

**ANÁLISIS MEIÓTICO Y RESCATE DE EMBRIONES DE
HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS *Helianthus annuus x Tithonia
rotundifolia***

MARTHA GÓMEZ MARTÍNEZ

T E S I S

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS

EN FITOMEJORAMIENTO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
PROGRAMA DE GRADUADOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Enero del 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIRECCIÓN DE POSGRADO

**ANÁLISIS MEIÓTICO Y RESCATE DE EMBRIONES DE HÍBRIDOS
INTERGENÉRICOS *Helianthus annuus x Tithonia rotundifolia***

T E S I S

POR

MARTHA GÓMEZ MARTÍNEZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:

Dr. M. Humberto Reyes Valdés

Asesor:

M.C. Leticia Escobedo Bocado

Asesor:

M.C. Francisca Ramírez Godina

Asesor:

Dr. Valentín Torres Robledo

Asesor:

Dr. Juan Manuel Martínez Reyna

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Director de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Enero del 2009

AGRADECIMIENTOS

Mi más grande agradecimiento a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Postgrado así como ser parte de mi formación académica.

Al Dr. M. Humberto Reyes Valdés, por su gran colaboración en mi formación académica, así como el haberme brindado la oportunidad de participar en uno de sus proyectos de investigación y en la realización del presente trabajo de tesis, por confiar en mí, por darme su apoyo incondicional y esa mano amiga que siempre estuvo presente cuando más la necesitaba.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocardo, por ser parte de mi formación académica así como por su colaboración en la realización de mi trabajo de investigación, por su amistad y por el tiempo brindado incondicionalmente.

A la M.C. Francisca Ramírez Godina, por su asesoría y observaciones del presente trabajo de investigación, por su amable disposición para conmigo y por su amistad.

Al Dr. Valentín Robledo Torres por su amistad, por sus observaciones y sugerencias, por el tiempo brindado en la asesoría del presente trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Reyna, por sus sugerencias y acertadas observaciones en el trabajo de esta tesis, por su amistad desinteresada, por su apoyo y motivación en momentos críticos y apoyo incondicional.

A la Dra. Hermila García Ozuna, por ser parte importante en la elaboración de mi trabajo de investigación, por sus valiosas sugerencias y acertadas observaciones, por ese gran apoyo total e incondicional, por su amable disposición para conmigo y por su amistad.

A mí amiga y compañera de trabajo la M.C. Alma Patricia García Villanueva, por su valiosa colaboración en el trabajo de laboratorio, por su amistad desinteresada brindada generosamente por su estímulo en momentos difíciles y por su apoyo incondicional.

A la Bióloga Ana María Ochoa, por haberme auxiliado y apoyado en el trabajo de laboratorio para la realización de la tesis, por su amistad y mano amiga.

Al CONACYT por el apoyo financiero al proyecto de investigación del cual se derivó esta tesis.

A mis compañeros del Programa en Fitomejoramiento, que formaron parte de mi vida. A todos ellos gracias por su amistad y apoyo.

DEDICATORIA

A DIOS

Por que sin Él no somos nada y es la fuente de nuestra inspiración

A MIS PADRES

Manuel Gómez García ^(†) y Andrea Martínez Carbajal^(†)

Por ese amor tan grande que siempre me demostraron y ese gran apoyo para seguir adelante a pesar de mis caídas y por que gracias a ellos soy lo que soy, benditos sean siempre.

A MI ESPOSO E HIJO

Edmundo Alvarado Sánchez y Edmundo Alejandro Alvarado Gómez

Gracias por ese gran amor que me tienen, por su paciencia, comprensión y mano amiga, fuentes de apoyo moral e inspiración, los amo.

A MI HERMANA

Susana Gómez Martínez

Por ser ejemplo para mí de superación, tenacidad y entrega. Gracias por todo ese apoyo y amor que me has demostrado, gracias por confiar y creer en mí.

A MIS HERMANOS

Manuel ^(†), Juanita, Chelo, Tino, Gloria, Juan, Soco, Tere, Darío y Sandra.

Por ser los mejores hermanos, gracias por ayudarme a levantar cuando he caído y tener una frase de consuelo cuando lo he necesitado, por todo ese amor que siempre me han dado.

COMPENDIO

**Análisis meiótico y rescate de embriones de híbridos Intergenéricos
Helianthus annuus x *Tithonia rotundifolia***

POR

MARTHA GÓMEZ MARTÍNEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS
FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. 2008

Dr. M. Humberto Reyes Valdés -Asesor-

Palabras clave: *Helianthus annuus* L., *Tithonia*, hibridación, configuraciones meióticas, cultivo de embriones.

En esta investigación se llevaron al cabo análisis meióticos y propagación *in vitro* por medio de la técnica de rescate de embriones de híbridos intergenéricos producidos al cruzar el girasol cultivado (*Helianthus annuus*) con *Tithonia rotundifolia*. Los objetivos fueron: (i) evaluar el apareamiento cromosómico en meiosis y (ii) desarrollar una técnica para producir y propagar híbridos intergenéricos a partir de semillas mal desarrolladas

El análisis cromosómico se realizó en células en diacinesis, metafase I y anafase I siguiendo la técnica de "Squash", con meiocitos de anteras jóvenes. El cultivo *in vitro* se llevó al cabo por medio de la técnica de rescate de embriones, utilizando para ello embriones inmaduros con 13 y 22 días después de la polinización.

El apareamiento cromosómico fue anormal ya que se detectó la presencia de multivalentes y univalentes en metafase I, así como cromosomas con puentes y rezagados en anafase I, lo cual causa una segregación cromosómica irregular. Estos resultados nos indican que el girasol cultivado tiene incompatibilidad cromosómica con *T. rotundifolia*, que impide la reproducción sexual normal de los híbridos intergenéricos.

Se tuvo éxito en propagación de híbridos a través de rescate de embriones. Se logró obtener un 52% de plantas enraizadas, y se produjeron dos plantas completas. El desarrollo de las mismas no fue total, ya que se requiere definir la técnica de aclimatación.

ABSTRAC

Meiotic analysis and embryos of rescue of intergeneric hybrid

Helianthus annuus x Thitonia rotundifolia

BY

MARTHA GÓMEZ MARTÍNEZ

MASTER OF SCIENCES

PLANT BREEDING

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. ENERO 2009

Dr. M. Humberto Reyes Valdés -Advisor-

Key words: *Helianthus annuus* L., *Tithonia*, hybridization, meiotic configurations, embryo culture.

In this research we made meiotic analysis and *in vitro* propagation by the technique embryos of rescue of intergeneric hybrids obtained to crosses the sunflower (*Helianthus annuus* L.) with *Thitonia rotundifolia*. The objectives were: (i) to evaluate the chromosome pairing in meiosis (ii) to

develop a technique to produce and propagated intergeneric hybrids of incomplete developed seeds.

The chromosome analysis was made in diakinesis, metaphase I and anaphase I cells by the squash technique, with young anther's meiocytes. The *in vitro* culture was developed by the technique embryos of rescue, with immature embryos with 13 and 22 days after pollination.

The chromosome pairing was abnormal, because we observed the presence of univalents and multivalents in metaphase I, and chromosome with bridges and fast in anaphase I, this produce a irregular chromosomic segregation. These results indicated that sunflower has chromosomic incompatibility with *Thitonia rotundifolia*, this avoid the normal sexual reproduction of intergeneric hybrid.

We had succeed in the hybrid propagation by embryo of rescue. We obtained 52% of rooted plants and we produced two complete plants. They hadn't a total grow, so we need to define the acclimation technique.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
Meta.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen del girasol.....	4
Usos del girasol.....	5
Clasificación taxonómica del girasol.....	7
Origen y características morfológicas de <i>Tithonia rotundifolia</i>	7
Clasificación taxonómica de <i>Tithonia rotundifolia</i>	9
Hibridación.....	9
Análisis meióticos en híbridos.....	10
Cultivo de tejidos.....	12
Micropropagación.....	13
Cultivo de embriones.....	14
Medios de cultivo.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Análisis meióticos.....	17
Cultivo <i>in vitro</i>	18
Técnica de rescate de embriones.....	20
1). Establecimiento del cultivo aséptico.....	20
Colecta del explante.....	20
Desinfección.....	21
Siembra.....	22
2). Propagación masiva ó micropropagación.....	22
3). Enraizamiento.....	23
4). Aclimatización.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Análisis meióticos.....	25
Cultivo de tejidos.....	27
Rescate de embriones.....	27
Enraizamiento.....	30
Aclimatización.....	31

V. CONCLUSIONES.....	32
VI. RESUMEN.....	33
VII. LITERATURA CITADA.....	35
VIII. ANEXO.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
3.1 Composición basal del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Componentes para preparación de soluciones madre.....	19
3.2 Medios nutritivos usados para obtener plantas completas de híbridos F ₁ de <i>H. annuus</i> (CMS HA 89) x <i>T. rotundifolia</i> (accesión 26) por medio de la técnica de rescate de embriones.....	21
4.1 Híbridos analizados meióticamente por medio del método squash.....	25
4.2 Reguladores utilizados en medios nutritivos para reducir la hiperhidracidad en los híbridos F ₁ de la cruce de <i>H. annuus</i> x <i>T. rotundifolia</i>	28
4.3 Medios utilizados para enraizamiento de plantas híbridas F ₁ de la cruce de girasol cultivado con <i>T. rotundifolia</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
4.1	Meiosis irregular en los híbridos F ₁ de girasol cultivado <i>H. annuus</i> (CMS HA89) x <i>T. rotundifolia</i> (Accesión 26).....	26
4.2	Siembra de embriones.....	27
4.3	Planta híbrida CMS HA89 x <i>Tithonia rotundifolia</i>	29
4.4	Enraizamiento de plantas híbridas F ₁ de la cruce de girasol cultivado con <i>T. rotundifolia</i>	30
4.5	Aclimatación de plantas híbridas F ₁ de la cruce de girasol cultivado con <i>T. rotundifolia</i>	31

I. INTRODUCCIÓN

El girasol anual cultivado pertenece a la familia de las compuestas y al género *Helianthus* y comprende aproximadamente 68 especies entre las que hay anuales y perennes. En Norteamérica existen cerca de 50 especies del género *Helianthus* de las cuales la más importante es *Helianthus annuus* por dos razones: a) se cultiva como planta oleaginosa y ornamental; b) es la más distribuida geográficamente ya que plantas silvestres y cultivadas forman parte de la especie.

