



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Establecimiento de un sistema de organogénesis y
embriogénesis somática *in vitro* en *Helianthus annuus* L. a
partir de microesquejes y cotiledones.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela,

por la bachiller Alejandra Betancourt,

como requisito parcial para optar al

título de Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Teresa Edith Vargas

CARACAS, VENEZUELA

Febrero 2013

INDICE

I. Abreviaturas utilizadas	v
Introducción	1
Antecedentes	3
1. Descripción botánica de <i>Helianthus annuus</i> L.	3
1.1 Taxonomía y origen	3
1.2 Morfología	3
2. Importancia Económica	4
2.1 A nivel mundial	4
2.2 Importancia del girasol en Venezuela	6
3. Cultivo tradicional del girasol	7
3.1 Cultivo en Venezuela	8
3.2 Enfermedades y plagas	9
4. Cultivo <i>in vitro</i>	9
4.1 Cultivo <i>in vitro</i> en girasol	11
4.2 Micropropagación	12
4.3 Organogénesis	14
4.4 Embriogénesis somática	18
Objetivos	23
Materiales y Métodos	25
1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Helianthus annuus</i> L.	25
1.1 Material vegetal	25
1.2 Desinfección de las semillas	25
1.3 Medio de germinación de las semillas	25
2. Multiplicación y organogénesis <i>in vitro</i> a partir de microesquejes de <i>Helianthus annuus</i> L.	26
2.1 Material vegetal	26
2.2 Medios de cultivo para la multiplicación y la organogénesis	26
2.2.1 Efecto de la adición del nitrato de plata (AgNO ₃)	26

y caseína hidrolizada en los medios de cultivo.	
2.3 Regeneración <i>in vitro</i> de los callos formados durante la multiplicación.	27
2.3.1 Material vegetal	27
2.3.2 Medios de cultivo para la regeneración de los callos	27
3. Embriogénesis somática <i>in vitro</i> a partir de segmentos de cotiledones de <i>Helianthus annuus</i> L.	27
3.1 Inducción del proceso de embriogénesis somática.	27
3.1.1 Material Vegetal	27
3.1.2 Medios de inducción del proceso de embriogénesis somática.	27
3.2 Desarrollo de los embriones y organogénesis <i>in vitro</i> a partir de los embriones somáticos obtenidos en <i>Helianthus annuus</i> L.	28
3.2.1 Material vegetal	28
3.2.2 Medios para el desarrollo de los embriones y la organogénesis.	28
4. Siembra de los explantes	29
5. Condiciones del cultivo <i>in vitro</i>	29
6. Medios de enraizamiento	29
7. Aclimatización	30
8. Observaciones generales y periódicas al cultivo	30
9. Estudios anatómicos	30
10. Análisis estadístico de los resultados	31
Resultados	32
1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Helianthus annuus</i> L.	32
2. Multiplicación y organogénesis <i>in vitro</i> a partir de microesquejes de <i>Helianthus annuus</i> L.	33
2.1 Multiplicación	33
2.1.1 Efecto de la adición del nitrato de plata (AgNO ₃) y caseína hidrolizada en los medios de cultivo.	38
2.2 Organogénesis	40

2.2.1 Regeneración <i>in vitro</i> de los callos formados durante la multiplicación de los brotes.	42
3. Embriogénesis somática <i>in vitro</i> a partir de segmentos de cotiledones de <i>Helianthus annuus</i> L.	42
3.1 Inducción del proceso de embriogénesis somática	41
3.2 Desarrollo de los embriones	44
3.2.1 Organogénesis <i>in vitro</i> a partir de los embriones somáticos obtenidos en <i>Helianthus annuus</i> L.	46
4. Caracterización anatómica de tallos y hojas de plantas de <i>Helianthus annuus</i> L. mantenidas <i>in vitro</i> .	47
4.1 Tallo	47
4.2 Hoja	48
5. Enraizamiento	51
6. Aclimatización	51
Discusión	52
1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Helianthus annuus</i> L.	52
2. Multiplicación y organogénesis <i>in vitro</i> a partir de microesquejes de <i>Helianthus annuus</i> L.	52
2.1 Efecto de la adición del nitrato de plata (AgNO ₃) y caseína hidrolizada en los medios de cultivo.	54
2.2 Regeneración <i>in vitro</i> de los callos formados durante la multiplicación	56
3. Embriogénesis somática <i>in vitro</i> a partir de segmentos de cotiledones de <i>Helianthus annuus</i> L.	57
3.1 Inducción del proceso de embriogénesis somática	57
3.2 Desarrollo de los embriones	59
3.2.1 Organogénesis <i>in vitro</i> a partir de los embriones somáticos obtenidos en <i>Helianthus annuus</i> L.	60
4. Caracterización anatómica de tallos y hojas de plantas de <i>Helianthus annuus</i> L. mantenidas <i>in vitro</i> .	61

4.1 Tallo	61
4.2 Hoja	62
5. Enraizamiento	64
6. Aclimatización	65
Conclusiones	66
Bibliografía	69

I. ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4 D	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftalenoacético
AIA	Ácido indolacético
BA	Benciladenina
° C	Grados centígrados
cm	Centímetros
GA ₃	Ácido giberélico
g/l	Gramos por litros
IBA	Ácido indolbutírico
K	Cinetina
L	Litros
m	Metros
mg/L	Miligramos por litro
mm	Milímetros
MS	Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog, 1962.
NaOH	Hidróxido de sodio

INTRODUCCIÓN

El género *Helianthus* pertenece a la Familia de las Asteráceas, donde se encuentra el girasol (*Helianthus annuus* L.), incluye especies tanto anuales como perennes, y es una planta dicotiledónea anual, oleaginosa de gran valor (Box, 2005).

Las compuestas son la familia más numerosa entre las dicotiledóneas. Se caracterizan por tener las flores agrupadas en una inflorescencia, conocido como capítulo.

El principal uso actual del cultivo de girasol es para la producción de aceite comestible, y en menor medida como ornamental, confiteros, para la alimentación de aves y ganado, para la fabricación de jabones y champú, y como combustible ecológico en motores diesel (Ruiz y col, 2011; Cortiza y Pérez, 2009; Box, 2005).

El aceite de girasol tiene un valor nutritivo alto en comparación con otros aceites vegetales, gracias a su elevada proporción de ácido linoleico; contiene también provitaminas y vitaminas liposolubles A, D y E (Box, 2005).

En Venezuela, las zonas de producción de girasol se ubican hacia los llanos orientales, los estados Guárico, Portuguesa, Barinas, Miranda y Aragua. Aumentar la producción sería muy importante con miras a disminuir la importación de semilla, aceite y flores de corte.

El cultivo tradicional del girasol se realiza a partir de semillas, en general, con siembra directa, y muchas veces la cosecha se ve afectada por enfermedades causadas por agentes patógenos (Lorenzo, 2006; Díaz y col, 2003), siendo el cultivo *in vitro* una importante herramienta para obtener material vegetal con condiciones de sanidad superiores a los obtenidos por vía convencional. La propagación *in vitro*, constituye dentro de la biotecnología vegetal, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado al mejoramiento de especies vegetales (Jiménez, 1998).

Los estudios científicos referidos al girasol, están mayoritariamente dirigidos a la genética y a la biotecnología. Este rubro ha sido manipulado genéticamente, con el fin de variar el contenido de un determinado ácido graso, mejorando su calidad (Burke, 2003; Cummings, 2001, citados por Díaz, 2007).

Se ha planteado que el girasol se encuentra entre las especies consideradas “recalcitrantes” para las técnicas de cultivo *in vitro*, donde la regeneración de plantas completas está influenciada por las condiciones de cultivo, por el genotipo y por sus interacciones, lo cual unido a la baja capacidad de regeneración, pobre enraizamiento y a la ocurrencia de plántulas hiperhídricas y con formación prematura de botones florales, limita considerablemente la aplicación de métodos de mejoramiento por vías biotecnológicas (Mayor y col, 2001 citado en Rodríguez y col, 2008^a).

Se han realizado diversas investigaciones en esta especie, mediante el empleo de diferentes reguladores del crecimiento, así como con diferentes partes de la planta, donde se han obtenido logros importantes en la inducción de callos, regeneración y organogénesis, así como la obtención de variantes somaclonales resistentes a *Alternaria helianthi* (Rodríguez y col, 2008^a).

Debido a la importancia económica, agrícola y medicinal del género *Helianthus*, y al interés de aumentar su producción, se plantea establecer un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis y vía embriogénesis somática para el girasol (*Helianthus annuus* L.), a partir de microesquejes y segmentos de cotiledones.

ANTECEDENTES

1. Descripción botánica de *Helianthus annuus* L.

1.1 Taxonomía y origen

El género *Helianthus* pertenece al reino Plantae, a la clase Magnoliopsida, al orden Asterales y a la Familia Asteraceae, donde se encuentra el girasol (*Helianthus annuus* L.). Incluye especies tanto anuales como perennes (Box, 2005).

El **origen** del género *Helianthus* es americano, y en su mayoría del subcontinente septentrional.

Unos 3000 años antes de Cristo, las tribus indígenas lo cultivaban ya en Arizona y Nuevo México. Las semillas formaban parte de la dieta en diferentes formas; el aceite se empleaba con fines no alimenticios, sino como medicina y en ceremonias religiosas.

La planta de girasol fue introducida en Europa por los conquistadores españoles tras el descubrimiento de América, y desde España se extendió a todo el continente Europeo (Box, 2005).

1.2 Morfología

La planta de girasol posee una **raíz** principal pivotante que puede alcanzar hasta 1,5m de profundidad; un **tallo** herbáceo, verde, delgado, cilíndrico, sencillo y con una altura hasta el capítulo entre 40cm y 2m. La superficie exterior del tallo es rugosa y pubescente, excepto en su base. Las **hojas** del girasol son simples, alternas, grandes, aserradas, de ápice agudo, de láminas ovales y de áspera vellosoidad tanto en el haz como en el envés. Llegan a medir hasta 40cm de largo. El color va de verde oscuro a verde amarillento. (Ruiz y col, 1958; Lorenzo, 2006; Ávila, 2009).

La **inflorescencia** es amplia, puede tener forma plana, cóncava o convexa. El capítulo es rotatorio y orientado hacia el sol hasta la fecundación (Lorenzo, 2006). La parte externa (radial) lo constituyen unas hojas estériles de color amarillo, formando la

parte más llamativa. Las flores del interior son más numerosas, hermafroditas, pequeñas, y contienen los órganos de reproducción. Estas flores se desarrollan en sentido radial comenzando con las externas (León, 1987; Ávila, 2009).

El **fruto** es seco e indehiscente, conocido como aquenio y está formado por el pericarpio (cáscara) y la semilla, su forma general es ovoide y su color blanco o grisáceo es uniforme o con manchas oscuras longitudinales (León, 1987). La **semilla** contiene al embrión, y está constituida principalmente por los cotiledones. El contenido de proteína y aceites es alto (León, 1987).

2. Importancia Económica

2.1 A nivel mundial

Durante dos siglos, el girasol fue cultivado como planta ornamental, y hasta comienzos del siglo XVIII no se había reconocido la semilla de girasol como fuente de aceite. La extracción de aceite con fines alimenticios comenzó en Rusia en la década de 1830, contribuyendo a extender rápidamente el cultivo de esta especie (Box, 2005).

En la tabla N° 1 se muestra la posición de los primeros cinco países más productores de semillas de girasol según FAO, 2010.

Tabla N° 1. Posición de los primeros cinco países más productores de semillas de girasol por toneladas (T) y producción en dólares (\$)

Posición	Región	Producción (1000\$ Int)	Producción (T)
1	Ucrania	1816831	6771500
2	Federación de Rusia	1360888	5344820
3	Argentina	608200	2220710
4	Francia	442730	1633110
5	Bulgaria	378448	1596100

El principal uso actual del cultivo de girasol es para la producción de aceite comestible, y en menor medida como ornamental, confiteros, para la alimentación de aves y ganado, para la fabricación de jabones y champú, y como combustible ecológico en

motores diesel, como una fuente de energía alternativa, en sustitución al petróleo (Ruiz y col, 2011; Cortiza y Pérez, 2009; Box, 2005).

El aceite extraído del girasol tiene un alto valor nutritivo en comparación con otros aceites vegetales, gracias a su elevada proporción de ácido linoleico; contiene también provitaminas y vitaminas liposolubles A, D y E (Box, 2005). Presenta un bajo porcentaje de ácidos grasos saturados. La concentración de aceite en el grano varía entre 48 y 54% y la de proteínas varía entre 15 y 19%. Existen tres grupos de genotipos: los tradicionales, los medio oleico y los alto oleico (Díaz y col, 2003).

También se emplea el girasol para obtener lecitina, que se utiliza en industrias de la alimentación. La harina obtenida de la extracción del aceite, constituye una importante fuente de proteínas para la alimentación del ganado. Esta importante planta forrajera ha sido utilizada históricamente con gran intensidad para ensilado en Estados Unidos y Canadá (Box, 2005).

En cuanto al uso medicinal, tenemos que del girasol se pueden obtener metabolitos secundarios útiles en farmacología. Díaz en el 2007, realizó un estudio de extracción, aislamiento y purificación de metabolitos secundarios en *H. annuus* L., utilizando flores, cabezuelas y hojas, para evaluar la actividad antiinflamatoria de dichos extractos.

Se tienen resultados de otros trabajos donde se han aislado, de extractos de flores y las cabezuelas de girasol, diterpenos de tipo kaurano (ácidos kaurenoico y traquilobánico) y el ácido grandiflorólico (Pyrek, 1970; Panizo, 1979, citados en Díaz, 2007).

2.2 Importancia del girasol en Venezuela

En Venezuela, la producción del girasol comienza con un período introductorio a partir de 1970. Las alternativas de producción de oleaginosas en Venezuela estaban

reducidas a la palma aceitera y al cocotero, pero tuvieron poco uso en el consumo de mesa. (Soto, 2006).

Según FEDEAGRO, para el año 2010, la producción de girasol en Venezuela en función de cifras oficiales es de 85.792 toneladas, el área cosechada es de 50.606 hectáreas, y el rendimiento de 1,695 kilogramos por hectáreas (Tabla 2).

Tabla N° 2. Producción de girasol en Venezuela para los años 2000 al 2010, según FEDEAGRO.

Rubro	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008*	2009*	2010*
Volumen de producción	3,523	2,818	1,97	1,242	970	439	5,23	15,514	36,552	34,549	85,792
Valor de la producción	454	363	254	160	125	57	673	1,997	4,706	4,448	11,046
Superficie cosechada	3,548	2,747	2,214	1,502	1,2	715	4,673	12,517	30,46	14,46	50,606
Rendimiento	993	1,026	890	827	808	614	1,119	1,239	1,2	2,389	1,695

*FAO en función de cifras oficiales y Hoja de Balance de Alimentos INN. Volumen en toneladas, Valor en miles de bolívares, Superficie en hectáreas y rendimiento en kilogramos por hectáreas.

Se puede decir que la producción de girasol en Venezuela, ha tenido su puesto en la agricultura Venezolana con una misión bien clara, la de contribuir a la disminución de la dependencia de aceite y semilla del exterior (Soto y Fernández, 1997).

Por otra parte, se tiene que la floricultura representa una actividad de relevante significado económico, turístico y artístico en Venezuela, entre las que se encuentra la venta de flores de girasol. El sector de la floricultura en Venezuela, ha demostrado ser un área viable para las nuevas inversiones, presentando un 300% de crecimiento en los últimos diez años (Osuna, 2012). Una de las principales ventajas con las que cuenta el país para la producción de este rubro, es su ubicación geográfica. Asimismo, a diferencia de otros países, el clima de Venezuela permite la producción de flores durante

prácticamente, todo el año. Diversas iniciativas, entre ellas las alianzas con otras naciones, ha permitido minimizar las importaciones de flores y agilizar los proyectos que se tienen establecidos en materia agraria (Osuna, 2012).

3. Cultivo tradicional del girasol

El cultivo de girasol se realiza a partir de semillas, en general, con siembra directa. El ciclo promedio del girasol comprende entre 100 y 150 días según genotipos, fechas de siembra, latitud y disponibilidad de agua y nutrientes. La duración de la floración es de unos 7 a 10 días (Lorenzo, 2006; Díaz y col, 2003).

El desarrollo del girasol depende principalmente del cultivar y de la temperatura, la cual afecta la duración de todas las fases de desarrollo, y el fotoperíodo sólo modifica algunas de ellas (Díaz y col, 2003). En la siembra, la temperatura del suelo es idónea por encima de los 8-10°C (Box, 2005). En cuanto a la temperatura ambiental, el girasol se adapta a un amplio rango, desde 10°C hasta 30°C (Lorenzo, 2006).

El girasol no es un cultivo demasiado exigente en texturas de suelo, y produce rendimientos aceptables sin necesidad de demasiada fertilización. Aunque si es esencial que el suelo sea profundo y tenga buen drenaje. El rango aceptable de pH oscila entre 5.8 y 8, y el intervalo óptimo puede situarse entre 6,5 y 7,5. Es tolerante a la sequía, sin embargo, la disponibilidad de humedad es importante en todo el ciclo del cultivo, especialmente durante la formación del capítulo (Box, 2005; Lorenzo, 2006).

