



Floración Prematura en la Micropropagación por Organogénesis de Girasol

Nestares, G.; *Mayor, M.L.; Ronchi, P.; Zorzoli, R. y Picardi, L.
Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. CC 14 S2125
Zavalla. *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
E-mail: gnestare@fcagr.unr.edu.ar

Introducción

Uno de los factores que ocasionan pérdidas de plantas en la micropropagación de girasol durante la incubación in vitro es la floración prematura (Knittel et al, 1991; Nestares et al, 1996; Baker et al, 1999). La inducción precoz de la floración en girasol ha sido informada en varios trabajos, sin embargo los factores involucrados en la expresión de este fenómeno han sido poco estudiados. Entre los factores determinantes de la floración prematura pueden citarse el fotoperíodo, las fuentes de carbono y nitrógeno y el tiempo de exposición a los reguladores vegetales. Es interesante destacar que el etileno ha sido sugerido como inhibidor, y en algunos casos como estimulador, de la floración in vitro en otras especies vegetales (Dickens y van Staden, 1988). Existen inhibidores del etileno entre los que se encuentran el nitrato de plata y los iones calcio y cobalto, los cuales al ser incorporados al medio de cultivo pueden modificar las respuestas in vitro.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de floración prematura durante las etapas in vitro y de aclimatación de un genotipo de alta capacidad de regeneración micropropagado en diferentes medios de cultivo.

Material y Métodos

Material Vegetal El genotipo utilizado fue la línea endocriada HA 300B aportada por el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino.

Obtención de explantos Los explantos consistieron en cotiledones de plántulas de dos días posgerminadas. Para su desinfección, los achenios fueron sumergidos durante 30 segundos en etanol al 96%, luego en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante otros 15 minutos y posteriormente lavados 3 veces en agua bidestilada estéril bajo cámara de flujo laminar. El medio de germinación consistió en la base salina de Murashige y Skoog (1962) al 50% suplementada con 10 g l⁻¹ de sacarosa y solidificada con 9 g l⁻¹ de agar. El pH fue ajustado a 5.8 con hidróxido de sodio 1 N previo al agregado del agar. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad en cámara climática durante 2 días y luego transferidas a la luz durante los siguientes 2 días. La temperatura se mantuvo constante a 25 ± 2°C y el fotoperíodo utilizado fue de 12 horas con una intensidad lumínica de 50 μmol m⁻² s⁻¹.

Medios de cultivo para regeneración Los medios de cultivo se formularon sobre la base salina de Murashige y Skoog (1962) (MS) con el agregado de los siguientes reguladores vegetales: 1 mg/l de ácido-3-indol-acético (AIA) y 2 mg/l de cinetina (KIN). Los tratamientos consistieron en diferentes niveles de nitrato de plata, hidrolizado de caseína, nitrato de calcio y nitrato de cobalto (Tabla 1).

Siembra e incubación de explantos Las siembras se realizaron en cajas de petri estériles de 100 mm de diámetro. La incubación se realizó en cámara climática durante 22 días bajo las mismas condiciones ambientales anteriormente descriptas. Luego de transcurrido este período, aquellos explantos que presentaron algún tipo de respuesta organogénica (vástagos y/o primordios) fueron subcultivados a tubos de ensayos con el mismo tratamiento de la etapa previa durante 15 días. **Caracteres evaluados** Finalizado el período de incubación se evaluaron los siguientes caracteres:
Número de vástagos (NV)
Porcentaje de regeneración (PR)=(n° de explantos que regeneraron vástagos / n° de explantos totales) x 100
Porcentaje de floración (PF)=(n° de vástagos florecidos / n° de vástagos totales) x 100.

Diseño experimental El diseño del experimento fue en bloques completos al azar con 2 repeticiones. Cada repetición consistió en 20 explantos (2 cajas de petri de 100 mm de diámetro con 10 explantos cada una). Se realizaron las pruebas de normalidad para todas las variables. El NV fue analizado a través del análisis de la variancia y las medias fueron comparadas con la prueba de LSD. Las variables PR y PF fueron analizadas por la prueba no paramétrica de ji-cuadrado (Snedecor, 1964).