La semilla de esta oleaginosa es muy importante posee de 45 a 55% de aceite cuya calidad se encuentra entre las mejores. A nivel mundial ocupa el segundo lugar como materia prima en la producción de aceite comestible sólo superada por la soya.

Los géneros *Viguiera* y *Tithonia* están relacionados con el género *Helianthus* y algunas de sus especies pueden cruzarse produciendo híbridos con *Helianthus*.

El género *Tithonia* es nativo de América Central, pertenece a la familia Asteraceae (Compositae). Es una planta anual grande que tiene características ornamentales deseables para transferirse al girasol (pubescencia suave, tonos

naranja, pedicelo largo) carece de características que posee el girasol como: resistencia a heladas, insensibilidad al fotoperíodo y capítulos grandes. Tiene valor ornamental en otros países, pero su potencial no ha sido explotado en México. Una forma de aprovechar su potencial genético es a través de cruzamientos amplios con el girasol cultivado.

En cruzamientos intergenéricos la principal causa de infertilidad híbrida es el apareamiento cromosómico irregular, condición que puede ser detectada a través de análisis meiótico.

La propagación vegetativa es un recurso valioso cuando no es posible propagar sexualmente una planta o población. El cultivo *in vitro* es la vía de reproducción vegetativa para el girasol y especies diploides anuales relacionadas con el mismo. El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de plantas es una técnica importante empleada en agricultura en tres aspectos importantes: la micropropagación de cultivares, la preservación de germoplasma silvestre y el mejoramiento genético.

El establecimiento de una técnica de cultivo *in vitro* eficiente y reproducible es el paso básico para la transformación genética de plantas adaptadas a las cambiantes demandas del mercado.

Objetivos

1. Evaluar el apareamiento cromosómico en meiosis de híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia*.
2. Desarrollar una técnica para rescate de embriones de semilla híbrida sin desarrollo completo.

Hipótesis

1. El apareamiento cromosómico en híbridos intergenéricos es irregular lo que provoca infertilidad.
2. Es posible producir y propagar plantas de híbridos intergenéricos a través de rescate de embriones.

Meta

Conocer las posibles causas de esterilidad de los híbridos intergenéricos y buscar la manera de propagar las plantas híbridas que logren obtenerse.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Origen del Girasol

El origen del girasol cultivado se atribuye principalmente a México, Estados Unidos, Canadá e incluso Brasil (Ortegón *et al.*, 1993). Estudios posteriores reportados por estos mismos autores, indican que el girasol procede del oeste de Norteamérica, incluso del norte de México. Se cree que la introducción del girasol en Europa fue realizada por los españoles, quienes llevaron al viejo continente semilla obtenida en territorio mexicano, (Ortegón *et al.*, 1993).

El girasol domesticado se originó y desarrolló a partir de su progenitor *H. annuus* silvestre, que probablemente fue domesticado en la mayor parte de Estados Unidos, sur de Canadá y norte de México (Séiler y Rieseberg, 1997). Pope *et al.* (2001) descubrieron recientemente los restos de girasol completamente domesticado en el sitio de San Andrés (en la costa tropical del Golfo de México), los cuales tienen 4700 años de antigüedad. Harter *et al.* (2004) reportan posteriormente el descubrimiento del girasol domesticado con 4000 años de antigüedad en San Andrés.

Los restos arqueológicos precolombinos de girasol silvestre en México cubren un largo período de tiempo, desde el arcaico tardío al período post-clásico. Lentz *et al.* (2008) demostraron que los humanos consumían frutos de girasol en esa región ya que encontraron depósitos de coprolitos en la fase Flacco (2900 a 2200 cal A.C.) en una cueva de Ocampo Tamaulipas, México. 10 aquenios de girasol silvestre al menos se encontraron como parte de una ofrenda en el templo mayor azteca de Tenochtitlán, final del tiempo precolombino, (Lentz *et al.*, 2008). Estos mismos autores reportan que se encontraron dos aquenios de girasol los cuales fueron fechados con un acelerador de espectrometría de masas en 2875 a 2575 cal A.C. y 2867 a 2482 cal A.C. respectivamente. Demuestran y presentan datos arqueológicos, lingüísticos, etnográficos y etnohistóricos de que la domesticación del girasol ocurrió 2600 cal A.C.

Lentz *et al.* (2008), reportan datos de girasol domesticado encontrado en la Cueva de Gallo, Morelos, México. Se encontraron tres grandes aquenios en excelentes condiciones, que fueron desenterrados de la cueva, y eran usados para actividades rituales y funerales.

Usos del Girasol

El género *Helianthus* está adaptado a una amplia variedad de hábitats y exhibe una gran diversidad de características morfológicas y fisiológicas.

Algunos miembros del género son cultivados como ornamentales y dos contribuyen a la alimentación humana: *H. annuus* y *H. tuberosus*.

El aceite de girasol entre las oleaginosas, es considerado como uno de los mejores en características nutritivas especialmente cuando se le compara con los más conocidos como el del algodón, soya y cártamo. La principal característica es su alto contenido de ácidos grasos no saturados que favorece su empleo en la elaboración de margarinas, mayonesas y ensaladas, además de su uso común como aceite para cocinar. Robinson (1973) menciona que en la industria se emplea para elaborar pinturas, barnices y en la manufactura de plásticos. Sandvik (1979) y Warrington (1980) indican que el aceite de girasol crudo en proporciones de 50% con aceite diesel puede utilizarse como lubricante de motores.

El porcentaje de proteína en la semilla es importante ya que las semillas son usadas como alimento para ganado. Las proteínas almacenadas en la semilla del girasol pertenecen a dos grandes grupos: globulinas y albúminas. Las globulinas constituyen cuando mucho un 55% del total de la proteína de la semilla (Dalgalarondo *et al.*, 1984). La proteína principal es helianthinina una proteína 11S con propiedades similares a las de las leguminosas considerada como la mejor proteína almacenada en legumbres, (Allen *et al.*, 1985 y This *et al.*, 1988).

Clasificación Taxonómica del Girasol

La clasificación botánica del girasol en base a Plants USDA (2008) es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Helianthus</i> L.
Especie	<i>Helianthus annuus</i> L.

Origen y Características Morfológicas de *Tithonia rotundifolia*

En México se han localizado un total de 19 especies de *Tithonia*, con su máxima distribución en altitudes mediana y alta de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental (Gómez-Sánchez y González-Elizondo, 1994).

El género *Tithonia* es originario de México y actualmente está distribuido en los trópicos húmedos y sub-húmedos de Centro y Sudamérica, Asia y África (George *et. al.*, 2001).

Tithonia rotundifolia Mill. pertenece a la familia Asteraceae (Compositae). En México se localiza en los estados de Nayarit, Colima, Jalisco, Puebla, Michoacán, Estado de México, Guerrero y Oaxaca (Gómez-Sánchez y González- Elizondo, 1994). Sus flores anaranjadas son relativamente grandes y atractivas y se le ha considerado un buen candidato para la domesticación (Upfold and Vanstaden, 1990). Es una planta anual de 70 a 75 cm que tiene características ornamentales deseables que pueden transferirse al girasol como la pubescencia suave, tonos naranja, y pedicelo largo. Sus aquenios presentan latencia y necesitan 12 semanas para iniciar la germinación (Upfold and Vanstaden, 1990).

Clasificación Taxonómica de *Tithonia rotundifolia*

La clasificación botánica de *Tithonia rotundifolia* en base a Plants USDA, 2008 es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tithonia</i>
Especie	<i>Tithonia rotundifolia</i> (Mill.) S. F. Blake

Hibridación

El objetivo de la hibridación interespecífica en el mejoramiento del girasol es la introducción de genes deseables para que le confieran resistencia a ciertas enfermedades, así como características químicas y agronómicas (Laferrière, 1986).

La hibridación interespecífica en especies silvestres y cultivadas de girasol se ha hecho por muchos años. Los primeros trabajos reportan la introducción de genes para la resistencia al moho, formando híbridos entre *H. annuus* x *H. argophyllus*. Se transfirieron posteriormente genes a líneas cultivadas formando la primera línea CMS (esterilidad citoplasmática masculina), obtenida de la crucea *H. annuus* x *H. petiolaris* (Leclercq, 1969). Los primeros híbridos obtenidos de la crucea entre *H. laevigatus* x *H. annuus* fueron realizados por Georgieva-Todorova (1990), y Christov (1991).

La hibridación intergenérica es todavía más difícil de llevar a cabo. Cristov y Panayotov (1991) reportaron cruzamientos amplios entre los géneros *Helianthus* y *Tithonia* con obtención de híbridos fértiles pero no demostraron molecularmente su naturaleza híbrida.

Reyes-Valdés *et al.* (2005) obtuvieron un híbrido intergenérico estéril al cruzar la línea androestéril de *H. annuus* HA89 x *Tithonia rotundifolia*. Confirmaron su naturaleza híbrida por medio de AFLPs y descartaron el fenómeno de hibridación parcial por medio del análisis de distancias euclidianas.

Análisis Meióticos en Híbridos

Una especie diploide con reproducción sexual para ser fértil debe poseer un comportamiento meiótico normal, es decir, un buen apareamiento entre

cromosomas homólogos y consecuentemente formación de bivalentes. Ello determina que exista buena segregación y formación de gametos balanceados y fértiles. El grado de apareamiento meiótico es una medida de la homología que existe entre los cromosomas. Es cierto cuando son normales los genes que regulan fisiológicamente todas las etapas y procesos de la división meiótica. Se puede decir que hay afinidad (homología) entre los genomas parentales sí el híbrido analizado es fértil y posee formación de bivalentes.