3.1 Cultivo en Venezuela

Hasta el año 1972, las siembras de girasol se realizaban casi exclusivamente con variedades de polinización abierta, con problemas como la falta de uniformidad y la ausencia del vigor híbrido, obteniendo menores rendimientos. Los primeros cultivares

probados provenían de Rumania, posteriormente en la década de los ochenta se introdujeron nuevas generaciones de cultivares provenientes de Argentina y los Estados Unidos (Soto, 2006).

La siembra comercial de girasol en Venezuela se ha realizado utilizando semillas de híbridos importados (Ávila y col, 2007), y bajo condiciones de secano, lo cual implica que el cultivo debe disponer del agua almacenada en el perfil del suelo, y de la precipitación que ocurra después de su siembra, porque las siembras efectuadas en la época lluviosa han mostrado una importante incidencia de enfermedades foliares (Pineda y col, 1991 citado en Ávila y col, 2007). Es considerado como un cultivo suplementario, debido a la fecha de siembra, entre octubre y diciembre, después de los cultivos principales que generalmente son maíz y arroz. (Soto, 2006). La siembra, en Venezuela, se ha realizado de manera manual, de manera mecánica con sembradoras, y de manera directa con muy buenas perspectivas. (Ávila, 2009).

Se ha establecido que las zonas con mayor potencial para la siembra de girasol, se encuentran ubicadas en los estados Portuguesa, Barinas y los llanos orientales (Madera y Sulbarán, 1990 citado en Ávila, 2007).

3.2 Enfermedades y plagas

La mayoría de las enfermedades que afectan los rendimientos del girasol son de origen fúngico, algunas son bacterianas o virales y su incidencia depende de las condiciones ambientales (Díaz y col, 2003). Las más comunes de las enfermedades que pueden presentarse son la roya blanca (*Puccinia helianthi*), el moho algodonoso (*Sclerotinia sclerotiorum*) y el hongo *Botrytis* sp. (Lorenzo, 2006).

Varios investigadores, han señalado las enfermedades más comunes en diversas áreas de siembra en Venezuela, destacando las enfermedades del suelo: pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), pudrición del tallo (*Sclerotium rolfsii*), la mancha negra del tallo, causada por *Phoma oleracea* var. *Helianthi tuberosi* y la pudrición del tallo, causada por la bacteria *Erwinia* sp. Otras enfermedades menos frecuentes son la marchitez (*Fusarium* sp.), necrosis bacterial (*Pseudomonas helianthi*) y mancha foliar (*Phomopsis* sp.) (Soto y Fernández, 1997).

Por otra parte, la amenaza de insectos y otras plagas animales ocurre desde la siembra hasta la cosecha, y fallas en su control afectan tanto a los rendimientos como a la calidad del producto (Díaz y col, 2003). La mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) ha sido una plaga importante, complicándose su control al encontrarla en más de 100 hospederos (Ávila, 2009).

4. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es definido como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, a los cuales se les proporcionan artificialmente, las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Pierick, 1990; Roca y Mroginski, 1991). Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología, genética y bioquímica, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* y la ingeniería genética (Jiménez, 1998).

El cultivo *in vitro*, constituye dentro de la biotecnología vegetal, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado al mejoramiento de especies vegetales. La Biotecnología puede definirse como el conjunto de manipulaciones biológicas de células u organismos vivos, con fines agronómicos y/o medicinales, entre otros (Jiménez, 1998).

Pueden identificarse cinco etapas bien definidas en los procesos de propagación *in vitro*, cada una con objetivos específicos: Fase 0: preparativa, que corresponde a la preparación de la planta madre o explante inicial; Fase I: desinfección adecuada del material; Fase II: establecimiento o iniciación de los cultivos; Fase III: multiplicación; Fase IV: enraizamiento y Fase V: aclimatización para el traspaso a tierra (Krikorian, 1991).

Además, existen factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación como lo son, la planta que dona el explante, el explante, factores físicos (luz, temperatura, humedad, fotoperíodo), los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo (Villalobos y Thorpe, 1991).

4.1 Cultivo *in vitro* en girasol

El estudio y aplicación de técnicas biotecnológicas relacionadas al cultivo *in vitro* en especies de la familia de las Asteráceas, ha sido muy desarrollado en crisantemo y lechuga, constituyendo éstas especies modelos de exploración para otras especies de la familia, como el girasol (Radonic, 2010).

Se ha planteado que el girasol, se encuentra entre las especies consideradas “recalcitrantes”, término con el que se denominaron a todas aquellas especies que presentaban dificultades para establecer un cultivo, o bien eran incapaces de mostrar una respuesta morfogénica (Lopez, 1996), donde la regeneración de plantas completas está influenciada por las condiciones de cultivo, por el genotipo y por sus interacciones, lo

cual unido a la baja capacidad de regeneración, pobre enraizamiento y a la ocurrencia de plántulas hiperhídricas, limita considerablemente la aplicación de métodos de mejoramiento por vías biotecnológicas en girasol (Mayor y col, 2001 citado en Rodríguez y col, 2008^a).

La hiperhidricidad es un fenómeno indeseable, y es un problema frecuente en los sistemas de cultivo *in vitro* en girasol (Fauguel y col, 2008). Es un desorden morfológico y fisiológico, asociado a una excesiva hidratación, que afecta a las plantas regeneradas *in vitro*, y en ciertos casos, impide el establecimiento de plantas micropropagadas en condiciones *ex vitro*. Se manifiesta principalmente en las hojas, y afecta a dos procesos importantes: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso. Las causas están ligadas a las características del cultivo *in vitro* (Ziv, 1991). Gaspar (1986) sugiere que los niveles de etileno tienen un papel determinante en la hiperhidratación. Se ha señalado, que la inhibición del etileno puede ser controlada adicionando nitrato de plata a los medios de cultivo.

Otra característica que también es observada por algunos autores en el cultivo *in vitro* de girasol, es la aparición prematura de botones florales en las plantas *in vitro* pero muchos lo ven como un aspecto indeseable (Zorzoli y col, 1994 citado en Rodríguez y col 2008^a).

Por lo tanto, en el control de la hiperhidricidad y floración prematura *in vitro* de girasol, se han encontrado buenos resultados con la incorporación de nitrato de plata (AgNO_3) en los estudios de Rodríguez y col 2008^b; Mayor y col 2001; Mayor y col 2003; y con nitrato de plata y caseína hidrolizada en los estudios de Vasic y col 2001; Mayor y col 2003.

Según Kumar y col (2009), el receptor de etileno, ETR1, contiene un sitio de enlace al etileno, y el enlazamiento esta mediado por un ión cobre. Los iones de plata son capaces de generar insensibilidad al etileno en las plantas, ya que reducen la capacidad del receptor para unir etileno, porque reemplaza al cofactor cobre, bloqueando el receptor en una conformación tal, que continuamente reprime los efectos del etileno.

4.2 Micropropagación

La micropropagación, es considerada como la técnica de propagación *in vitro* que implica generalmente la producción de plantas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se deriva (Krikorian, 1991).

Cuando un inoculo con potencialidad de diferenciación (meristemas de vástagos, segmentos de tallos con yemas axilares, yemas apicales) se incuba en condiciones favorables (balance hormonal adecuado), regenera un nuevo individuo, pudiendo considerar la micropropagación como un sistema de multiplicación masiva *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991).

En muchas especies, esta metodología ha generado grandes ventajas en comparación con los sistemas tradicionales de propagación vegetativa, lográndose un incremento acelerado del número de plantas por genotipo, reducción en el tiempo de multiplicación, mayor control sobre el estado fitosanitario del material propagado, introducción rápida de nuevas variedades o clones, de los cuales existan pocos individuos y uniformidad y estabilidad genética en las plantas producidas (Villalobos y Thorpe, 1991; Jiménez, 1998).

Vasic y colaboradores (2001) cultivaron *in vitro* ápices de *H. maximiliani* en un medio MS sin hormonas, y observaron hiperhidricidad en algunas de las plantas

obtenidas. De las plántulas obtenidas aislaron segmentos nodales y apicales y se cultivaron en un medio MS con 2 mg/l de nitrato de plata y 3 g/l de caseína hidrolizada. Éste medio les ayudó a mejorar cualitativamente el problema de hiperhidricidad observado, y les permitió obtener una cantidad suficiente de material *in vitro* para el aislamiento y cultivo de protoplastos.

Gómez y colaboradores en el 2010, utilizaron embriones a partir de semillas inmaduras del híbrido *H. annuus* L. x *Tithonia rotundifolia*. Estos autores probaron un medio MS con vitaminas y BA (0,5 y 1 mg/l) para la germinación *in vitro* de embriones, obteniendo sólo 8 plantúlas, de los 86 embriones iniciales, donde siete fueron descartadas por hiperhidricidad. A partir de la única plántula sobreviviente, realizaron micropropagación en un medio MS con vitaminas, y con BA (0,1 y 0,5 mg/l), donde obtuvieron 130 plantas *in vitro*. Para la etapa de enraizamiento, utilizaron medios MS sin hormonas y medios MS con AIA (0,2 mg/l) y ANA (0,2 y 0,1 mg/l) con distintas combinaciones de ácido salicílico (0,14 mg/l) y carbón activado (1,5 g/l). La mejor respuesta fue en el medio MS con 0,1 mg/l ANA, sin ácido salicílico o carbón activado, con un 52% de plantas enraizadas. Para la aclimatación, las plantas enraizadas fueron pasadas a una mezcla 3:1 de turba-musgo/vermiculita y arena, 20 fueron aclimatadas, donde solamente una generó botones y llegó a floración inconclusa.

Sujatha y colaboradores (2012^a) utilizaron esquejes axilares de plantas transformadas de *H. annuus* L. Los esquejes axilares fueron cultivados en un medio de crecimiento MS con 0,5 mg/l BA, 1 mg/l 2iP y 250 mg/l cefotaxima y 100 mg/l kanamicina. Para el enraizamiento, emplearon un medio MS con 1 mg/l ANA y 250 mg/l de cefotaxima. El proceso de aclimatación consistió en utilizar vermiculita estéril, como sustrato para la adaptación de las plántulas.

4.3 Organogénesis

La organogénesis es un proceso de regeneración, que implica la formación de órganos de *novο* a partir de pequeños grupos celulares meristemáticos, denominados meristemoides (Villalobos, 1990). Este proceso puede ocurrir directamente del explante, o indirectamente, con la formación previa de un callo, definido como una estructura desorganizada de crecimiento acelerado y continuo, formada por células en división, que se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta (Gómez, 1998).

La mayoría de los meristemoides obtenidos se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante, y bajo condiciones apropiadas de cultivo, pueden formar yemas o raíces primarias (Bonnett y col., 1996, citado por Litz y Jarrez, 1991).

La organogénesis está regulada por el balance auxina/citoquinina en el medio de cultivo. Medios con una relación alta auxina/ citoquinina inducen la formación de raíces, mientras una baja relación de auxina/citoquinina induce la formación de vástagos y una relación intermedia induce la formación de callos (Christianson y Warnick, 1983).

Mayor y colaboradores en el 2003, realizaron un estudio para reducir la hiperhidratación en el cultivo *in vitro* de girasol. Cultivaron semillas de tres líneas híbridas en un medio MS sin hormonas para la germinación, posteriormente la parte basal de los cotiledones, fueron colocados en un medio MS con 1 mg/l AIA y diferentes concentraciones de cinetina K (1 y 2 mg/l), nitrato de plata (0,42; 0,84 y 1,3 mg/l), caseína hidrolizada (250, 500 y 750 mg/l), nitrato de calcio (1,3; 3 y 4 mg/l) y nitrato de cobalto (0,5; 1 y 1,4 mg/l) en el medio de cultivo. Sólo un híbrido respondió a todos los medios de cultivo, obteniendo organogénesis directa. Los mejores resultados fueron observados

con la adición de 2 mg/l de K y 500mM de caseína hidrolizada, porque incrementaban el promedio de brotes/explantes. El nitrato de calcio y cobalto, no ayudaron en el control de la hiperhidricidad, en cambio con el nitrato de plata, en la concentración de 1.3 mg/l, se logró el menor porcentaje de brotes hiperhídricos (29,41%), un 82,5% de regeneración de brotes y un promedio de brotes/explantes de 2,37.

Vega y colaboradores (2006), evaluaron la respuesta de la organogénesis directa en girasol en diferentes zonas del cotiledón, para ello utilizaron semillas de seis líneas híbridas. Después de germinar las semillas en un medio MS sin hormonas, los cotiledones fueron removidos para cultivar secciones transversales de la parte distal, media y proximal en un medio MS con 2 mg/l K y 1 mg/l AIA, obteniendo los mejores resultados en la parte proximal, seguido por la parte media y distal. Cinco genotipos respondieron, de los cuales con el híbrido N834 se obtuvo los mejores resultados con 81,7% de brotes y un promedio de 2,57 brotes/explantes.

Vega y colaboradores (2007), a partir de una línea híbrida de girasol, utilizaron el mismo protocolo del estudio anterior, para obtener brotes, y adicionalmente, utilizaron un medio de inducción de callo, constituido por un medio MS con 1 mg/l de 2,4D. En la regeneración directa de brotes obtuvieron nuevamente los mejores resultados en la parte proximal con un porcentaje de regeneración del 94%, un número de explantes regenerados de 51 de los 60 iniciales que fueron cultivados. En su estudio de inducción de callo, observaron la formación de un callo friable para todos los explantes, independientemente de la región del cotiledón usada.

Ozyigit y colaboradores (2007), indujeron callo y regeneraron brotes en 5 genotipos de girasol, a partir de hipocótilos y cotiledones de semillas germinadas *in vitro*, en un medio MS sin reguladores de crecimiento. Los trozos de hipocótilos y segmentos

transversales de cotiledones fueron cultivados en un medio MS con 1mg/l 2,4D para la inducción de callo. La inducción de callo fue mayor en el hipocótilo y del 100% en tres genotipos. Posteriormente para la regeneración de los callos utilizaron un medio MS sin hormonas, en el cual no se obtuvo ninguna respuesta de regeneración, y un medio MS con 1 mg/l BA y 0,5 mg/l ANA donde todos los genotipos tuvieron respuesta de regeneración, con formación de brotes en un porcentaje del 31%, cuando se empleó el hipocótilo.

Rodríguez y colaboradores (2008^a), cultivaron diferentes tipos de explantes (ápices, hipocótilos, epicótilos, cotiledones y hojas de plántulas germinadas *in vitro*) de cuatro genotipos distintos de girasol, en un medio MS con diferentes concentraciones de BAP (1,5 y 7 mg/l), 2,4D (1 mg/l) y AIA (1 mg/l), encontrando que los mejores explantes para la inducción de callo fueron el hipocótilo y el epicótilo, en el medio con 5mg/l BAP, seguidos por el ápice en el mismo medio. La respuesta hacia la producción de callo también fue diferente entre los cuatro genotipos.

Rodríguez y colaboradores (2008^b), cultivaron cotiledones maduros, de cuatro genotipos de *H. annuus* L., en medios MS con diferentes combinaciones de AIA (0,5 y 1 mg/l), BA (0,5 y 1 mg/l), K (2 mg/l) y nitrato de plata (0,34 mg/l). En esta investigación, los mejores resultados, fueron obtenidos con 0,5 mg/l de AIA y BA, respecto a la regeneración directa, con el genotipo Ca-15, ya que presentaba el mayor número de brotes/explante. En los subsiguientes repiques de Ca-15, observaron 21% de formación de callo, 17% de botones florales y 62% de brotes hiperhídricos. Los medios con nitrato de plata no mostraron diferencias significativas, pero si se observaron mejores resultados cualitativos en cuanto al control de la hiperhidricidad. Los brotes obtenidos en los medios con nitrato de plata, fueron colocados en un medio MS (1/2) para inducir la formación de

raíces, encontrando que en el genotipo C-65 se obtuvo 70% de plantas enraizadas, con los menores porcentajes de botones florales (10%) y de plantas hiperhídricas (12%).

Sujatha y colaboradores (2012^b), cultivaron cotiledones maduros, de 42 genotipos de girasol, en un medio MS con doce diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento: BA (0,2-5 mg/l), AIA (0,1-3 mg/l), ANA (0,1-1 mg/l), IBA (0,1-1 mg/l), TDZ (0,2-2 mg/l), K (0,1-10 mg/l), 2,4D (0,2-2 mg/l), 2-iP (0,2-5 mg/l). La regeneración de brotes ocurrió a partir de la tercera semana, y los mejores resultados fueron en el medio con TDZ e IBA donde todas las combinaciones de reguladores de crecimiento dieron respuesta de regeneración, siendo la mayor de 80 % con 0,5 mg/l TDZ y 1 mg/l IBA. Resultados también satisfactorios, fueron obtenidos con 5 mg/l 2-iP y 1 mg/l AIA, logrando 90 % de regeneración, y con 2 mg/l BA y 1 mg/l ANA 70% de regeneración. Por otra parte, observaron que muchos de los explantes utilizados formaron callo organogénico, con variedad de color y textura, dependiendo del medio. Algunos fueron transferidos a un medio MS con 2, 1 y 0,5 mg/l de BA sin obtener ninguna respuesta de regeneración.

4.4 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula somática (Tisserat y col, 1979 citado por Gómez, 1998b), el cual logra bipolaridad desde etapas tempranas como sucede en la embriogénesis cigótica, pero sin fusión de gametos (Sharp y col. 1980; Williams y Maheswaran, 1986).

