

REGENERACIÓN DIRECTA A PARTIR DE COTILEDONES MADUROS DE GENOTIPOS CUBANOS DE GIRASOL (*HELIANTHUS ANNUUS*).

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

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: ajrm@inifat.co.cu**

RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio sobre el comportamiento de la regeneración de brotes a partir de cotiledones maduros, en diferentes genotipos cubanos de girasol y varios medios de cultivo. Además se analizaron los porcentajes de callos, brotes con botones florales y brotes hiperhídricos. La regeneración de brotes se evaluó de forma cualitativa en algunos casos y mediante el número de brotes en otros. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza y prueba de Duncan al 5 %. Se encontró que el medio que tuvo un mejor comportamiento en la regeneración de brotes fue el MS que contenía BAP y AIA en la dosis menor. Con relación a los porcentajes de brotes hiperhídricos y botones florales presentados *in vitro*, aspectos que afectan el desarrollo normal de las plantas, se apreció que el genotipo C-65 presentó los valores más bajos, con un porcentaje de formación de raíces del 70 %. Mediante esta metodología sería posible la multiplicación de genotipos de interés.

DIRECT REGENERATION FROM MATURE COTYLEDONS OF SUNFLOWER CUBAN GENOTYPES (*HELIANTHUS ANNUUS*).

ABSTRACT

A study about shoot regeneration from mature cotyledons of different Cuban sunflower genotypes and some culture media was made. Hyperhydric and flowered shoots percentages and calli percentages also were studied. Shoot regeneration was evaluated qualitatively or by shoots number. Results were evaluated through variance analysis and Duncan test at 5 %. The best shoot regeneration was found in the small BAP and AIA concentration. Related to Hyperhydric and flowered shoots found *in vitro* it was appreciated that C-65 genotype showed the lowest values with 70 % of rooting. It would be possible to propagate interesting genotypes using this methodology.

INTRODUCCION

El girasol se encuentra entre las especies consideradas "recalcitrantes" para las técnicas de cultivo *in vitro* (Freyssinet y Freyssinet, 1988), donde la regeneración de plantas completas está influenciada por las condiciones de cultivo, por el genotipo y por sus interacciones. Esto unido a la baja capacidad de regeneración y a la ocurrencia de plántulas hiperhídricas limita considerablemente la aplicación de métodos de mejoramiento por vías biotecnológicas (Mayor *et al.*, 2001).

En la última década se han obtenido resultados alentadores en el género *Helianthus*, entre los que se encuentran los de Geneviève *et al.*, (1995), Zorzoli *et al.*, (1996), Nestares *et al.*, (1996), Laparra *et al.*, (1997), Mayor *et al.*, (2001). A pesar de ello debe continuarse profundizando en estos trabajos, ya que al estar involucrados diferentes factores para obtener éxito, en ocasiones no hay repetibilidad. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio con diferentes medios de cultivo y genotipos para analizar el comportamiento de la regeneración directa de girasol, con vistas a su utilización en la propagación de genotipos de interés para el mejoramiento genético.

MATERIALES Y METODOS

Como material vegetal se emplearon cotiledones de semillas maduras de diferentes genotipos de girasol. Las semillas sin la testa, fueron desinfectadas con alcohol al 70 % durante 2 min. y posteriormente con bicloruro de mercurio 0,1 % durante 5 min. Se realizaron varios experimentos con diferentes medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificados con combinaciones de Acido Indol Acético, 6- Bencilaminopurina, Kinetina y/o Nitrato de Plata (Tabla I). 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. En el momento de la siembra, a las semillas se les eliminó el tegumento y el embrión. Se utilizó un cotiledón por tubo. Los cultivos se mantuvieron en un foto período de 14 horas luz y 25 ± 2 ° C de temperatura.

Se realizaron evaluaciones cualitativas de la regeneración, considerando como 0 (no regeneración y/o callo), 1 (comienzo de regeneración), 2 (mitad del explante regenerado), 3 (regeneración abundante). La formación de callos y explantes que regeneraron brotes y no formaron callos, se reflejó en forma de porcentajes, mientras que el número de brotes y la evaluación cualitativa de la regeneración se analizó estadísticamente. Para las evaluaciones estadísticas se utilizaron 10 réplicas por tratamiento, mediante análisis de varianza, con un diseño completamente aleatorizado y prueba de Duncan al 5 %.