Las irregularidades cromosómicas meióticas en los híbridos pueden ser debidas a que los genomas parentales presentan una homología o compatibilidad reducida, esto es, que los padres difieren en su constitución genómica. Dichas anomalías pueden causar esterilidad (Jackson, 1988; Jan y Chandler, 1989; Atlagic *et al.*, 1993, 1995; Atlagic y Skoric, 1999).

Georgieva-Todorova (1990) reportó irregularidades cromosómicas con trivalentes y un gran número de univalentes así como una completa esterilidad masculina en los híbridos interespecíficos entre *H. laevigatus* y *H. annuus*.

Atlagic *et al.* (1993) analizaron células meióticas en híbridos de *H. tuberosus* L. x *H. annuus* (L-1, OCMS 74, OCMS 22, L-9 Y CMS 10) y encontraron una meiosis altamente irregular (univalentes y multivalentes en diacinesis, cromosomas “rápidos” en la metafase I y cromosomas con puentes y rezagados en anafase I). Atlagic *et al.* (1995) volvieron a encontrar posteriormente las mismas irregularidades cromosómicas en los híbridos F₁ de

las cruzas de *Helianthus mollis*, *Helianthus salicifolius*, *Helianthus maximiliani* con girasol cultivado (CMS 9, L-9, CMS BCPL 139, L-3 Y OCMS74). Todos estos resultados nos indican que el girasol anual cultivado *H. annuus* difiere en su constitución genómica con estas especies silvestres.

Aunque *T. rotundifolia* presenta igual número de cromosomas que el girasol anual cultivado y otras especies de *Tithonia* ($2n = 34$) (Heiser, 1948; Delay, 1951 y Turner & King, 1964), la división meiótica del híbrido obtenido de la cruce de *T. rotundifolia* x *H. annuus* generalmente no es normal y su fertilidad esta disminuida (Cristov *et al.*, 1991).

En los estudios realizados por Chandler *et al.* (1986) se asume que las configuraciones multivalentes son debidas a translocaciones y que los puentes de cromosomas son causadas por las inversiones.

Cultivo de Tejidos

Según Mroginski *et al.* (2004) una de las primeras aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura lo constituyó su empleo como ayuda para la obtención de híbridos derivados de cruzamientos interespecíficos donde se produce el aborto temprano de embriones. Definen el cultivo de tejidos como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada de la planta que pueden ser protoplastos - células desprovistas de pared celular-, células, tejidos u órganos) se cultiva

asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

El cultivo de tejidos se basa en la totipotencia celular que es la capacidad de cualquier célula somática que puede dar lugar a cualquiera y a todos los tipos celulares de un organismo completo o adulto.

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de plantas es una técnica importante empleada en aplicaciones agrícolas en tres aspectos fundamentales: la micropropagación de cultivares, la preservación de germoplasma agronómico y silvestre y el mejoramiento genético (Robert y Loyola, 1985).

Micropropagación

Olmos, *et al.* (2004) definen a la micropropagación como la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos, el cual es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada.

La micropropagación tiene aplicación inmediata en forma comercial ya que se utiliza ampliamente en la multiplicación vegetativa de cultivares económicamente importantes y libres de patógenos como son las plantas

ornamentales, hortícolas, especies fructícolas, y especies en peligro de extinción.

Las etapas de la microrpopagación son:

- Establecimiento del cultivo
- Desarrollo y multiplicación de vástagos
- Enraizamiento
- Aclimatación de las plántulas

Cultivo de Embriones

Los embriones inmaduros tienen un alto potencial morfogénico y son usados frecuentemente para la regeneración de plantas en especies donde la regeneración con otros explantes es difícil.

El cultivo de embriones consiste en el aislamiento y crecimiento *in vitro*, en condiciones estériles, de un embrión inmaduro con el fin de obtener una planta viable (Pierik, 1990). Los embriones inmaduros se originan en semillas no acabadas de madurar su cultivo es extremadamente difícil y las posibilidades de éxito dependen mucho del estado de desarrollo del embrión en el momento de ser aislado.

El cultivo de embriones inmaduros se utiliza frecuentemente como prevención del aborto embrionario que resulta de la incompatibilidad en cruzamientos interespecíficos, intergenéricos, y entre cruzamientos de diploides y tetraploides en los cuales el endospermo puede no desarrollarse o hacerlo muy pobremente

Hay factores que afectan el éxito del cultivo de embriones como: genotipo, estado del desarrollo del embrión en el momento del aislamiento, condiciones de crecimiento de la planta madre, composición del medio nutritivo, oxígeno, luz y temperatura.

Las cruzas interespecíficas entre especies silvestres y cultivadas de girasol están siendo regeneradas por medio de cultivo de tejidos con la técnica de rescate de embriones (Chandler and Beard, 1983; Freyssinet, *et al.*, 1988; Kräuter, *et al.*, 1991; Faure, *et al.*, 2002). Taski-Ajdukovic *et al.* (2006) lograron regenerar híbridos somáticos interespecíficos entre *Helianthus annuus* L. y *Helianthus maximiliani* obtenidos por la electrofusión de protoplastos confirmando su naturaleza híbrida por su morfología y análisis de RAPD.

Medios de Cultivo

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.

Un medio de cultivo es una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos, (Mroginski, 2004).

Básicamente los medios de cultivo se componen de:

- Sales inorgánicas
- Compuestos orgánicos
- Complejos naturales
- Materiales inertes de soporte

La regeneración del girasol por organogénesis es altamente variable y depende del genotipo, la naturaleza del explante, la composición del medio nutritivo, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento y las condiciones en el que se desarrolla el cultivo (Mayor, *et al.*, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó al cabo en los laboratorios de Análisis de Genomas y Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Análisis Meióticos

Se colectaron 36 botones florales de los híbridos intergenéricos producto de cruzar el girasol cultivado (CMS HA89) con la especie silvestre *T. rotundifolia* (Accesión 26). Fueron fijados, para su estudio citológico en una solución 3:1 (etanol: ácido acético glacial).

El análisis cromosómico se realizó en células en diacinesis, metafase I y anafase I siguiendo la técnica de "Squash", en meiocitos de anteras jóvenes extraídas con una aguja de disección. Las anteras se colocaron en un portaobjetos y se les agregó una gota de colorante carmín, con la aguja curva se cortaron las anteras por la mitad, se presionó para que salieran los microsporocitos. La envoltura de la antera se extrajo. Se dejaron colorear los microsporocitos y se colocó un cubreobjetos, se calentó y se presionó

suavemente sobre un papel filtro. Se observó con el objetivo 100x de un microscopio de luz visible Kart Zeiss.

Cultivo *in vitro*

Se procedió a la búsqueda de información científica sobre trabajos realizados en girasol con técnicas *in vitro* tanto en cruzamientos interespecíficos como cruzamientos intergenéricos (Anexo A1).

El manejo del cultivo *in vitro* se realizó en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar de aire. Todos los medios, instrumentos y recipientes de cultivo fueron esterilizados con vapor húmedo, empleando para esto la autoclave por espacio de 20 minutos a una presión de 1 kg/cm² y a una temperatura de 120-121°C. Se prepararon soluciones madre para la elaboración de medios nutritivos. (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Composición basal del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Componentes para preparación de soluciones madre.

Compuestos	Por litro	gramos	10 litros
MACRONUTRIENTES			
NH ₄ NO ₃	1650.00 mg	1.650	16.50
KNO ₃	1900.00 mg	1.900	19.00
CaCl ₂ . 2H ₂ O *	440.00 mg	0.440	3.322
KH ₂ PO ₄	170.00 mg	0.170	1.70
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00 mg	0.370	3.70
MICRONUTRIENTES			
KI	830.00 µg	0.00083	0.0083
H ₃ BO ₃	6.20 mg	0.00620	0.0620
MnSO ₄ .4H ₂ O *	17.00 mg	0.01700	0.1288
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60 mg	0.00860	0.0860
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	250.00 µg	0.00025	0.0025
CuSO ₄ .5H ₂ O	25.00 µg	0.000025	0.00025
CoCl ₂ .6H ₂ O	25.00 µg	0.000025	0.00025
SOL. DE FIERRO			
Na ₂ EDTA	37.30 mg	0.0373x10	0.373
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80 mg	0.0278x10	0.278
VITAMINAS			
Inositol	100.00 mg	0.10000	1.000
Ác. nicotínico	0.50 mg		0.005
Piridoxina-HCl	0.50 mg		0.005
Tiamina-HCl	0.10 mg		0.001
Glicina	2.00 mg		0.020

Técnica de Rescate de Embriones

1. Establecimiento del Cultivo Aséptico

El explante utilizado fue el embrión inmaduro obtenido de la cruce de *H. annuus*, línea CMS HA 89 x *T. rotundifolia* de la Accesoión 26.

Colecta del Explante

Se extirparon 46 y 40 embriones procedentes del cruzamiento de *H. annuus* x *T. rotundifolia*, (13 y 22 días después de la polinización), con pinzas de disección y se colocaron en frascos de vidrio para su siembra en cultivo de tejidos.

Se utilizaron tres medios (Cuadro 3.2) para la obtención de planta completa a partir de embriones inmaduros: 1). MI para la emergencia del embrión, 2). MII para la propagación de la planta y 3). MIII para su enraizamiento

Cuadro 3.2. Medios nutritivos usados para obtener plantas completas de híbridos F₁ de *H. annuus* (CMS HA 89) x *T. rotundifolia* (Accesión 26) por medio de la técnica de rescate de embriones.

