

OBTENCION DE CALLO HAPLOIDE DE GIRASOL (Helianthus annuus L.) MEDIANTE EL CULTIVO DE ANTERAS in vitro.

C. Rovelo, A. Angeles-Espino y G. Suárez.

Departamento de Agronomía, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétaro. Apdo. Postal 37 C.P. 76000. Querétaro, Qro. México.

summary

Sunflower indehiscent anthers were collected in a field plot and brought into the laboratory for in vitro culture studies. Murashige and Skoog medium was complemented with sucrose, vitamins, agar and the pH adjusted to 5.6. 25 combinations treatments were employed by using 0.0 (control), 0.5, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/l of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Bencil Adenine (BA); sterilized at 121°C with 16 hr light photoperiod in a growth chamber. The callus were transplanted and 10 micron cuts were obtained 60 days after sowing for their microscope observation at 400 and 1000 X. The following results were obtained: Anthers developed bigger callus in 25 days in a 0.5 mg/l of 2,4-D and BA medium than other levels in which the callus appear after 40 days. This was statistically different.

Greater callus development was observed at increasing BA levels, however no adventitious buds were observed. Callus preparations cuts showed an uninuclear grain pollen. The pollen tube was projected along one of the pores giving origin to a group of multinuclear cells. It can be concluded that haploid sunflower callus can be obtained and the further studies are needed to regenerate complete haploid plants.

RESUMEN

En el campo se colectaron anteras indehiscentes de girasol y se llevaron al laboratorio para su cultivo in vitro. Se usó el medio básico de Murashige y Skoog y se complementó con sacarosa, vitaminas, agar y el pH se ajustó a 5.6. Se obtuvieron 25 tratamientos combinando 0.0 (testigo), 0.5, 2.0, 5.0 y 10 mg/l del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y Bencil Adenina a las mismas concentraciones. Se esterilizó a 121°C con un fotoperiodo de 16 hr luz en la cámara de crecimiento. Los callos se transplantaron a los 60 días después de la siembra y se obtuvieron cortes finos de 10 micras y se observaron al microscopio a 400 y 1000 X. Se obtuvieron los siguientes resultados: Las anteras desarrollaron callos grandes a los 25 días después de la siembra en la dosis de 0.5 mg/l de 2,4-D y BA. En comparación a otras dosis donde el callo apareció hasta los 40 días. Estas diferencias son significativas al 1%.

Al incrementar las concentraciones de BA en los callos transplantados se observó un gran desarrollo, pero no se obtuvieron yemas adventicias. En las preparaciones fijadas se observaron granos de polen uninucleados, cuyos tubos polínicos se proyectaban a lo largo del poro, dando origen a un grupo de células multinucleadas. Se concluye que se obtuvo callo haploide de girasol, y que en trabajos posteriores deben regenerarse plantas completas.

INTRODUCCION

En el mejoramiento genético la obtención de líneas puras se ve limitada por la autocompatibilidad génica, donde en algunas ocasiones los híbridos que se obtienen son de líneas tempranas S2 o S3. Por otra parte cuando se obtienen líneas avanzadas S6 o S7, los años que se requieren para llegar a estas, representan un riesgo para el mejorador, ya que la presencia de insectos plaga y fitopatógenos así como la selección recurrente pueden ser la causa de que un germoplasma valioso se pierda. Sin embargo, se presenta una alternativa para la obtención de líneas puras a través del cultivo de tejidos vegetales, el que ofrece la posibilidad de generar haploides in vitro mediante el cultivo de anteras. Esta técnica se ha utilizado en otras especies con buenos resultados; sin embargo en el caso de girasol no se cuenta con ninguna información tanto para el género Helianthus como para la familia Compositae. Por lo anterior se planteó el siguiente objetivo: Desarrollar la metodología básica in vitro de polen y/o anteras para la obtención de callo haploide.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro de julio de 1986 a mayo de 1987. El material biológico constó de granos de polen y anteras colectadas en el campo experimental. Se hicieron dos bioensayos con un diseño factorial 5 x 5 distribuido al azar.

En el bioensayo I se utilizaron los medios básicos de Murashige y Skoog (MS) y Nitch (N). 3 y 2% de sacarosa respectivamente, complementados con vitaminas y agar al 0.8% para su solidificación. Se usó como auxina el ácido indolacético y como tratamientos las dosis de: 0.0(testigo), 1.0, 10.0, 20.0 y 30 mg/l. Como citocinina se usó la Kinetina a 0.0, 0.5, 2.0, 5.0 y 10 mg/l. El pH se ajustó a 5.6 con soluciones 1N de HCl y NaOH. El medio se distribuyó en tubos de ensaye de 25 x 120 mm a razón de 10 ml/tubo. Se cubrieron con papel aluminio reforzado y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos..

