

Obtención de callos de *Helianthus annuus* L.

Ana Julia Rodríguez Mansito, Arlene Rodríguez Manzano, Reynaldo López Gutiérrez, Dayamí Pérez Hernández, Odalys Pérez Díaz y Norma Marrero Granado

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", INIFAT

RESUMEN

Se describe un protocolo para la obtención de callos utilizando diferentes explantes y medios de cultivo, para ello se trabajó primeramente con la variedad Caburé-15 de girasol (*Helianthus annuus* L.). Se utilizaron como explantes el ápice y secciones de hipocótilo, epicótilo y hoja de plántulas germinadas *in vitro*, que fueron cultivados en cuatro medios MS modificados con los reguladores del crecimiento BAP (1 y 5 mg/L), 2,4 -D (1 mg/L) y AIA (1 mg/L). Posteriormente se estudiaron los genotipos Cubasol-113, Cubasol-83, Cubasol-65 y Caburé-15, con el empleo de los explantes hipocótilo y cotiledones en dos medios de cultivo MS con concentraciones de 5 y 7 mg/L de BAP. Los datos obtenidos del crecimiento de los callos se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño factorial, con el empleo del programa estadístico STATITCF. El crecimiento de los callos fue significativamente mayor cuando se emplearon 5 mg/L de BAP en ambos experimentos. En este medio el genotipo que presentó un crecimiento de los callos significativamente inferior fue el C-65. El hipocótilo fue el tipo de explante que produjo mayor crecimiento. Para un mismo tipo de explante no se observaron diferencias significativas entre genotipos. Los ápices cultivados en presencia de AIA desarrollaron plántulas pero no presentaron desarrollo de callos. En este mismo medio ocurrió la formación de raíces adventicias en el resto de los explantes.

Palabras clave: AIA, BAP, 2,4-D, explantes, girasol, *Helianthus annuus* L.

ABSTRACT

A procedure for calli obtention in different explants and culture media is described. First we worked with Caburé-15 variety of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Apical region and hypocotil, epycotil and leaf sections from *in vitro* germinated plantlets were used as explants. They were cultivated in four modified MS media with BAP (1 and 5 mg/L), 2,4-D (1mg/L) and IAA (1mg/L) as growth regulators. After Cubasol-113, Cubasol-83, Cubasol-65 y Caburé-15 genotypes were studied with hypocotiles and cotyledons explants in two MS media containing 5 and 7 mg/L BAP. Results were evaluated through varianz analysis for a factorial design STATITCF statistical program. A significantly higher weight increase appeared with 5 mg/L BAP in both experiments. In this medium C- 65 genotype showed a significantly lowest growth callus. Growth was significantly higher in hypocotil explant. Significative differences weren't observed between genotypes in the same explant. In IAA medium calli were not present, but plantlets were developed from apical region while adventitious roots were formed from the other explants.

Key words: IAA, BAP, 2,4-D, explants, sunflower, *Helianthus annuus* L.

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) está entre los cultivos productores de aceite más importantes del mundo, cultivándose principalmente en Europa y Estados Unidos, aunque también se ha extendido a otros países desarrollados y subdesarrollados, debido a sus bajos requerimientos de producción, alta calidad de aceite y que la torta resultante de la extracción es muy importante en la alimentación animal por su alto contenido en proteínas (Škorié, 1992).

La aplicación de métodos biotecnológicos posibilita acelerar y apoyar los programas de mejoramiento genético convencionales en muchos cultivos. En el caso específico del girasol esto está frenado considerablemente por la dificultad de regenerar plantas completas, ya que ello depende de la naturaleza del explante, el contenido hormonal del medio y del genotipo, encontrándose entre las especies consideradas "recalcitrantes" para estas técnicas (Freyssinet y Freyssinet, 1988).

Se han realizado investigaciones en girasol con el empleo de diferentes partes de la planta y varios reguladores del

crecimiento, donde se han obtenido logros importantes en la inducción de callos, regeneración y organogénesis (Greco *et al.*, 1984; Witrzens *et al.*, 1988; Filippone *et al.*, 1992; Geneviève *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), aunque todavía, los estudios sobre su comportamiento en el cultivo *in vitro* son limitados aún y con resultados variables (Alibert, 1994).