COMPONENTES	M E D I O S		
	I	II	III
Sales gr/l	MS*	MS	MS
Vitaminas gr/l	MS	MS	-
Aminoácidos gr/l	+	-	-
Sacarosa gr/l	90	30	20
6-BAP gr/l	0.0005 - 0.001	0.0001 – 0.0005	-
ANA gr/l	-	-	0.0001
Agar gr/l	6	9	9
pH	5.0	5.0	5.0

MS* Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

Desinfección

Los embriones colectados se desinfectaron con alcohol etílico al 70% por 1 minuto para pasar al hipoclorito de sodio al 20% por 15 minutos. Se enjuagaron tres veces con agua estéril des-ionizada. La desinfección se llevó al cabo en la campana de flujo laminar del cuarto de siembra.

Siembra

Los embriones desinfectados fueron extirpados bajo un estereomicroscopio con pinza y aguja de disección. Se retiraron las partes externas de la semilla y se colocó el embrión en un recipiente de vidrio que contenía el medio I (medio MS, inositol, alanina, glutamina, serina, triptófano, cisteína, BAP, sacarosa, agar y pH 5.0) y fueron puestos en la cámara de crecimiento para su germinación.

2. Propagación Masiva o Micropropagación

Al cabo de 6 semanas emergieron 3 plántulas aproximadamente de 1 y 0.5 cm que se colocaron en medio II (medio MS, BAP, sacarosa, agar, pH 5.0, sin aminoácidos), para su desarrollo en plántula y micropropagación. Se encontró que las plantas estaban hiperhidratadas a la semana del trasvase.

Debido a que la concentración de agar fue baja (6 g/l), se procedió a aumentar su concentración hasta 9 g/l y se probaron tres medios diferentes con la finalidad de reducir el exceso de agua en las plántulas. Cada medio contenía un tipo de regulador de crecimiento, el medio 1 paclobutrazol (1 mg/l), el medio 2 asimidol (1 mg/l) y el medio 3 prohexadiona de calcio (0.250 mg/l).

3. Enraizamiento

Una vez que se recuperaron las plántulas se prepararon medios con diferentes reguladores de crecimiento, para obtener plantas completas (con raíz), preparando para ello 8 medios: 1). MS libre de hormonas, 2). MS libre de hormonas + 1.5 g/l de carbón activado, 3). MIIIA (no contiene vitaminas, con 0.0002 g/l de AIA y 0.000138 g/l de ácido salicílico), 4). MIIIA (sin vitaminas y con 0.0001 g/l de regulador de crecimiento ANA), 5). MIIIA (sin vitaminas, con 0.0002 g/l de ANA y 0.000138 g/l de ácido salicílico), 6). MIIIV (con vitaminas y 0.0001 g/l de ANA), 7). MIIIA (1.5 g/l de carbón activado y 0.0001 g/l de ANA) y 8). MIIIV (con vitaminas, 1.5 g/l de carbón activado y 0.0001 g/l de ANA). Fueron colocadas de 3 a 4 plántulas por frasco con un total de 5 frascos por tratamiento y trasladados a la cámara de crecimiento con temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

4. Aclimatación

Se prepararon las condiciones necesarias para su aclimatación y desarrollo una vez que se obtuvo la planta completa.

El medio fue retirado de las raíces de 20 plantas con agua de la llave para después sumergirlas en una solución de 3.125 g de bactericida-fungicida en 500 ml agua des-ionizada por dos minutos para protegerlas de posibles enfermedades. Se colocó enseguida la parte basal de la planta en una solución

de 0.625 gr de Raizal® 400 en 100 ml de agua des-ionizada, por tres minutos para el fortalecimiento de la raíz y finalmente las plantas enraizadas (2 a 5 cm) se transfirieron a macetas con una mezcla 3:1 de peat-moss/vermiculita y arena que se mantuvieron en el laboratorio.

Las plantas fueron inicialmente cubiertas con bolsas de plástico y gradualmente expuestas (cada tercer día) a humedad ambiental. Después de 10 días fueron transferidas a condiciones regulares de invernadero, donde comenzó su desarrollo y maduración.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Meióticos

En los híbridos F₁ de la cruce del girasol cultivado con *T. rotundifolia*, (Cuadro 4.1) de las 54 células analizadas en fases de diacinesis, metafase I y anafase I, las meiosis fueron altamente irregulares observándose cromosomas univalentes y multivalentes probablemente debidos a translocaciones e inversiones, así como cromosomas rápidos, rezagados y con puentes. (Figura 4.1).

Cuadro 4.1. Híbridos analizados meióticamente por medio del método squash.

Híbrido	Ramificada	No ramificada	No. de células analizadas
CMSHA89*TRG		*	32
CMS HA89*TRI	*		8
CMSHA89*TRK	*		14

TRG, TRI, TRK: identificación del progenitor masculino

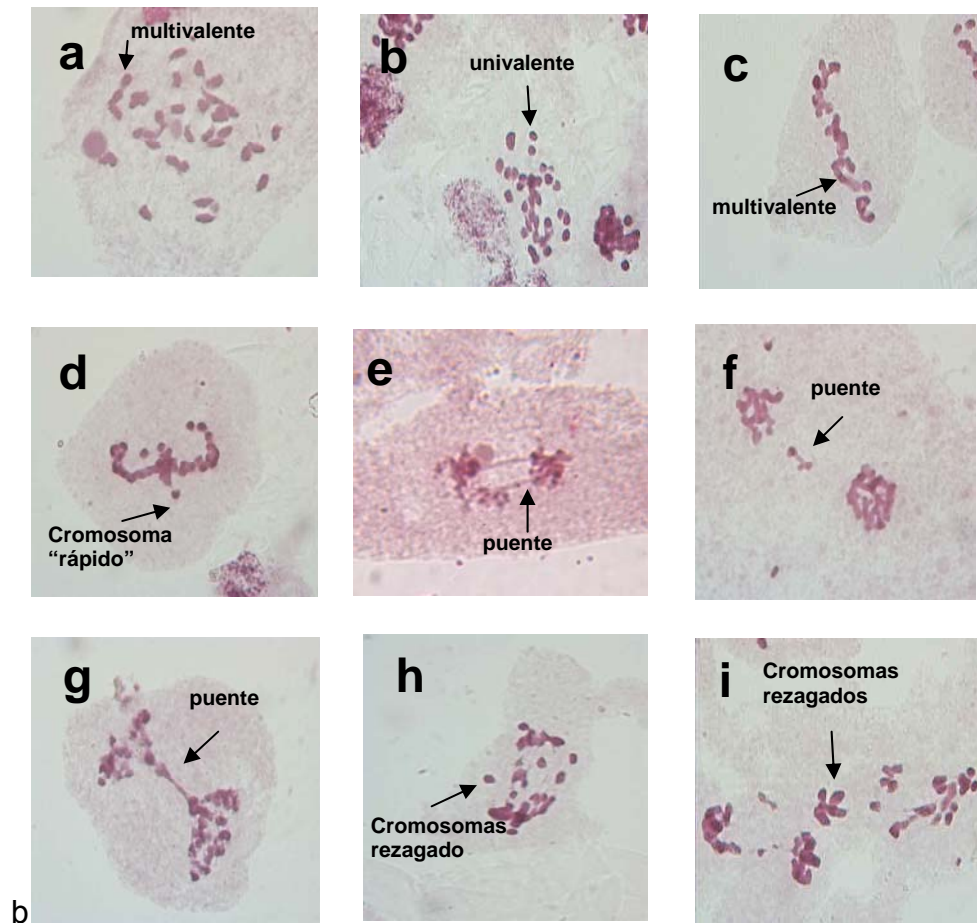


Fig. 4.1. Meiosis irregular en los híbridos F_1 de girasol cultivado *H. annuus* (CMS HA89) \times *T. rotundifolia* (Accesión 26): **a) y b)** Diacinesis con univalentes y multivalentes; **c) y d)** Metáfases con univalentes y multivalentes con cromosomas "rápidos"; **e), f) y g)** Anáfases irregulares con puentes; **h) y i)** Anáfases irregulares con cromosomas rezagados.

Resultados similares se han obtenido en estudios con híbridos interespecíficos de *H. annuus* con *H. tuberosus*, *H. mollis*, *H. salicifolius* y *H. maximiliani* (Atlagic et al., 1993; Atlagic et al., 1995). Ellos reportaron una meiosis altamente irregular (univalentes y multivalentes en diacinesis, cromosomas "rápidos" en la metafase I y cromosomas con puentes y rezagados en anafase I).

Cultivo de Tejidos

Rescate de Embriones

Tres plántulas emergieron de la siembra de los 86 embriones en medio MI (Figura 4.2) después de 6 semanas. Midieron entre 0.5 a 1.0 cm de longitud. Emergieron 5 más de 8 a 9 semanas con medidas entre 1.5 a 2.5 cm y 7 plántulas no lograron sobrevivir.

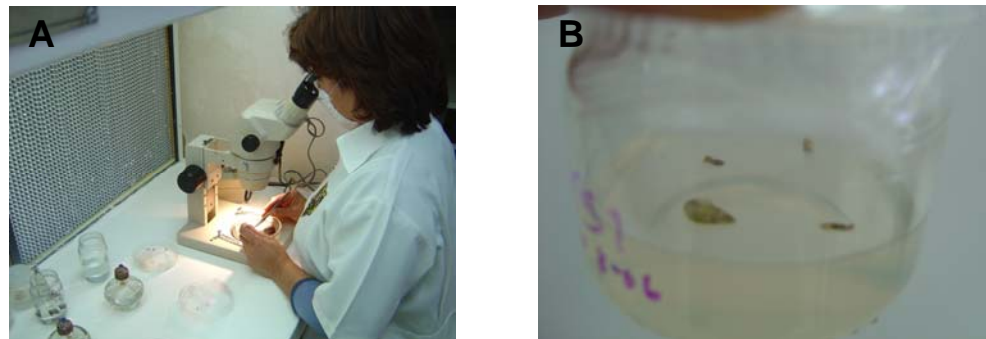


Fig. 4.2. Siembra de embriones: **A)** Extirpación de embrión para su siembra; **B)** Embrión de cuatro semanas. Fotos Dr. Humberto Reyes.

