

ASPECTOS SOBRE EL CULTIVO *IN VITRO* DE GIRASOL ABORDADOS EN EL INIFAT

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

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), Cuba.
E mail: ajrm@inifat.co.cu

RESUMEN

El girasol se encuentra entre los cuatro cultivos oleaginosos más importantes del mundo, cultivándose tanto en países desarrollados como subdesarrollados, debido a sus bajos requerimientos de producción y por su utilidad, tanto en la alimentación humana como animal. Por ello abordar los aspectos relacionados con el cultivo *in vitro* de girasol resulta importante, teniendo en cuenta además, que este es un cultivo considerado “recalcitrante” para estas técnicas. En los últimos años en el INIFAT se realizaron estudios sobre la callogénesis, regeneración directa de plantas, así como la germinación de embriones inmaduros a diferentes tiempos de polinización y conservación de las semillas. Se encontró que el mayor crecimiento de los callos se produjo en el medio constituido por 5 mg/L de BAP y el explante hipocotilo. La regeneración de los brotes resultó mejor en el medio que contenía la menor dosis de AIA y BAP estudiada. En el caso de la germinación de los embriones, se determinó que un período de siete días de permanencia de las semillas en refrigeración estimuló la germinación y el crecimiento de las plántulas *in vitro*. En todos los genotipos fue posible la obtención de plántulas a los 40 días de conservadas las semillas, así como su adaptación a condiciones ambientales.

Palabras claves: girasol, callogénesis, regeneración directa y embriones

INTRODUCCION

El girasol (*Helianthus annuus*) está entre los cultivos productores de aceite más importantes del mundo. Debido a sus bajos requerimientos de producción, alta calidad de aceite, contenido de proteína y utilización de todas las partes de la planta, su cultivo se ha extendido en países desarrollados y subdesarrollados (Škorić, 1992).

Se ha planteado que 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).

El género *Helianthus* comprende 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, con lo que se logra reducir el intervalo generacional para la obtención de materiales selectos de girasol (Aspiroz *et al.*, 1987). Se ha planteado además, que la resistencia a imidazolinonas observada en campo puede ser verificada en plántulas desarrolladas a partir de embriones inmaduros (Nestares, 2008)

Por otra parte George (1993) planteó que el material de plantas puede ser conservado para ser usado con propósitos posteriores, lo que aumenta su posibilidad de empleo. Esto también ha sido abordado por Zorzoli *et al.*, (1996).

Además, se han realizado investigaciones mediante el empleo de diferentes reguladores del crecimiento, así como con diferentes partes de la planta, donde se han obtenido logros importantes en la inducción de callos, regeneración y organogénesis (Greco *et al.*, 1984; Witrzens *et al.*, 1988; Filippone, 1992; Geneviere *et al.*, 1995; Nestares *et al.*, 1996; Laparra *et al.*, 1997), así como obtención de variantes somaclonales resistentes a *Alternaria helianthi* (Gallenberg *et al.*, 1990).

A pesar de los resultados obtenidos debe continuarse profundizando en estos trabajos, ya que al estar involucrados diferentes factores para obtener éxito, en ocasiones no hay repetibilidad. Los objetivos de este trabajo fueron: disponer de metodologías para la callogénesis, regeneración directa y multiplicación *in vitro*, conocer las condiciones necesarias para el establecimiento del cultivo de embriones, así como conocer la respuesta de diferentes genotipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Callogénesis:

Material Vegetal: ápices, hipocótilos, epicótilos, cotiledones y hojas de plántulas del genotipo de girasol: Caburé-15 (Ca-15), Cubasol-113 (C-113), Cubasol- 83 (C-83) y Cubasol- 65 (C-65), germinadas *in vitro*.

Medios de cultivo: Murashige y Skoog, 1962 (MS), modificados con los reguladores del crecimiento: BAP (1, 5 y 7mg/L), ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4 -D) (1 mg/L) y Acido indol acético (AIA) (1 mg/L).

Evaluación: crecimiento de los callos (g). Análisis estadístico ANOVA para un diseño factorial, programa estadístico STATITCF

Regeneración directa:

Material Vegetal: cotiledones maduros (C-65, C-83, C-113, Ca-15, híbrido).

Medios de cultivo: MS modificado con AIA y BAP o AIA y Kinetina (6-Furfurilamino purina).

Incorporación de AgNO₃.