Teniendo en cuenta que tanto el establecimiento como el desarrollo de los callos están muy influidos por el tipo de explante, medio de cultivo y genotipo, se planteó como objetivo de este trabajo lograr una metodología para la obtención de callos mediante el estudio de dichas variables, que posibilite realizar investigaciones posteriores de regeneración de plantas, para apoyar los programas de mejoramiento convencionales del girasol en el INIFAT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon semillas maduras sin la testa de diferentes variedades de girasol, que fueron desinfectadas con alcohol al 70 % durante 2 min. y

posteriormente con bicloruro de mercurio 0,1 % durante 5 min. La germinación se realizó en medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) sin hormonas. 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. y a 120 ° C. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 14 horas luz y 25 ± 2 °C de temperatura.

Después que las plantas se desarrollaron se realizaron dos experimentos:

En el primero se emplearon como explantes: el ápice y secciones de hipocótilo, epicótilo y hoja de la variedad de girasol Caburé-15, que fueron colocados en cuatro medios de cultivo:

- MS +1 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP)
- MS+ 5 mg/L de BAP
- MS + 1 mg/L de Acido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4 -D)
- MS + 1 mg/L de Acido indol acético (AIA)

Para la evaluación del crecimiento de los callos se tomaron 8 réplicas por tratamiento a los 30 días de cultivo, utilizándose el peso fresco de los mismos en gramos menos el peso inicial del explante. Además, se determinó la presencia de raíces adventicias, mediante el porcentaje de explantes que las presentaron.

Posteriormente se realizó el segundo experimento. En este caso se utilizaron como explantes secciones de hipocótilos y cotiledones de las variedades Cubasol-113 (C-113), Cubasol-83 (C-83), Cubasol-65 (C-65) y Caburé-15 (Ca-15), que fueron colocados en dos medios de cultivo:

- MS + 5 mg/L de BAP
- MS + 7 mg/L de BAP

Se evaluaron 10 réplicas por tratamiento a los 35 días de cultivo.

Los datos de cada experimento se analizaron de forma independiente, mediante un análisis de varianza para un diseño factorial empleando el programa estadístico STATITCF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferencias entre los medios de cultivo y entre los explantes resultaron significativas, así como las interacciones medio explante en ambos experimentos. También las interacciones medio - genotipo y explante - genotipo en el segundo experimento mostraron diferencias significativas, no así al tener en cuenta las tres variables (Tablas I y II).

Al analizar la interacción medio - explante en el primer

experimento, se pudo observar a los treinta días, 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 (Fig.1). Este mismo comportamiento había sido detectado desde los doce días, pero sólo visualmente.

TABLA I

Análisis de varianza del experimento 1.

	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 %

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.

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 sólo o combinado en diferentes tipos de concentraciones y explantes, hallando en la concentración de 5 mg/L de BAP a diferencia nuestra, 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. Ya a los doce días de colocados los explantes procedentes de hipocótilos y epicótilos en el medio de cultivo, se pudo observar su presencia, aunque no se evaluó. En la evaluación realizada a los 30 días se encontró esa formación en diferentes porcentajes, de acuerdo al tipo de explante, así se pudo apreciar en el hipocótilo (35 %), epicótilo (23 %) y hoja (11 %) (Fig. 2).

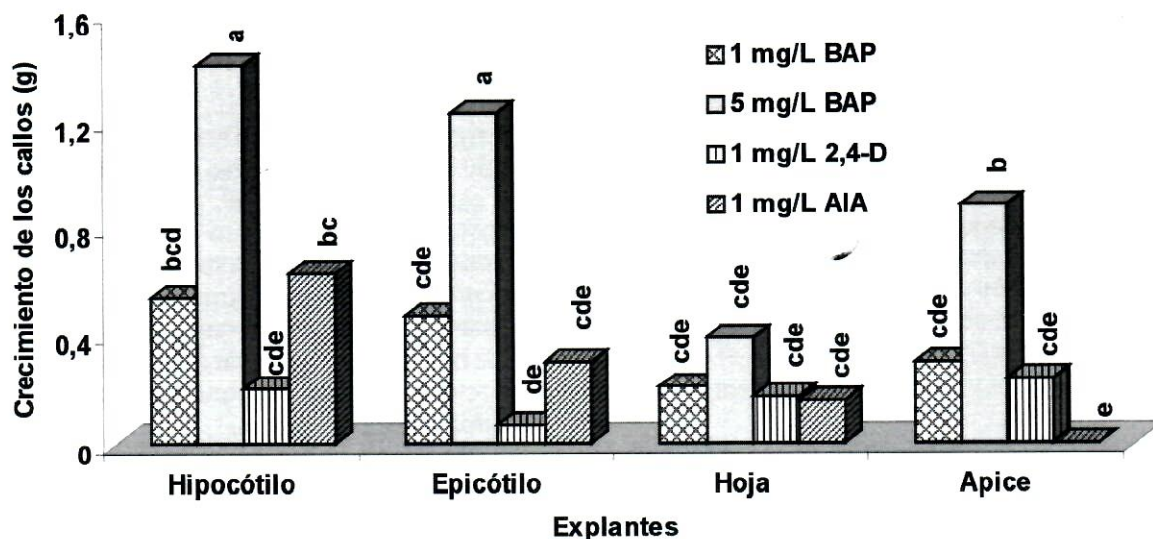


Fig. 1. Interacción medio-explante en el crecimiento de los callos de girasol.