Tabla 1.- Experimentos y evaluaciones realizadas

EXPERIMENTO	REGULADOR (mg/L)	GENOTIPO	EVALUACION
Experimento 1	1 AIA y 2 Kin. 1 AIA y BAP 0,5 AIA y BAP	Caburé-15 Cubasol-113	20 días % regeneración de brotes, % formación callos
Subcultivo 1	Idem	Caburé-15	25 días % regeneración de brotes, % formación callos, # brotes / explante regenerado., regeneración cualitativa
Subcultivo 2	Idem	Caburé-15	20 días % formación callos, % brotes hiperhídricos, % brotes con botones florales
Experimento 2	0,50 AIA y BAP 0,50 AIA, BAP, 0,34 AgNO ₃	Cubasol- 83 Cubasol- 65 Híbrido	25 días regeneración cualitativa
Experimento 3	MS (1/2)	Cubasol- 83 Cubasol- 65 Híbrido	15 días % brotes hiperhídricos, % brotes con raíces % brotes con botón floral

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuando se compararon los medios de cultivo con combinaciones de AIA y BAP, o AIA y Kinetina en el experimento 1 (Fig. 1), se observó regeneración abundante de brotes en el 100 % de las muestras del genotipo Ca-15 en el medio que contenía 0,5 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIA. En el caso del C- 113 sólo se observó regeneración en el 17 % de los casos, en este mismo medio.

En los otros dos medios también hubo porcentajes de regeneración altos en el genotipo Ca-15 y no hubo ninguna en el C-113 (Fig. 1).

En el comportamiento de la formación de callos, se observaron porcentajes elevados en el genotipo C-113, aunque en el medio que contenía 0,5 de AIA y BAP fue menor (Fig. 2). Los menores porcentajes se encontraron en el genotipo Ca-15, sin presencia de callos en ese medio.

Fig. 1.- Porcentajes de explantes que formaron brotes en los genotipos Ca-15 y C-113

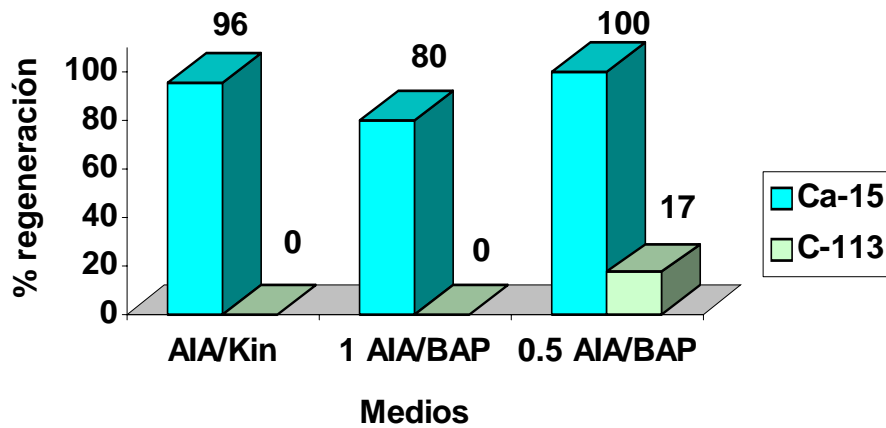
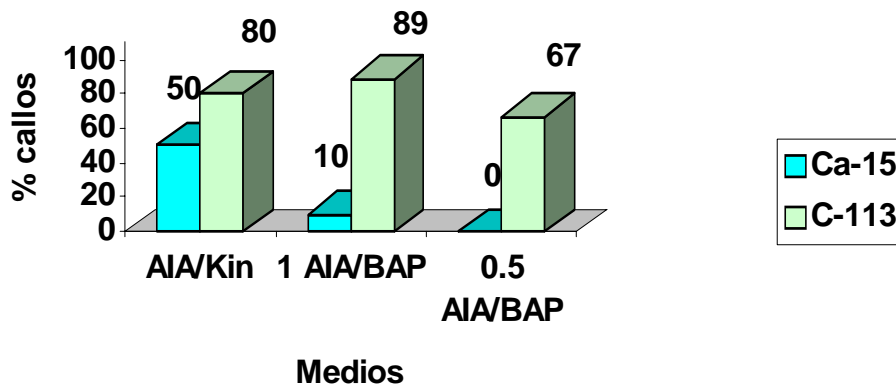
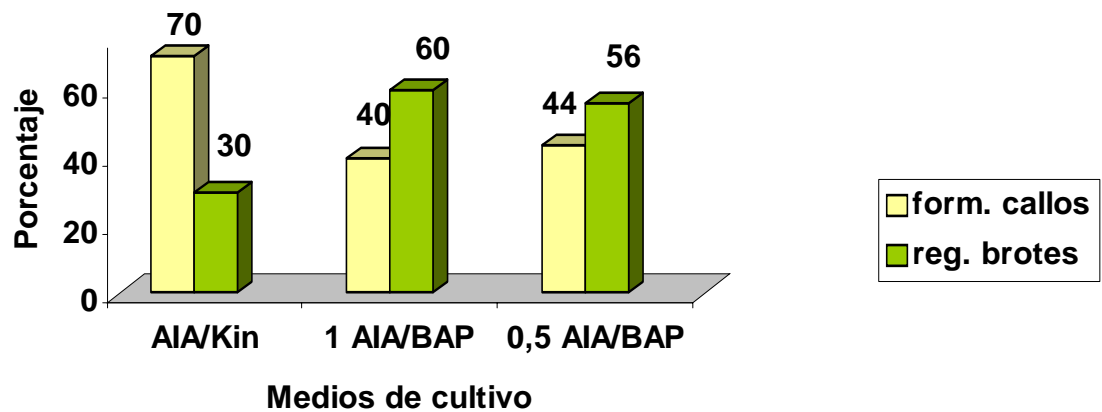