Evaluación: según Tabla I

Cultivo de embriones:

Material Vegetal: embriones inmaduros de diferentes genotipos.

Exp.1 (selección del medio): MS (1/2) y MS modificado con ANA, Kin. y Acido Giberélico o BAP y ANA, a los 15 días de polinizados.

Exp. 2: embriones colectados a los 9, 12 y 15 días en MS (1/2).

Evaluación: germinación cualitativa y presencia de callos.

Conservación de embriones:

Material Vegetal: cabezuelas en nylon, o semillas en frascos plásticos.

Tiempos de refrigeración de las semillas: 0, 7, 40, 55 y 70 días.

MS con la mitad de los nutrientes

Evaluación: % de contaminación y germinación, altura de las plántulas.

En estos casos se empleó ANOVA con un diseño completamente aleatorizado desbalanceado y Duncan al 5% de significación.

Tabla 1. Experimentos realizados para la regeneración directa

EXPEIMENTO	REGULADOR	GENOTIPO	EVALUACION
Experimento 1	1 AIA y 2 Kin. 1 AIA y BAP 0,5 AIA y BAP	Caburé-15 Cubasol-113	% regeneración de brotes % formación callos
Subcultivo 1	Idem	Caburé-15	% regeneración de brotes, % formación callos, # brotes / explante regenerado., regeneración cualitativa (*)
Subcultivo 2	Idem	Caburé-15	% 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	* regeneración cualitativa: 1: comienzo de regeneración 2: mitad de explantes regenerados 3: regeneración abundante
Experimento 3	MS (1/2)	Cubasol- 83 Cubasol- 65 Híbrido	% brotes hiperhídricos, % brotes con raíces % brotes con botón floral

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Callogénesis

Al analizar el comportamiento de los cuatro medios de cultivo estudiados y los cuatro explantes, se observaron diferencias significativas tanto entre los medios, como entre los explantes, además en la interacción entre ambos (Tabla 2).

Tabla 2: 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*	-	-
ERROR	11,27	112	0,10	0,32	70,3 %

Al analizar la interacción de los medios con los diferentes tipos de explantes (Fig. 1) se encontró que los mejores crecimientos de los callos se obtuvieron en el hipocótilo y epicótilo del medio que contenía 5 mg/L de BAP, sin diferencias significativas entre ellos, seguidos por el ápice en ese mismo medio y el hipocótilo en los medios con 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA.

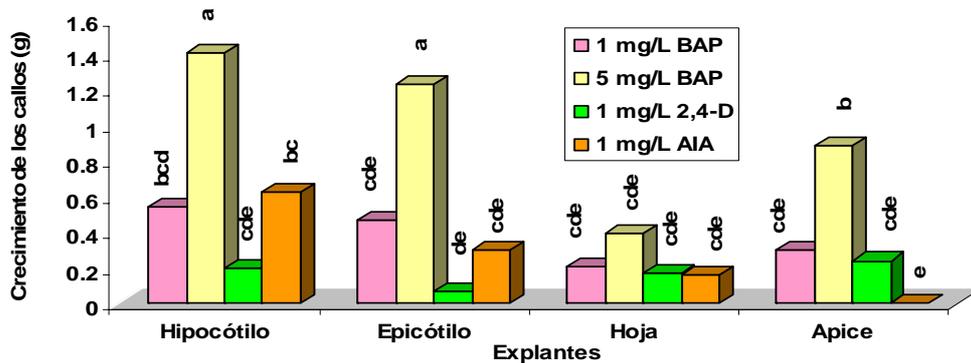


Fig. 1.- Interacción medio-explante en el crecimiento de los callos de girasol

En el medio que contenía 1 mg/L de AIA, se observó la formación de raíces adventicias en diferentes porcentajes, de acuerdo al tipo de explante. En el hipocótulo (35 %), epicótulo (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 se produjo el crecimiento de plántulas con el 75 % de enraizamiento. Al cultivar los nudos en el mismo medio de cultivo hubo desarrollo de plántulas, lo que sería útil para la propagación de materiales de interés, ya que aunque los meristemos apicales también han sido utilizados por otros autores para la micropropagación 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 puede ser otra vía a utilizar para estos fines.

También es de señalar, 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 tejidos, pudiera ser útil en estudios fisiológicos de 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).