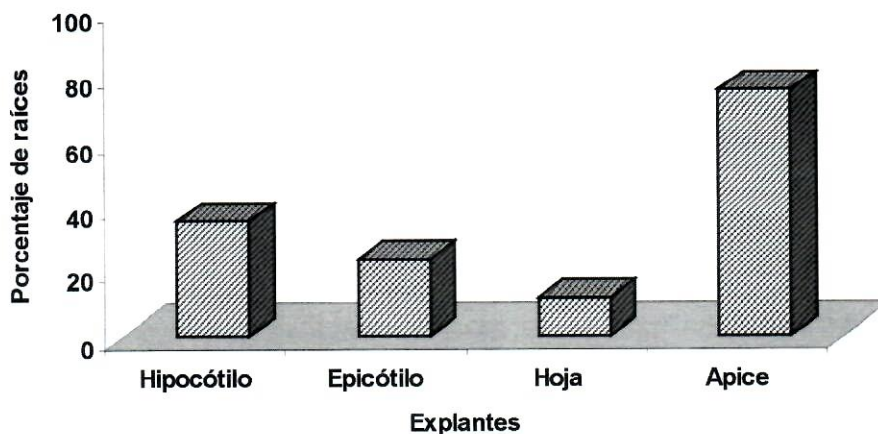


Fig. 2. Efecto del AIA en la formación de raíces adventicias de girasol.

TABLA II

Análisis de varianza del experimento 2.

	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 N.S.	-	-
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 N.S.	-	-
ERROR	11,27	144	0,23	0,48	43,2 %

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 sí el crecimiento de plántulas, donde se apreció el 75 % de enraizamiento (Fig. 2) 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 pudiera 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 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.

Otro aspecto que se debe señalar, es la ocurrencia de algunas plántulas con inflorescencia, cuestión encontrada también por otros autores (Greco *et al.*, 1984; Paterson, 1984; Nestares *et al.*, 1996 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).

Cuando analizamos la interacción medio - explante en el segundo experimento (Fig. 3), se observó que en los hipocótilos el medio que contenía 5 mg/L de BAP produjo un incremento del crecimiento de los callos significativamente superior, no encontrándose diferencias significativas entre medios al analizar los cotiledones.

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. 4), se apreció que en los genotipos C-83 y 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 al resto. 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 dosis mayores de BAP.

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 plantas y plantearon que éste ejerció un efecto pronunciado sobre la respuesta morfológica del girasol.

Con relación a la interacción explante - genotipo (Fig. 5), 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 de los genotipos C-113 y C-65. Al analizar los explantes separadamente, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los mismos entre genotipos.

CONCLUSIONES

-Los medios y explantes se comportaron de forma diferente, produciéndose el mayor crecimiento de los callos en el medio constituido por BAP 5 mg/L y el explante hipocótilo.

-El medio constituido por AIA 1 mg/L provocó el desarrollo de plántulas a partir de los ápices, lo que pudiera ser analizado para ser empleado en la micropropagación.

-Existió un comportamiento diferencial entre genotipos, en el medio constituido por BAP 5 mg/L, presentando el genotipo C-65 un crecimiento significativamente inferior al resto.

-No existieron diferencias significativas entre los genotipos para un mismo explante.

BIBLIOGRAFÍA

Alibert GC, Aslane- Chanabe C y Burrus M. 1994. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. *Plant Physiol. Biochem.*, 32 (1): 31- 44 R.

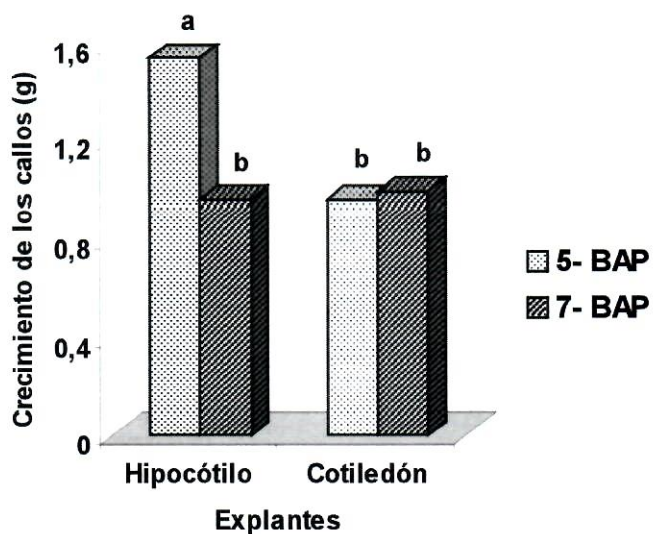


Fig. 3. Interacción medio-explante en el crecimiento de los callos de girasol.