Las anteras y el polen se desinfectaron con alcohol etílico al 70% por tres minutos en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación del medio. La siembra se realizó depositando una antera por tubo; y el polen maduro se colocó golpeando las anteras para que este cayera sobre el medio. En el bioensayo II solo se utilizó el medio básico MS y como fuente de auxina se cambió al ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y como citocinina la Bencil Adenina (BA). Ambas hormonas se usaron a las siguientes dosis: 0.0, 0.5, 2.0, 5.0 y 10.0 mg/l obteniendo 25 tratamientos además de someter algunos capítulos a bajas temperaturas (de 0 a -2°C) antes de la siembra de las anteras, la cual se realizó igual que el bioensayo I. Las condiciones de incubación para los bioensayos fueron: En la cámara de crecimiento se colocaron los tubos sembrados a una temperatura de 27°C con un fotoperíodo de 16 hr luz con lámparas de 225 Lux.

Los primeros callos se transplantaron a los 60 días después de la siembra manteniendo constante la concentración de 2,4-D en 0.5 mg/l; mientras que las concentraciones de BA variaron en intervalos de 10 de 0 a 50 mg/l con el objeto de inducir yemas adventicias en los callos. Al momento del trasplante se tomó una muestra de callo, la que se fijó en una solución Farmer por 24 hr. Se lavó con alcohol al 50 por ciento y se colocó en un cambiador automático de tejidos que contenía 12 concentraciones de alcohol etílico, Xilol y parafina. El tejido estuvo por 24 hr. Con un microtomo se obtuvieron cortes finos de 10 micras y se tiñeron con safranina-verde fijo. La anatomía del callo se observó a 400 y 1,000 X en un microscopio óptico de contraste de fases.

RESULTADOS

En el bioensayo I no hubo inducción de callo en ninguna de las 25 concentraciones de AIA y Kinetina en los medios MS y N tanto con polen como con anteras. En el bioensayo II tampoco hubo respuesta en los tratamientos con polen, así como aquellos en que se congelaron los capítulos antes de la siembra. La iniciación de callo se presentó en las siembras de anteras a los 25 días en la concentración de 0.5mg/l de 2,4-D y BA (tratamiento 1) y a los 40 días en los tratamientos 2 y 3 que corresponden a las concentraciones 10-5 y 5-0.5 mg/l de 2,4-d y BA respectivamente, como se muestra en la figura 1. El análisis de varianza del cuadro 1 reporta diferencias significativas al 1% de probabilidad entre las tres concentraciones que indujeron callo, así mismo las comparaciones ortogonales indican que el tratamiento 1 supera significativamente a los tratamientos 2 y 3, no habiendo diferencia significativa entre estos dos últimos. Se hizo una correlación entre las concentraciones y el área de los callos, obteniendo un valor no significativo ($r = 0.42$).

El desarrollo de los callos que se transplantaron a los 60 días, apareció en la figura 2; donde se observa que los callos de mayor tamaño se obtuvieron en las concentraciones de 20 y 30 mg/l de BA.

Cuadro 1. Análisis de varianza y comparaciones ortogonales para el área de callo en mm². ITESMCQ. 1986-87

Causas	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Tratamientos	2	776.67	388.3	9.07**
1 vs 2 + 3	1	763.30	763.0	17.84**
2 vs 3	1	13.37	13.37	0.31ns

C.V.% = 58.1 ** = diferencia al 1% ns = dif. no significativa

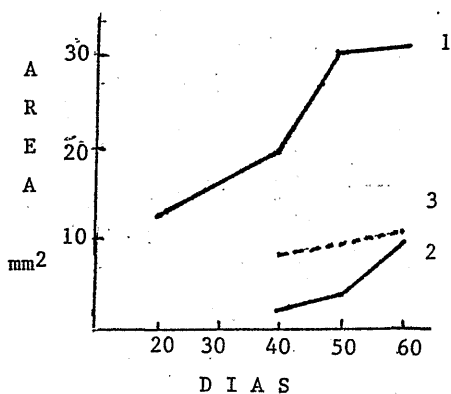


Figura 1. Inducción y desarrollo de callo. ITESMCQ.