Según Haccius, 1978 (citado por Rout y col, 2006), los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical que no poseen conexión vascular con el tejido materno, por lo que pueden ser separados fácilmente de éste; su origen puede ser

unicelular o multicelular y son capaces además de crecer y formar plantas completas (Gómez, 1998b).

En la embriogénesis somática directa, los embriones se originan directamente de tejidos, a partir de una célula o de un grupo de células, en ausencia de callo, mientras que en la embriogénesis somática indirecta, los embriones se originan a partir de la formación previa de callo (Tisserat, 1985).

El contenido endógeno y la aplicación exógena de auxinas, son factores determinantes durante la inducción y la fase de expresión génica en la embriogénesis somática. Ha sido reportado que el uso de 2,4D en el medio, incrementa los niveles endógenos de auxina en el explante, lo que favorece el establecimiento del gradiente polar de auxinas, lo que está relacionado con el desarrollo de la simetría bilateral del embrión somático y cigótico (Schiavone y Cooke, 1987, citados por Jiménez, 2001).

Las observaciones morfológicas detalladas de los estados tempranos de embriogénesis somática fueron descritas por Komamine y col. (1980) en *Daucus carota*, en un medio suplementado con 0,1 mg/L de 2,4D.

Existen tanto ventajas como desventajas en la multiplicación de plantas a gran escala, mediante la embriogénesis somática. Las principales ventajas son la producción de grandes cantidades de embriones en biorreactores, la posibilidad de encapsular estos embriones para la obtención de semillas sintéticas, y su posterior criopreservación, además de la posibilidad de aplicarles transformación genética y emplearlos como mecanismo de propagación clonal (Jain, 2002 citado por Rout y col, 2006). Las principales limitaciones son la dependencia genotípica de la producción de embriones somáticos y la baja tasa de germinación (Jiménez, 1998).

McCann y colaboradores (1988), cultivaron embriones de semillas inmaduras de una línea híbrida de girasol en un medio Gamborg's suplementado con 2 mg/l de 2,4D y 1,3 mg/l de ABA. Una vez que obtuvieron la formación directa de embriones somáticos, realizaron un primer subcultivo a las tres semanas en un medio con 0,7 mg/l de ABA y 0,2 mg/l BA, para eliminar la auxina del medio. Después de dos semanas realizaron un segundo subcultivo en un medio MS con 0,1 mg/l de AIA y 1 mg/l de K, para favorecer las siguientes etapas de desarrollo, obteniendo un 70% de embriones desarrollados en brotes.

Pugliesi y colaboradores (1993), utilizaron anteras de plantas mantenidas en vivero de los híbridos *H. annuus* x *H. tuberosus* y *H. annuus* x (*H. annuus* x *H. tuberosus*). La iniciación del cultivo se realizó en un medio MS con diferentes concentraciones de AIA, ANA, K y BA, y un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/ oscuridad. La formación de callo, en un 97,8 % se obtuvo para *H. annuus* en el medio con 0,2 mg/l de BA y 0,1 mg/l ANA, observándose en la superficie de los callos brotes y embriones somáticos, que a su vez formaban embriones somáticos secundarios. La formación de brotes en los callos fue del 100% en el medio con 0,2 mg/l de BA y 0,2 mg/l ANA, para *H. annuus* x *H. tuberosus*. Los brotes y los embriones formados, en el cultivo de anteras, se desarrollaron en plantas sin necesidad de ser transferidos a un medio distinto, y los mejores resultados fueron obtenidos en el medio con 1 mg/l BA y 0,5 mg/l ANA, con 87,3 % de regeneración para *H. annuus* x *H. tuberosus*.

Laparra y colaboradores (1997), utilizaron hojas, obtenidas *in vitro*, de *Helianthus smithii*, y las cultivaron en distintas combinaciones de BA y ANA (0,1-2 mg/l). La mayor formación de callo y embriones somáticos (78,1%) fue en el medio MS con 0,1 mg/l BA

y 1,5 mg/l de ANA. Luego los embriones fueron cultivados en un medio MS sin reguladores de crecimiento, donde obtuvieron la formación de plantas completas, las cuales se transfirieron a tierra.

Fiore y colaboradores (1997), utilizaron secciones transversales del cotiledón, a partir de semillas, de cinco genotipos de girasol, germinadas *in vitro* en un medio MS sin reguladores de crecimiento. Las semillas fueron germinadas en oscuridad, luego los explantes (secciones del cotiledón) fueron cultivados en dos medios de inducción de embriogénesis somática, que consistían en un medio MS con 1 mg/l ANA, 1 mg/l BA y 0,1 mg/l GA₃, y otro medio con 2 mg/l ANA, 2 mg/l BA y 0,1 mg/l de GA₃. Un tratamiento fue en luz, dando lugar a un callo no morfogénico que no les permitió seguir con el estudio, el otro tratamiento fue en oscuridad, dando lugar a un 72% de explantes con callo embriogénico. Los callos fueron cultivados en un medio para la germinación de los embriones desarrollados en ellos, que consistía en MS con 0,5 mg/l ANA, 1 mg/l BA, 0,1 mg/l GA₃, obteniendo brotes en un porcentaje mayor al 250%.

Gurel y Kazan (1998), utilizaron secciones transversales del cotiledón, a partir de semillas, de tres híbridos comerciales de girasol, germinadas *in vitro* en un medio MS sin reguladores de crecimiento y en oscuridad. Los cotiledones fueron cultivados en oscuridad en un medio MS con 1 mg/l BA, 1 mg/l ANA y 0,1 mg/l de GA₃, para inducir la formación de embriones somáticos. Luego los explantes fueron subcultivados en el mismo medio, con un fotoperíodo de 16horas. La respuesta de los cuatro cultivares fue distinta, observando la formación de embriones somáticos, raíces y callo en el mismo explante. Los mejores resultados fueron en un cultivar con un promedio de 2,28 raíces/explante y 1,47 embriones/explante, los cuales fueron de forma directa. En cuanto

a la formación de callo, este se originó del cotiledón pero en una región distinta de donde se originaron los embriones. Finalmente los explantes, fueron transferidos a un medio de regeneración el cual era MS con 1 mg/l BA, 0,5 mg/l ANA y 0,1 mg/l de GA₃, obteniendo la formación de plantas completas.

Fambrini y colaboradores (2003), usaron como explantes raíces intactas, obtenidas *in vitro*, del híbrido interespecífico *H. annuus* x *H. tuberosus*, y las cultivaron en un medio MS sin reguladores de crecimiento a 23±1°C en un fotoperíodo de 16 horas, obteniendo el desarrollo de múltiples estructuras en el mismo explante como, vástagos, raíces adventicias, callo embriogénico y embriones somáticos primarios y secundarios. Adicionalmente, realizaron estudios y análisis histológicos de sus resultados.

Nuevamente Fambrini y colaboradores (2006), usaron como explantes hojas, obtenidas *in vitro*, del mismo híbrido y las cultivaron bajo las mismas condiciones pero a una temperatura de 25±1°C, obteniendo el desarrollo de yemas adventicias y embriones somáticos en fase de corazón, en el mismo explante y de forma directa, según sus análisis histológicos.

OBJETIVO GENERAL

- Establecer un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis y embriogénesis somática, a partir de microesquejes y cotiledones en *Helianthus annuus* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el proceso de germinación *in vitro* a partir de semillas de *H. annuus* L., y así obtener material vegetal (microesquejes y cotiledones) en condiciones asépticas, para ser usados como explantes en la propagación *in vitro* de esta especie.
- Establecer protocolos de multiplicación y de organogénesis *in vitro* de *H. annuus* L., a partir de microesquejes.
- Establecer protocolos de embriogénesis somática y organogénesis *in vitro* de *H. annuus* L., a partir de segmentos de cotiledones.
- Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de microesquejes y segmentos de cotiledones de *H. annuus* L. cultivados *in vitro*.
- Determinar el efecto del nitrato de plata y la caseína hidrolizada en la disminución de la hiperhidratación y la aparición de botones florales de los brotes obtenidos por el proceso de multiplicación *in vitro* de *H. annuus* L., a partir de microesquejes.

- Comparar la respuesta organogénica y embriogénica de microesquejes y segmentos de cotiledones, respectivamente, que provienen de plantas *de H. annuus* L. mantenidas en condiciones *in vitro*.
- Determinar a través de estudios histológicos la naturaleza de los procesos morfogénicos y si estos ocurrieron de manera directa o indirecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Germinación *in vitro* de semillas de *Helianthus annuus* L.

1.1 Material vegetal

Semillas extraídas de frutos secos comerciales, provenientes de tiendas especializadas en productos para mascotas.

1.2 Desinfección de las semillas

Los frutos fueron lavados con agua y jabón comercial, se trataron con el fungicida VITAVAX® por 30 minutos, y se enjuagaron con agua destilada para ser colocados en cloro comercial al 20% con dos gotas de Tween 20 por 20 minutos, transcurrido este tiempo, los frutos fueron trasladados a la cámara de flujo laminar en donde se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se procedió a retirar el pericarpio y a extraer las semillas, las cuales fueron pasadas a una solución de GERDEX® (desinfectante) por 1 minuto. Para la siembra, se colocaron de 3 a 4 semillas por frasco, para un total de 130 semillas.

1.3 Medio de germinación de las semillas

Para la germinación *in vitro* de las semillas se utilizó un medio básico constituido por sales MS (Murashige & Skoog 1962), suplementados con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L mio-inositol, 10 ml/l de vitaminas de Morel, 30 g/L de sacarosa, ajustado a un pH de 5,8 con NaOH y/o HCl y solidificado con 8 g/L de agar. Éstos fueron servidos en frascos de vidrio, y se esterilizaron en autoclave con vapor húmedo durante 20 minutos a una temperatura de 120-121 °C bajo una presión de 1 kg/cm².

2. Multiplicación y organogénesis *in vitro* a partir de microesquejes de *Helianthus annuus* L.

2.1 Material vegetal

Posterior al proceso de germinación *in vitro* de las semillas y con tres semanas de crecimiento, se aislaron microesquejes de aproximadamente 1cm, y se cultivaron en medios de multiplicación para aumentar el número de plantas donantes de explantes.

2.2 Medios de cultivo para la multiplicación y la organogénesis

Durante la fase de multiplicación y organogénesis, se sembraron microesquejes en medio básico definido en (1.3), al cual se le añadió diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, detallados en la tabla 3.

Tabla N° 3. Composición de los medios de inducción de la multiplicación y la organogénesis *in vitro* en *H. annuus* L.

Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento			
	ANA (mg/l)	BA (mg/l)	AIA (mg/l)	K (mg/l)
MO1*	---	---	---	---
MO2**	---	---	1	2
MO3***	0.5	1	---	---
MO4****	---	2	---	---
MO5*****	1	2	---	---

*Medio control, **Medios reportados por Vega y col, 2007 ***Medios reportados por Ozyigit y col, 2007 **** Medios reportados por Rodríguez y col, 2008. *****Medios reportados por Sujatha y col, 2012^b.

2.2.1 Efecto del nitrato de plata (AgNO₃) y la caseína hidrolizada, adicionado al medio de cultivo, sobre la hiperhidricidad y la floración prematura en plantas de *H. annuus* L. micropropagadas.

Durante este experimento, se sembraron otros microesquejes en medio básico definido en (1.3), al cual se le añadió diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, detallados en la tabla 3, los cuales además fueron suplementados con nitrato

de plata (1 mg/l) y caseína hidrolizada (500 mg/l), para el control de la hiperhidricidad y la floración prematura. El nitrato de plata fue colocado posterior a la esterilización del medio, bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar, con la finalidad de evaluar la eficiencia del mismo como un agente para inhibir la acción del etileno, la caseína hidrolizada fue colocada antes de la esterilización del medio.

2.3 Regeneración *in vitro* de los callos formados durante la multiplicación.

2.3.1 Material Vegetal

Posterior al proceso de multiplicación *in vitro*, se aislaron segmentos de callo que se habían formado en la base de los microesquejes y se cultivaron en medios de regeneración.

2.3.2 Medios para la regeneración de los callos

Durante la fase de regeneración de los callos, se utilizó un medio básico definido en (1.3), sin reguladores de crecimiento y otros dos medios a los cuales se les añadió 1 y 2 mg/L de BA respectivamente.

3. Embriogénesis somática *in vitro* a partir de segmentos de cotiledones de *Helianthus annuus* L.

3.1 Inducción del proceso de embriogénesis somática.

3.1.1 Material Vegetal

Se aislaron segmentos longitudinales de cotiledones de las plantas germinadas *in vitro*, de aproximadamente 2cm de largo, y se cultivaron en un medio para la inducción de la embriogénesis somática.

3.1.2 Medios de inducción del proceso de embriogénesis somática.

Durante la fase de inducción, los explantes se cultivaron en un medio básico definido en (1.3), al cual se le añadió 1 mg/l del regulador de crecimiento 2,4D (Tabla 4).

3.2 Desarrollo de los embriones y organogénesis a partir de los embriones somáticos obtenidos en *Helianthus annuus* L.

3.2.1 Material vegetal

Luego de inducir la embriogénesis somática, los embriones somáticos en estado globular que se formaron, fueron aislados para promover los siguientes estados de desarrollo.

3.2.2 Medios para el desarrollo de los embriones somáticos y la organogénesis

Una vez obtenidos los embriones en estado globular, estos fueron trasferidos, individualmente y en grupos, a un medio básico definido en (1.3), al cual se le añadió diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, detallados en la tabla 4.

Tabla N° 4. Composición de los medios de inducción de la embriogénesis somática, desarrollo de los embriones y organogénesis a partir de embriones *in vitro* en *H. annuus* L.

Proceso	Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento				
		ANA (mg/l)	BA (mg/l)	AIA (mg/l)	K (mg/l)	2,4D (mg/l)
Inducción de la embriogénesis somática <i>in vitro</i>	MSE*	---	---	---	---	1
Desarrollo de los embriones y organogénesis a partir de embriones	ME1**	---	---	---	---	---
	ME2***	---	---	1	2	---
	ME3****	0.5	1	---	---	---
	ME4*****	---	2	---	---	---

*Medios reportados por McCann, 1988. **Medio control, ***Medios reportados por McCann, 1988. ****Medios reportados por Gurel y Kazan, 1998. ***** Medios reportados por Fiore y col, 1997.

4. Siembra de los explantes

Los explantes provenientes de plantas *in vitro* de *H. annuus* L. se sembraron en los medios de inducción en la cámara de flujo laminar, bajo condiciones de asepsia a razón

de cuatro secciones por frasco, con diez réplicas cada uno, obteniendo un total de cuarenta (40) explantes por tratamiento.

5. Condiciones del cultivo *in vitro*

El material vegetal fue incubado en condiciones de luz fluorescente continua (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) y temperatura 27 ± 1 °C, durante el lapso de tiempo necesario para inducir los procesos de propagación *in vitro*, excepto en el proceso de inducción de la embriogénesis somática, donde los explantes fueron incubados en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 ± 1 °C y en total oscuridad, durante cuatro semanas para inducir el proceso de embriogénesis somática. Y el repique del material vegetal fue realizado cada mes y medio.

6. Medios de enraizamiento

Después de las distintas etapas de propagación *in vitro*, los brotes formados que no desarrollaron raíces en el proceso anterior, y que poseían un tamaño de 2-3 cm aproximadamente, fueron transferidos a un medio MS sin reguladores de crecimiento, y otro medio MS suplementado con 1mg/l de ANA. (Tabla 5)

Tabla N° 5. Composición de los medios de enraizamiento en *H. annuus* L.

Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento
	ANA (mg/l)
MS1*	---
MS2**	1

*Medio control. **Medio reportado por Sujatha y col, 2012.

7. Aclimatización

Las plantas obtenidas durante el proceso de propagación *in vitro*, se sembraron en dos sustratos, a) mezcla 1:1 de tierra y turba b) mezcla 1:1 de tierra y arena. Se colocaron por 10 días en propagadores de alta humedad (80-93% de humedad relativa) y baja

luminosidad ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, densidad de flujo fotónico fotosintético DFF). Luego las plantas fueron transferidas a condiciones de vivero.

8. Observaciones generales y periódicas al cultivo

Para cada uno de los cultivos se llevaron a cabo observaciones cualitativas y cuantitativas semanalmente. Las características cualitativas evaluadas fueron: color de los explantes, formación de callo y/o embriones, tipo de callo formado, formación de botones florales, neoformaciones e hiperhidricidad. Entre las características cuantitativas, se evaluó el tiempo de respuesta de los explantes, % de contaminación de los explantes, % de germinación de las semillas, % de explantes con brote, promedio de brotes por explante, % formación de callo y/o embriones, % callo que formaron órganos, número de órganos por callo, % de hiperhidricidad, % de botones florales, tamaño del explante, y promedio de embriones por explante, usando para ello un microscopio estereoscópico marca Zeiss.

9. Estudios anatómicos

Para comprobar la naturaleza organogénica o embriogénica del proceso de regeneración *in vitro*, y determinar si el proceso ocurrió de forma directa o indirecta, se realizaron cortes transversales a mano alzada de material fresco obtenido. Igualmente, se planteó realizar estudios anatómicos, para la comparación entre tejidos (tallos y hojas) hiperhídricos y los no hiperhídricos de los cultivos obtenidos *in vitro*. Los cortes anatómicos fueron observados a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2, y se realizaron registros fotográficos en el mismo microscopio con una cámara acoplada marca Nikon FDX-35 modelo H-III.

10. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los datos obtenidos para cada tratamiento, se realizó a través de una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la ayuda del programa CaEst para Windows 7.

RESULTADOS

1. Germinación *in vitro* de semillas de *Helianthus annuus* L.

El método utilizado para la desinfección de las semillas fue adecuado, ya que se obtuvo un 80% de semillas libres de agentes contaminantes.

A las tres semanas de cultivo se obtuvo un 82% de germinación de semillas, en un medio sin reguladores de crecimiento (medio MS1). Con un promedio de 1 planta por semilla. Se observó un 20% de pérdida por oxidación y/o contaminación, obteniendo un 62% de sobrevivencia de plantas, a las cuatro semanas de cultivo.

Las plantas obtenidas presentaron un desarrollo normal, con una altura de 7cm aproximadamente, de hojas y cotiledones verdes y en todas se observó formación de raíces (Figura 1).

Tabla N° 6. Resultados de la germinación *in vitro* de semillas de *Helianthus annuus* L.

% Contaminación	% Germinación	% Sobrevivencia	N° plantas/semilla
20	82	62	1

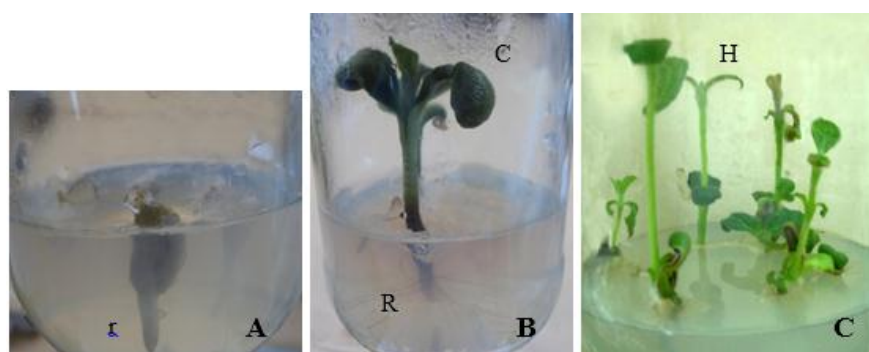


Figura N° 1. Diferentes etapas de la germinación y crecimiento *in vitro* de *H. annuus* L., en medio MS1. **A.** 3 días **B.** 15 días y **C.** 21 días de cultivo. (r: radícula, C: cotiledones, R: raíces, H: primordios foliares)

2. Multiplicación y organogénesis *in vitro* a partir de microesquejes de *Helianthus annuus* L.

2.1 Multiplicación

Posterior al proceso de germinación *in vitro* de las semillas, se aislaron y cultivaron microesquejes en medios de multiplicación para aumentar el número de plantas donantes de explantes.

A las cuatro semanas de cultivo, los microesquejes sembrados en el medio control sin reguladores de crecimiento (MO1), continuaron su desarrollo y no presentaron ninguna respuesta hacia la multiplicación (Figura 2). Las plantas tenían una altura de 6cm aproximadamente, de hojas verdes, sin formación de raíces, sin presencia de hiperhidricidad, con el mayor número de nudos (4-5), y el área foliar más desarrollada. A las siete semanas de cultivo, se observó la formación prematura de botones florales en un 42 % de los ápices (Figura 3).



Figura N° 2. Respuesta de los microesquejes de *H. annuus* L. cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento (MO1). **A.** Siembra de los microesquejes de 1 cm. **B.** Desarrollo de la planta a las tres semanas de cultivo. **C.** A las cuatro semanas de cultivo.

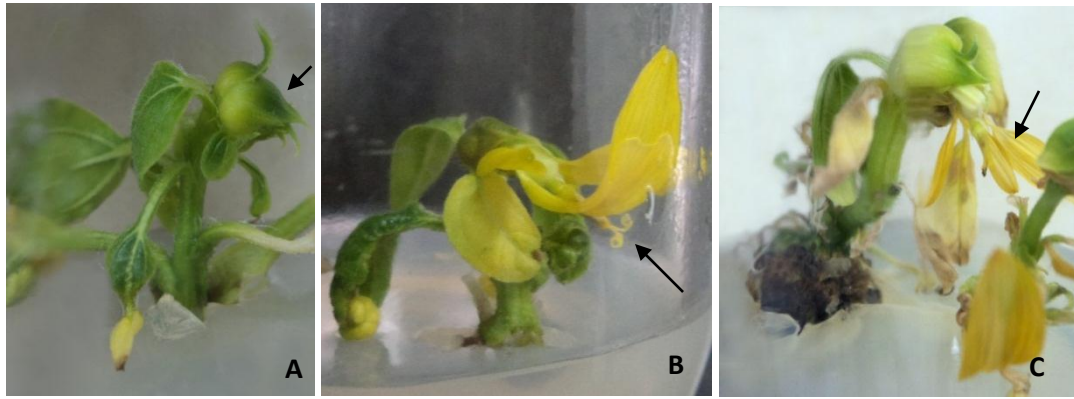


Figura N° 3. **A.** Presencia de botones florales en los ápices de las plantas desarrolladas en un medio MS a las siete semanas de siembra (→). **B y C.** Desarrollo de una flor (→) y de algunos pétalos de la inflorescencia (→) en la semana número ocho de cultivo.

Igualmente, en el medio MO2 (2 mg/L K + 1 mg/L AIA) los microesquejes continuaron su desarrollo y no presentaron ninguna respuesta hacia la multiplicación, a las cuatro semanas de cultivo. Las plantas en este medio eran verdes, con un eje principal entre 2 y 2,5 cm, con desarrollo de hojas normales. En este medio no hubo formación de callo, pero si de raíces en un 21,15%, siendo el único tratamiento donde hubo enraizamiento (Figura 4). En algunos casos (20%) se observó plantas con hojas y tallos con apariencia hiperhídrica. En la figura N° 5, se observan los cambios morfológicos que presentaron las plantas con características hiperhídricas, para todos los medios de cultivo con reguladores de crecimiento (MO2, MO3, MO4 y MO5).

Por otra parte, hubo un 11 % de plantas con formación prematura de botones florales en los ápices. Todos los botones florales, formados en los medios con reguladores de crecimiento, tenían el mismo tamaño, forma y características que los observados en el medio MO1 sin reguladores de crecimiento, según las evaluaciones cualitativas realizadas durante todo el período de experimentación (Figura 3).

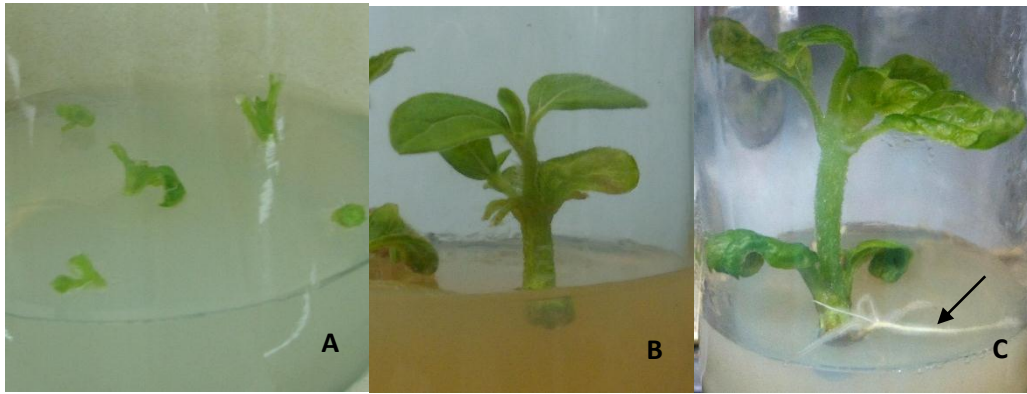


Figura N° 4. Respuesta de los microesquejes en medio MO2 (2 mg/L K + 1 mg/L AIA). **A.** Siembra de los microesquejes de *H. annuus* L. **B** Desarrollo de las plantas a la tercera semana. **C.** Formación de raíces en las plantas a la cuarta semana (→)

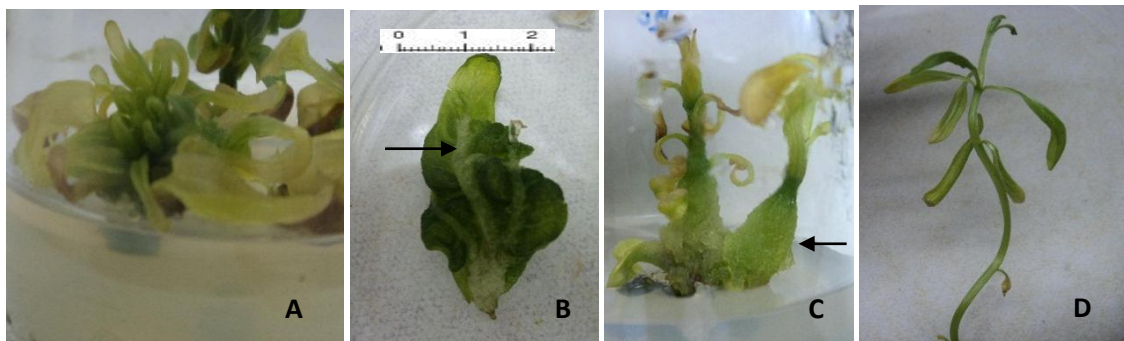


Figura N° 5. Cambios morfológicos observados a las siete semanas de cultivo en los medios con reguladores de crecimiento (MO2, MO3, MO4 y MO5). **A.** Explantes con un conjunto de hojas arrosadas. **B.** Detalle de una hoja hiperhidratada, se observan los nervios (→) y la succulencia. **C.** Tallos de los explantes hiperhidratados, se observa mayor grosor en la parte basal (→). **D.** Plántula de *H. annuus* L. *in vitro* que presentan una morfología muy distinta a las desarrolladas en tierra.

A las cuatro semanas de cultivo, se observaron cambios morfológicos y respuesta hacia la multiplicación, en los tres medios de cultivo con BA y ANA (MO3, MO4 y MO5), pudiéndose distinguir en MO3 (1 mg/L BA + 0,5 mg/L ANA) un 80,5% de multiplicación con un promedio de 2,64 brotes/explante, al mes de cultivo (Figura 6).

En este medio de cultivo, se observó un 41,6% de los brotes con características de hiperhidricidad, que presentaban color verde, aproximadamente de 1 a 1,5 cm de altura, con entrenudos más cortos, hojas muy estrechas y pequeñas (Figura 6). Adicionalmente también se observó la formación de botones florales en los ápices del 26% de los brotes.

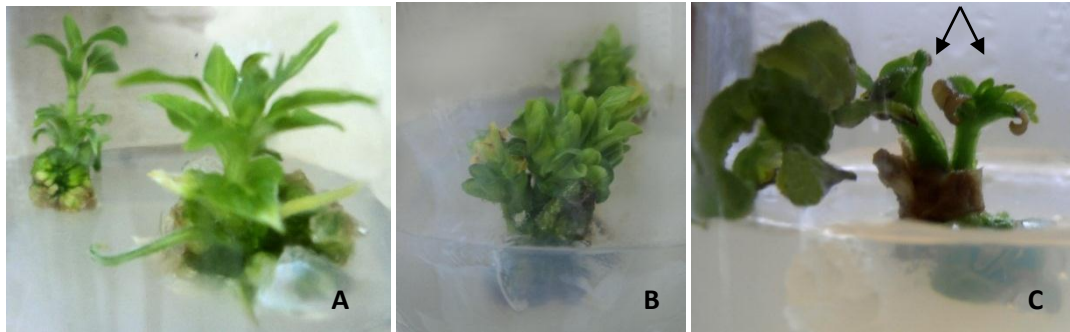


Figura N° 6. Multiplicación *in vitro* a partir de microesquejes en medio MO3 (1 mg/l BA + 0,5 mg/l ANA), a las cuatro semanas de cultivo. **A y B.** Formación de varios brotes a partir de microesquejes **C.** Detalle del desarrollo de dos brotes (→)

Luego de 30 días de cultivo, en el medio MO4 (2 mg/L BA), se observó un 70 % de multiplicación con un promedio de 2,52 brotes/explante (Figura 7). En un 31,8 % de los brotes formados se observó características de hiperhidricidad, y en un 20 % formación de botones florales en los ápices.

En el medio MO5 (2 mg/L BA + 1 mg/L ANA), en un período de 30 días, se observó un 75% de multiplicación con un promedio de 2,7 brotes/explante (Figura 7). En este medio el porcentaje de brotes con características de hiperhidricidad fue de 36,9 %, y de brotes con aparición prematura de botones florales en los ápices fue de 18%.

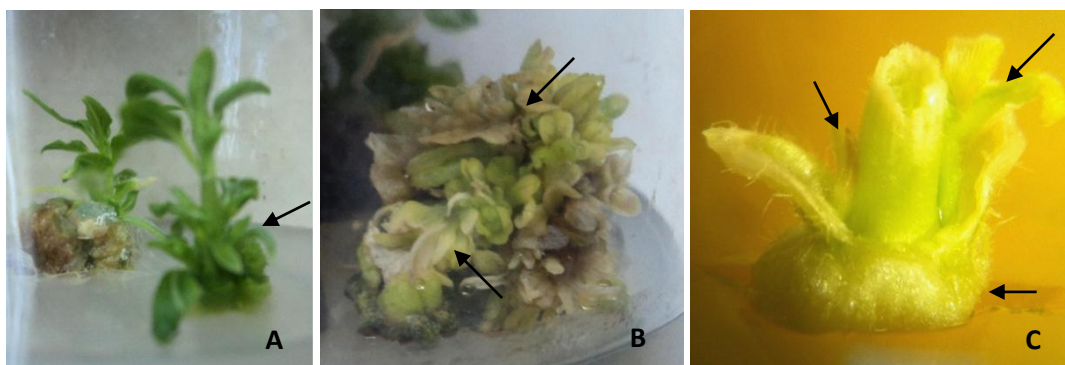


Figura N° 7. Multiplicación a partir de microesquejes en los medios MO4 y MO5 **A y B.** Formación de varios brotes por microesqueje en MO4, al mes de cultivo (→) **C.** Detalle del desarrollo de dos brotes (→) y formación de callo (→) a partir del microesquejes inicial en el medio MO5, a la primera semana de cultivo.

Tabla 7. Comparación estadística de la respuesta de multiplicación y efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de multiplicación de *H. annuus* L. a partir de microesquejes al mes de cultivo, en los diferentes medios empleados.

Medios de Cultivo	% Multiplicación	Brotes/ explantes	% Brotes con hiperhidricidad	% Brotes con botones florales	Tamaño del brote (cm)
MO1	0	0	0	42a	6
MO2	0	0	20a	11b	2 - 2,5
MO3	80,5a	2,64a	41,6b	26c	1 - 1,5
MO4	70b	2,52a	31,8 a, c	20d	1 - 1,5
MO5	75c	2,70a	36,9c	18e	1 - 1,5

* Letras diferentes indican diferencias significativas, letras iguales indican diferencias no significativas.

En esta etapa, se obtuvo un mayor porcentaje de multiplicación (80,5%) en el medio MO3, con una concentración de 1 mg/L de BA y 0,5 mg/L de ANA, con respecto a los medios MO4 y MO5, a lo largo de todo el periodo de experimentación, sin embargo, la mayor formación de brotes/explante fue en el medio MO5 (2,7) (Tabla 7).

El análisis estadístico, indica que existen diferencias significativas entre los porcentajes de multiplicación, y entre el porcentaje de brotes con botones florales, para los diferentes tratamientos. En relación al promedio de brotes/explante, no existen diferencias significativas. En lo relativo al porcentaje de brotes con hiperhidricidad, no existen diferencias significativas entre MO2 y MO4 y entre MO4 y MO5, mientras que MO3 muestra diferencias con todos los otros tratamientos (Tabla 7).

2.1.1 Efecto del nitrato de plata (AgNO_3) y la caseína hidrolizada, sobre la hiperhidricidad y la floración prematura en plantas de *H. annuus* L. micropropagadas.

Con el objetivo de disminuir la apariencia hiperhídrica y la floración prematura en la micropropagación de plantas de *H. annuus* L., se le adicionó a los medios de cultivo 1 mg/l de nitrato de plata (AgNO_3) con 500 mg/l de caseína hidrolizada (Tabla 8).

En los medios con reguladores de crecimiento (MO2, MO3, MO4 y MO5), se observaron brotes con la base del tallo engrosada (Figura 5C), brotes con hojas necrosadas, brotes con la pérdida total de las hojas, brotes con hojas de tamaños anormales, podían llegar hasta 3 cm de alto por 2 cm de ancho y su textura era rugosa, vidriosa y frágil, a pesar de estar muy engrosadas en comparación con las hojas normales desarrolladas en las plantas *in vitro* de girasol (Figura 5B). También se observaron brotes con hojas muy reducidas y estrechas, algunas pequeñas y otras alargadas que salían de un mismo punto, con entrenudos muy cortos, y una tendencia de crecimiento en forma arrosetada, que tenían una morfología muy distinta a las plantas normales desarrolladas *in vitro* (Figura 5A). Todas estas características, se intensificaron a medida que los brotes se dejaban por más de siete semanas en los medios de cultivo con reguladores de crecimiento. Para intentar disminuir la hiperhidricidad en estas plantas, algunas fueron

subcultivadas en un medio MS sin reguladores de crecimiento, pero no se observaron mejoras cualitativas, y en algunos casos la planta moría.

