

ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES INMADUROS DE GIRASOL CONSERVADOS EN REFRIGERACIÓN Y ACLIMATACIÓN DE LAS PLANTAS.

Ana Julia Rodríguez Mansito, Yanisbel Sánchez Rodríguez, Dayamí Pérez Hernández,
Norma Marrero Granado y Guillermo Brito Iglesias.

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”
(INIFAT), Cuba.*

E mail: ajrm@inifat.co.cu

RESUMEN

El cultivo de embriones inmaduros, entre otras aplicaciones, brinda la posibilidad de obtener líneas en un período de tiempo relativamente corto, lográndose reducir el intervalo generacional para la obtención de materiales selectos de girasol. En ocasiones se hace necesario conservar el material algún tiempo, por lo que se deben conocer las ventajas o desventajas que esto provoca. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio del efecto que produjo la conservación de semillas inmaduras, en refrigeración (4 °C), sobre la contaminación, la germinación de los embriones y el crecimiento de las plántulas *in vitro*, así como la adaptación a las condiciones ambientales de diferentes genotipos. Esto contribuirá a ajustar la metodología para su utilización en los programas de mejoramiento genético. Se utilizaron semillas inmaduras (en las cabezuelas o en frascos plásticos) de tres genotipos a los quince días posteriores al comienzo de la polinización y diferentes períodos de tiempo de permanencia en un refrigerador doméstico. Los embriones fueron introducidos en medio MS con la mitad de los nutrientes. A los siete días de cultivo se calculó el porcentaje de contaminación y germinación, así como se evaluó la altura de las plántulas. Las plántulas obtenidas fueron adaptadas a las condiciones ambientales. Se apreció que un corto período de permanencia de las semillas en refrigeración (siete días) estimuló el crecimiento. Fue posible la obtención de las plántulas de todos los genotipos estudiados a los cuarenta días de conservación de las semillas inmaduras, así como su adaptación a tierra.

Palabras claves: embriones inmaduros, germinación, girasol

GERMINATION STUDIES OF SUNFLOWER IMMATURE EMBRYOS THAT WERE PRESERVED IN REFRIGERATION AND PLANTS ACCLIMATIZATION.

ABSTRACT

Immature embryos culture gives the possibility to obtain plant lines in a relatively short period of time with the reduction of generational intervals for obtaining select sunflower materials. In occasions, it is necessary to preserve materials for some period of time and their advantages or disadvantages must be known. This paper studied the effect of immature seed preservation at low temperature (4 °C) on contamination, embryo germination, *in vitro* plantlets growth and adaptation of different genotypes to environment conditions. This study will contribute to adjust the methodology for utilization in genetic improvement programs. Immature seeds of three genotypes (maintained in the head or in plastic flasks) at fifteen days after pollination beginning and different period of times in domestic refrigerator were used.

Embryos were cultured in MS medium with half of nutrients. Contamination and germinating percentage were calculated and plantlets high were measure, at seven days of culture. Obtained plantlets were adapted to environmental conditions. It was observed that short refrigeration time of seeds (seven days) stimulated plantlet growth. Plantlets from all studied genotypes were obtained at forty days of preservation of immature seeds at low temperature and they were adapted to soil conditions.

Key words: germination, immature embryos, sunflower

INTRODUCCIÓN

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 está limitado por ser una de las especies consideradas “recalcitrantes” para estas técnicas, aunque se han obtenido algunos resultados en la última década.

El primer reporte de cultivo de embriones exitoso, con híbridos interespecíficos de *Helianthus*, fue realizado por Bohorova, *et al.*, (1985), donde plantearon que se podían obtener plantas de interés para estudios citogenéticos del género.

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.

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). Teniendo en cuenta estos antecedentes se ha hecho necesario conocer la posibilidad de refrigeración de los embriones inmaduros, para ampliar los estudios sobre estos aspectos. Los objetivos de este trabajo fueron: analizar la contaminación, la germinación y el crecimiento de las plántulas *in vitro*, de tres genotipos a diferentes tiempos de refrigeración, así como la adaptación a condiciones ambientales de los genotipos estudiados. Todo lo anterior permitiría ajustar la metodología para el rescate de embriones inmaduros y acelerar los ciclos de selección bajo las condiciones estudiadas.

