



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

**Establecimiento de un Sistema de Embriogénesis
Somática y de Organogénesis *in vitro* en *Ananas
comosus* (L.) Merr.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Adriana Pineda Salazar como requisito
parcial para optar al título de Licenciado
en Biología.

Tutora: Dra. Teresa Edith Vargas.

CARACAS, VENEZUELA

SEPTIEMBRE – 2009

I. AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darme la vida, brindarme todas estas maravillosas oportunidades que hoy me hacen estar aquí ante ustedes, por haberme hecho nacer en mi hermosa familia y por haberme hecho nacer en este gran país llamado Venezuela.
- A esta Magna casa de estudios, la Universidad Central de Venezuela, a la cual estoy orgullosa de representar tal como lo hicieron y hacen mis padres y mis hermanos y de la que estaré eternamente agradecida pues en sus recintos me formé como estudiante, hice vida política, practiqué deporte, comí muchísimas veces en su comedor estudiantil y lo más importante, aprendí a amarla, defenderla y a llevarla por siempre en mi corazón.
- A mis padres, Ramón y Rosa. No existen palabras con las cuales pueda expresar mi gratitud hacia ustedes, quienes nunca dudaron en darme cuanto estuviera a su alcance para lograr que me convirtiera en la mujer que ahora soy y en lograr por encima de todas las cosas mi felicidad. Papá gracias por llevarme a clases todos los días desde que estaba en preescolar y a ti Mamá, gracias por entenderme cuando nadie más sabía cómo hacerlo. Los amo y lamento no demostrarlo siempre como debería.
- A mis hermanos Ramón, Scarlet, y Cheo. Ustedes han sido mi modelo a seguir, más que hermanos han sido mis padres y madre secundarios y sé cuánto me quieren. Infinitas gracias por todo el apoyo incondicional e incluso por los regaños oportunos que aún me dan. Los quiero muchísimo!
- A mi sobrina María Andreína quien con su alegría e inocencia me recuerda que la vida es mucho más bella de lo que a veces parece.
- A Adriana, Nathalie y Argenis. Ustedes han formado parte de mi vida por varios años y hemos vivido muchos buenos momentos. Gracias a todos.

- A Andrés, quien ha estado a mi lado desde hace más de dos años, haciéndome feliz y que además me ha ayudado mucho con los aspectos informáticos de mi tesis. Gracias negrito.
- A mi tutora Edith, mejor conocida como Pura. Eres una persona maravillosa en todos los aspectos, excelente investigadora, compañera de trabajo, docente, amiga y hasta consejera sentimental. Creo que de todo lo que viví en el laboratorio nada se compara con el valor de tu amistad, mil gracias por toda la confianza, cariño, paciencia, por no cansarte de decirme la misma cosa varias veces y por hacer muchísimo más de lo que otros tutores hacen por sus alumnos. También gracias a Joaquín, quien más de una vez me dio la cola hacia o desde el laboratorio y no se quejó conmigo cuando le tenía acaparada a la Pura.
- A mis amigas Gabriela, Erimar y Jamileth. A Gaby por ser mi amiga desde los primeros semestres de la carrera, donde compartimos muchas risas y algunas tristezas, sé que cuento contigo y tranquila que no falta mucho. A Eri por ser buena amiga, compañera de trabajo y hasta de deporte, a ustedes dos mil gracias por no fallarme en uno de los momentos más difíciles de mi vida, no sé que habría hecho sin ustedes. Y a Jami por ser una persona maravillosa, compañera de estudios y del herbario. Las quiero a todas!!! Gracias también a la señora Vicky (la mamá de Jami) por ese trato especial que me ha brindado y por la deliciosa torta de piña que tanto me gusta.
- A mis compañeros de laboratorio: Grecio, Amalia, Héctor, Luis, Alejandro, Jeanetvska y Maribel. Sin ustedes estos dos años en el laboratorio habrían sido muy distintos, especialmente sin Grecio y Héctor, que son los padres de mis embriones!
- A la Dra. Eva quien me abrió las puertas del laboratorio y siempre estuvo dispuesta a dedicarme tiempo, facilitarme separatas y a hacerme oportunas correcciones.
- A la Prof. Maira y los compañeros del Lab. de Mejoramiento Vegetal: Ana K., Sandra, Erick, Renaldo.

