

## RESCATE DE EMBRIONES INMADUROS: REDUCCION DEL INTERVALO GENERACIONAL PARA LA OBTENCION DE MATERIALES SELECTOS DE GIRASOL

Zorzoli, Roxana<sup>1</sup>; Cointry, Enrique Luis<sup>1</sup>; Ludueña, Pedro<sup>2</sup> y Picardi, Liliana Amelia<sup>1</sup>

1 Cátedra de Genética. Fac. Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.

2 Estación Experimental Agropecuaria. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Pergamino.

### RESUMEN

Se cultivaron embriones cigóticos F<sub>2</sub> rescatados entre 9 y 15 días posteriores a la polinización sobre un medio MS modificado. Los porcentajes de germinación fluctuaron entre 0 y 96% respectivamente, no encontrándose diferencias genotípicas. Se evaluaron 3 tratamientos de rusticificación previo al trasplante a tierra resultando superior aquél en que se utilizaron plantas con un solo par de hojas (mantenidas durante 48-72 horas en agua en un cuarto climatizado a 26 ± 2°). Las plantas regeneradas manifestaron una reducción en la altura y en el diámetro del capítulo no significando esto un inconveniente en la aplicación del método SSD para la obtención de líneas.

**Palabras Clave:** *Helianthus annuus* - cultivo in vitro - embriones inmaduros - intervalo generacional

### INTRODUCCION

Los métodos de selección en las plantas algamas tienen como objetivo mejorar el rendimiento y otros caracteres de la población base para luego, a partir de esa población mejorada, producir líneas endocriadas progenitoras de híbridos. Estos métodos suelen durar varios años dependiendo de varios factores el avance por selección.

Las técnicas del cultivo *in vitro* constituyen una alternativa válida a fin de complementar los planes de mejoramiento tradicionales. Por ejemplo, se pueden emplear para obtener líneas en un período de tiempo relativamente corto cultivando embriones inmaduros. Plotnikov (1983) usó esta técnica para obtener líneas androestériles de girasol realizando 6 generaciones de retrocruzas en 70 días. Azpiroz *et al.*, (1987) lograron obtener embriones F<sub>5</sub> en un lapso de 330 días a partir del cruzamiento inicial. Por lo tanto, su uso permitiría acelerar los ciclos de selección teniendo la precaución de evitar cualquier anomalía fenotípica que pueda surgir en las plantas regeneradas.

El presente trabajo tiene como objetivos: a) seleccionar las condiciones adecuadas para la germinación de embriones inmaduros, b) determinar la respuesta de diferentes genotipos, c) analizar diferentes tratamientos de rusticificación de las plantas logradas previo al trasplante y d) evaluar características morfovegetativas en los materiales regenerados.

## MATERIAL Y METODOS

Como material donante de embriones inmaduros se utilizaron capítulos de plantas F<sub>1</sub> de polinización libre del Programa Girasol de la E.E.A. INTA Pergamino cosechados a los 9, 11, 13 y 15 días posteriores a la polinización.

Los embriones fueron desinfectados por inmersión en alcohol etílico 96° e hipoclorito de sodio al 4% de Cl activo durante 10 minutos. Previo a su siembra *in vitro* se extrajeron los tegumentos que recubren al embrión.

Se utilizaron 2 medios de cultivo formulados sobre la base salina del medio Murashige y Skoog (M.S) (1962) reducida a la mitad.

Medio 1 (M1): 0,1 mg l<sup>-1</sup> de ANA + 0,1 mg l<sup>-1</sup> de BA + 30 gr l<sup>-1</sup> de sacarosa.

Medio 2 (M2): 20 gr l<sup>-1</sup> de sacarosa.

Se sembraron 50 embriones por edad y medio de cultivo.

La incubación se efectuó en un cuarto climatizado a 16 horas de luz y 25 ± 2°C.

Para la selección del medio de cultivo adecuado se evaluaron los porcentajes de germinación (G), de tejidos meristemáticos indiferenciados (callos) (C) y de no germinación (NG).