La técnica de rescate de embriones fue aplicada por Chandler, *et al.* (1983) y posteriormente por Freyssinet, *et al.* (1988) quienes modificaron la técnica al cambiar en la primera parte el medio de Gamborg (B5) por el de Murashige and Skoog así como su regulador de crecimiento. Trabajaron con embriones inmaduros de 4 a 21 días después de la polinización, de 6 líneas consanguíneas de girasol (*H. annuus*) (T 76B, HA 89B, HA 291B, HA 300B, HA

303B Y RT 26) y obtuvieron plantas fértiles. Dicha técnica se modificó al cambiar en la etapa tres el medio B5 por el de Murashige and Skoog, así como su regulador de crecimiento, concentración de regulador, cantidad de sacarosa y concentración de agar; ya que debido a la baja concentración del agar las plántulas comenzaron a hiperhidratarse.

El medio con paclobutrazol logró la mejor respuesta para eliminar la hiperhidracidad ya que con los medios que contenían asimidol y prohexadiona de Calcio el material se necrosó rápidamente y murieron en menos de una semana.

Se probaron tres medios con diferentes reguladores y concentraciones para reducir el exceso de agua en ellas (Cuadro 4.2). El medio con paclobutrazol logró la mejor respuesta para eliminar la hiperhidracidad ya que con los medios que contenían asimidol y prohexadiona de Calcio el material se necrosó rápidamente y murieron en menos de una semana.

Cuadro 4.2. Reguladores utilizados en medios nutritivos para reducir la hiperhidracidad en los híbridos F₁ de la cruce de *H. annuus* x *T. rotundifolia*.

Regulador	Material Trasvasado	Material Vivo
Paclobutrazol 1mg/l	10 frascos con 4 explantes cada uno	90% material rescatado y en buenas condiciones
Prohexadiona de calcio 0.250 mg/l	10 frascos con 4 explantes cada uno	100% necrosado
Asimidol 1 mg/l	10 frascos con 4 explantes cada uno	100% necrosado

Una vez recuperadas las plantas, se procedió a la micropropagación de la misma. Se lograron obtener de 130 plántulas en buenas condiciones (Figura 4.3).



Fig. 4.3. Plántula híbrida CMS HA89
x *Tithonia rotundifolia*

Enraizamiento

Una vez que se logró tener el mayor número de plantas propagadas y en buenas condiciones, se enfocó el trabajo hacia el enraizamiento de la misma. Se prepararon para ello diferentes medios nutritivos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. De los 8 medios de crecimiento utilizados la mejor respuesta se obtuvo con el medio MIIIA sin vitaminas y con 0.0001 g/litro de ANA (Cuadro 4.3). Se logró obtener 5 plantas enraizadas en los primeros cuatro días de su siembra con longitudes de 3 a 4.5 cm que llegaron a medir hasta 12 cm a los 10 días de su transvase (Figura 4.4).

Cuadro 4.3. Medios utilizados para enraizamiento de plantas híbridas F₁ de la cruce de girasol cultivado con *T. rotundifolia*. Saltillo, Coah. 2007

Medio	Regulador Utilizado	Plantas	
		Trasvasadas	Enraizadas
1. MS	Libre de hormonas	24	2
2. MS + carbón	Libre de hormonas	16	0
3. MIIIA	Ácido Indolacético (AIA) y ácido salicílico	24	0
4. MIIIA*	Ácido naftal-acético (ANA)	48	25-30
5. MIIIA	Ácido naftal-acético y ácido salicílico	24	0
6. MIIIV*	Ácido naftal-acético (ANA)	24	0
7. MIIIA + carbón	Ácido naftalacético (ANA)	16	0
8. MIIIV + carbón	Ácido naftalacético (ANA)	16	0

A* No contiene vitaminas V* Contiene vitaminas

Se obtuvo un 52% de plantas enraizadas a partir de las 48 plantas trasvasadas al medio MIIIA con 0.0001 g/litro de ANA. Se obtuvo un 8.3% de enraizamiento de 24 plantas trasvasadas al medio de crecimiento MS (libre de hormonas), y con los otros medios restantes se encontró el 0% de plantas enraizadas probablemente debido a la ausencia de vitaminas y alta concentración de reguladores de crecimiento.



Fig. 4.4. Enraizamiento de plantas híbridas F₁ de la cruce de girasol cultivado con *T. rotundifolia*. Saltillo, Coah. 2007.

Aclimatación

De las 20 plantas que fueron aclimatadas primero en condiciones de laboratorio y después en invernadero, solamente dos lograron desarrollarse y una planta generó dos botones, de los cuales uno llegó a floración, pero no pudieron adaptarse normalmente ya que aun falta definir las condiciones de aclimatación (Figura 4.5).



Fig. 4.5. Aclimatación de plantas híbridas F_1 de la cruce de girasol cultivado con *T. rotundifolia*: **a) y b)** Aclimatación en laboratorio; **c), d) y e)** Aclimatación en invernadero. Saltillo, Coah. 2007.

V. CONCLUSIONES

Las irregularidades en el apareamiento meiótico observadas en este trabajo nos indican que los genomas parentales (*H. annuus* HA 89 y *T. rotundifolia* Ac 26) no son compatibles, lo cual impide una segregación normal y no permite la formación de gametos viables. Esto resulta en una barrera a la reproducción sexual de los híbridos. Las anomalías en el apareamiento cromosómico son el resultado de la evolución divergente entre las dos especies, que han acumulado diferencias morfológicas cromosómicas por translocaciones o inversiones. Estas diferencias son grandes ya que no se observó ni una célula meiótica con apareamiento normal.

Tres medios MS adicionados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, aminoácidos y agar permitieron el rescate de embriones híbridos de semillas mal desarrolladas. La técnica de rescate de embriones resultó exitosa en este trabajo y puede promover el desarrollo intensivo de híbridos con potencial ornamental pues los cruzamientos *H. annuus* x *T. rotundifolia* producen en su gran mayoría achenios sin desarrollo completo, sin embargo, aún se requiere estandarizar las condiciones de aclimatación

VI. RESUMEN

En el presente trabajo se llevaron al cabo análisis meióticos y propagación *in vitro* por medio de la técnica de rescate de embriones de híbridos intergenéricos producidos al cruzar el girasol cultivado (*Helianthus annuus*) con *Tithonia rotundifolia*, con los siguientes objetivos: (i) evaluar el apareamiento cromosómico en meiosis y (ii) desarrollar una técnica para producir y propagar híbridos intergenéricos a partir de semillas mal desarrolladas.

El análisis cromosómico se realizó en células en diacinesis, metafase I y anafase I siguiendo la técnica de "Squash", con meiocitos de anteras jóvenes. El cultivo *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por medio de la técnica de rescate de embriones, utilizando para ello embriones inmaduros con 13 y 22 días después de la polinización.

El apareamiento cromosómico fue anormal ya que se detectó la presencia de multivalentes y univalentes en metafase I, así como cromosomas con puentes y rezagados en anafase I, lo cual causa una segregación cromosómica irregular. Estos resultados nos indican que el girasol cultivado

tiene incompatibilidad cromosómica con *T. rotundifolia*, que impide la reproducción sexual normal de los híbridos intergenéricos.

Se tuvo éxito en propagación de híbridos a través de rescate de embriones. Se logró obtener un 52% de plantas enraizadas, y se produjeron dos plantas completas. El desarrollo de las mismas no fue total, ya que se requiere definir la técnica de aclimatación.

LITERATURA CITADA

- Allen, R.D., C.L. Nessier and T.L. Thomas. 1985. Developmental expression of sunflower 11S storage protein genes. *Plant Mol. Biol.*, 5:165-173.
- Atlagic, J. and D. Skoric. 1999. Cytogenetic study of *Helianthus laevigatus* and its F₁ and BC₁F₁ hybrids with cultivated sunflower, *Helianthus annuus*. *Plant Breeding* 118:555-559.
- Atlagic, J., 1990. Pollen fertility in some *Helianthus* L. species and their F₁ hybrids with the cultivated sunflower. *Helia* 13:47-54.
- Atlagic, J., B. Dozet y D. Skoric. 1993. Meiosis and pollen viability in *Helianthus tuberosus* L. and its hybrids with cultivated sunflower. *Pl. Breed.* 111:318-324.
- Atlagic, J., B. Dozet y D. Skoric. 1995. Meiosis and pollen grain viability in *Helianthus mollis*, *H. salcifolius*, *H. maximiliani* and their F₁ hybrids with cultivated sunflower. *Euphytica* 81:259-263.
- Berrios, E.F., L. Gentzbittel, G. Alibert, Y. Griveau, A. Bervillé and A. Sarrafi. 1999. Genetic control of *in vitro*-organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding*. 118:359-361.
- Chandler, J. M. and B. H. Beard. 1983. Embryo culture of *Helianthus* hybrids. *Crop Sci.* 23:1004-1007.
- Chandler, J. M., C. C. Jan and H. Beard. 1986. Chromosomal differentiation among the annual *Helianthus* sp. *Systematic Botany* 11 (1), 354-371.