MATERIALES Y METODOS

Como material vegetal se emplearon embriones inmaduros de los genotipos de girasol Cubasol-113 (C-113), Caburé- 15 (Ca-15) y CM-15, colectados a los quince días posteriores al comienzo de la autopolinización manual. Se tomaron embriones para ser utilizados el mismo día de la recolección y el resto se conservó en refrigerador doméstico a 4 °C aproximadamente, mediante dos variantes:

- Las cabezuelas en un sobre de nylon
- Las semillas inmaduras extraídas de las cabezuelas, en un frasco plástico

Para la siembra se utilizaron embriones procedentes de semillas frescas y a diferentes tiempos de refrigeración (0, 7 y 40 días). Los genotipos C-113 y Ca-15 además, se mantuvieron hasta los 55 y 70 días respectivamente.

La desinfección se realizó con alcohol al 70 % durante 2 min. y posteriormente con bicloruro de mercurio 0,1 % durante 5 min. La testa y los tegumentos que cubrían los embriones se eliminaron en el momento de la siembra. Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 (MS), reducido a la mitad con 20 g/L de sacarosa.

El pH de los medios se ajustó 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 foto período de 14 horas luz y 25 ± 2 °C de temperatura.

A los siete días de cultivo se evaluaron los porcentajes de contaminación y germinación, así como la altura de las plántulas, desde la base al ápice, empleando 6 réplicas por

tratamiento. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza, con un diseño completamente aleatorizado y prueba de Duncan al 5 %.

Las plántulas obtenidas fueron sometidas a dos tratamientos para la adaptación a condiciones ambientales:

- El tubo de ensayo destapado en el cuarto de cultivo por 24 horas y después colocar las plántulas en agua por 48 horas más.
- El tubo de ensayo destapado por 72 horas en casa de cristal.

Posteriormente las plántulas fueron sembradas en cepellones, con tierra y materia orgánica al 50 % y cubiertas con tubos de cristal por 72 horas. A los 10 días fueron pasadas a bolsas de nylon con tierra.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar que tipo de muestra fue la más idónea para conservar 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. 1), 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.

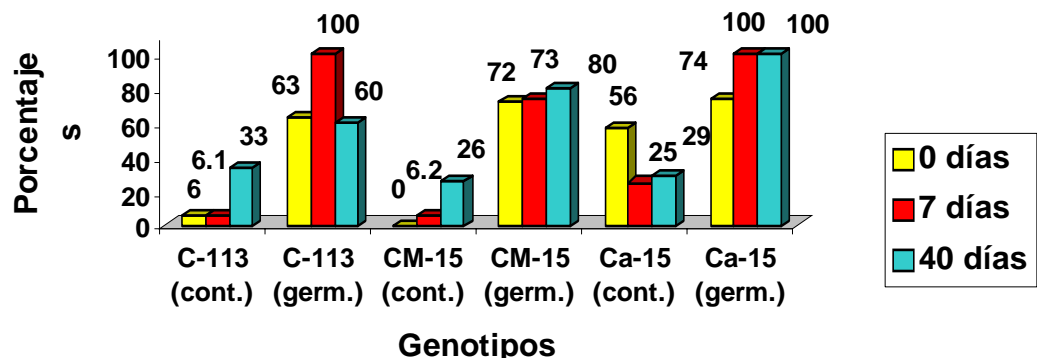


Fig. 1.- Comportamiento de la contaminación y la germinación, en tres genotipos a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

Si analizamos la contaminación en los genotipos C-113 y Ca-15, independientemente, teniendo en cuenta que se evaluaron a los 55 y 70 días de refrigeración respectivamente, se pudo apreciar en el genotipo C-113 un incremento a los 55 días, comparado con las semillas conservadas a los 0 y 7 días (Fig. 2), no así con 40 días, donde la contaminación fue mayor. Por el contrario en el caso del genotipo Ca-15 se presentó un incremento al comparar con los 7 y 40 días y una disminución con las semillas frescas (Fig. 3)

En el caso de la germinación (Fig. 1), se observaron porcentajes superiores al 72 % en todos los tiempos, en los genotipos CM-15 Y Ca-15, 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, pero no hubo prácticamente diferencia entre cero y 40. Al establecer una relación entre la contaminación y la germinación en los genotipos C-113 y Ca-15 se observó menor germinación en los mayores valores de contaminación, pero en el genotipo CM-15 esto no ocurrió, por lo que no se puede afirmar que estén relacionados.