Las diferencias significativas que se presentaron al estudiar los explantes hipocotilo y cotiledón, con cuatro genotipos y dos medios de cultivo se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: 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 %

Tabla 4.- Interacción medio-genotipo y explante-genotipo en el crecimiento de los callos de girasol.

MEDIOS	GENOTIPOS	X MEDIA	EXPLANTES	GENOTIPOS	X MEDIA
5 BAP	Csol 83	1,51 a	Hipocótilo	Csol 83	1,41 a
	Cab 15	1.36 ab		Cab 15	1.05 ab
	Csol 113	1.33 ab		Csol 113	1.34 a
	Csol 65	0.8 c		Csol 65	1.19 ab
7 BAP	Csol 83	0.79 c	Cotiledón	Csol 83	0.89 b
	Cab 15	0.84 c		Cab 15	1.15 ab
	Csol 113	1.07 bc		Csol 113	1.05 ab
	Csol 65	1.2 abc		Csol 65	0.82 b

Teniendo en cuenta la interacción medio-genotipo (Tabla 4), 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.

Para muchas especies ha sido reportado que la respuesta a las condiciones de cultivo es afectada por el genotipo. En girasol Witzrens *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 (Tabla 4), 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. 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.

Regeneración directa

Al analizar estadísticamente el número de brotes mayores de un centímetro por explante regenerado (Fig. 2), no se observaron diferencias significativas entre los medios con AIA y BAP, que presentaron los mejores valores. 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.

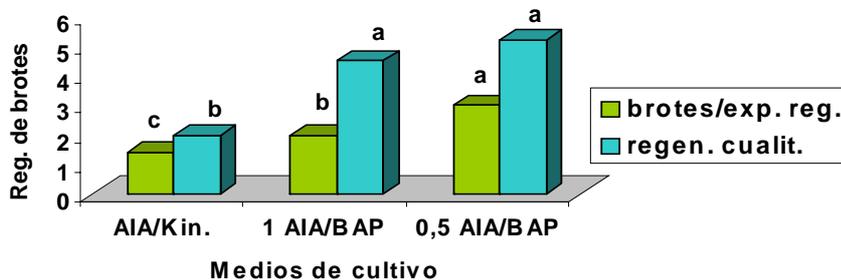


Fig. 2.- Número de brotes / explante regenerado y regeneración cualitativa (1: comienzo de regeneración, 2: mitad de explantes regenerados, 3: regeneración abundante) de brotes del genotipo Ca-15 (subcultivo 1).

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. 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.

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.

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 ambos genotipos tuvieron valores significativamente superiores en el medio M1 con relación al M3 (Fig. 3).

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.

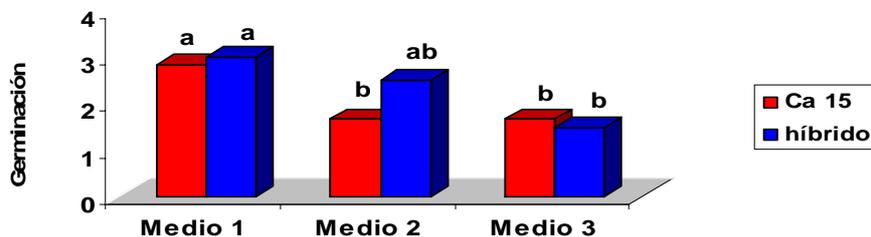


Fig. 3.- Germinación de los embriones inmaduros de girasol en tres medios de cultivo y dos genotipos a los 15 días posteriores a la polinización.

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. 4). 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. Los mejores valores a los 15 días se apreciaron en el Ca-15 (Fig. 5).

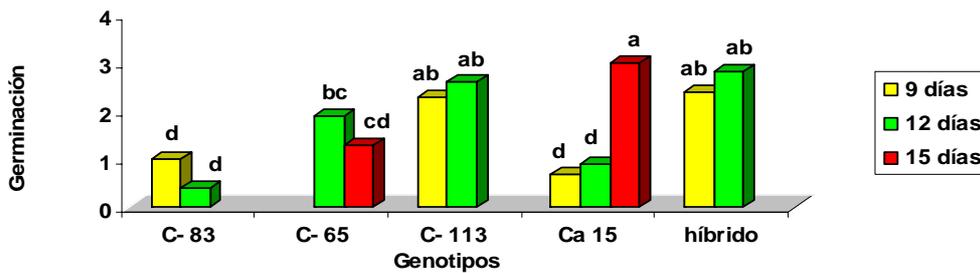


Fig. 5.- Germinación de los embriones inmaduros de girasol en cinco genotipos a diferentes tiempos de polinización.