Para evaluar la respuesta genotípica se utilizaron 210 embriones correspondientes a las siguientes F<sub>2</sub>: 3614, 3616 y 3619 obtenidas por polinización libre entre materiales pertenecientes al mismo Programa para asegurar suficiente variabilidad genotípica. Se evaluó nuevamente el porcentaje de germinación (G), el de callos (C) y la no germinación (NG).

Para conservar los capítulos cosechados se evaluó el efecto de las bajas temperaturas sobre el mantenimiento de la capacidad de germinación. Para ello los embriones remanentes en los correspondientes capítulos fueron conservados tanto en freezer (-5°C) durante 30 días como en heladera (+4°C).

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de rustificación de las plantas previo al trasplante se probaron tres tratamientos:

T1) Las plantas con 5 hojas se colocaron durante 5-7 días en agua para permitir una mayor expansión del sistema radicular y posteriormente se transplantaron a macetas con tierra. Durante este período las plantas se mantuvieron en cuarto climatizado (26 ± 2°C).

T2) Se repitió el T1 en plantas con sólo un par de hojas.

T3) Las plantas con un par de hojas fueron mantenidas durante 36 horas en el tubo de ensayo con medio de cultivo y en contacto directo con el aire. Previo al trasplante a tierra se mantuvieron en agua por 48-72 horas. Para este tratamiento no se efectuó la incubación en cuarto climatizado.

En las plantas que superaron la rustificación se evaluaron diferentes características morfovegetativas: Diámetro de flor, Altura de planta, Diámetro de capítulo, Número de semillas por capítulo, Días a floración y el Ciclo de embrión - embrión.

## RESULTADOS Y DISCUSION

A las 48 horas de la siembra *in vitro* se observó que la germinación está afectada por la edad del embrión y el medio de cultivo (Figura 1). Estos resultados permiten concluir que embriones de 13 y 15 días de edad serían los apropiados para obtener la máxima