Aclimatación. Los vástagos que no presentaron raíz fueron subcultivados a medio de enraizamiento que consistió en el medio Control sin reguladores vegetales. Para su aclimatación, las plantas con raíces fueron mantenidas 24 hs en el mismo tubo de ensayo con el medio de cultivo pero sin la cobertura de PVC. Posteriormente, las plantas se mantuvieron en agua por un período de 48 a 72 hs con el objeto de permitir una mayor expansión del sistema radicular para su trasplante a macetas con tierra.

Resultados y Discusión

Etapa in vitro

La línea HA 300 B presentó una respuesta organogénica en todos los medios de cultivo. En la Tabla 2 se presentan las variables PR y NV para cada tratamiento. Para las variables NV, PR y PF se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos (F=3,42 p<0,0213; 2 =21,08 p<0,049; 2 =32,89 p<0,001, respectivamente).

Nitrato de plata En estos medios el PR fue similar al medio control, pero se obtuvo un mayor número de vástagos. La relación entre el PF y la concentración de nitrato de plata fue directa y positiva (Gráfico 1a). Las diferencias fueron significativas entre los niveles extremos de nitrato de plata (2 =4,21 p<0,04).

Hidrolizado de caseína Los niveles extremos presentaron similares PR y NV respecto al medio Control. Si bien en el medio HCa 500 se observaron los menores valores para estas dos variables, no se presentaron vástagos florecidos prematuramente (Gráfico 1a). El PF difirió significativamente entre los tres niveles analizados (2 =4,62 p<0,01). Para esta misma variable, el medio de cultivo HCa 250 presentó diferencias significativas respecto al medio HCa 500 (2 =3,04 p<0,08).

Nitrato de Calcio En el medio Ca 24,0 el PR fue significativamente menor respecto del medio Control (2=10,03 p<0,002). A su vez, el menor número de vástagos fue observado en este medio. El PF del medio Control fue significativamente menor respecto de los medios Ca 24,0 (2 =5,44 p<0,02) y Ca 16,0 (2 =7,43 p<0,006).

Nitrato de Cobalto En estos tratamientos no se observaron diferencias significativas con respecto al Control para todas las variables evaluadas.

En general, las pérdidas por floración durante esta etapa fueron bajas y consistentes con lo observado en estudios previos para líneas e híbridos experimentales de *Helianthus annuus* L. (Mayor, 2002).

Etapa de aclimatación

Los únicos vástagos que pudieron ser aclimatados fueron los obtenidos a partir de los medios de cultivo que contenían nitrato de plata debido a que este compuesto redujo las pérdidas por hiperhidricidad (Mayor et al, 2003). Las plantas hiperhídricas presentan un aspecto engrosado, 'suculento' con tejidos translúcidos de color verde claro. Estas plantas retienen agua en exceso en sus tejidos, son deficientes en clorofila, de pobre lignificación durante la etapa in vitro y en consecuencia no pueden ser aclimatadas. Los vástagos obtenidos en los restantes medios de cultivo presentaron este disturbio fisiológico. En general, los porcentajes de floración observados durante la aclimatación superan a los de la etapa in vitro. Este hecho sugiere que la inducción de este fenómeno ocurrió durante la etapa previa. El PF observado en el medio Ag 2,5 fue significativamente menor respecto a los otros dos niveles (2 =6,6 p<0,01; 2 =5,83 p<0,016, respectivamente) (Gráfico 1b). A diferencia de la hiperhidricidad, las plantas inducidas a floración pueden aclimatarse y completar su ciclo, sin embargo reducen la eficiencia del proceso de micropropagación ya que los capítulos obtenidos son de tamaño muy reducido y producen pocas semillas de baja ó nula viabilidad.

Conclusiones

- El tratamiento más eficiente en el control de la floración prematura durante la etapa in vitro fue el HCa 500. Sin embargo este tratamiento presentó un porcentaje de regeneración menor respecto al medio Control.