- A la cuchi Marcia, quien siempre me apoyó en la parte anatómica de mi tesis y estuvo allí cada vez que necesité de su ayuda.
- A mis amigos botánicos Rodmar y Oscar, con los que compartí varias materias, algunas muy buenas y otras de terror pero siempre recurríamos al compañerismo y al dicho de al mal tiempo buena cara.
- A mis compañeros de laboratorio de Eco2: Mariandre, Roma, Joxmer, La China y Ana. Gracias a ustedes la trauma trófica no fue tan traumática, un abrazo muchachos!
- A Maiz y Nuriángel, cada una por su parte me demostró que les apasiona lo que hacen y compartimos momentos muy gratos durante la carrera, gracias por todo el cariño que me brindaron.
- Al los profesores Jorge Pérez y Héctor Finol, dos profesionales de la biología a quienes admiro y respeto muchísimo y de quienes aprendí que un biólogo debe ser integral y aprender de la ecología, zoología y biología celular aún si lo que se quiere ser es botánico. Existen profesores como ustedes que ayudan a los alumnos aún sin proponérselo, en verdad mil gracias a los dos.
- Especiales gracias a Amalia (otra vez) y a Oranys, quienes desde los inicios de mi carrera vieron en mí un futuro botánico y con sus enseñanzas me transmitieron el amor a las plantas.
- A Melvin, Caín y Cristian. Gracias por tantos buenos momentos en los almuerzos donde discutíamos desde la fisicoquímica de las cotufas hasta del pie de manzana con chayota! Y Caín, mil gracias por ayudarme con la estadística de mi tesis.
- A la Prof. Gunta por demostrarme su afecto a pesar de alguno que otro regaño.
- Finalmente quiero agradecer a mis abuelas, al abuelo, a los tíos y tías, especialmente Ronald y Gerardo, a mi madrina, mi padrino, a mis primos, a los cuales aprecio y estarán por siempre en mi corazón.

ÍNDICE

I. Agradecimientos	i
II. Índice de tablas	vii
III. Abreviaturas utilizadas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Descripción botánica de <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	4
2.1.1 Taxonomía	4
2.1.2 Origen	4
2.1.3 Morfología y Anatomía	4
2.2 Importancia económica	5
2.3 Cultivo tradicional de la piña	7
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de la piña	7
2.4.1 Micropropagación clonal	7
2.4.1.1 Micropropagación clonal mediante yemas y microesquejes	9
2.4.1.2 Organogénesis	12
2.4.1.3 Embriogénesis Somática	14
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo General	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Material Vegetal	20
4.2 Obtención del explante	20
4.3 Medios de cultivo	20
4.3.1 Medios de inducción de Embriogénesis somática y Organogénesis	21

4.3.2 Medios para el desarrollo de los embriones somáticos	21
4.4 Siembra de los explantes	22
4.5 Condiciones del cultivo <i>in vitro</i>	22
4.6 Observaciones	22
4.7 Caracterización morfoanatómica	23
4.8 Aclimatación	24
4.9 Análisis estadístico	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Establecimiento del cultivo	25
5.2 ORGANOGÉNESIS	26
5.2.1 Organogénesis de <i>A. comosus</i> var. Española Roja	26
5.2.1.1 Inducción del callo	26
5.2.1.2 Regeneración	27
5.2.2 Organogénesis de <i>A. comosus</i> var. Tabë Canã	32
5.2.2.1 Inducción del callo	32
5.2.2.2 Regeneración	33
5.3 Aclimatación	36
5.4 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	37
5.4.1 Embriogénesis somática de <i>A. comosus</i> var. Española Roja	37
5.4.1.1 Inducción del callo	37
5.4.1.2 Regeneración	40
5.4.1.3 Desarrollo de embriones somáticos	42
5.4.2 Embriogénesis somática de <i>A. comosus</i> var. Tabë Canã	46
5.4.2.1 Inducción del callo	46
5.4.2.2 Regeneración	48

5.4.2.3 Desarrollo de embriones somáticos	49
5.5 Comparación de la Organogénesis y la Embriogénesis somática para ambas variedades	51
5.6 Caracterización morfoanatómica de hojas de <i>Ananas comosus</i>	52
6. DISCUSIÓN	57
6.1 Establecimiento del cultivo	57
6.2 Organogénesis de <i>A. comosus</i> variedades Española Roja y Tabë Canä	58
6.2.1 Inducción del callo	58
6.2.2 Regeneración	59
6.3 Aclimatación	63
6.4 Embriogénesis somática de <i>A. comosus</i> variedades Española Roja y Tabë Canä	65
6.4.1 Inducción del callo	65
6.4.2 Regeneración	68
6.4.3 Desarrollo de embriones somáticos	69
6.5 Comparación de la Organogénesis y la Embriogénesis somática para ambas variedades	71
6.6 Caracterización morfoanatómica de bases de hojas de <i>Ananas comosus</i>	72
7. CONCLUSIONES	76
8. BIBLIOGRAFÍA	79

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información nutricional de la piña.	2
Tabla 2. Composición de los medios para la inducción de la Organogénesis.	21
Tabla 3. Composición de los medios para la inducción de la Embriogénesis Somática.	21
Tabla 4. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Organogénesis en segmentos de bases de hojas de piña var. Española Roja.	30
Tabla 5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Organogénesis en segmentos de bases de hojas de piña var. Tabè Canä.	33
Tabla 6. Comparación estadística de la respuesta organogénica de la var. Española Roja y var. Tabè Canä.	35
Tabla 7. Porcentaje de formación de callo en segmentos de bases de hojas de la variedad Española Roja.	39
Tabla 8. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Embriogénesis somática en segmentos de bases de hojas de piña var. Española Roja.	42
Tabla 9. Número de embriones globulares de la var. Española Roja sembrados en los medios de cultivo para la siguientes etapas de desarrollo.	43
Tabla 10. Desarrollo de los embriones somáticos de piña var. Española Roja.	44
Tabla 11. Porcentaje de formación de callo en segmentos de bases de hojas de la variedad Tabè Canä.	47
Tabla 12. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Embriogénesis somática en segmentos de bases de hojas de piña var. Tabè Canä.	49
Tabla 13. Número de embriones globulares de la var. Tabè Canä sembrados en los medios de cultivo para las siguientes etapas de desarrollo.	50