- Charrière, F. and G. Hahne. 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Science*. 137:63-71.
- Christov, M. 1991. Possibilities and problems in the hybridization of cultivated sunflower with species of the genus *Helianthus* L. *Helia* 14:35-40.
- Cristov, M. and I. Panayotov. 1991. Hybrids between the genera *Helianthus* and *Tithonia* and their study. *Helia* 14:27-34.
- Dalgarrondo, J., J. Raymond and J.L. Azanza. (1984). Sunflower seed storage proteins: characterization and subunit composition of the globulin fraction. *J. Exp. Bot.* 1618-1628.
- Delay, C. 1951. Nombres chromosomiques chez les Phanerogames. *Rev. Cytol. Et Biol. Veg.* 12(3-4):161-368.
- Faure, N., H. Serieys, F. Kaan and A. Bervillé. 2002. Partial hybridization in crosses between cultivated sunflower and the perennial *Helianthus mollis*: effect of *in vitro* culture compared to natural crosses. *Genetic Transformation and hybridization. Plant cell Rep.* 20:943-947.
- Freyssinet M. and G. Freyssinet. 1988. Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. *Plant Science*. 56:177-181.
- George, T. S., P. J. Gregory, J. S. Robinson, R. J. Buresh & B. A. Jama. 2001. *Tithonia diversifolia*: variants in leaf nutrient concentration and implications for biomass transfer. *Agroforestry Systems*. 52:199-205.
- Georgieva-Todorova, J. 1990. Genetic and cytogenetic investigation of the genus *Helianthus* L. (in Bulgarian). *Bulgarian Acad. Sci., Sofia*.

- Goffner, D., P. This, and M. Delseny. 1990. Effects of abscisic acid and osmotica on helianthinin gene expression in sunflower cotyledons in vitro. *Plant Science*. 66:211-219
- Gómez-Sánchez, D. and González-Elizondo, S., 1994. Localization of *Helianthus*, *Siguiera* and *Tithonia* genera in Mexico. In: Seiler, G. J. (Ed.), *FAO working group: evaluation of wild Helianthus species*. pp. 134-150.
- Harter, A.V., K. A. Gardner, D. Falush, D. L. Lentz, R. A. Bye & L. H. Rieseberg. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature*. 430, 201-205.
- Heiser, C. R. 1948. Taxonomic and cytological notes on the *annual* species of *Helianthus*. *Bull. Torrey Bot. Club*. 75 (5):512-515.
- Jackson, R. C. 1988. A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in helianthus (Compositae). *Amer. J. Bot.* 75:609-614.
- Jan, C. C. and J. M. Chandler. 1989. Sunflower Interspecific hybrids and Amphiploids of *Helianthus annuus* x *H. bolanderi*. *Crop Sci*. 29:643-646.
- Kräuter, R., A. Steinmetz, and W. Friedt, 1991: Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via “embryo rescue” and characterization of the hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 82:521-525.
- Kunasaki, T. J. 1970. Tissue cultura of tropical ornamental plants. *Hort. Sca.* 7: 17-18.
- Laferriere, J. E. 1986. Interspecific hybridization in sunflowers: an illustration of the importance of wild genetic Resources in plant breeding. *Outlook on Agriculture*. 15:104-109.

- Leclercq, P. 1969. Une stérilité male cytoplasmique chez le tournesol. *Ann Amélior Plant* 19:99-106
- Lentz, D. L., M. D. Pohl, J. L. Alvarado, S. Tarighat and R. Bye. 2008. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre.Columbian domesticate in Mexico. *PNAS*. 105:6232-6237.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- Mayor M.L., G. Nestares, R. Zorzoli, P. Ludueña and L. Picardi. 2001. Shoot organogenesis derived from cotyledonary explants in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR-CIURN-CONICET, CC 14. Trabajo presentado en el IV encuentro latinoamericano de Biotecnología Vegetal.
- Mayor M.L., G. Nestares, R. Zorzoli & L.A. Picardi. 2003. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 72:99-103.
- Mroginski, L., S. Pedro y F. Eduardo. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski. Ediciones INTA. pp. 35-39.
- Nestares, G., M.L. Mayor, T. Vega, R. Zorzoli y L. Picardi. 2005. Inducción de vástagos por organogénesis directa en *Helianthus annuus* L. V Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal 2002. *Biotecnología Vegetal – por E-campo*.

Nestares, G., M.L. Mayor, P. Ronchi, R. Zorzoli y L. Picardi. Cartel presentado en el 2º congreso Argentino de girasol en 2003. Floración prematura en la Micropropagación por Organogénesis de Girasol. Asagir.

< http://www.asagir.org.ar/2docongreso_murales.asp>

Olmos, S., L. Gabriela and G. Ernestina. 2004. Micropropagación. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski. Ediciones INTA. p. 163.

Ortegón, M.A.S., A. Escobedo Mendoza, J. Loera Gallardo, A. Díaz Franco y E. Rosales Robles. 1993. El girasol. Editorial Trillas. Primera Edición. p. 11

Paterson, K.E. 1984. Shoot tip culture of *Helianthus annuus*-flowering and development of adventitious and multiple shoots. Amer. J. Bot. 71 (7):925-931.

Parody, B., N. López, M. López Bilbao, y H.E. Hopp. 2005. Respuesta durante el cultivo *in vitro* de girasol (*Helianthus annuus*) dependiente de los diferentes métodos de desinfección utilizados. V Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal 2002. Biotecnología Vegetal – por E-campo.

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo de embriones en Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones mundi-Prensa. Department of Horticulture, Agricultural University Wageningen. The Netherlands. pp. 139-147.

Plants USDA. 2008. Plants profile <<<http://plants.usda.gov/classification.html>>>

Pope, K. O., M. E. D. Pohl, J. G. Jones, D. L. Lentz, C. von Nagy, F. J. Vega and I. R. Quitmyer. 2001. Origin and environmental setting of ancient agriculture in the lowlands of Mesoamerica. Sci. 292:1370-1373.

- Punia, M.S. and N. E. Bohorova. 1992. Callus development and plant regeneration from different explants of six wild species of sunflower (*Helianthus* L). *Plant Science*. 87:79-83.
- Reyes-Valdés, M.H., M. Gómez-Martínez, O. Martínez and F. Hernández Godínez. 2005. Intergeneric hybrid between cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Tithonia rotundifolia* (Mill.)Blake. *Helia* 28:61-68.
- Robert, L. M. y Loyola M. V. El Cultivo de tejidos Vegetales en México. Ed. Consejo Nacional de Ciencia y tecnología. Ciudad Universitaria. México, D. F. p. 87-89
- Robinson, R. B. 1973. The sunflower crop in Minnesota. Exp. Bull 293. Agri. Ext. Serv., University of Minnesota.
- Sandvik, M. M. 1979. The sunflower oil shows promise as a fuel but in economically not yet feasible, *The sunflower*. Vol. 5.
- Seiler, G. J. and L. H. Rieseberg. 1997. Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. In: *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph # 35. Schneiter A. A. (ed.). p.41.
- Sujatha, M. & A. J.Prabakaran. 2001. High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65:23-29.
- Taski-Ajdukovic, K., D. Vasic and N. Nagl. 2006. Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani*

(Schrades) via protoplast electrofusion. Genetic Transformation and hybridization. Plant Cell Rep. DOI 10.1007/s00299-006-0134-5.

This, P., P.D. Goffner, M. Taynal, Y. Chartier and M. Delseny. 1988. Characterization of major storage proteins of sunflower and their accumulation. Plant Physiol Biochem. 26:125-132.

Turner, B. L., R. M. King. 1964. Chromosome numbers in the Compositae. VIII. Mexican and Central American species. Southwestern Naturalist 9(1):27-39.

Upfold, S. J. and J. Vanstaden. 1990. The germination characteristics of *Tithonia rotundifolia*. Ann. Bot. 66: 57-62.

Warrington, C. 1980. Sunflower-energy power, The sunflower news letter. I.S.A. Vol.4, núm. 1.

A N E X O S

Anexo A1. Técnicas biotecnológicas para formación de plantas completas por medio de la organogénesis, embriogénesis y embriones inmaduros en girasol

No.	REFERENCIA	OBJETIVO	EXPLANTE UTILIZADO	MEDIO	pH	*S g/l	AGAR	REGULADORES mg/l	*T °C	*I.L. lux	*F h/día	*P.E.	PROTOCOLO	RESULTADOS
1	M.S. Punia and N.E. Bohorova. 1992. "Desarrollo de Callo y Regeneración de Plantas con Diferentes Explantes de 6 Especies de Girasol (<i>Helianthus L.</i>)". Plant Science. 87: 79 – 83.	Describir un sistema de rutina para regeneración de planta e inducción de callos con diferentes explantes con 6 especies de Helianthus.	- Tallo - Hoja - Brote (yema) - Cotiledones	CALLO i) MSP1 ii) MSD4 iii) S1 DIFERENC. Y REGENER. DE PLANTAS i) S2 ii) S3 iii) Medio R iv) Medio HaR	5.8	30 g/l	7 g/l	CALL O i) 2 NAA - 0.5 6. BAP ii) 0.05 NAA - 0.5 6. BAP iii) 0.1 2,4 D - 0.1 GA ₃ - 500 CA - 40 AS DIF. Y REGN. DE PLANTAS. i) 1 6. BAP - 0.1 GA ₃ - 500 CA - 40 AS ii) 0.1 IAA - 0.1 GA ₃ - 500	25	2000 lux	16 h/día		Las semillas de los achenios fueron esterilizadas con una solución blanqueadora comercial al 15% por 40 minutos y enjuagada de 5 – 6 tiempos en agua destilada esterilizada. Las semillas fueron puestas asépticamente en medio BGS para su germinación in Vitro. Un mes después estas semillas fueron usadas como fuente de explante (tallos, hoja cotiledones y brotes). Estos se llevaron al medio R y una vez que hubo formación de plántula (6 – 7 pares de hojas) se separaron y se subcultivaron en medio MSD4 para su alargamiento y formar plantas completas. Las plantas fueron enraizadas en MS basal libre de hormonas y medio BGS	El mejor resultado para formación de callo fue el medio MSD4, los dos restantes fallaron. Para la diferenciación y regeneración de plantas el mejor medio resulto el MEDIO R. COTILEDONES unico que no presento regeneración. EXPLANTE-CALLO-REGENERACIÓN 45 -80 días.