- Los inhibidores del etileno presentaron porcentajes de floración similares y/o mayores respecto al Control. Este hecho sugiere que la presencia de este regulador sería necesaria para la inhibición de la floración prematura.
- Las mayores pérdidas de vástagos por floración prematura se produce durante la etapa de aclimatación como consecuencia de una inducción durante la etapa *in vitro* reduciendo la eficiencia del proceso de micropropagación en esta especie.

regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. Plant Sci 73:219-226.
 Mayor M.L. (2002) Variabilidad genética para caracteres relacionados con la morfogénesis *in vitro* en girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis para optar al grado de Magister en Genética Vegetal. Convenio INTA-UNR
 Mayor M.L., Nestares, G., Zorzoli, R. & Picardi L. (2003) Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72: 99-103.
 Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
 Nestares G., Zorzoli R., Mroginski L. & Picardi L. (1996) Plant regeneration from cotyledons derived from mature sunflower seeds. Helia 19:107-112.
 Snedecor G.W. (1964) Métodos estadísticos aplicados a la investigación agrícola y biológica. Compañía Editorial Continental, S.A., México.

Referencias

Baker C.M., Muñoz-Fernandez N. & Carter C.D. (1999) Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 39-49.
 Dickens C.W.S. & van Staden J. (1988) The induction and evocation of flowering *in vitro*. S. Afr. J. Bot. 54:325-344.
 Knittel N., Escandón A.S. & Hahne G. (1991) Plant

Tabla 1: Composición de los distintos medios de cultivo formulados sobre la base salina de Murashige y Skoog (1962)

Componentes	MEDIOS												
	Control	Ag 2.5	Ag 5.0	Ag 7.5	Hca 250	Hca 500	Hca 750	Ca 8.0	Ca 16.0	Ca 24.0	Co 2.5	Co 5.0	Co 7.5
Ácido-3-indol-acético (mg l ⁻¹)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cinetina (mg l ⁻¹)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Nitrato de plata (µM)	-	2.5	5.0	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrolizado de caseína (mg l ⁻¹)	-	-	-	-	250	500	750	-	-	-	-	-	-
Nitrato de calcio (mM)	-	-	-	-	-	-	-	8.0	16.0	24.0	-	-	-
Nitrato de cobalto (µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	5.0	7.5

Tabla 2: Porcentaje de regeneración (PR) y número de vástagos (NV) obtenidos para cada tratamiento durante la etapa *in vitro*

Tratamiento	PR	NV ⁽¹⁾
Control	75	44,5 abc
Ag 2,5	72,5	55,0 a
Ag 5,0	74,3	53,0 a
Ag 7,5	75	47,5 abc
HCa 250	72,5	45,0 abc
HCa 500	57,5	29,5 bcd
HCa 750	70	43,0 abc
Ca 8,0	63,9	26,5 cd
Ca 16,0	60	35,0 abc
Ca 24,0	20	8,5 d
Co 2,5	65	51,0 ab
Co 5,0	67,5	36,0 abc
Co 7,5	57,5	49,0 ab

⁽¹⁾ Letras similares no difieren significativamente al 5%

Gráfico 1. Porcentaje de vástagos florecidos (PF) de la línea HA 300B durante la etapa *in vitro* en los diferentes tratamientos (a) y durante la etapa de aclimatación en los tratamientos con nitrato de plata (b).

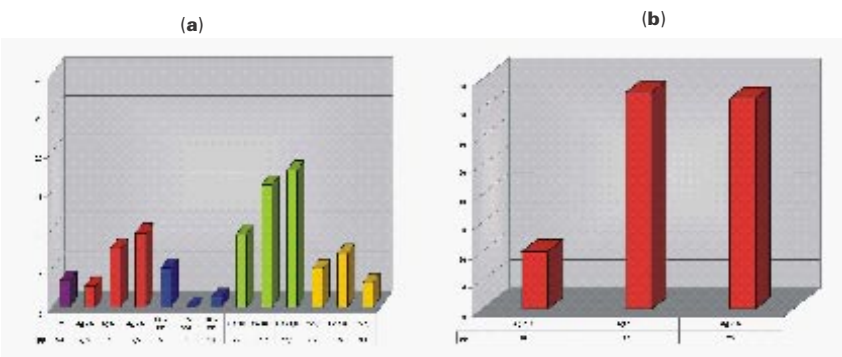


Figura 1: Vástagos florecidos prematuramente durante las etapas *in vitro* (a) y de aclimatación (b).