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 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 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.

Al analizar que tipo de muestra fue la más idónea para conservar embriones inmaduros en refrigeración, se apreció que los capítulos guardados en bolsas de nylon sufrieron una rápida contaminación, observándose ya a los siete días hongos en los mismos, mientras que al mantener las semillas sueltas, envueltas en papel dentro de frascos, el tiempo planteado pudo extenderse, por lo que se utilizó esta vía para realizar el estudio posterior.

Cuando se analizaron los porcentajes de contaminación teniendo en cuenta tres genotipos y tres tiempos de conservación mediante el empleo de las semillas conservadas sueltas, se pudo apreciar un incremento de la contaminación al aumentar los días de exposición a baja temperatura (Fig. 5), con excepción del genotipo Ca-15, en el que se presentó el mayor porcentaje de todos los tiempos estudiados, sin haber sido colocado en refrigeración, lo que pudiera deberse a un problema no inherente al material.

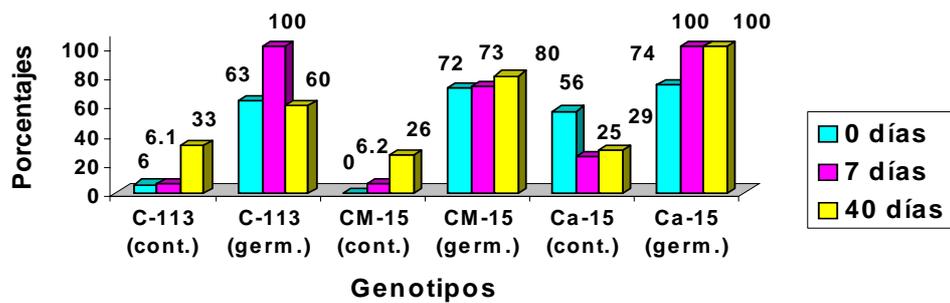


Fig. 5.- Comportamiento de la contaminación y la germinación, en tres genotipos a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

En el caso de la germinación (Fig. 5), se observaron porcentajes superiores al 72 % en todos los tiempos, encontrándose los valores mayores a los 7 y 40 días, mientras en el genotipo C-113 el valor más elevado ocurrió a los 7 días.

Al analizar la altura de las plántulas germinadas en los diferentes tratamientos, se observó que en todos los genotipos la tendencia fue de incrementar a los 7 días de refrigeración.

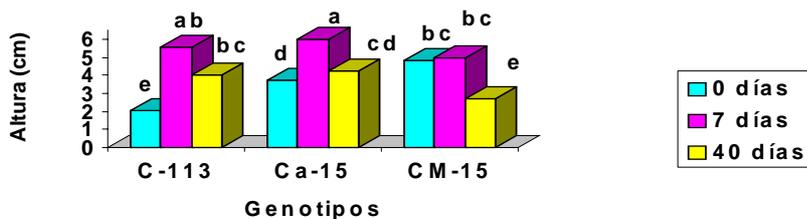


Fig. 4.- Comportamiento de la altura de las plántulas, en tres genotipos a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

Zorzoli *et al.*, (1994), en estudios con otros genotipos y otras condiciones, habían observado que a partir de los 43 días el porcentaje de contaminación aumentaba debido al estado necrótico de los capítulos, por lo que sugirieron que el período de siembra de los materiales podía prolongarse hasta este tiempo..

Se puede plantear que un corto período de refrigeración (7 días) estimuló los porcentajes de germinación y altura de las plántulas, aunque con tiempos mayores (55 y 70 días) también fue posible el crecimiento de plántulas con un desarrollo apropiado para la adaptación a tierra.

Se observó en casos aislados la ocurrencia de plántulas hiperhídricas, lo que también ha sido encontrado por otros autores en el cultivo *in vitro* de girasol (Witizens, 1988; Nestares, 1996; Mayor, 2001).

En el actual trabajo se logró la eliminación de este fenómeno al exponer las plántulas en tubos de ensayo destapadas, por 72 horas en casa de cristal, lo que no había sido planteado con anterioridad. Esto contribuyó a la aclimatación de las plantas, donde casi un 100 % de plántulas se adaptó a tierra, observándose el mejor comportamiento comparado con el mantenimiento de los tubos destapados en el cuarto de cultivo por 24 horas y después las plántulas colocadas en agua por 48 horas, que había sido sugerido por otros autores (Zorzoli, 1996). En este caso la mayoría de las plántulas murieron al ser trasplantadas a cepellones.