En cuanto a la germinación en el genotipo C-113 (Fig. 2), se observó que todavía a los 55 días se obtuvo un valor alto de germinación. En el genotipo Ca-15 (Fig. 3), a los 70 días se

vio disminución en la germinación comparada con los otros tiempos, inclusive inferior al tiempo cero.

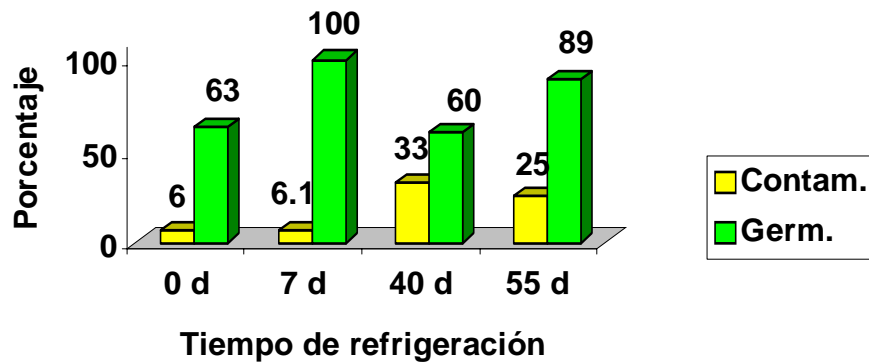


Fig. 2.- Comportamiento de la contaminación y la germinación, en el genotipo C-113 a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

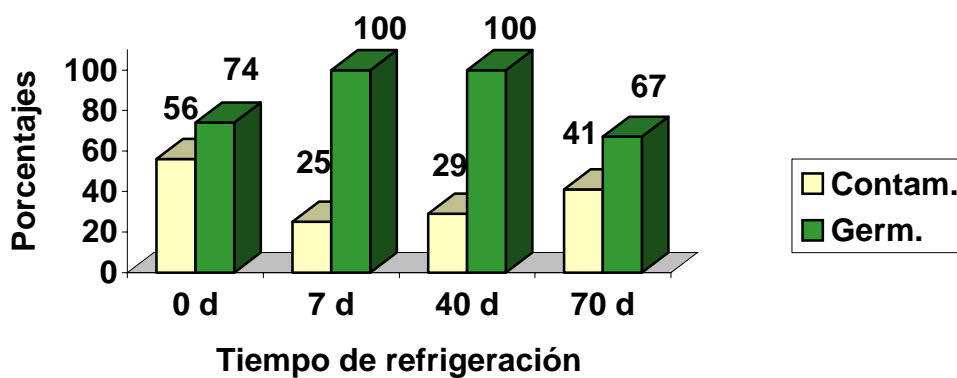


Fig. 3.- Comportamiento de la contaminación y la germinación, en el genotipo Ca-15 a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

Al analizar la altura de las plántulas germinadas en los diferentes tratamientos (Fig. 4), se observó que en todos los genotipos la tendencia fue de incrementar a los 7 días de refrigeración, aunque en el caso de la C-113 no tuvo diferencias significativas con al tratamiento de 40 días, y en el CM-15 la diferencia fue con los embriones colectados el mismo día la siembra.