Por lo tanto, se procedió a cultivar microesquejes en medios a los cuales se les adicionó nitrato de plata (1mg/l) con caseína hidrolizada (500 mg/l), en los cuales, no se observó engrosamiento en la base del tallo de los brotes, tampoco se observaron brotes con hojas: arrosetadas, necrosadas, o de tamaño reducido. Sin embargo, se mantuvo un bajo porcentaje de brotes que mostraba ciertas características de hiperhidricidad en las hojas (hojas algo engrosadas y de mayor tamaño que las plantas normales *in vitro*) (Tabla 8).

Con respecto a la floración prematura, en los medios donde se adicionó AgNO₃ y caseína hidrolizada, este fenómeno disminuyó en gran medida (Tabla 8). Cuando se observó la presencia de botones florales en los ápices, estos se apreciaron de menor tamaño y grosor, en comparación a los formados en los medios sin estas sustancias.

Tabla 8. Efecto del nitrato de plata (AgNO₃) y caseína hidrolizada, en el proceso de multiplicación de *H. annuus* L. a partir de microesquejes.

	Sin AgNO ₃ y caseína hidrolizada	Con AgNO ₃ y caseína hidrolizada	Sin AgNO ₃ y caseína hidrolizada	Con AgNO ₃ y caseína hidrolizada
Medios de Cultivo	% Brotes con hiperhidricidad	% Brotes con hiperhidricidad	% Brotes con botones florales	% Brotes con botones florales
MO2	20a	8d	11a	0
MO3	41,6b	19,8a	26b	14f
MO4	31,8 a, c	9,5e	20c	9,4g
MO5	36,9c	14,7f	18d	7,2h

* Letras diferentes indican diferencias significativas, letras iguales indican diferencias no significativas.

Evaluando las condiciones de cultivo, estadísticamente se encontró que existen diferencias significativas en la respuesta de los brotes para un mismo medio, tanto para

el porcentaje de hiperhidricidad, como para el de brotes con botones florales. Por otra parte, el porcentaje de hiperhidricidad en un medio MO2 sin nitrato de plata y caseína hidrolizada, no mostró diferencias significativas con el porcentaje de hiperhidricidad en el medio MO3 con nitrato de plata y caseína hidrolizada.

2.2 Organogénesis

En los medios MO3, MO4 y MO5, donde hubo respuesta en la etapa de la multiplicación, se observó la formación de un callo compacto y de coloración verde a marrón en la base de todos los microesquejes sembrados, a partir de la primera semana de cultivo, es decir, que el callo se formaba mucho antes de que ocurriera la multiplicación de los brotes (Figura 8A y B). Cualitativamente, la cantidad de callo formado en el medio MO3 y MO5 fue aproximadamente el doble de la cantidad de callo formado en el medio MO4.

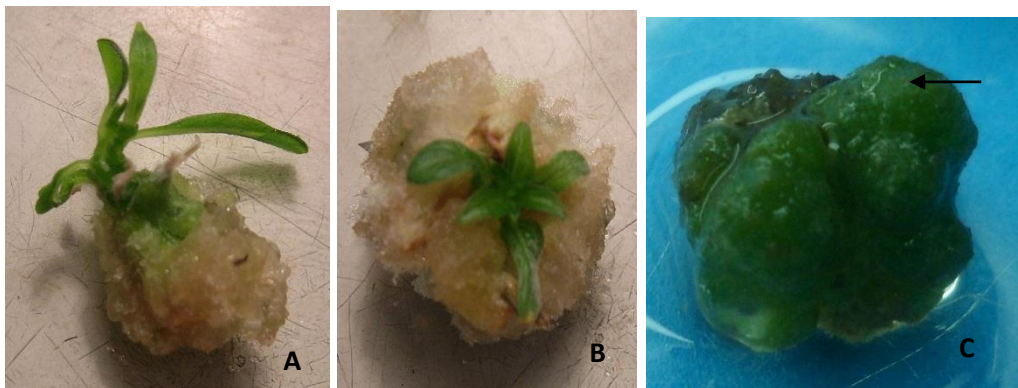


Figura N° 8. A y B. Formación de callo en la base de todos los microesquejes sembrados, a partir de la primera semana de cultivo. **C.** Callo aislado de los microesquejes a las siete semanas con estructuras esféricas de color verde (→)

A las siete semanas de cultivo, los callos formados en la base de los microesquejes, comenzaron a mostrar a simple vista indicios de desarrollo de órganos con la aparición de estructuras esféricas de color verde, que luego darían origen a brotes (Figura 8C).

Una vez realizado el corte anatómico, se comprobó que algunas estructuras correspondían a meristemoides (Figura 9B), o regiones localizadas de células en división activa, los cuales se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante. En las figuras 9C y D se puede observar el corte longitudinal de yema formada en los medios MO3, MO4 y MO5 a partir de callo organogénico, y se observa la conexión vascular existente entre el brote y el tejido de origen (callo).

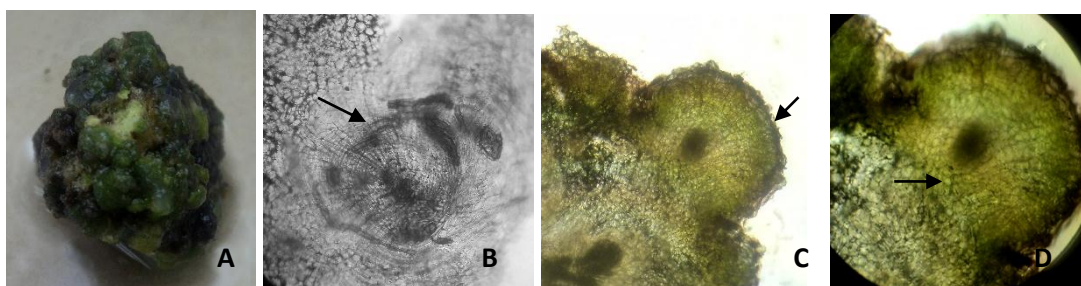


Figura N° 9. A. Callo compacto y organogénico formado en la base de los microesquejes B. Células del callo y meristemoide (→) C. Corte transversal que muestra las células del callo y la formación de un brote a partir del mismo (→) D. Detalle de la conexión vascular entre el callo y el brote (→)

2.2.1 Regeneración *in vitro* de los callos formados durante la multiplicación.

Posterior al proceso de multiplicación *in vitro*, se aislaron los callos organogénicos que se habían formado en la base de los microesquejes, y se cultivaron en medios de regeneración, para que los brotes obtenidos de forma indirecta continuaran su elongación y desarrollo en plantas completas.

A los dos meses de cultivo, no se obtuvo ninguna respuesta de desarrollo en ninguno de los medios probados, los cuales eran medios sin reguladores de crecimiento, un medio con 1 mg/l BA y un medio con 2 mg/l BA (Figura 10).



Figura N° 10. Callos organógenicos, que se habían formado en la base de los microesquejes, cultivados en medios de regeneración sin obtener respuesta hacia la formación de plantas.

3. Embriogénesis somática *in vitro* a partir de segmentos de cotiledones de *Helianthus annuus* L.

3.1 Inducción del proceso de embriogénesis somática.

Se aislaron segmentos longitudinales de cotiledones de las plantas germinadas *in vitro*, y se cultivaron en un medio MS con 1 mg/l de 2,4D para la inducción de la embriogénesis somática (Figura 11A).

En los cotiledones provenientes de las plantas germinadas *in vitro* se obtuvo un 92% de explantes libres de contaminación.

A las cuatro semanas de cultivo, en el medio con 1 mg/l de 2,4D (MSE), y bajo condiciones de oscuridad, se comenzaron a observar cambios morfológicos en los cotiledones, tal como el engrosamiento y deformación de dicho tejido cotiledonar. Apreciándose siete semanas después la formación de embriones somáticos en estado

globular en la cara adaxial del 70 % de los cotiledones (Figura 11B). El promedio de embriones/explante fue de 29. Los embriones obtenidos eran de color blanquecino a transparente, de superficie lisa y brillante, tamaño aproximado de 1-2mm² (Figura 11C), y podían ser extraídos con facilidad del tejido circundante que les dio origen (cotiledón).



Figura N° 11. **A.** Cultivo de segmentos longitudinales de cotiledones. **B.** Segmento de cotiledón mostrando formación de embriones en la cara adaxial (→). **C.** Detalle de un grupo de embriones somáticos (→) formados en la superficie del cotiledón.

A través de un estudio anatómico, se pudo observar que los embriones somáticos estaban constituidos por células pequeñas isodiamétricas, con paredes celulares definidas y contenido citoplasmático denso (Figura 12). Cuando se realizó un corte transversal del cotiledón después de la formación de los embriones, pudimos comprobar que éstos se originaron de manera directa, sin la formación previa de callo (Figura 13), aunque en este mismo medio, pareció haber formación aparente de una pequeña porción de callo incipiente. Aparentemente las células que se dividen para dar origen a los embriones provienen del parénquima en empalizada (Figura 13B).

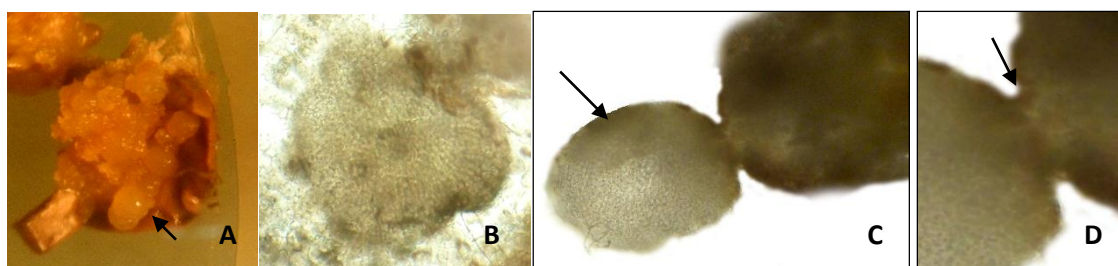


Figura N° 12. **A.** Grupo de embriones somáticos (→) formados en la superficie de un cotiledón. **B.** Macerado del tejido mostrando un embrión globular, constituido por células pequeñas isodiamétricas. **C.** Corte longitudinal de embrión globular (→) de *H. annuus* L. **D.** Detalle de ausencia de conexión vascular entre el embrión y el tejido que le dio origen (→).

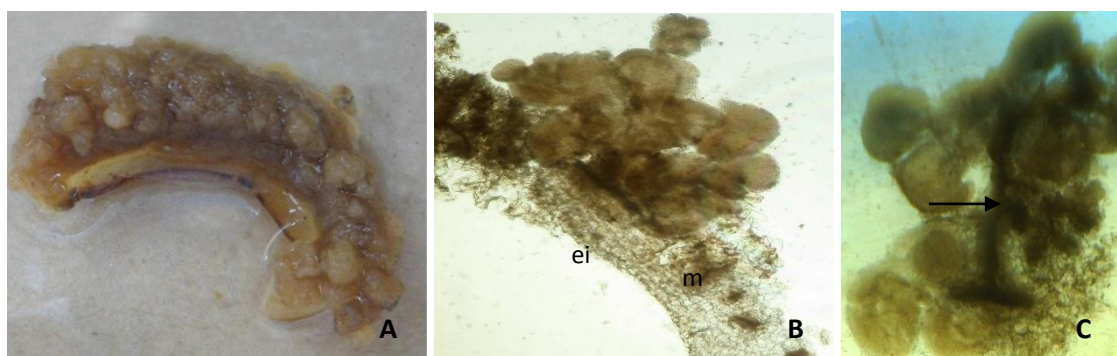


Figura N° 13. **A.** Formación de embriones somáticos (→) en un segmento del cotiledón, a los dos meses de cultivo. **B.** Corte transversal del cotiledón mostrando la formación de los embriones somáticos de forma directa. m: mesófilo, ei: epidermis inferior. **C.** Detalle anatómico de los embriones somáticos formados de manera directa alrededor de las nervaduras del cotiledón (→)

3.2 Desarrollo de los embriones somáticos

Después de 11 semanas de originados los embriones en estado globular en un medio con 2,4D, estos fueron aislados y trasladados, individualmente y en grupos, a cuatro medios distintos, para las subsiguientes etapas de desarrollo.

Los embriones que fueron cultivados de forma individual, a los dos meses de cultivo no mostraron ninguna respuesta morfogénica, en los medios de cultivo probados. Los

embriones globulares que fueron cultivados en grupos, en un medio sin reguladores de crecimiento (ME1) y en el medio con 2 mg/l de BA (ME4), no mostraron ninguna respuesta de desarrollo, a los dos meses de cultivo.

En los medios ME2 y ME3 se observó, a los tres meses de cultivo, la formación aparente de dos tipos de callo, sobre la superficie de los embriones globulares, uno de consistencia friable, de color blanco y beige (Figura 14A) y otro de color marrón de consistencia compacta (Figura 16). Cuando se realizó el estudio anatómico, se observó que el callo friable que era de un color blanco-beige, estaba formado por típicas células embriogénicas (Figura 14B y C), que no continuaron su desarrollo. También en este callo, se apreció la presencia de numerosas traqueidas espiraladas de forma globular (Figura 15B y C). Por otra parte, el callo compacto era organogénico (Figura 17C). A partir del callo organogénico se formaron brotes y en algunos casos raíces (17,4%) (Figura 17A y B). Cualitativamente, en el medio ME2 (2 mg/l K + 1 mg/l AIA) se formó mayor cantidad de callo embriogénico que de callo organogénico, con respecto al medio ME3 (1 mg/l BA + 0,5 mg/l ANA) donde hubo mayor formación de callo organogénico.



Figura N° 14. **A.** Formación de callo embriogénico beige, sobre la superficie de los embriones globulares, en un medio MO2, a los tres meses de cultivo (→). **B.** Formación de típicas células embriogénicas (→). **C.** Detalle de las células embriogénicas, se observan pequeñas, isodiamétricas, con paredes celulares definidas y contenido citoplasmático denso (→).

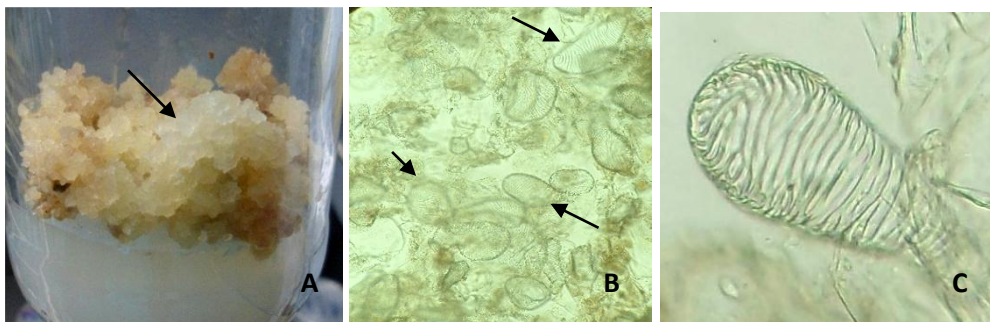


Figura N° 15. A. Formación de callo embriogénico blanco, en un medio MO2, a los tres meses de cultivo (→). B. Formación de numerosas traqueidas (→). C. Detalle de una traqueida espiralada de forma globular.



Figura N° 16. Formación de callo compacto y marrón sobre la superficie de los embriones globulares, a los tres meses de cultivo (→)

3.2.1 Organogénesis a partir de los embriones somáticos formados en *Helianthus annuus* L.

En el caso del callo compacto, formado a partir de los embriones globulares, a los tres meses de cultivo, se apreció a simple vista en los medios ME2 y ME3 la formación, a partir del callo, de estructuras esféricas de color verde (Figura 17A). En un corte anatómico se identificaron estas estructuras como brotes (Figura 17C), los cuales permanecieron dormantes, a pesar de realizarse varios subcultivos durante 2 meses, en el

medio ME3, y de ser transferidos a un medio MS sin reguladores de crecimiento, y ser mantenidos en este medio durante 2 meses.

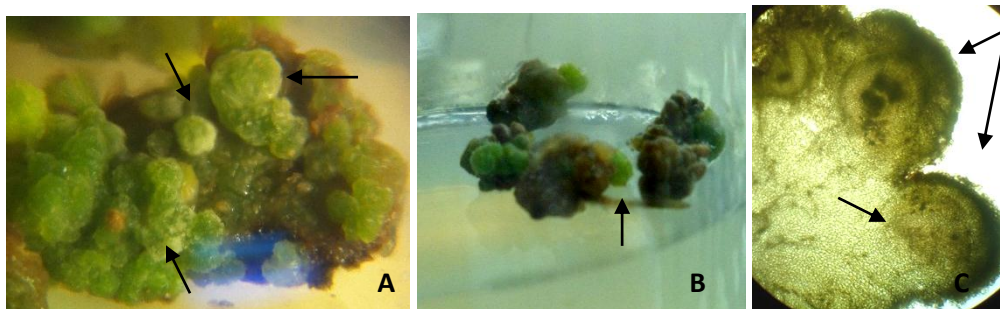


Figura N° 17. A. Detalle de los brotes formados en medio MO3, a los tres meses de cultivo (→). **B.**

Detalle de una raíz (→) desarrollada a partir del callo organogénico en medio MO3, a los tres meses de

cultivo. **C.** Detalle anatómico de un corte transversal del brote (→) y de las células de callo que le dieron

origen, se observa la conexión vascular entre el callo y el brote (→)

4. Caracterización anatómica de tallos y hojas de plantas de *Helianthus annuus* L.

En este estudio con *H. annuus* L., se realizó una comparación anatómica de hoja y tallo de: una planta obtenida en tierra, a partir de la germinación de semillas utilizadas en este estudio, una planta micropropagada *in vitro* y la planta micropropagada exhibiendo características de hiperhidricidad.