Fig. 2.- Porcentajes de explantes que formaron callos en los genotipos Ca-15 y C-113



Al realizar el primer subcultivo en los mismos medios de cultivo, del genotipo Ca-15, que tuvo los mejores porcentajes de regeneración y los menores de formación de callos, se observaron porcentajes de formación de callos superiores en el medio que contenía AIA y Kinetina, mientras en los de AIA y BAP fue similar (Fig. 3). Los porcentajes de explantes que regeneraron brotes y no callos fueron superiores en los medios que contenían AIA y BAP.

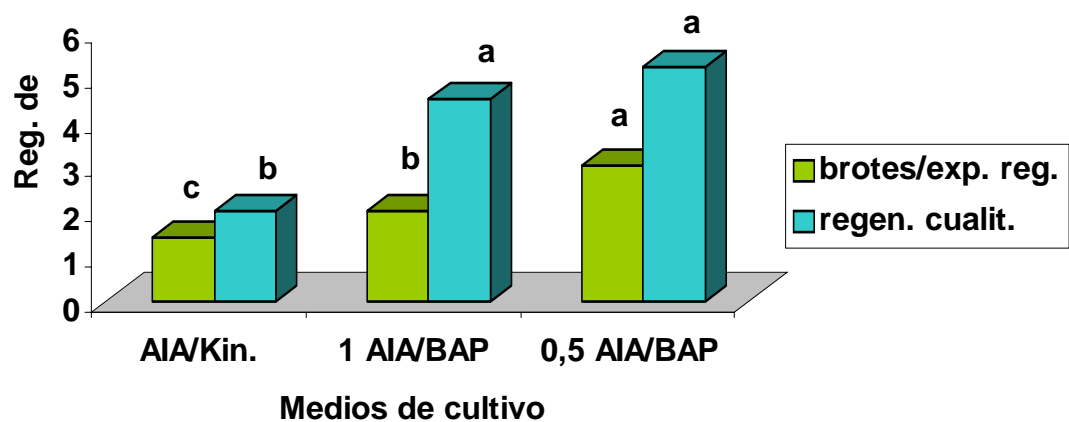
Fig. 3.- Porcentajes de explantes que formaron callos, o regeneraron brotes del genotipo Ca-15 (subcultivo 1)



Al analizar estadísticamente el número de brotes mayores de un centímetro por explante regenerado (Fig. 4), no se observaron diferencias significativas entre los medios con AIA y BAP, que presentaron los mejores valores, y el peor valor se encontró en el medio con Kinetina y AIA. Algo similar ocurrió al analizar de forma cualitativa la regeneración, pero en este caso el medio con la menor concentración de AIA y BAP, tuvo un comportamiento significativamente superior al resto.