								CA - 40 AS iii) 1 6. BAP - 0.1 GA ₃ - 500 CA iv) 1 NAA - 1 6. BAP - 0.1 GA ₃ - 500 CA - 40 AS						
2	M. Sujatha* & A.J. Prbakaran. 2001. "Alta Frecuencia de Embriogénesis en Embriones de Zigotos Inmaduros de Girasol". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 23-29.	Evaluar los requerimientos nutricionales para inducir la alta frecuencia en la formación de embriones somáticos a partir de embriones zigoicos en girasol	Aquenos de embriones inmaduros	MS sin reguladores, Gamborg, Nitsch y White	5.6 ±0.1	120 -210 g/l	8 – 10 gr	EMB RIOG ÉNES IS 0.33 mg/l 2,4 D. BROT E 2mg/l BA + 1.0mg /l NAA EMB + BROT E 0.2 BA + 0.2 NAA	28 ± 32		16-h luz	- Genotipo - Tamaño del embrión (0.5 – 10mm) - Concentración de sacarosa (30 – 240 g.l ⁻¹) - Medio basal (MS, Gamborg, Nitsch, White) - Fotoperíodo (luz, oscuridad) Temperatura (20 – 36°C	- Embriones inmaduros se lavan en agua corriendo por 30 min. Seguida de esterilización superficial al 0.1 % con HgCl por 8 minutos y 4 enjuagadas de 5 min con agua destilada esterilizada. - Los embriones son cortados en un estereomicroscopio y colocados transversalmente en diferentes medios e incubados en oscuridad Desarrollo de embriones somáticos y vástagos fueron el resultado, estos fueron subcultivados en medio suplementado 0.5 y 0.2 mg/l de BA para	TODAS excepto fotoperíodo tuvieron efectos significantes en la frecuencia de embriogénesis - Desarrollo de embriones somáticos dentro de 6 – 10 días y vástagos de 10 – 15 días

														la proliferación adicional y elongación. Los vástagos alargados fueron enraizados para su vigor medio en medio MS con 1.0 mg/l NAA. Se transfiere a medio MS libre de reguladores para total desarrollo de la planta.	
3	John M. Chandler and Benjamín H. Beard. 1983. “Embryo culture of <i>Helianthus</i> hybrids”. Crop Science. Vol. 23.	Adaptar la técnica de cultivo de embriones para ser usada en la producción de híbridos de cruza de especies de <i>Helianthus</i> .	Embriones	Gamborg's B5 Contiene aminoácidos	5.0	120g/l y en otro medio 10g/l	Agar 7g/l	0.05 NAA mg/l						Fueron utilizados dos medios diferentes. El medio de crecimiento de los embriones fue esterilizado en dos volúmenes fraccionadas iguales. Una fracción conteniendo sacarosa y agar las cuales fueron esterilizadas y autoclaveadas a 138 KPa (20psi) por 15 minutos. La otra fracción conteniendo los minerales inorgánicos, vitaminas y hormonas, su pH fue ajustado a 5.0 y esterilizados por filtración. Se utilizo un poro pequeño para la esterilización. El medio líquido de germinación es una solución simple que contiene el B5 sales inorgánicas y 10g/l de sacarosa	Obtención de brotes, plantulas jóvenes y enraizamiento.
4	F. Charrière, G. Hahne. 1998. “Inducción de	Mostrar los efectos que tienen los	Embriones zigóticos inmaduros	MS (macro y micronutrientes) + Gamboarg	5.8	LIM 3% HIM 12%	0.7 %	BAP 6.6 µM						Los embriones zigóticos inmaduros fueron cortados	

	Embriogénesis versus caulogénesis en un cultivo <i>in vitro</i> de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) a partir de Embriones zigóticos Inmaduros: Papel de los Reguladores de crecimiento en las plantas". Plant Science. 137: 63-71.	reguladores de crecimiento de estas tres clases, auxinas, ABA y citocininas y poder criticar ampliamente la influencia el tipo de respuesta morfológica donde ellos están introduciendo en el medio basal, estimulando específicamente la formación de vástagos de meristemas o embriones somáticos.		(B5 vitaminas)				1 g/l CA - 100mg /l myoin isitol - 500mg /l MES 2(N-morpholino) ethane sulfonic acid. AUXINAS: NAS: DICA MBA, IAA,Y NAA. CITO CININ AS: BAP, IPA Y ZEAT INA. Todas la misma concentración que BAP.					longitudinalmente a la mitad en la superficie	
5	E. F. Berrios, L. Gentzbittel, G. Alibert, Y. Griveau, A. Bervillé and A. Sarrafi. (1999) "Control Genético de Organogénesis <i>in vitro</i> en	Evaluar la variabilidad genética para la regenerabilidad por organogenesis en 93 líneas consanguíneas recombinantes (F ₃) obtenido de	Pericarpios y posteriormente Cotiledones	MS	5.7	20g	7g	4.4 μM de BAP y 5.4 μM de NAA	25 ± 2	Luz flux de 100 μmol/m ² -s (OSRAM L36 W/36 tubos natural	16 h. luz/8 h obscuridad		Cultivar pericarpios removiendolos y las semillas esterilizarlas por inmersión de 20' en un 5%(w/v) de hipoclorito de calcio con una solución de Tween 20 al 0.1 %. Enjuagar en tres tiempos en agua	La regeneración de parámetros fue reportada 3-4 semanas después del explante inicial seguida por transferencia de vástagos a tubos de cultivo por tres semanas. Algunas de las plántulas fueron

	Líneas Consanguíneas Recombinantes de Girasol". Plant Breeding 118, 359-361.	la cruza entre genotipos 'PAC-2' and 'RHA-266'							es			destilada esterilizada y germinar en medio MS libre de hormonas. Dos días después cultivar los cotiledones excluyendo los meristemos axilares. Cada cotiledon fue dividido en dos piezas y el y fue cultivado en 15mm de diametro en caja Petri conteniendo regeneración del medio el cual consistió en MS el cual fue suplido con 50µM KNO ₃ , 1 µM mio-inositol, 5 µM de caseína hidrolizada considerada como medio basal (Chraibi et al. 1991), modificado con adición de 4.4 µM de BAP y 5.4 µM de NAA. Cada caja tenía 4 esplantes. Las condiciones del cultivo fueron las mismas que las de germinación.	trnsferidas a ollas en el invernadero y se obtuvieron plantas fértiles. Alta variabilidad genotípica para parámetros de organogénesis entre genotipos fueron observados en este estudio. Concluyeron que los resultados basados en variabilidad genética de organogénesis responde actualmente a líneas consanguíneas inferiores en girasol el cual esta siendo mejorada por cruzamientos directos y derivadas de líneas SSD, con parámetros de organogénesis deseables para ser seleccionaos.
6	Nestares, G.; Mayor, M. L.; Vega, T.; Zorzoli, R. y Picardi, L. (2002) "Inducción de Vástagos por Organogénesis Directa en Helianthus annuus L". e-	Caracterizar la respuesta <i>in vitro</i> de cuatro genotipos de girasol y determinar el efecto de diferentes tiempos de exposición a reguladores vegetales sobre	Cotiledones de plántulas	Murashige y Skoog (1962).			2 mg.l ⁻¹ KIN, 1 mg.l ⁻¹ AIA NO reguladores	25 ± 2		12 horas.	- Porcentaje de regeneración - Tasa de regeneración - Tasa de prolificidad	Se evaluaron 10 tiempos de exposición al medio de inducción después los explantes fueron transferidos a medio de cultivo basal sin reguladores vegetales hasta completar los 30 días de incubación	Los genotipos evaluados presentan potencial de regeneración a partir de cotiledones de plántulas. Siete días de incubación sobre medio de inducción son suficientes para obtener los máximos niveles de regeneración.

	campo.com. V Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal 2002. Del 20 – 22 oct. 02.	la respuesta organogénica.												
7	Nestares, G.; Mayor, M. L.; Vega, T.; Zorzoli, R. y Picardi, L. “Floración Prematura en la Micropropagaci ón por Organogénesis de Girasol”. Asagir	Evaluar la presencia de floración prematura durante las etapas <i>in vitro</i> y de aclimatación de un genotipo de alta capacidad de regeneración micropropagado en diferentes medios de cultivo	Cotiledone s de plántulas de dos días post- germinada s.	MS al 50%	pH 5.8	10 gr.	9 gr	1mg AIA y 2mg KIN	25 ± 2	50 µmol/ m-2 s-1	12 horas	- Número de vástagos - Porcentaje de regeneración - Porcentaje de floración	<p>OBTENCIÓN DE EXPLANTES</p> <p>Para desinfectar los aquenios fueron sumergidos durante 30 seg. en etanol al 96%, posteriormente solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 15 min. Y posteriormente lavados tres veces en agua bidestilada estéril bajo de cámara de flujo laminar. El medio de germinación fue el de MS al 50% . Los cultivos fueron mantenidos en obscuridad en cámara climática durante 2 días y luego transferidas a la luz durante los siguientes dos días.</p> <p>MEDIOS DE CULTIVO PARA REGENERACIÓN</p> <p>El medio de cultivo utilizado fue el MS agregando: Los tratamientos consistieron en diferentes niveles de nitrato de plata, hidrolizado de caseína, nitrato de calcio y nitrato de</p>	Las pérdidas por floración en esta etapa fueron bajas y consistentes con lo observado en estudios previos para líneas e híbridos experimentales de H. annuus L. El tratamiento más eficiente en el control de la floración prematura durante la etapa <i>in vitro</i> fue el HCa 500. Sin embargo este tratamiento presentó un porcentaje de regeneración menor respecto al medio control.