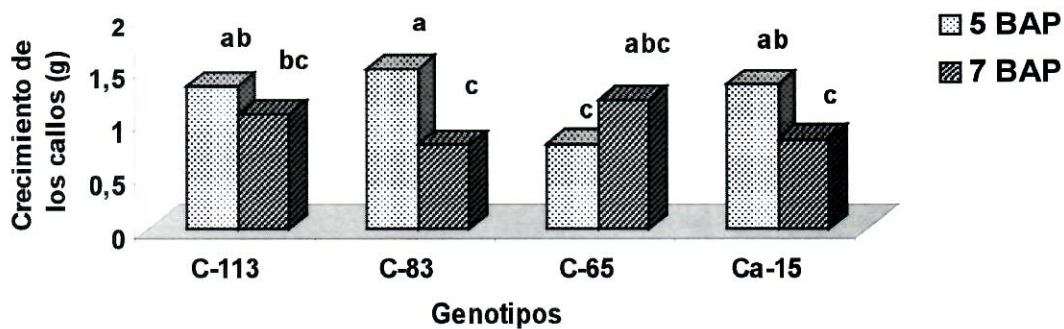


Fig. 4. Interacción medio-genotipo en el crecimiento de los callos de girasol.

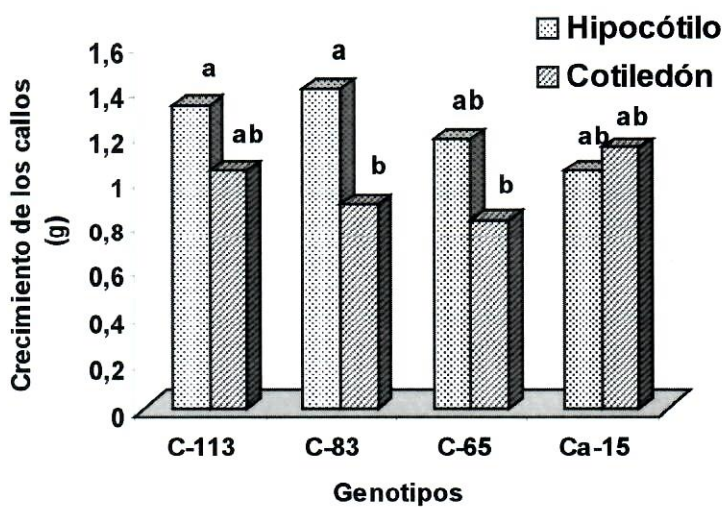


Fig. 5. Interacción genotipo-explante en el crecimiento de los callos de girasol.

- Antonova TS, Zezul TG, Krasnyanski SF y Borovkov AJ. 1990. Direct and indirect embryogenesis of sunflower. En: Proceedings: Sunflower Research Workshop. 30-32.
- Filippone E, M Leone y 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.
- Gallenberg P, Espinse A y Carson M. 1990. **In vitro** production of somaclonal variants resistant to *Alternaria helianthi*. En: Proceedings: Sunflower Research Workshop. 28.
- Geneviève J, Bronner R y Hahne G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis 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, Stoeva P, Ivanov P y Hahne G. 1997. Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser. Plant Cell Rep. 16: 692-695.
- 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.
- 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. 117. 188-190.
- Paterson KE. 1984. Shoot tip culture of *Helianthus annuus*-flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Am. J. Bot.* 71 (7) 925- 931.
- Sadhu MJ. 1974. Effect of different auxins on growth and differentiation in callus from sunflower stem pith. *Ind. J. Exp. Biol.* 12: 110-111.
- Škorić D. 1992. Achievements and future directions of sunflower breeding. *Field Crops Research*. 30: 231-270.
- Wingender R, Henn H-J, Barth S, Voeste D, Machlab H y Schnabl H. 1996. A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 15: 742-745.
- Witzens 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.

Recibido: 5 de septiembre del 2000.

Direcc. de los autores: *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros. CP.17200, Ciudad de La Habana, Cuba.