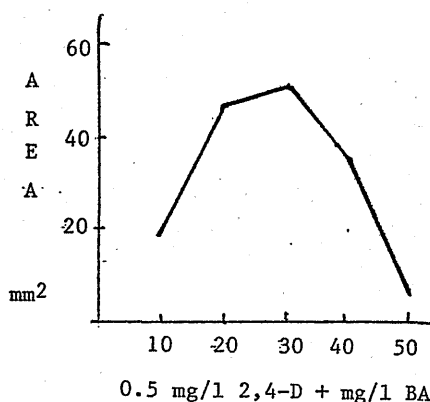


Figura 2. Desarrollo de callo al transplante

DISCUSION

Los resultados indican que la inducción de callo se presentó únicamente en los tratamientos en que se sembraron anteras, además que de las 25 concentraciones que se utilizaron en el bioensayo II, solo en tres hubo respuesta. Por otra parte el desarrollo de los callos tuvo un comportamiento distinto, como se aprecia en la figura 1; o sea que cada concentración tiende a comportarse de manera independiente como lo demuestra la correlación no significativa. Esto se debe a que la concentración hormonal es específica para cada especie y tipo de explante, debido a que existen factores bioquímicos, fisiológicos y ambientales que determinan la diferenciación del tejido como lo indican Dodds y Roberts 1982, quienes consignan que las respuestas cuantitativas del desarrollo del callo involucran un sinergismo estrecho y complejo entre el explante usado para la inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa. Esto se corrobora ya que en el bioensayo I no hubo inducción de callo en los medios nutritivos MS Y N al usar AIA y Kinetina. Sin embargo al cambiar a 2,4-D y BA como fuente de auxina y citocinina respectivamente, la respuesta fué positiva. Ahora bien, el haber usado rangos tan amplios de estos biorreguladores se debió a que básicamente este fué un experimento exploratorio donde se justifica la amplitud de los rangos para incrementar la probabilidad de tener una respuesta positiva. En experimentos posteriores, estos rangos deben ser menores y oscilar entre las concentraciones en que hubo respuesta a la inducción de callo.

Al transplantar los callos es necesario incrementar la concentración de citocinina tanto para la multiplicación de estos como para la inducción de yemas adventicias; sin embargo estas últimas no se obtuvieron en el presente experimento, pero en experimentos futuros deben incluirse otras fuentes de citocinina y combinar estas con auxinas y giberelinas. Debe considerarse que este trabajo es solo un experimento exploratorio y que aún faltan muchos puntos por esclarecer; sin embargo el haber obtenido la inducción de callo es un gran avance, ya que es una de las etapas más críticas dentro de la investigación in vitro.

De las preparaciones fijas que se observaron al microscopio a través de cortes secuenciales se obtuvo la siguiente descripción: Se identificaron granos de polen uninucleados con un surco y la capa de exina en forma de picos irregulares. Estos se encuentran en el estado I descrito por Suderlan y Dowell 1973, donde las esporas contienen las tétradas y sufrieron la primera división meiótica proveniente de la célula madre, y es donde se obtiene el mayor porcentaje de respuesta. Los granos de polen germinados cuyo tubo polínico originaba una masa celular multinucleada. En la parte interna de la antera donde se encuentran las células madre de las microsporas, está la proliferación de callo haploide, sin embargo este queda rodeado por callo diploide que se encuentra en la parte externa de la antera.

En la secuencia de 11 cortes se distinguieron varias zonas de proliferación originando una masa celular multinuclear, y conforme avanzaba su desarrollo se diferenciaban más las paredes celulares, incrementando el número de células. Esto demuestra que los callos se desarrollaron a partir de la ruta descrita por Vasil y Suderlan 1980, lo cual es benéfico para la obtención de plantas haploides. En una célula que se encontraba en mitosis se observaron los cromosomas, y al hacer el conteo se obtuvo que este oscilaba entre 14 y 20.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo callo haploide y somático en diferentes proporciones.
- La dosis óptima para la inducción de callo fue de 0.5 mg/l de 2,4-D y BA.
- Los callos se obtuvieron de anteras cuyo polen estaba en estado uninucleado.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. E.M. Engleman del Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados por las facilidades brindadas en el laboratorio de Anatomía.

REFERENCIAS

- Acosta, Z.C. 1981. Plantas haploides de tabaco y trigo por cultivo de anteras, la sobrevivencia del polen y la androgénesis in vitro. Tesis de Maestría sin publicar. Colegio de Postgraduados.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1982. Plant tissue and cell culture. Cambridge University Press.
- Hurtado, V.D. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. México.
- Suderlan, N. 1980. Anther and pollen culture. Proceeding of the second International Haploid Conference. Ed. Crowe and Sons Ltd. England. U.K.
- Vasil, K.I. 1980. Androgenetic Haploid. International Review of cytology. Perspectives in plant cell and tissue culture. Ed. Academic Press. London, England.