4.1 Tallo

En un detalle de la epidermis, de una planta de *H. annuus* L. obtenida en tierra, se observa que posee células más o menos grandes, simétricas, y con cutícula más o menos gruesa (Figura 18A), seguidas por un colénquima lagunar. En la planta normal de *H. annuus* L. mantenida *in vitro*, la anatomía es muy similar a la anterior, pero con una epidermis y colénquima más delgado (Figura 18B), mientras que en la planta

hiperhidratada obtenida *in vitro*, se observa una epidermis de superficie papilosa, constituida por grandes células, y las células que corresponde al colénquima no se encuentran engrosadas (Figura 18C).

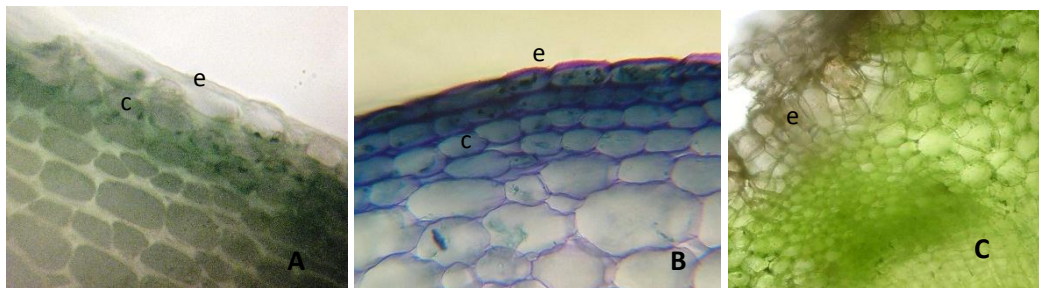


Figura N° 18. Cortes transversales del tallo de *H. annuus*, mostrando en detalle el colénquima y la epidermis. (400X) **A.** Planta de *H. annuus* L. obtenida en tierra. **B.** Planta normal de *H. annuus* L. mantenida *in vitro*. **C.** Planta hiperhidratada obtenida *in vitro*. e: epidermis. c: colénquima.

En *H. annuus* L., la planta obtenida en tierra, posee unos haces vasculares, colaterales y abiertos, y se observa un gran casquete de esclerénquima por encima del floema, y un cámbium vascular que se extiende a través de los rayos medulares. Existe una gran porción de médula y los haces vasculares están dispuestos en un anillo y muy cercanos al exterior (Figura 19A). En la planta normal mantenida *in vitro*, la anatomía es muy parecida a la anterior, pero el casquete de esclerénquima es más reducido, al igual que la porción de xilema (Figura 19B y C). Por su parte, el tallo de la planta hiperhidratada *in vitro*, muestra muy poca lignificación en el xilema, y las células que corresponden al casquete de esclerénquima no están lignificadas. El xilema presenta muy pocos vasos, rodeados por una gran cantidad de parénquima (Figura 19D).

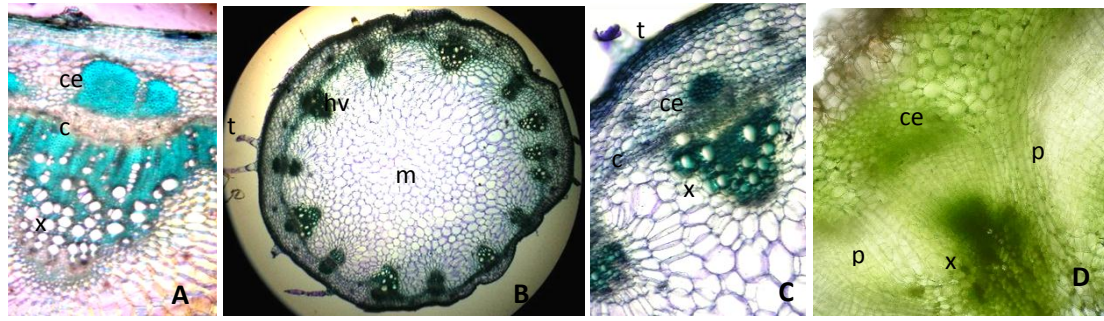


Figura N° 19. Cortes transversales del tallo de *H. annuus* L. **A.** Planta de *H. annuus* L. obtenida en tierra (150X) **B y C.** Planta normal de *H. annuus* L. *in vitro*. B: (40X); C: (100X) **C.** Planta hiperhidratada *in vitro*. ce: casquete de esclerenquima. c: cámbium. x: xilema. hv: haz vascular. m: médula. t: tricoma. p: parénquima.

4.2 Hoja

En la planta de *H. annuus* L. obtenida en tierra, la epidermis superior es más gruesa que en la planta normal y la planta hiperhidratada obtenidas *in vitro*. Igualmente, en esta planta, hay más abundancia de tricomas, tanto glandulares como en forma de látigo y todos son pluricelulares y se encuentran distribuidos en forma regular por toda la superficie de ambas epidermis (Figura 19A). Por otra parte, la epidermis inferior de la planta hiperhidratada *in vitro*, es muy delgada y con células papilosas (Figura 19C)

La hoja de *H. annuus* L., es bifacial o dorsiventral ya que el parénquima en empalizada sólo está en el lado superior. En un detalle del mesófilo, de la planta obtenida en tierra, se observa como el parénquima en empalizada está distribuido en dos capas (Figura 19A), mientras que en las otras solo hay una capa, cuando esta presente.

El parénquima esponjoso de *H. annuus* L., es más o menos compacto con pocos espacios intercelulares, y se logra observar ésta característica en la planta obtenida en tierra y la normal *in vitro* (Figura 19A y B). En la planta hiperhidratada obtenida *in vitro*,

hay más cantidad de parénquima esponjoso, el cual se encuentra desorganizado, y los espacios intercelulares son más grandes, conllevando a un incremento del volumen celular con respecto a las hojas normales *in vitro* o a las de tierra (Figura 19C).

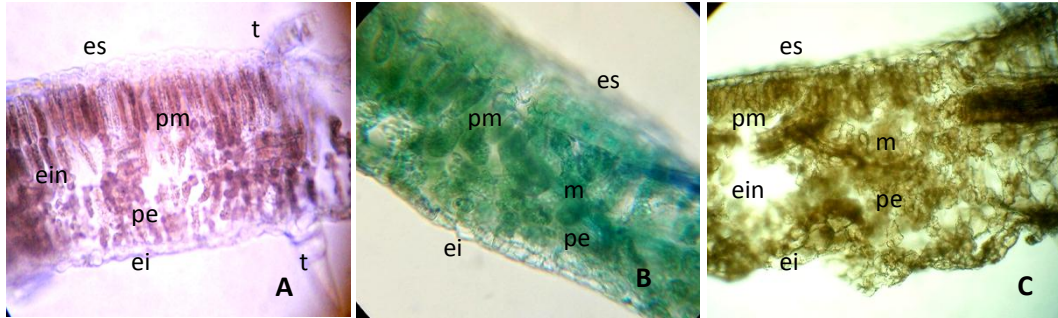


Figura N° 19. Cortes transversales de la hoja de *H. annuus* L. **A.** Planta de *H. annuus* L. obtenida en tierra (300X) **B y C.** Planta normal de *H. annuus* L. mantenida *in vitro*. **C.** Planta hiperhidratada obtenida *in vitro*. es: epidermis superior. pm: parénquima en empalizada. pe: parénquima esponjoso. ei: epidermis inferior. t: tricoma. ein: espacio intercelular.

Los haces vasculares, en las hojas de *H. annuus* L. obtenidas en tierra, están dispuestos a lo largo del tejido de forma uniforme, y son igualmente colaterales, y en un detalle del nervio central, se observa que, de forma similar al tallo, se distingue que después de la epidermis existen dos o tres capas de colénquima, seguido por parénquima (Figura 20A y B), pero en la planta hiperhidratada *in vitro* no hay presencia de colénquima después de la epidermis y el parénquima esta constituido por células muy grandes, aumentando el volumen celular del nervio central, en comparación con las otras hojas (Figura 20C).

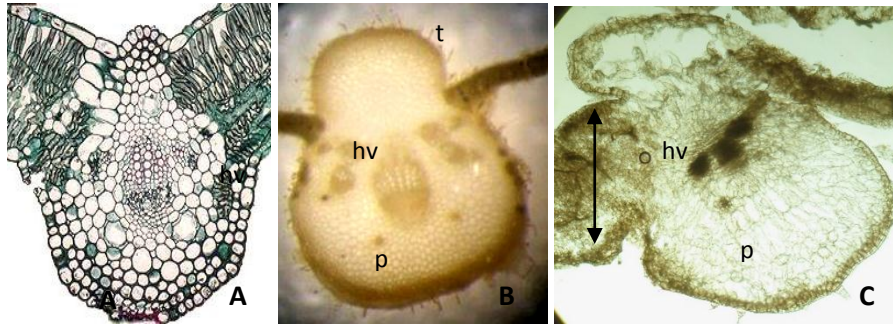


Figura N° 20. Cortes transversales de la hoja de *H. annuus* L., en un detalle del nervio central. (300X) **A y B.** Planta de *H. annuus* L. obtenida en tierra. (A: Esquema representativo). **C.** Planta hiperhidratada obtenida *in vitro*. Engrosamiento del mesófilo (↔) hv: haz vascular. t: tricomas. p: parénquima.

Observando en detalle los tricomas de las plantas de *H. annuus* L. obtenidas en tierra, visualizamos un tricoma en forma de látigo y otro glandular, que presentan una base pluricelular de donde nacen varias células de paredes delgadas dispuestas en forma uniseriada (Figura 21). Los tricomas, tanto en tallos como en hojas, de las plantas de *H. annuus* L., son iguales anatómicamente, pero varían en número, dependiendo de las distintas condiciones de cultivo.

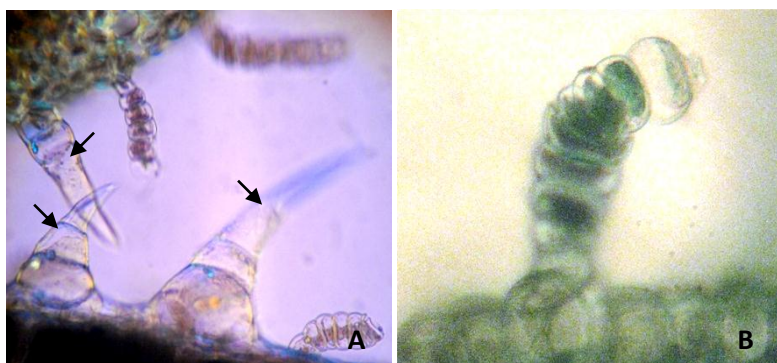


Figura N° 21. Cortes transversales de hoja de *H. annuus* L., obtenida en tierra. Detalle de tricomas pluricelulares. **A.** variedad de tricomas y diferencias de tamaño. Tricoma en forma de látigo (→) (150X) **B.** Detalle de tricoma glandular (300X).

5. Enraizamiento

Después del proceso de multiplicación *in vitro*, los brotes que se desarrollaron en los medios MO3, MO4 y MO5, y que tenían una altura entre 1,5-2 cm, fueron cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento (MS1) y en un medio con 1 mg/l ANA (MS2), para promover la formación de raíces, sin embargo, no hubo formación de raíces en MS1 y en MS2 el porcentaje fue bajo, del 18,75%, observándose además un 72,7% de muerte en los brotes a las cuatro semanas de cultivo, para ambos medios, dificultando la transferencia de las plantas a tierra.

6. Aclimatización.

Del total de 5 plantas de *H. annuus* L. que formaron raíces en el medio MO2 (2 mg/l K + 1 mg/l AIA), y que fueron transferidas a tierra y mantenidas en los propagadores, se obtuvo un 0% de sobrevivencia al final de los 7 días que duró el período de aclimatación.

DISCUSIÓN

1. Germinación *in vitro* de semillas de *Helianthus annuus* L.

La germinación *in vitro* del 82 % de las semillas ocurrió en un período de 1 a 3 días, seguido por un rápido crecimiento, y un desarrollo temprano de los cotiledones y los primordios foliares, en un medio sin reguladores de crecimiento (medio MS1).

Resultados similares fueron encontrados en los trabajos de Ozyigit y colaboradores en el 2007, ya que tuvieron una frecuencia de germinación alrededor del 90 % para cinco genotipos de semillas de *H. annuus* L., que cultivaron en un medio MS sin reguladores de crecimiento. Asimismo, Rodríguez y colaboradores en el 2008^a, observaron porcentajes de germinación superiores al 72 % cuando colocaron semillas en un medio MS (1/2), sin reguladores de crecimiento. Mientras Gómez y colaboradores en el 2010, intentaron germinar embriones cigóticos del híbrido *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia* adicionando al medio de cultivo una citoquinina BA (0,5-1 mg/l), donde obtuvieron sólo el 9,3 % de germinación. Otros investigadores también encontraron altos porcentajes de semillas germinadas, con el empleo de medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (Fiore y col, 1997; Gurel y Kazan, 1998; Mayor y col, 2003; Vega y col, 2006; Vega y col, 2007).

2. Multiplicación y organogénesis *in vitro* de microesquejes de *Helianthus annuus* L.

Los microesquejes cultivados en el medio sin reguladores de crecimiento (MO1) formaron plantas con el mayor crecimiento (6 cm de altura) con respecto a los otros medios probados, sin embargo, en este medio también se observó el más alto porcentaje

de plantas con formación prematura de botones florales en los ápices (42 %). La aparición prematura de botones florales en las plantas de girasol cultivadas *in vitro*, es una característica observada por muchos autores en sus estudios, y algunos lo consideran como un aspecto indeseable, porque disminuye las probabilidades de obtener semillas funcionales en la descendencia. (Zorzoli y col, 1994 citado en Rodríguez y col, 2008^a; Marchenko, 2005; Sujatha y col, 2012^b). Adicionalmente por ser una planta anual, el proceso de floración, conlleva a la muerte del organismo.

En MO1 no se observaron plantas con apariencia de hiperhidricidad, pero en los medios con reguladores de crecimiento, utilizados en el proceso de multiplicación, se encontraron plantas exhibiendo esta característica, lo cual pudiera sugerir, que el uso de reguladores de crecimiento, en este estudio, este asociado a la aparición de este tipo de alteraciones, lo cual es muy frecuente en el cultivo *in vitro* de girasol.

Igualmente, en el medio MO2 (2 mg/l K + 1 mg/l AIA) los microesquejes no presentaron ninguna respuesta hacia la multiplicación, con los menores porcentajes de hiperhidricidad (20 %) y aparición de botones florales (11 %) en relación con los otros tratamientos.

Los medios que presentaron una respuesta positiva en la etapa de multiplicación (MO3, MO4, MO5), estaban suplementados con Benciladenina (BA) y ácido nalftalenoacético (ANA), con resultados similares, aunque mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico, observándose el mayor % de multiplicación (80,5 %) en el medio con 1 mg/l BA + 0,5 mg/l ANA (MO3), y el mayor número de brotes/explante (2,7) se consiguió en el medio con 2 mg/l BA (MO5).

Diversos estudios sobre el cultivo *in vitro* de girasol, utilizan diferentes concentraciones de citoquininas (BA y K) y auxinas (AIA y ANA) como reguladores de crecimiento, para promover la organogénesis y la multiplicación de brotes.

Abdoli y colaboradores (2007), Vega y colaboradores (2006, 2007) y Sujatha y colaboradores (2012^b), obtuvieron altos porcentajes (55 %, 81,7 %, 94 %, 70 %) de respuesta organogénica directa a partir de cotiledones de diferentes genotipos de *H. annuus* L., con la adición al medio de cultivo de diferentes combinaciones de citoquininas (BA, K) a concentraciones de 1 y 2 mg/l, y auxinas (ANA, AIA) a 1 mg/l.

Gómez y colaboradores en el 2010, lograron una alta multiplicación de brotes en *H. annuus* L. x *Tithonia rotundifolia* a partir de microesquejes, con el uso solo de citoquinina BA (0,1 y 0,5 mg/l) sin adicionar algún tipo de auxinas al medio de cultivo.

2.1 Efecto del nitrato de plata (AgNO₃) y la caseína hidrolizada, sobre la hiperhidricidad y la floración prematura en plantas de *H. annuus* L. micropropagadas.

En esta investigación se observaron plantas con apariencia hiperhídrica y plantas con formación prematura de botones florales en los ápices, y muchos investigadores lo ven como aspectos indeseables, siendo un problema frecuente en los sistemas de cultivo *in vitro* de girasol, y en ciertos casos impide el establecimiento de las plantas micropropagadas (Fauguel y col, 2008; Rodríguez y col 2008^b). Gaspar 1986, sugiere que estos desordenes fisiológicos están asociados a la presencia de altos niveles de etileno.