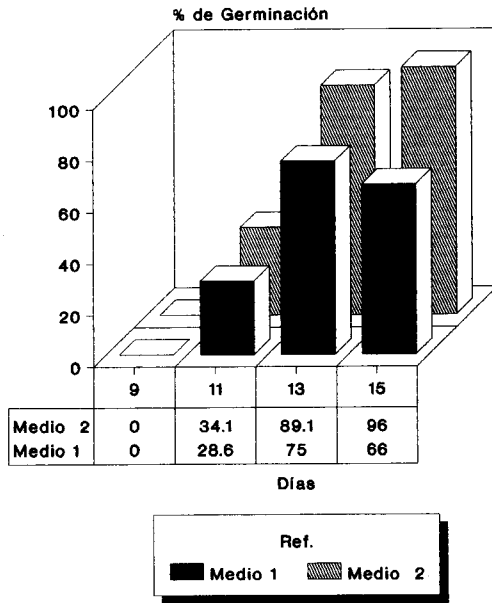


Figura 1: Porcentaje de germinación. Días desde la polinización

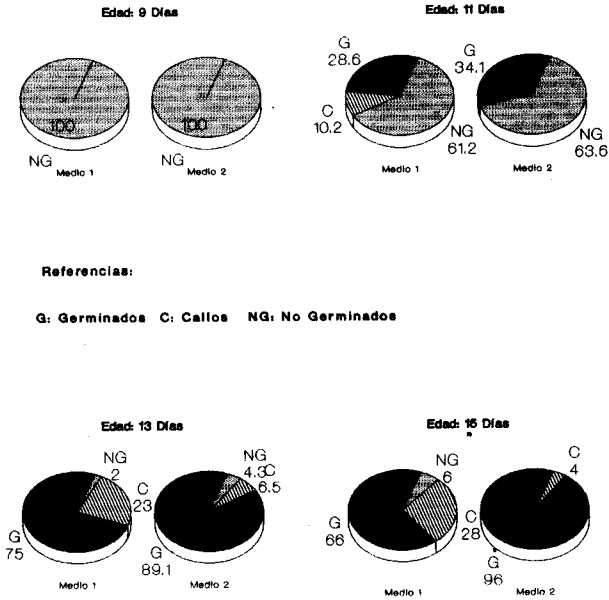


Figura 2: Porcentaje de G, C y NG por edad y medio de cultivo

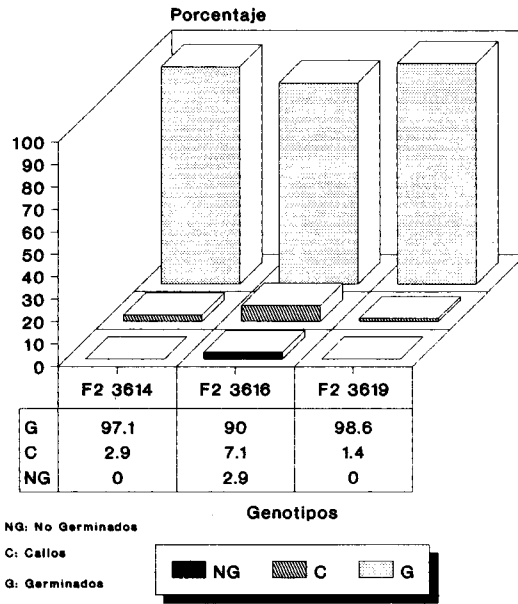


Figura 3: Porcentaje de G, C y NG por genotipo

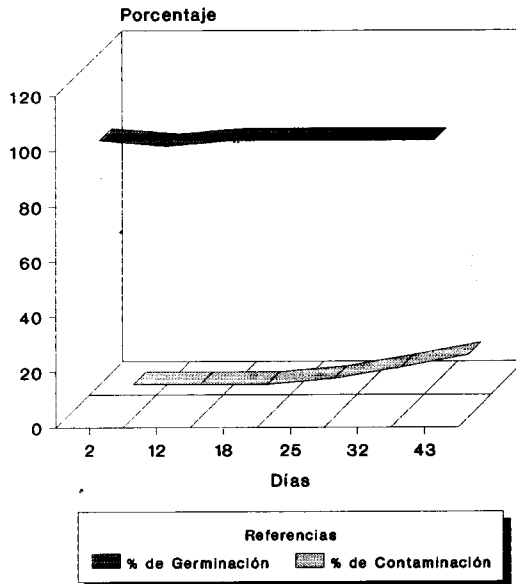


Figura 4: Mantenimiento de la capacidad germinativa a 4 C.

germinación dado que este porcentaje incrementa desde 0, para un embrión de 9 días, hasta 96% para un embrión de 15 días.

En la Figure 2 se puede visualizar que el porcentaje de germinación aumenta cuando se utiliza el Medio 2 independientemente de la edad del embrión. El porcentaje de callos fue siempre superior en el Medio 1, lo que implicaría una pérdida de eficiencia de esta metodología debido a la posibilidad de aparición de variación genética. Esta fuente de variación, la variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981), es un fenómeno difundido en algunas especies que aparece con más frecuencia cuando las plantas regeneradas provienen de callos. Si el cultivo de tejidos es usado para propagar plantas, esa variación se debe minimizar. Por lo tanto es necesario analizar, no sólo las plantas regeneradas, sino también su progenie para determinar si son estables desde el punto de vista genético. Dado estos resultados el Medio 2 es el más adecuado para el rescate embrionario. Además este medio tiene una ventaja adicional que es la disminución en los costos operativos debido a la no utilización de hormonas en su formulación.

Una vez seleccionado el estado del embrión y el medio de cultivo fue necesario evaluar la amplitud de la respuesta genotípica. Los resultados que se muestran en la Figura 3 permiten concluir que no existen diferencias genotípicas por lo que este protocolo puede ser extrapolable a distintos materiales genéticos. Un inconveniente que se presentó, independientemente del material probado, fue la producción de plantas vítreas y una precoz formación de capítulos que condujo a una disminución drástica en el tamaño de la inflorescencia. Esta situación fue superada modificando el fotoperíodo durante la incubación, de 16 horas luz a 11 horas luz.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre el mantenimiento del poder germinativo de los embriones remanentes se encontró que los mantenidos por debajo de 0°C no mostraron síntomas de germinación. Por el contrario los que fueron mantenidos a 4°C siguieron el proceso normal de germinación. En la Figura 4 se pueden observar los resultados obtenidos que permiten prolongar el período de siembra de los materiales hasta los 43 días. A partir de esta fecha el porcentaje de contaminación comenzó a aumentar debido al estado necrótico de los capítulos.