								cinetina (KIN).					cobalto.		
8	Betiana Parody, Nilda López, Marisa López Bilbao, H. Esteban Hopp. (2002) "Respuesta durante el Cultivo <i>in vitro</i> de Girasol (<i>Helianthus annuus</i>) Dependiente de los Diferentes Métodos de Desinfección Utilizados". e-campo.com. V Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal 2002	Comparar la eficacia de distintos métodos de desinfección y analizar su efecto sobre la respuesta de los cultivos <i>in vitro</i> de girasol	Semillas de girasol. Se usaron tres genotipos (HA89, LB15 y Dek90)	MS, MS1, MS2, MS3, MS4 y MS5	---- ---- ---- ---			BAP y ANA con diferentes concentraciones					- Índice de germinabilidad - Nivel de contaminación - Altura de los brotes A partir de MS3 - Aspecto general del explanto	A) 20 ml/l solución PPM por 24 hs en agitación constante. B) Idem A) con la adición de 0.05 mg/ml de MgCl ₂ C) Lavandina (4% p/v Cl activo) + gota Triton x 100 durante 20 min. De vacío seguido de 6 enjuagues en agua estéril, quedando toda la noche en agua estéril. D) igual a C pero quedando toda la noche en la solución de PPM. Una vez desinfectadas las semillas se ponen a germinar en medio MS durante 2 días y luego se cortan de forma de obtener 2 hemiembriones y se transfieren a medio MS1 por 3 días. Se repicaron aproximadamente cada 10 días en sucesivos medios: MS2, MS3, MS4 y MS5,	El método más eficiente de desinfección y en el cual los brotes mostraron, a su vez el mejor aspecto y desarrollo, fue la solución de PPM con MgCl ₂ (Método B); siguiéndole el del A. Para los dos no afecta la germinabilidad. El método D resultó ser el más agresivo ya que disminuyó el porcentaje de germinabilidad en los tres genotipos, mientras que el tratamiento solo lo retrasó, no llegando en ninguno de los dos casos a la desinfección total.
9	Mayor, M. L.; Nestares, G.; Vega, T.; Zorzoli, R. y	Reducir la ocurrencia de hiperhidricidad en plantas de	Cotiledones	MS	pH 6.0		9 g/l	KIN 2mg.l ⁻¹ , IAA	25 ± 2	35 μmol/m ⁻² s ⁻¹	12 horas	- Porcentaje de regeneración (RP)	Cultivados en 7 diferentes medios. MS (M!). El medio de cultivo de M2 –	La regeneración de plántulas de girasol es influenciada por el genotipo, la media y	

	Picardi, L. "Brote por Organogénesis derivada de Explantes de Cotyledones en Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)". Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR-CIURN-CONICET, CC 14.	girasol y Evaluar <i>in vitro</i> la capacidad de regeneración de cuatro líneas consanguíneas expuestas a medios de cultivos conteniendo nitrato de plata o caseína hidrolizada.						1mg.l ⁻¹ , GLUTAMIN A (M1) 200mg.l ⁻¹				-Porcentaje de hipertrofia (HP) - Porcentaje de vástagos hiperhidratados (HS) - Porcentaje de primordios hiperhidratados (HPr) - Porcentaje de vástagos floreados (FH) - Porcentaje de hiperhidracidad en vástagos floreados (HFS) - Tasa de productividad de vástagos (SPR) - Tasa de productividad de primordios (PPR) - Tasa de proliferación de vástagos (SFR) - Tasa de proliferación de primordios (PFR)	M7 es con M1 pero con adición de 2.5, 5.0 y 7.5 μmol de AgNO ₃ y 250, 500 y 750 mg.l ⁻¹ de caseína hidrolizada respectivamente. Por 22 días. Cada explante tubo muy pocos vástagos o primordios, fueron transfereidos a tubos que contenían el mismo medio inicial y cultivo bajo las mismas condiciones por otros 15 días.	la interacción entre estos. La adición de AgNO ₃ disminuye la hiperhidracidad de plantas no perturbando la tasa de regeneración. La adición de caseína hidrolizada en medios de cultivo no disminuye el porcentaje de hiperhidracidad en vástagos. La tasa de regeneración tampoco mejora.
10	Karol E. Paterson. (1984) " Cultivo de brotes de	Reportar un simple método de multiplicación de girasol y 2	Brotes	MS				CITO CININ AS: BA,	26	luz fluorecente (1,500	16h lua / 8 obscuridad.	Producción de brotes, raíces, callos y	Las semillas estuvieron germinándose asépticamente en	BA y K sí promueven la formación de vástagos (0.1 – 1mg/l) y en altas

	<p><i>Helianthus annuus</i> – Floreciendo y Desarrollando de Células Adventicias y Brotes Múltiples” AMER. J. Bot. 71(7): 925 - 931</p>	<p>métodos de transferencia de brotes al invernadero. Regeneración directa de vástagos adventicios en hojas</p>											<p>K, Z y ZiP. AUX.: IAA, NAA, 2,4-D e IBA</p>		<p>– 300 lux)</p>		<p>florecimiento.</p>	<p>tubos con 0.5% de sacarosa y 0.8 % de agar seguido de esterilización por 15 min. con blanqueador al 30% y lavado con una gota de detergente. Las semillas se pusieron a germinar en la obscuridad a 26°C de 3-4 días, seguida por 2-4 días bajo luz fluorescente. Se observaron brotes de 5-8 mm de long los cuales fueron asépticamente cortados y cultivados superficialmente en el medio. Los brotes fueron cultivados en 100 x 15mm en cajas Petri y selladas con parafilm y puestas en fluorescencia blanca. Después de tres semanas los brotes enraizados fueron transferidos al invernadero para el método siguiente.</p>	<p>concentraciones inhiben el enraizamiento. Las auxinas suprimieron el crecimiento de brotes y promovieron la formación de callo (1-4mg/l). Los vástagos adventicios fueron inducidos solamente de hojas cultivadas las cuales fueron removidas 11 días después y cultivadas en medio MS con 0.5 mg/l BA, 0.1 mg/l IAA y 0.01 Mg/l de GA₃</p>
11	<p>Christopher J. Power. (1987). “Organogénesis de la línea pura del híbrido <i>Helianthus annuus</i> a partir de Cotiledones de Embriones Zigóticos” AMER. J. Bot. 74(4): 497 – 503.</p>		<p>Cotiledones de embriones cigóticos maduros e inmaduros</p>	<p>MS vitaminas modificado: -100 mg myo inositol 2 mg glicina -1.5 mg Ac. Nicotínico -0.5 mg piridoxina HCl -0.5 mg timina HCl -0.5 mg Ác. Fólico -0.15 biotina</p>	5.5		0.8 %	<p>BA, 0.5 – 1 mg (0.5) NAA, 0.1 – 1 mg (0.1)</p>	21 – 24	<p>La luz fue suplida por CW bulbos fluorescentes (10 – 10.8 Klux)</p>	18 Hs. No inicia el periodo de obscuridad fue la condición		<p>Embriones maduros fueron cortados de semillas obtenidos de Sigco Research, Inc. El pericarpio de cada akenio fue removido cortando el borde con un escalpelo y pelando el pericarpio con la mano. Las semillas fueron remojadas 1 min. en 2-propanol seguido por dos</p>	<p>Tanto el NAA y BA confirman los resultados de otros investigadores la organogénesis a partir de cotiledones maduros e inmaduros de girasol.. Altas concentraciones de NAA solo incrementan la producción de callo. GA₃ (0-1), CA y L-</p>					

				KNO ₃ 6.9 gr/l Clorofenol rojo 5 mg Sulfato de adenina 40 mg CA 500 mg.									lavadas en agua destilada en una solución al 20% de cloro con tween 20 en una surfactant de 20min. El primer minuto se encuentra en un vacío (25 cm HG) para expeler el aire de la burbuja. Las semillas son lavadas en Buchner estéril de 5 a 7 tiempos con agua destilada estéril. Las semillas permanecen de 2-3 horas para remover y cortar la cubierta de la semilla (ver técnica)	glutamina manifiestan pequeños efectos positivos.
12	Freyssinet M. and G. Freyssinet. 1988. Fertile plant regeneration from sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) immature embryos. Plant Science. 56: 177-181.	Regeneración de plantas fértiles de Girasol a partir de embriones inmaduros.	Embriones inmaduros de 4 – 21 días después de la fertilización.	MEDIO I: MS vitaminas modificadas. - aminoácidos (Inositol 3.9, alanina 1, glutamina 0.8 serina 0.16 triptófano 0.05 y cisterna 0.01g/l). MEDIO II: MS vitaminas modificadas. NO aminoácidos MEDIO III: MS NO vitaminas ni aminoácidos.	5.0	90	3	6-BAP 0.0005 -0.001 g/l	26 y 15 si es transferido a suelo.	Oscuridad de 2-3 semanas.	Oscuridad de 2-3 semanas		Las semillas se esterilizaron por inmersión por 20 min. en una solución blanqueadora comercial diluida, 3° Cl, conteniendo una gota de detergente y lavar 3 veces con agua destilada estéril. Los embriones inmaduros se colocan en MI y se incuban de 2 -3 semanas. Las estruct. semejantes de los embriones son aisladas y transferidas a MII incubándose de 2 – 3 semanas teniendo plántulas desarrolladas de 2 – 5 cm. De aquí puede tomar 2 caminos: Pasar a MIII para	
					5.0	30	3	6-BAP 0.0001 - 0.0005 g/l		1500 lux	16-8h luz/oscuridad de 2-3 sem.			
					5.0	10	2.5	AIA 0.0002 g/l	26	1500 lux	16-8 h luz/oscuridad de 2-3 semanas. Si va a suelo			

											15:9h luz/os curida d.	para enraizamiento eincubandose de 2 – 3 semanas y las plantas enraizadas ser pasadas a suelo. “. O bien transferir directamente a ollas que contengan una mezcla de post- meat/vermiculita/are na (3:2:1) e incubarse. Inicialmente las plantas deben estar cubiertas y gradualmente exponerlas a la humedad ambiental. Finalmente ser transferidas a invernaderos en condiciones regulares	
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------------------------	--	--

*S = Sacarosa; T = Temperatura; I.L. = Intensidad lumínica; F. = Fotoperíodo; P.E. = Parámetros evaluados