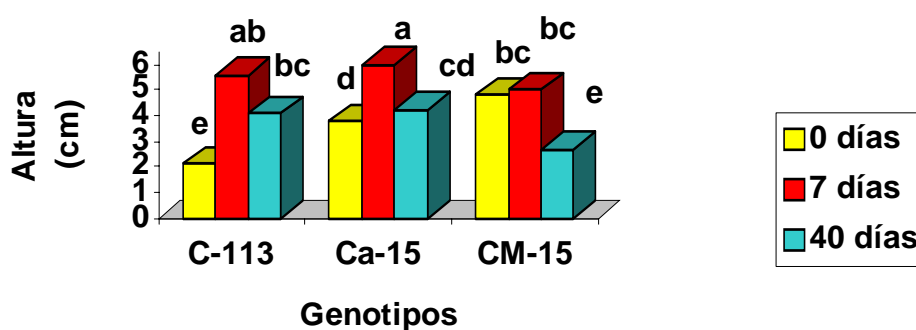


Fig. 4.- Comportamiento de la altura de las plántulas, en tres genotipos a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

Cuando se realizó la comparación de la altura a los tiempos 0, 7 y 40 con los de 55 días (Fig. 5), el genotipo C-113 no mostró diferencias entre 40 y 55 días, pero dicho parámetro resultó superior a los 55 días que en las semillas conservadas frescas, lo que sugiere la posible utilización de este tiempo también, ya que además existió un porcentaje alto de germinación en él (89 %).

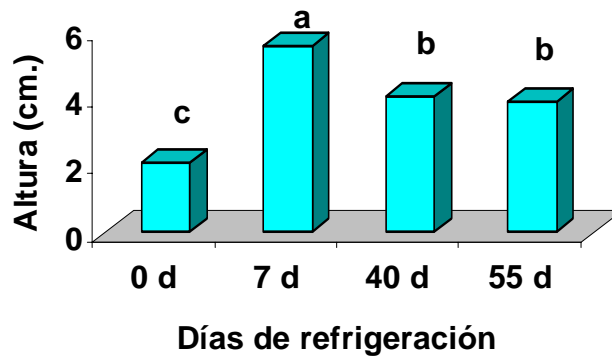


Fig. 5.- Comportamiento de la altura de las plántulas, en el genotipo C-113 a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

En el caso del genotipo Ca-15, estudiado a los 70 días (Fig. 6), la altura resultó significativamente inferior al resto de los tratamientos, en éste también se observaron los valores menores de germinación (67 %)

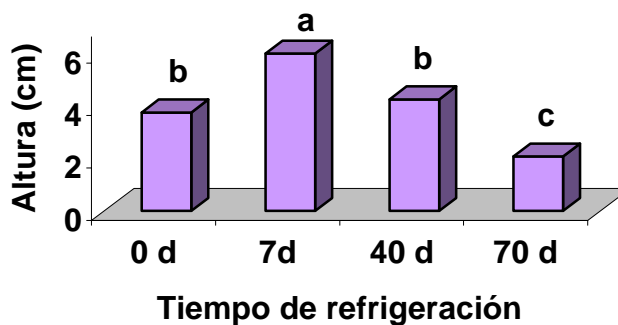


Fig. 6.- Comportamiento de la altura de las plántulas, en el genotipo Ca-15 a los diferentes tiempos de refrigeración de las semillas.

Zorzoli *et al.*, (1994) 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, pero ellos no utilizaron semillas conservadas sueltas.

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 (Witzens, 1988; Nestares, 1996; Rodríguez, 2001; Mayor, 2001). Este último sugirió la incorporación de nitrato de plata al medio de cultivo, lo que disminuyó su ocurrencia.

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

CONCLUSIONES

- Un período de permanencia de las semillas inmaduras durante siete días en refrigeración, estimuló la germinación y el crecimiento de las plántulas *in vitro*.
- Fue posible la obtención de plántulas de todos los genotipos estudiados, a los 40 días de conservación de las semillas inmaduras.
- Se logró la aclimatación de las plantas de los genotipos estudiados a las condiciones ambientales.

BIBLIOGRAFIA

- Aspiroz, HS, Vincourt T, Serieys P y Galais A (1987) La culture *in vitro* des embryos inmaturs dans l' accélération du cycle de sélection des dignées de tournesol et ses effects morphovégétalifs. Helia. 10: 35-38.
- 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.
- George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2^{da} Edición.
- 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 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.
- Rodríguez, AJ, Rodríguez A, López R, Pérez d, Pérez O y Marrero N (2002) Obtención de callos de *Helianthus annuus* L. Rev. Del Jardín Botánico Nacional 23 (1): 131-136.
- 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 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.