Las plántulas se adaptaron a tierra en cepellones y estuvieron listas para ser transferidas al suelo a los 10 días. El desarrollo se llevó a cabo en bolsas de nylon donde florecieron, y se obtuvieron semillas cuyos embriones germinaron *in vitro*.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología para el crecimiento de los callos de girasol, determinándose el mejor explante (hipocótilo) y medio de cultivo (5 mg/L de BAP) a utilizar.

Se ajustó la metodología de regeneración directa de brotes a partir de cotiledones maduros, reportándose los mejores resultados en el medio que contenía la dosis menor de AIA y BAP.

Se ajustaron las condiciones necesarias para el establecimiento del cultivo de embriones inmaduros, así como su mantenimiento, encontrándose que un período de permanencia de

las semillas inmaduras durante siete días en refrigeración, estimuló la germinación y el crecimiento de las plántulas *in vitro*.

Se logró la adaptación a condiciones ambientales y el desarrollo hasta la floración de las plantas obtenidas a partir de embriones inmaduros.

El genotipo jugó un papel importante tanto en la callogénesis, morfogénesis, como el cultivo de embriones inmaduros, de los genotipos cubanos de girasol estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsley, P. J.; F. A. Hammerschlang; G. W. Bertozzi Collins y M. Sedgley: "Regeneration of almond immature seed cotyledons". *Plant cell, tissue and organ culture*, 67 (3): 221-226, 2001.
- Aspiroz, HS, Vincourt T, Serieys P y Galais A (1987) La culture *in vitro* des embryos immatures dans l' accélération du cycle de sélection des lignées de tournesol et ses effets morphovégétatifs. *Helia*. 10: 35-38.
- Baker, CM, *et al.*, (1999) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 39-49.
- Bohorova, N, Atanassov A y Georgieva-Todorova J (1985) *In vitro* organogenesis, androgenesis and embryo culture, in the genus *Helianthus* L. *Z. Pflanzenzüchtg.* 95, 35-44.
- Chaturvedi, R. y S. P. Bhatnagar: "High- frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar Baby". *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant*, 37: 255-258, 2001.
- 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.
- Freyssinet, M. y G. Freyssinet: "Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L) immature embryos". *Plant Sci.*, 56: 177-181, 1988.
- Gallenberg, P, Espinasse A y Carson M (1990) *In vitro* production of somaclonal variants resistant to *Alternaria Helianthi*. En: *Proceedings: Sunflower Research Workshop*. 28.
- Geneviève, J.; R. Bronner y G. Hahne: "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, 1995.
- George, EF (1993) *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. The technology. 2^{da} Edición.
- Greco, B.; O. A. Tanzarella, G. Carozzo y A. Blanco: "Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L)". *Plant Science Letters*, 36: 73-77, 1984.
- Laparra, H, Stroeve 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)
- 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, Nestares G, Zorzoli R, Ludueña P y Picardi (2001) Shoot organogenesis derived from cotyledonary explants in sunflower (*Helianthus L.*). Redbio 2001.
- Murashige, T. y F. Skoog: "A revised medium of rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture". *Physiol. Plant.* 15: 473- 497, 1962.
- Nestares, G. (2008) <!DOCTYPE HTML PUBLIC "-//W3C//DTD HTML 4.0 Transitional//EN" "http://www.w3.org/TR/REC-html40/loose.dtd"> <html xml:lang="es" lang="es"><head>
- 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. 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.
- Škorić, D (1992) Achievements and future directions of sunflower breeding. *Field Crops Research.* 30: 231-270.
- Soneji, J. R.; P. S. Rao y M. Mhatre: "Enhanced regeneration of multiple shoots and plantlets in young cotyledons of neem, *Azadirachta indica A.*" *Juss. Physiol. Mol. Biol. Plants*, 7 (2): 175-180, 2001.
- 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.
- Woo S.H.; A. Nair, T. Adachi y C. G. Campbell: "Plant regeneration from cotyledons tissues of common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*)". *In vitro. Cell Dev. Biol.- Plant*, 36: 358-361, 2000.
- Zorzoli, R, Coinly EL, Ludueña P y Picardi 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.