Se han encontrado buenos resultados en la disminución de estas características, con la incorporación de nitrato de plata (AgNO₃) al medio de cultivo en los estudios realizados, en girasol, por Rodríguez y col 2008^b; Mayor y col 2001; Mayor y col 2003;

y con nitrato de plata y caseína hidrolizada en los estudios de Vasic y col 2001; Mayor y col 2003.

El nitrato de plata ha sido empleado extensivamente para la multiplicación de brotes *in vitro* en *Cichorium intybus*, de la familia de las asteráceas, (Bais y col, 2000), dado su solubilidad en agua, y su efecto no tóxico cuando es empleado en concentraciones adecuadas (Beyer, 1976 citado por Kumar y col, 2009). Se ha señalado que al emplear el nitrato de plata, el ión juega un papel importante en la reducción de la actividad del etileno, pero no inhibe su síntesis, favoreciendo el crecimiento de las plantas, principalmente el área foliar y disminuyendo la hiperhidricidad. (Zhang y col, 2006; Kumar y col, 2009).

En nuestro estudio, con la adición al medio de cultivo de 1 mg/l de nitrato de plata y 500 mg/l de caseína hidrolizada, se evidenció la disminución del efecto del etileno y de la aparición prematura de botones florales, al observar un mejor desarrollo de las plantas, en todos los tratamientos, en cuanto a porte, tamaño y morfología de las hojas.

Vasic y colaboradores en el 2001, Mayor y colaboradores en el 2003, al utilizar 2 y 1 mg/l de nitrato de plata, combinado con caseína hidrolizada (3 g/l y 500 mM), lograron mejorar cualitativamente y cuantitativamente el problema de hiperhidricidad en las plantas de girasol regeneradas por cultivo *in vitro*.

Rodríguez y colaboradores (2008^b), lograron el control de la hiperhidricidad y de la formación de botones florales, adicionando al medio de cultivo 0,34 mg/l de nitrato de plata, obteniendo sólo 12 % de plantas de *H. annuus* L. con aspecto hiperhídrico y 10 % con formación de botones florales.

Aunque la concentración óptima de estos compuestos está directamente relacionada con el genotipo, para el caso del nitrato de plata, se han obtenido resultados

similares en la micropropagación de *Zinnia angustifolia* cv *Starbright*, de la familia de las asteráceas, con una concentración de 2 mg/l de nitrato de plata (Anantasaran y Kanchanapoom, 2008).

La hiperhidricidad también es asociada al tipo y concentración de agente gelificante (Debergh, 1983; Ziv y Halevy, 1983; Pierik, 1990). Sin embargo, Abdoli y colaboradores (2007), en un estudio de organogénesis directa a partir de cotiledones de *H. annuus* L., evaluaron tres concentraciones de agar (4, 6 y 8 g/l), y encontraron que el porcentaje de brotes hiperhídricos es mayor cuando la concentración de agar disminuye, para la concentración de 4 g/l de agar obtuvieron 53,3 % de plantas hiperhídricos, en cambio con 8 g/l fue de solo 7,8 %.

En los estudios de girasol, la concentración de 8 g/l de agar es muy utilizada, indicando que, la hiperhidricidad frecuentemente observada en el cultivo *in vitro* de esta especie, no es un problema del tipo y concentración del agente gelificante.

2.2 Regeneración *in vitro* de los callos formados durante la multiplicación.

Para inducir el desarrollo de las yemas, secciones de los callos con yemas, que fueron formados en la base de los microesquejes, fueron cultivados en un medio MS sin reguladores de crecimiento, y en otros dos medios MS con 1 mg/l BA y otro con 2 mg/l BA, sin embargo, las yemas se mantuvieron en estado dormante en los 3 medios probados, a los dos meses de cultivo. Los brotes formados a partir de callo organogénico, no continuaron su elongación y desarrollo en plantas completas. Un resultado similar fue encontrado en los estudios de Sujatha y colaboradores (2012^b), quienes empleando un medio MS con 2, 1 y 0,5 mg/l de BA trataron sin éxito, de regenerar brotes a partir de callo organogénico obtenido de diferentes explantes (cotiledones, hipocótilos y raíces) de

girasol. Por otra parte, Ozyigit y colaboradores (2007), para la regeneración de los callos organogénicos obtenidos a partir del cultivo de hipocótilos y segmentos de cotiledones de *H. annuus* L., utilizaron un medio MS sin hormonas, donde no obtuvieron ninguna respuesta de regeneración, y un medio MS con 1 mg/l BA y 0,5 mg/l ANA, en donde hubo respuesta con diferente magnitud hacia la formación de brotes en todos los genotipos empleados, concluyendo que el genotipo fue un factor importante en la respuesta de inducción de callo y la organogénesis indirecta. Rodríguez y colaboradores (2008^a) y Sujatha y colaboradores (2012^b) también evidenciaron en girasol, que el genotipo juega un papel importante en la respuesta hacia el crecimiento de los callos obtenidos, como en lo referido a la capacidad de regeneración de los cultivos.

Se sabe que uno de los factores importantes que determinan el éxito en los sistemas de propagación *in vitro*, son el genotipo de la planta madre de donde aislamos el explante. En el caso del girasol, la cual es una especie recalcitrante, la regeneración de plantas completas está influenciada por las condiciones de cultivo, pero principalmente por el genotipo y por sus interacciones con el medio de cultivo.

3. Embriogénesis somática *in vitro* en segmentos de cotiledones de *Helianthus annuus* L.

3.1 Inducción del proceso de embriogénesis somática

El 70 % de los explantes (cotiledones) respondieron hacia la formación de embriones somáticos en estado globular, a las siete semanas de cultivo, en el medio de inducción (1 mg/l 2,4D), y de manera directa. Se obtuvo un alto promedio de embriones/explante (29) en el medio de inducción de la embriogénesis somática.

Fiore y colaboradores (1997) y Gurel y Kazan (1998), en sus investigaciones con girasol, utilizaron con éxito secciones transversales del cotiledón como explantes para

obtener embriones somáticos, mientras que Laparra y colaboradores (1997) y Fambrini y colaboradores (2006), utilizaron hojas obtenidas de plantas *in vitro*.

McCann y colaboradores (1988), obtuvieron la formación de embriones somáticos, cultivando embriones zigóticos inmaduros de girasol, en un medio Gamborg's suplementado con 2 mg/l de 2,4D y 1,3 mg/l de ABA.

El contenido endógeno y la aplicación exógena de auxinas son factores determinantes durante la inducción de la embriogénesis somática. Ha sido reportado que el uso de 2,4D en el medio incrementa los niveles endógenos de auxina en el explante y está relacionado con el desarrollo de la simetría bilateral del embrión somático (Schiavone y Cooke, 1987, citados por Jiménez, 2001). Sin embargo, varios investigadores han inducido embriogénesis somática a partir de cotiledones y hojas en *H. annuus* L., con el empleo de citoquininas combinadas con otras auxinas distintas al 2,4D (Fiore y col, 1997; Laparra y col, 1997; Gurel y Kazan, 1998).

En nuestra investigación, el proceso de embriogénesis somática ocurrió por vía directa, a partir de cotiledones. Otros investigadores en su estudio con girasol obtuvieron la formación de embriones somáticos de forma directa (McCann y col 1988; Gurel y Kazan, 1998; Fambrini y col, 2006).

La respuesta embriogénica de un explante hacia la vía directa o indirecta dependerá de la determinación de la célula o del potencial embriogénico, en caso de que la célula inicie un programa de expresión de los genes embriogénicos y un estímulo de la división celular pueda ser suficiente para la formación de un embrión somático, se llevará a cabo el proceso de embriogénesis somática directa a partir de células determinadas preembriogénicas (CsDPE) (Gómez, 1998; Jiménez, 2001).

Según Gómez (1998^b), el desarrollo directo de embriones desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo, es producto de la función realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante.

3.2 Desarrollo de los embriones somáticos

En la presente investigación, no se logró la formación de plantas completas provenientes de los embriones obtenidos en el medio con 2,4D, sin embargo, se obtuvo la formación abundante de callo embriogénico y de callo organogénico. En el callo embriogénico, se formaron nuevas células embriogénicas, que pueden dar origen a nuevos embriones, y también se formaron numerosas traqueidas. Las traqueidas son uno de los elementos conductores del xilema, junto con los vasos (Lindorf y col, 1991).

Otros investigadores han logrado las diferentes etapas de desarrollo de la embriogénesis somática en *H. annuus* L. (McCann y col, 1988; Pugliesi y col, 1993; Laparra y col, 1997; Fiore y col, 1997; Gurel y Kazan, 1998; Fambrini y col, 2006).

La respuesta morfogénica de los embriones somáticos fue muy escasa, posiblemente asociado al proceso de habituación, ocasionado por el contacto de los explantes con la auxina 2,4D por largos períodos de tiempo, requeridos para la inducción de la embriogénesis somática. Buchheim y col (1989), sugieren que en esta etapa puede ser necesaria la adición de carbón activado al medio de cultivo para remover la mayor cantidad de auxina como sea posible de los embriones somáticos, o realizando subcultivos periódicamente.

Por otra parte, el hecho de que se observó una mayor respuesta morfogénica, en los casos en que los embriones eran mantenidos en grupos, se debe a la interacción positiva entre las plantas, conocida como efecto nodriza, el cual es un fenómeno bien conocido en la botánica y la ecología, que también se presenta en condiciones *in vitro*.

Consiste en que una planta o grupo de plantas proveen de protección a sus plántulas vecinas en un ambiente estresante, mientras realizan conjuntamente su crecimiento (Muller, 1953; citado en Gutiérrez y Squeo, 2004).

3.2.1 Organogénesis a partir de los embriones somáticos formados en *Helianthus annuus* L.

En esta investigación, con la idea de que, los embriones somáticos en estado globular continuaran las siguientes etapas de desarrollo, estos fueron cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento y en medios con BA y ANA y con AIA y K, lo cual no sucedió, ya que se observó la formación de callo organogénico sobre la superficie de los embriones somáticos, apreciándose la formación más abundante de callo, brotes y raíces, en el medio con 1 mg/l BA con 0,5 mg/l ANA.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células, ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos dependiendo fundamentalmente del balance citoquininas/auxinas (Gómez, 1998^a).

Algunos investigadores, en sus estudios de embriogénesis somática en girasol, obtuvieron la formación de más de una estructura cuando colocaban distintos explantes en un medio para inducir la embriogénesis somática, sugiriendo que estas células contienen la información genética necesaria para dar más de una respuesta morfogénica en un mismo explante y medio de cultivo (Pugliesi y col, 1993; Gurel y Kazan, 1998; Fambrini y col, 2003 y 2006).

A diferencia de otros cultivos, el girasol es una de las especies más recalcitrantes para el cultivo de tejidos y transformación génica, por lo que el desarrollo de protocolos adaptables a genotipos de interés comercial, sigue siendo un desafío, ya que la respuesta

del girasol al cultivo *in vitro* depende de variables como el genotipo, tipo de explante y medios de cultivo. Además presenta problemas como floración *in vitro* e hiperhidratación, que limita el establecimiento y maduración de las plantas regeneradas, disminuyendo la eficiencia del protocolo establecido. También se debe acortar la etapa *in vitro*, de 60 a 45 días para reducir notablemente la hiperhidratación y la floración prematura (Circosta y col, 2007).

4. Caracterización anatómica de tallos y hojas de plantas de *Helianthus annuus* L.

En esta investigación con *H. annuus* L., al realizar una comparación anatómica de hoja y tallo de, una planta obtenida en tierra, la planta micropropagada *in vitro* y la planta exhibiendo características de hiperhidricidad, se encontraron ciertas diferencias en los tallos y hojas estudiados.

4.1 Tallo

En *H. annuus* L., la anatomía de las plantas cultivadas en tierra ha sido descrita, y poseen un tallo con una epidermis con células más o menos grandes, de forma simétrica, y con cutícula más o menos gruesa (Ruiz y col, 1958). Los tallos herbáceos, como el de *H. annuus* L., suelen ser verdes porque debajo de la epidermis conservan parénquimas clorofílicos, (Ruiz y col, 1958) y en la corteza, poseen colénquima y clorénquima alternados, el cual es propio de este tallo (Metcalf y Chalk, 1950). El colénquima, el cual es un tejido de sostén, es lagunar en *H. annuus* L., de acuerdo al engrosamiento de las paredes, el cual es generalmente en los espacios intercelulares. (Metcalf y Chalk, 1950; Valla, 2007). Luego continua con un gran casquete de esclerénquima por encima del floema y el cámbium vascular se extiende a través de los rayos medulares, y le dan la característica de haz vascular colateral abierto, el cual se distribuye uniformemente,

dándole la característica de dicotiledónea en crecimiento secundario (Metcalf y Chalk, 1950; Roth, 1980).

4.2 Hoja

Igual que en el tallo, la anatomía de las hojas de plantas de *H. annuus* L., cultivadas en tierra ha sido descrita, señalando que la epidermis superior es más gruesa que la inferior, y el mesófilo, el cual se halla especializado como tejido fotosintético, se encuentra diferenciado en parénquima esponjoso y parénquima en empalizado, además la hoja es bifacial ya que el parénquima en empalizada sólo está en el lado superior y representa el tejido de asimilación, y en un detalle se observa como el parénquima en empalizada está distribuido en dos capas (Roth, 1980). El parénquima esponjoso, se caracteriza por presentar espacios intercelulares, facilitando el intercambio gaseoso y también posee cloroplastos tan abundantes como en el tejido anterior.

En la epidermis se encuentran los llamados derivados epidérmicos, conocidos como pelos o tricomas, que son muy abundantes en tallos herbáceos como el de *Helianthus*, pero son aún más abundantes en las hojas. Se originan por el crecimiento y diferenciación de una o varias células epidérmicas, quedando así unicelulares o pluricelulares. Los pelos contribuyen a aumentar la protección de la epidermis y también ayudan en la absorción de agua (Ruiz y col, 1958). Los tricomas glandulares, como los presentes en *H. annuus* L., sustentan elementos globulares que contienen sustancias resinosas o aceites esenciales.

Por otra parte, es bastante conocido que el fenotipo de las plantas que crecen en condiciones *in vitro* está caracterizado por presentar, respecto a aquellas desarrolladas en ambientes *ex vitro*, tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de tejidos mecánicos de soporte, incremento de contenido de

agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo (Denng y Donelly, 1993). Asimismo, en esta investigación dichas características fueron presentadas por aquellas plantas cultivadas y mantenidas *in vitro*, a las cuales se les realizó el estudio anatómico.

En general, las plantas que exhiben hiperhidratación, cuando son cultivadas *in vitro*, presentan las hojas con un parénquima en empalizada muy delgado, parénquima esponjoso con muchos espacios intercelulares, pobre desarrollo de la cutícula, poca lignificación y tejido vascular reducido. La lignificación defectuosa puede alterar extensibilidad de la pared celular, y reducir la presión de turgencia, permitiendo una mayor incorporación de agua. Otras malformaciones fisiológicas son baja fijación de dióxido de carbono, bajo contenido de clorofila y excesiva transpiración, producto de que los estomas se mantienen relativamente abiertos (Ziv, 1991).

Fauguel y colaboradores (2008), realizaron un análisis anatómico de los brotes normales e hiperhídricos que obtuvieron en el proceso de organogénesis directa *in vitro*, cuando cultivaron cotiledones de un híbrido de girasol, en un medio MS con 1 mg/l AIA y 2 mg/l K. En su estudio, encontraron que la estructura anatómica de hojas y tallos de plantas normales obtenidas *in vitro* no difirió de la de las plantas obtenidas en tierra. En contraste, las plantas hiperhídricas, obtenidas *in vitro*, presentaron varias anomalías anatómicas. El tallo mostró hipertrofia de la corteza y la médula, además de hipolignificación del sistema vascular. Las células estaban rodeadas por una delgada y poco rígida pared celular. Las hojas se mostraban engrosadas y malformadas, y en un detalle anatómico se evidenciaba un incremento en el volumen celular, presentando un laxo y desorganizado mesófilo, con haces vasculares alterados e hipolignificados. Además observaron falta de diferenciación entre parénquima empalizada y esponjoso, con una reducción del primero, llegando a estar en algunos casos ausente. Todas estas

características fueron observadas en nuestro análisis anatómico realizado en los tejidos de tallo y hoja hiperhídricos de *H. annuus* L.

5. Enraizamiento

En los medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (MS1) y con 1 mg/l de ANA (MS2), que se usaron para inducir el proceso de enraizamiento, de los brotes obtenidos en la multiplicación, se observó que el porcentaje de formación de raíces fue de 0% para MS1 y muy bajo para MS2 (18,75%), y además hubo un 72,7% de muerte en los brotes a las cuatro semanas de cultivo.

Mientras que con el uso de ANA (0,1 y 1 mg/l) algunos investigadores han logrado altos porcentajes (52%, 90% y 100%) de plantas de girasol enraizadas (Sujatha y col, 2012^a; Sujatha y col, 2012^b; Gómez y col, 2010).

También con el empleo de medios sin hormonas o adicionando 1 mg/l de IBA, Ozyigit y colaboradores en 2007, obtuvieron una alta eficiencia (95 y 100%) en el enraizamiento de plantas de girasol; pero en el medio con IBA las raíces tenían mayor grosor.

6. Aclimatización

Durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen en un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa (Agramonte y col, 1998).

La importancia de que se lleve a cabo la fase de aclimatización radica en lograr la adaptación de las plantas obtenidas *in vitro* a condiciones autótrofas, donde tendrán que

regular adecuadamente sus procesos de absorción, traslocación y transpiración de agua (Hurtado y Merino, 1987; Santa Cruz y col, 2006).