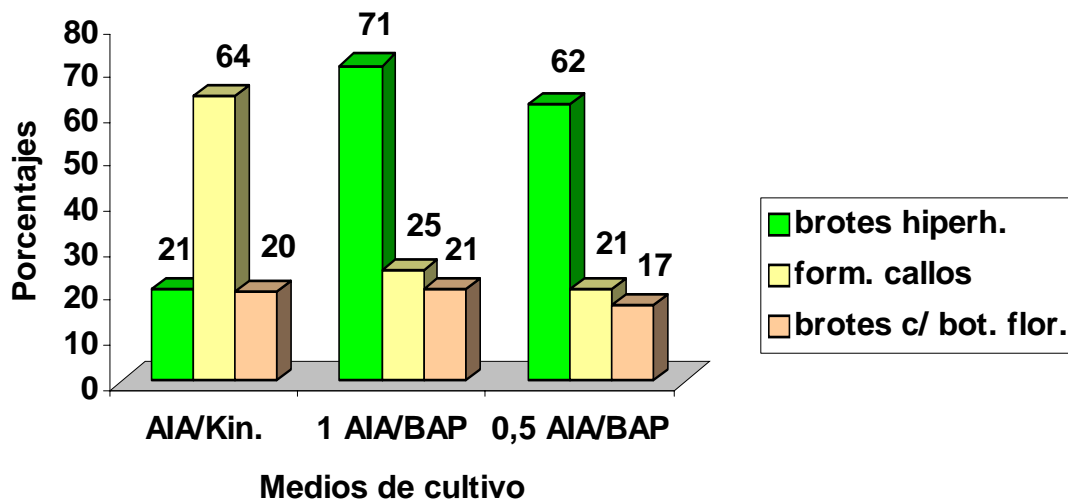
La organogénesis directa había sido obtenida anteriormente en girasol a partir de cotiledones de semillas maduras por Nestares *et al.*, 1996 y Mayor *et al.*, 2001, así como en otras especies por Soneji *et al.*, 2000, Ainsley *et al.*, 2001, Chaturvedy y Bhatnagar, 2001 y Woo *et al.*, 2001.

Fig. 4.- Número de brotes / explante regenerado y regeneración cualitativa de brotes del genotipo Ca-15 (subcultivo 1)



Cuando se analizó la evaluación del segundo subcultivo, se observó que la regeneración continuó desarrollándose más abundantemente en el medio con la concentración de 0,5 mg/L de AIA y BAP y el menor porcentaje de formación de callos y presencia de botones florales (Fig. 5). En el medio que contenía AIA y Kinetina, aunque hubo menor porcentaje de brotes hiperhídricos, la regeneración fue menos abundante y el porcentaje de formación de callos fue mayor, aspecto indeseable que debe evitarse cuando se desea que haya estabilidad genética.

Fig. 5.- Porcentaje de brotes hiperhídricos, formación de callos y presencia de botones florales del genotipo Ca-15 (subcultivo 2)



En todos los medios hubo presencia de brotes hiperhídricos, así como botones florales, como había sido encontrado anteriormente por otros autores (Greco *et al.*, 1984; Nestares *et al.*, 1996; Paterson, 1984 y Zorzoli *et al.*, 1996). La floración precoz fue atribuida tanto a condiciones físicas, como químicas durante la incubación (Paterson, 1984) y aunque es considerado un factor indeseable, ha sido planteado por otros autores como útil en los estudios fisiológicos de floración *in vitro* (Greco *et al.* (1984).

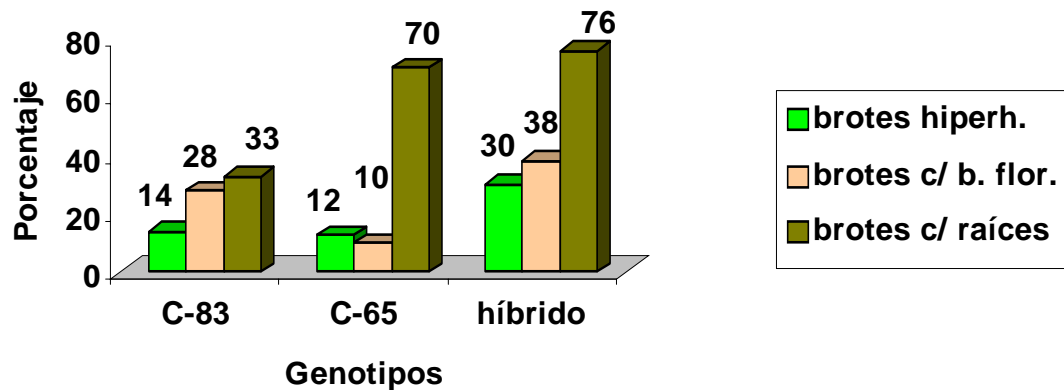
En el análisis de la incorporación de nitrato de plata al medio que había dado los mejores resultados y el empleo de diferentes genotipos (experimento 2), no se apreciaron diferencias significativas entre medios de cultivo, ni entre genotipos, aunque se observaron mejores resultados en los medios con nitrato de plata.

