido, lo que además de afectar la formación de raíces en éste, no es recomendable por la probabilidad de incrementar la variabilidad genética y no ser beneficioso cuando se desea mantener la estabilidad del material (Larkin y Scowcroft, 1981). Además, se apreció formación de callo en al caso del híbrido en el medio M2 en un 33 %. Sólo no hubo presencia de callo en las plántulas del medio M1, que es el que no poseía reguladores del crecimiento en su composición. Este medio también fue el más efectivo en estudios realizados en otras variedades por Zorzoli et al ., 1994

Al analizar la respuesta de la germinación de los embriones con relación a los días posteriores a la polinización se observó un comportamiento diferente en algunos genotipos (Fig. 5). El C-113 y el híbrido presentaron un comportamiento similar tanto a los 9 como a los 12 días exhibiendo los mejores valores de germinación sin diferencias significativas. El C-83 y Ca-15, tanto a los 9 como a los 12 días, tuvieron los peores valores, sin diferencias significativas con el C-65 a los 15 días. Los mejores valores a los 15 días se apreciaron en el Ca-15 (Fig. 5).

Fig. 5.- Germinación de los embriones inmaduros de girasol en cinco genotipos a

diferentes tiempos de polinización.



Este resultado contrasta con lo encontrado en los estudios de Zorzoli et al., (1994), aunque si ha sido planteado por otros autores la influencia del genotipo en trabajos de cultivo *in vitro*. De esta forma Witzens et al. (1988) encontraron que el genotipo tuvo efecto sobre el crecimiento de los callos obtenidos a partir de embriones inmaduros, así como sobre la capacidad de regenerar de los cultivos y Nestares et al. (1998) reportaron dependencia del genotipo en la habilidad de regenerar plantas y plantearon que éste ejerció un efecto pronunciado sobre la respuesta morfogénica del girasol. También se encontró un comportamiento diferencial entre genotipos por Mayor *et al.*, (2001) en estudios de organogénesis de girasol.

También es de destacar que las plántulas del C-83 a los 9 días fueron muy débiles, mientras que las de C-113 a esa misma edad tuvo plántulas vigorosas, a pesar de tener esta variedad embriones más pequeños que el resto.

CONCLUSIONES

- ❖ Los medios y explantes se comportaron de forma diferente, produciéndose el mayor crecimiento de los callos con el regulador del crecimiento BAP, en la dosis de 5 mg/L y el explante hipocótilo.
- ❖ La germinación de los embriones tuvo una mejor respuesta en el medio MS reducido a la mitad.

- ❖ El genotipo jugó un papel importante, tanto en el crecimiento de los callos como en germinación de los embriones inmaduros.

BIBLIOGRAFIA

- Antonova, TS, Zezul TG, Kransyanski SF y Borovkov AJu (1990) Direct and indirect embryogenesis of sunflower. En: Proceedings: Sunflower Research Workshop. 30-32
- Aspiroz, HS, Vincourt P, Serieys H y Gallais A (1987) La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'accélération du cycle de selection des lignées de tournesol et ses effects morphovégétatifs. *Helia*. 10: 35-38.
- Filippone, E, M Leone R Penza (1992) Recent advances in cell and tissue culture. En: Enhancing Research on Tropical Crops in Africa. Eds. G Thottappilly. LM Monti, DR Moham Raj, AW Morre. 364 pp.
- Fischer, Ck y Hanne G (1992) Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L): shoot regeneration and seed production. *Plant Cell Reports*. 11: 632-636.
- Freyssinet, M y Freyssinet G (1988) Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L) immature embryos. *Plant Sci.*, 56: 177-181.
- Geneviève, J, Bronner R y Hahne G (1995): Somatic embryogenesis and organogénesis induced on the immature zygotic of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Reports*. 15: 200-204.
- Greco, B, Tanzarella OA, Carozzo G y Blanco A (1984) Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L). *Plant Science Letters*, 36: 73-77.
- Laparra, H, Stroeva P, Ivanov P y Haahne G (1997) Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser. *Plant Cell Rep*. 16: 692-695.
- Larkin, PJ y Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet*. 60: 197-214.
- Liu, JH (1992) Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus* L) seedlings. IV. The role of changes in endogenous free and conjugated indole-3 acetic acid. *Physiol. Plant*. 86: 285-292.

- Lupi, MC, Bennici A, Locci F y Gennai (1987) Plantlet formation from callus and shoot-tip culture of (*Helianthus annuus* L). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 11: 47- 55.
- Mayor, ML, Nesttares G, Zorzoli R, Ludueña P y Picardi (2001) Shoot organogenesis derived from cotyledonary explants in sunflower (*Helianthus* L.). Redbio 2001.
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium of rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Nestares, G, Zorzoli R, Mroginski L y Picardi L (1996) Plant regeneration from mature sunflower seeds. *Helia* 19(24): 107- 112.
- Nestares, G, Zorzoli R, Mroginski L y Picardi L (1998) Cytoplasmic effects on the regeneration ability of sunflower. *Plant Breeding*. 117: 188-190.
- Paterson, KE (1984) Shoot tip culture of *Helianthus annuus*- flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Am. J. of Bot.* 71 (7) 925-931.
- Wingender, R, Henn H-J, Barth S, Voeste D, Machlab H and Schnabl H (1996) A regeneration protocol for sunflower (*helianthus annuus* L.) protoplasts. *Plant cell Reports*. 15: 742-745.
- Witizens, B, Scowcroft WR, Downes RW y Larkin PJ (1988) Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interespecific hybrids (*Helianthus tuberosus* x *H. annuus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 13: 61-76.
- Zorzoli, R, Coinly EL, Ludueña P y Picaardi L (1994) Rescate de embriones inmaduros: reducción del intervalo generacional para la obtención de materiales selectos de girasol. *Helia*. 17: 27-32.
- Zorzoli, R, Nestares GM y Mroginski LA (1996) Micropropagación de genotipos de girasol (*Helianthus annuus*) por cultivo in vitro y la evaluación de las fases de aclimatación. *Invest. Agr. : Prod. Prot.* 11 (3). 389-396.