En esta investigación no se obtuvieron buenos resultados de aclimatización, en las plantas de *H. annuus* L. obtenidas *in vitro* por el proceso de multiplicación.

Sólo cinco plantas formadas en el medio MO2 (2 mg/l K + 1 mg/l AIA) que tenían la altura más alta (2 y 2,5 cm), y que formaron raíces, fueron pasadas directamente a tierra sin necesidad de ser transferidas a un medio de enraizamiento, observándose la muerte de las mismas a partir de los tres días de cultivadas.

Gómez y colaboradores (2010), señalan que se necesitan establecer tratamientos que permitan definir con claridad las condiciones específicas para aclimatar al girasol, a través de la prueba de diferentes mezclas de sustratos y soluciones nutritivas bajo condiciones ambientales controladas. La aplicación foliar de giberelinas o aminoácidos es planteada como una alternativa para lograr el desarrollo óptimo en esta etapa.

CONCLUSIONES

- La germinación *in vitro* de un 82 % de semillas de *Helianthus annuus* L., ocurrió a los 1-3 días en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.
- En los medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (MO1) y donde se adicionó 2 mg/L de K y 1 mg/L de AIA (MO2) los microesquejes de *H. annuus* L., no presentaron ninguna respuesta hacia la multiplicación.
- Los microesquejes de *H. annuus* L., mostraron respuesta hacia la multiplicación cuando los medios fueron suplementados con benciladenina (BA) y ácido naltalenoacético (ANA), (MO3, MO4, MO5), con promedios de 2,64 brotes/explantes, 2,52 brotes/explante y 2,7 brotes/explante respectivamente.
- Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre el número de brotes por explante observados en los 3 medios, pero si se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de multiplicación, siendo el mayor porcentaje de multiplicación (80,5%) en el medio MO3.
- En esta investigación se observó el fenómeno de hiperhidricidad y floración prematura en plantas de *H. annuus* L., obtenidas en el proceso de multiplicación *in vitro*.
- En el medio sin reguladores de crecimiento no se observaron plantas con características asociadas a la hiperhidricidad mientras que este fenómeno si se observó en plantas cultivadas en medios con reguladores de crecimiento. Encontrándose el mayor porcentaje (41,6%) de plantas con características hiperhídricas en el medio MO3 (1 mg/L BA + 0,5 mg/L ANA).

- El mayor porcentaje (42%) de plantas con floración prematura se observó en un medio sin reguladores de crecimiento.
- En la etapa de multiplicación *in vitro* a partir de microesquejes de *H. annuus* L., la adición a los medios de cultivo de 2 mg/l nitrato de plata y 500 mg/l de caseína hidrolizada, disminuyó la aparición de plantas con características de hiperhidricidad y de plantas con floración prematura.
- Evidencias histológicas demostraron que los callos formados en las bases de brotes en la etapa de multiplicación de *H. annuus* L., en los medios MO3, MO4 y MO5 eran de naturaleza organogénica.
- Las yemas formadas a partir de los callos organogénicos de *H. annuus* L., no lograron su desarrollo en ninguno de los tratamientos hormonales probados.
- A partir de segmentos de cotiledones de plantas *in vitro* de *H. annuus* L., cultivados en un medio suplementado con 1 mg/l de 2,4D, fue posible la producción de embriones somáticos, en estado globular (29 embriones/explantes), en un 70% de los explantes.
- Los estudios histológicos permitieron demostrar la embriogénesis somática a partir de segmentos de cotiledones de *H. annuus* L., y que esta ocurrió de manera directa, sin la formación aparente de callo.
- Los embriones globulares cultivados en los medios ME2 y ME3, no continuaron las siguientes etapas de desarrollo, a partir de estos se formaron dos tipos de callo, evidencias histológicas demostraron que estos eran callos de naturaleza embriogénica y organogénica.
- En los estudios histológicos no se encontraron diferencias anatómicas relevantes entre los tejidos de la planta obtenida en tierra, y la micropropagada *in vitro*, salvo las características propias de las plantas cultivadas *in vitro*.

- Con respecto a las plantas con apariencia normal producidas *in vitro* y las que presentaron características hiperhídricas, en los estudios histológicos se apreciaron varias diferencias anatómicas en tallos y hojas.
- Siendo *H. annuus* L. una especie considerada recalcitrante para el cultivo *in vitro*, en esta investigación se logró el establecimiento de un sistema de germinación, multiplicación, organogénesis y embriogénesis somática, a partir de microesquejes y segmentos de cotiledones.
- Con los sustratos y las condiciones empleadas en esta investigación, no se logró la aclimatización de plantas de *H. annuus* L. obtenidas *in vitro*, por el proceso de multiplicación.
- Se recomienda continuar con los estudios de organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en *H. annuus* L., a partir de microesquejes y segmentos de cotiledones.
- La metodología empleada en esta investigación, proporciona la base para el desarrollo de múltiples investigaciones en el país, dirigidas hacia el mejoramiento genético de esta importante especie.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdoli, M., Moieni, A. y Dehghani, H. 2007. Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annus* L.). Pak. J. Bot., 39(1).
2. Agramonte, D., Jiménez, F., Dita, M. 1998. Aclimatización. En: J.N. Pérez Ponce (ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba, p. 193-206.
3. Anantasaran, J., Kanchanapoom, K. 2008. Influence of medium formula and silver nitrate on *in vitro* plant regeneration of *Zinnia* cultivars. Songklanakarin Journal of Science and Technology 30.
4. Ávila, J. 2009. Manual para el cultivo del Girasol. Primera Edición. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA. Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Portuguesa. Araure, Venezuela. Serie B N° 20.
5. Ávila, J., Díaz, A., De la Cruz, R., Moreno, N., Romero, D., Cáceres, R., Gutiérrez, L. y colaboradores. 2007. Evaluación comparativa de híbridos de girasol (*Helianthus annus* L.) En dos zonas productoras de Venezuela. *Bioagro*.
6. Bais, H.P., Sudha, G.S., Ravishankar, G.A. 2000. Putrescine and AgNO₃ influences shoot multiplication *in vitro* flowering and endogenous titres of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv Lucknow local. Journal Plant Growth Regulation 19.

7. Box, M. 2005. Prontuario de Agricultura. Cultivos Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
8. Buchheim, J., Colburn, S., Ranch, J. 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plante growth. *Plant Physiol.* 89: 768-775.
9. Christianson, M. y Warnick, A. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Environmental Biology* v.95.
10. Circosta, A., Lareu, F., Candrea, A., Petruccelli, S. 2007. Optimización de un protocolo de regeneración *in vitro* de girasol (*Helianthus annuus*) adecuado para distintos genotipos comerciales. REDBIO-Chile.
11. Cortiza, M. y Pérez, R. 2009. El girasol. Sus posibilidades económico-productivas en el modelo de desarrollo agropecuario sostenible. *Agroecología*.
12. Debergh, P. 1983. Antheren en pollenkultuur voor het bekomen van haploide embryos van *Lycopersicon* sp. *Physiol Plant* 59, 270-276.
13. Denng, R., Donnelly, D. 1993. In vitro hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Can J Plan Sci* 73: 1105-1113
14. Díaz, R. E. 2007. Farmacología de Terpenoides de *Helianthus annuus* L. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 73: p. 725-746.
15. Díaz, Z.M., Duarte, G. A., Plante, E., Díaz, Z. 2003. El Cultivo de Girasol. ASAGIR (Asociación Argentina de Girasol).

16. Fambrini, M; Cionini, G; Conti, A; Michelotti V; Pugliesi, C. 2003. Origin and development *in vitro* of shoot buds and somatic embryos from intact roots of *Helianthus annuus* x *Helianthus tuberosus*. *Annals of Botany* 92: p. 145-151.
17. Fambrini, M; Durante, C; Cionini, G; Geri, C; Giorgetti, L; Michelotti V y colaboradores. 2006. Characterization of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. *Dev Genes Evol.* 216: p. 253-264.
18. Fauguel, C.M., Vega, T.A., Nestares, G., Zorzoli, R., Picardi, L.A. 2008. Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated *In vitro*. *HELIA*, 31, Nr. 48, p. 17-26 UDC 633.854.78:631.523
19. Fiore, M., Trabace, T., Sunseri, F. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons *via* somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports.* 16: p. 295-298.
20. Gaspar, T. 1986. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. En: Greppin H, Penel C y Gaspar T (Edt.) *Molecular and Physiological Aspects of plant peroxidases*, p. 455-468. Universidad de Geneva, Suiza.
21. Gómez, M.M., E.M., Reyes, V.H., Martínez, R.J., Escobedo, B, L., García, O.T. 2010. Rescate de embriones en híbridos intergénicos *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia*. *Acta Bot. Mex.* 93: 111-119.
22. Gómez, R. 1998^a. Cultivo de células y tejidos. En J. N Pérez Ponce (ed). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba, p. 25-44.

23. Gómez, R. 1998^b. Embriogénesis somática. En: J.N Pérez Ponce (Ed).
Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de
Biotecnología de las Plantas, Cuba, p.57-59.
24. Gurel, E. y Kazan, K. 1998. Development of an efficient plant regeneration system
in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Tr. J. of Botany. 22. 381-387. Tubitak.
25. Gutiérrez, J y Squeo, F. 2004. Importancia de los Arbustos en los Ecosistemas
semiáridos de Chile. *Ecosistemas*, 13 p.10
26. Hurtado, D. y Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, S.A
de C.V México D.F.
27. Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: J.N Pérez Ponce (ed).
Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de
Biotecnología de las Plantas, Cuba, p. 13-24.
28. Jimenez, V. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on
the role of endogenous hormones. Bras. Fisiol. Veg. 13: 197-223.
29. Krikorian, A. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. y Mroginski, L.A.
Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT,
Colombia, p. 95-125.
30. Kumar, V., Parvatam, G.Y., Ravishankar, G.A. 2009. AgNO₃ a potential regulator
of ethylene activity and plant growth regulator. Electronic Journal of
Biotechnology 12.
31. Laparra, H., Stoeva, P., Ivanov, P. and Hahne, G., 1997. Plant regeneration from
different explants in *Helianthus smithii* Heiser. Plant Cell Reports 16: 692-695.

32. León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Segunda Edición. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura IICA. San José. Costa Rica.
33. Lindorf, H., Parisca, L., Rodríguez, P. 1991. Botánica: Clasificación, Estructura y Reproducción. Ediciones de la Biblioteca de la U.C.V.
34. Litz, R y Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, W. y Mroginski, L.A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia, p. 143-172.
35. López, M. 1996. Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Tesis Doctoral de la Universidad Complutense de Madrid.
36. Lorenzo G.A. 2006. Producción de flores y verdes de corte I. Cultivo de Girasol para flor de corte (*Helianthus annuus*). Cátedra de Floricultura. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
37. Marchenko, O.A. 2005. Morphogenesis of in vitro culture tissues and immature germs of sunflower hibrids (*Helianthus annuus* L.). HELIA, 28, Nr. 42, p. 45-50, UDC 633.854.78:631.524.
38. Mayor, M.L., Nestares, G., Zorzoli, R., Ludueña, P. y Picardi. 2001. Shoot organogenesis derived from cotyledonary explants in sunflower (*Helianthus* L.). Redbio.
39. Mayor, M.L., Nestares, G., Zorzoli, R. y Picardi, L.A., 2003. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 72: p. 99-103.

40. McCann, A.W; Cooley, G; Van Dreser J. 1988. A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14: p. 103-110.
41. Metcalfe C.R, Chalk L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. Oxford. London. Vol II
42. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised médium for rapad growth and bioassays whith tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15.
43. Ozyigit, I.I., Gozukirmizi, N., Derman, S.B. 2007. Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) African Journal of Biotechnology Vol. 6 (13), p. 1498-1502.
44. Pierik, R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, España.
45. Pugliesi, C., Megale, P., Cecconi, F. y Baroncelli, S. 1993. Organogenesis and embryogenesis in *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* x *Helianthus tuberosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: p. 187-193.
46. Radonic, M.L. 2010. Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
47. Roca, W., Mroginski, L. 1991. Establecimiento de un laboratorio de tejidos vegetales. En: Roca, W. y Mroginski, L. A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia, p. 1-17.

48. Rodríguez, A., López, R., Sánchez, Y., Pérez, D., Marrero, N., Pérez, O., Llorente, O., y colaboradores. 2008^a. Aspectos sobre el cultivo in vitro de girasol abordados en el INIFAT. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”, Cuba.
49. Rodríguez, A., Sánchez, Y., Pérez, D., Marrero, N., Llorente, O., Brito, G. 2008^b. Regeneración directa a partir de cotiledones maduros de genotipos cubanos de girasol (*Helianthus annuus*). Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Revista Agrotecnia de Cuba.
50. Roth, Ingrid. 1980. Organografía comparada de las plantas superiores. Segunda Edición. Ediciones de la Biblioteca. Colección Ciencias Biológicas. Universidad Central de Venezuela.
51. Rout, G., Mohapatra, A., Mohan, S. 2006. Tissue Culture of Ornamental Pot Plant: A critical Review on Present Scenario and Future Prospects. *Biotechnology Advances*. 24: 531-560.
52. Ruiz, M., Nieto, D., Larios, I. 1958. Botánica. Quinta Edición. Editorial Porrúa. México.
53. Ruiz, T., Villalba, M., Vera, C. 2011. Análisis de producción del girasol (*Helianthus annuus* L.) y subproductos en el distrito de Yby Yaú, Departamento de Concepción. Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencia Agrarias, Filial Pedro Juan Caballero.
54. Ruiz, M., Nieto, D., Larios, I. 1958. Botánica. Quinta Edición. Editorial Porrúa. México.

55. Santa Cruz, S., Graciano, D., Batista, J., Aquino, T., Copati, L. 2006. Anatomía foliar de Plantas Micropropagadas de Abacaxi. *Pesq. Agrop. Brasil*, Brasília, 41: 185-194.
56. Sharp, W., Sondhal, M., Caldas, L., Maraffa, G. 1980. The Physiology of *in vitro* Asexual Embryogenesis. *Hort. Rev.* 2: 268-310.
57. Soto, E. 2006. El cultivo del girasol en Venezuela. *Revista Ceniap hoy* N° 9. Girasol en Venezuela.
58. Soto, E., Fernández, H. 1997. El girasol en Venezuela. FONAIAP-CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Departamento de Recursos Fitogenéticos. Maracay. FONAIAP DIVULGA N° 56.
59. Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Veera, R.P., Rao, C.S. 2012^a. *Agrobacterium* – mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Plant Cell Tiss Organ Cult.* DOI 10.1007.
60. Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Svaraj, N., Rao, C.S. 2012^b. Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 111: p. 359-372.
61. Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, organogénesis and plant regeneration. En: Dixon, R. (ed). *Plant Cell Culture a practical approach*. IRL Press, USA. p. 79-105.
62. Valla, Juan J. 2007. Botánica. Morfología de las plantas superiores. Primera Edición. Buenos Aires: Hemisferio sur, p. 352

63. Vasić, D., Škorić, D., Alibert, G., Miklič, V. 2001. Micropropagation of *Helianthus maximiliani* (Schrader) by shoot apex culture. *HELIA*, 24, Nr. 34, p. 63-68, UDC 633.854.78:631.535.6.
64. Vega, T.A., Nestares, G.M., Zorzoli, R. y Picardi, L. 2006. Responsive regions for direct organogenesis in sunflower cotyledons. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 28. N° 5. p. 427-431.
65. Vega, T.A., Nestares, G.M., Pratta, G; Zorzoli, R; Gattuso, S. y Picardi, L. 2007. Biocemical and histological changes associated with *in vitro* responses in sunflower cotyledonary explants. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 43:415-422.
66. Villalobos, V. 1990. Organogénesis. En: Rosell, C. y Villalobos V. (ed). Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO producción y protección vegetal.v. 105, p. 29-32.
67. Villalobos, V. y Thorpe, T. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. y Mroginski, L.A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia, p. 127-141.
68. Williams, E. y Maheswaran, G. 1986. Somatic Embryogenesis: Factor Influencing Coordinated Behaviou of Cell as Embryogenic Group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.
69. Zhang, Z.J., Li, H.Z., He, Y., Xu, L. 2006. Effect of silver nitrate on *in vitro* shoot growth and tuberization in *Solanum tuberosum* L. *Journal of Zhejiang University* 32.
70. Ziv, M., Halevy, A. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2: 55-65.

71. Ziv, M. 1990. Vitricación: morphological and physiological disorders of in vitro plants. Editado de: Debergh P.C y Zimmerman R.H. Kluwer Academic Publishers. p. 45-69.
72. Ziv, M. 1991. Micropropagation. Technology and application. Editado de: Debergh P.C y Zimmerman R.H. Kluwer Academic Publishers.

Consultas en línea

FEDEAGRO. Confederación Nacional de Asociaciones de Productores Agropecuarios.
<http://www.fedeagro.org/> [Consulta: 30 de abril de 2012]

FAO. 2010. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. <http://faostat.fao.org/?lang=es> [Consulta: 30 de abril de 2012]

Osuna [Stephanie](#). 2012. Expansión del Sector Floricultor en Venezuela. CONAPRI.
<http://www.conapri.org/ArticleDetailIV.asp?articleid=491395&CategoryId2=14538>.
[Consulta: 02 de junio de 2012]