Mayor *et al.* (2001) habían planteado disminución de la presencia de plántulas hiperhídricas y botones florales con el empleo de nitrato de plata, aunque Baker *et al.* (1999) encontraron que produjo un pequeño efecto tanto positivo como negativo en la reducción de la hiperhidricidad.

Cuando se analizó el comportamiento de los brotes en un medio para facilitar el enraizamiento (Fig. 6), se apreció que el genotipo C-65 presentó los porcentajes más bajos de hiperhidricidad y botones florales, factores que afectan el desarrollo normal de las plántulas, así como un porcentaje de formación de raíces de 70 %.

En este comportamiento se pone de manifiesto la influencia del genotipo en los trabajos *in vitro*, como ha sido señalado en trabajos anteriores (Rodríguez *et al.*, 2002)

Fig. 6.- Porcentajes de brotes hiperhídricos, presencia de botones florales y enraizamiento en tres genotipos (experimento 3)



CONCLUSIONES

- La regeneración de brotes reportó los mejores resultados en el medio que contenía la dosis menor de AIA y BAP, en el cual sería posible la multiplicación de genotipos de interés.
- Los genotipos presentaron comportamientos diferentes en los porcentajes de hiperhidricidad y botones florales, presentándose los valores más bajos en el C-65, con un porcentaje de formación de raíces del 70 %.

BIBLIOGRAFIA

- Ainsley, P. J.; F. A. Hammerschlang; G. W. Bertozzi Collins y M. Sedgley, 2001: "Regeneration of almond immature seed cotyledons". *Plant cell, tissue and organ culture*, 67 (3): 221-226.
- Baker, C. M. *et al*, 1999.: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 39-49
- Chaturvedi, R. y S. P. Bhatnagar, 2001.: "High- frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar Baby". *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant*, 37: 255-258.
- Freyssinet, M. y G. Freyssinet, 1988.: "Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L) immature embryos". *Plant Sci.*, 56: 177-181,
- Geneviève, J.; R. Bronner y G. Hahne, 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.; O. A. Tanzarella, G. Carrozzo y A. Blanco, 1984. : "Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L)". *Plant Science Letters*, 36: 73-77,

Laparra,, H.; P. Stroevea, P. Ivanov y G. Hahne, 1997.: "Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser". *Plant Cell Rep.* 16: 692-695,

Mayor, M.L.; G. Nestares, R. Zorzoli, P. Ludueña y L. Picardi, 2001.: "Shoot organogénesis derived from cotyledonary explants in sunflower". REDBIO

Murashige, T. y F. Skoog, 1962. : "A revised medium of rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture". *Physiol. Plant.* 15: 473- 497,

Nestares, G.; R.Zorzoli R, L. Mroginski y L. Picardi, 1996: "Plant regeneration from mature sunflower seeds". *Helia*. 19 (24): 107-112.

Paterson, K. E. 1984.: "Shoot tip culture of *Helianthus annuus*- flowering and development of adventitious and multiple shoots". *Am. J. of Bot.*71 (7): 925-931.

Rodríguez, A. J.; A. Rodríguez, R. López, D. Pérez, O. Pérez y N. Marrero, 2002.: "Obtención de callos de *Helianthus annuus* L." *Rev. Jardín Botánico Nacional* 23 (1): 131-136,

Soneji, J. R.; P. S. Rao y M. Mhatre, 2001: "Enhanced regeneration of multiple shoots and plantlets in young cotyledons of neem, *Azadirachta indica* A." *Juss. Physiol. Mol. Biol. Plants*, 7 (2): 175-180.

Woo S.H.; A. Nair, T. Adachi y C. G. Campbell, 2000.: "Plant regeneration from cotyledons tissues of common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)". *In vitro. Cell Dev. Biol.- Plant*, 36: 358-361,

Zorzoli, R. G.; M. Nestares y L. A. Mroginski: 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): 389-396j.