Los tratamientos de rusticación arrojaron los siguientes resultados de supervivencia: 3%, 30% y 95% respectivamente.

Cuadro 1: Valores promedios de caracteres morfovegetativos evaluados en los dos primeros ciclos de regeneración.

Carácter	Valores promedios
Diámetro de flor (cm)	7.71 ± 2.4
Altura de planta (cm)	58.64 ± 27.9
Diámetro de capítulo (cm)	3.54 ± 1.2
Número de sem/cap.	42.00 ± 29.0
Días a floración	85.00 ± 13.0
Ciclo de embrión - embrión	100.00 ± 13.0

Aparentemente las plantas de mayor tamaño sufren un *stress* mayor provocado por la producción de etileno, la disminución del nivel de oxígeno y el empobrecimiento del

medio de cultivo. En las plantas que superaron la rustificación se evaluaron diferentes características morfovegetativas (Cuadro 1). Se puede estimar, a partir de los valores del ciclo embrión-embrión, el logro de 4 generaciones anuales. Si bien en estos materiales el diámetro del capítulo fue reducido, la producción de semillas fue suficiente para la aplicación del método SSD de obtención de líneas. También Azpiroz *et al.*, (1987) observaron una serie de cambios morfovegetativos no deseados tal como la reducción de la altura de la planta y el diámetro de capítulos.

Estas experiencias demostraron que la metodología descrita es útil para reducir el intervalo generacional en genotipos de *Helianthus annuus* para lograr materiales selectos en el Programa de Girasol.

#### BIBLIOGRAFIA

- Aspiroz, H.S.; Vincourt, P.; Serieys, H. et Gallais, A. 1987. La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'accélération du cycle de sélection des lignées de tournesol et ses effets morphogénétiqes. *Helia* 10:35-38.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth a bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Plotnikov, V.A. 1983. Use of method of culturing young embryos for accelerated development of sunflower cytoplasmic male sterility analogues. *Tsitologiya i genetika* 17(6):42-46.

#### INMATURE EMBRYO RESCUE: REDUCTION OF THE PERIOD BETWEEN GENERATIONS FOR THE OBTENTION OF ELITE MATERIAL IN SUNFLOWER

##### SUMMARY:

Zygotic F2 embryos recovered between 9 and 15 days after pollination were cultivated on a MS modified medium. The percentages of germination fluctuated between 0 and 96% respectively without observing any genotypic differences. Three treatments of hardening previous to transfer to pots were evaluated. The treatments using plants with only one pair of leaves (maintained during 48-72 hours in water in controlled room  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) was superior. The regenerated plants showed a reduction in height and head diameter although it was not an inconvenient for the application of the SSD for the obtention of lines.

#### SAUVETAGE D'EMBRYONS IMMATURES: REDUCTION DE LA DUREE DE GENERATION POUR L'OBTENTION DE MATERIEL SELECTIONNE DE TOURNESOL

##### RÉSUMÉ

Les embryons zygotiques F2 entre 9 et 15 jours après la pollinisation sont cultivés sur un milieu MS modifié. Les pourcentages de germination ont varié entre 0 et 96% et ne révèlent pas de différences génotypiques. Trois traitements de rusticité sont évalués avant le transfert en terre. Il en résulte que le meilleur traitement réside dans l'utilisation de plantules au stade une paire de feuilles (placées de 48h à 72h dans de l'eau à l'intérieur d'une chambre climatisée réglée à  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Les plantes régénérées ont manifesté une réduction de la hauteur et du diamètre du capitule qui ne handicape pas l'application de la méthode de SSD pour l'obtention de lignées.