Tabla 14. Desarrollo de los embriones somáticos de piña var. Tabè Canà.	50
Tabla 15. Comparación estadística de la respuesta embriogénica de la var. Española Roja y var. Tabè Canà.	51
Tabla 16. Caracterización morfoanatômica de hojas de <i>Ananas comosus</i> .	52

II. ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4-D	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Ácido naftaleno - acético
AIA	Ácido indol - acético
BA	Bencil – adenina
°C	Grados centígrados
Cal	Calorías
cm	Centímetros
cv.	Cultivar
g/L	Gramos por litros
HCl	Ácido clorhídrico
IBA	Ácido indol –butírico
K	Cinetina
L	Litros
m	Metros
mg/L	Miligramos por litros
mm	Milímetros
MS	Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog, 1962
MT	Medio de cultivo descrito por Murashige y Tucker
NaOH	Hidróxido de sodio
PIC	Picloram
PB	Paclobutrazol
TDZ	Thidiazuron
var.	Variedad

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Ananas comosus* pertenece a la familia Bromeliaceae y todas las variedades de piña de interés comercial pertenecen a esa especie (Py y col., 1984; citado por Santa Cruz y col., 2006). Esta familia es una de las más representativas de la flora neotropical, abarca unos 56 géneros y 2.600 especies (Smith y Hill, 1998, citados por Proença y Sajo, 2007) y tradicionalmente, se ha dividido en ocho subfamilias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae y Bromelioideae (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>), separadas básicamente por el tipo de tricomas, frutos, semillas y la posición del ovario (Smith y Downs 1974; 1977; 1979, citados por Proença y Sajo, 2007).

La familia Bromeliaceae crece en las regiones tropicales y subtropicales del Continente Americano. El mayor número de especies provienen de Sudamérica, siendo Brasil uno de los más ricos en esta flora (Smith y Downs 1979; citado por García y Serrano, 2005). Para el año 2008, se habían descrito aproximadamente unas 50 especies del género *Ananas* (consultado en: <http://www.tropicos.org>).

La piña es cultivada predominantemente para ser consumida como fruta fresca o enlatada. Es una fuente abundante de manganeso y contiene cantidades significativas de vitamina C y B1 (Tabla 1), además es usada como ingrediente en una gran variedad de comidas incluyendo: postres, condimentos, saborizantes, yogurt, licores, jugos, helados, confites, mermeladas, pizzas, gelatinas, etc. (Australian Government, Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator, 2008). Por otra parte, los tallos y las hojas de la planta

son una importante fuente de fibras naturales, los cuales pueden ser procesados para transformarlos en papel ya que son teñidos con facilidad y también pueden ser utilizados como comida de ganado.

Tabla 1. Información nutricional de la piña.

Nutrientes	Cantidad (mg)
Manganeso	2,56
Vitamina C	23,87
Vitamina B1	0,14
Cobre	0,17
Fibra dietética	1860
Vitamina B6	0,13
Calcio	6,2 - 37,2
Nitrógeno	38,0 - 98,0
Fósforo	6,6 - 11,9
Hierro	0,27 - 1,05
Ácido ascórbico	27 - 165,2
Carotenos	0,003 - 0,055
Riboflavina	0,011 - 0,04
Niacina	0,013 - 0,267

1 taza = 155g = 75,95 Cal.

Información compilada de Morton (1987) y Mateljan (2007); tomada de Australian Government, Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator, 2008.

Las propiedades analgésicas y anti-inflamatorias de la piña han sido probadas y las evidencias clínicas indican una reducción en los síntomas de artritis ósea y reumatoide (Walter y col., 2002, citados por García y Serrano, 2005). La piña produce bromelina, enzima proteolítica que es utilizada en la industria alimenticia y farmacéutica (García y Serrano, 2005; Tochi y col., 2008).

Según Maurer 2001 (citado por García y Serrano, 2005), la piña contiene peroxidasa, fosfatasa ácida e inhibidores de proteasas y calcio. Junto con éstas, la bromelina actúa como inmunomodulador, aumentando la inmunocitotoxicidad contra células tumorales.

La propagación *in vitro* ha sido ampliamente utilizada para lograr la rápida multiplicación de numerosas especies vegetales y su éxito a escalas comerciales depende de la habilidad de transferir las plantas a condiciones *ex vitro*, el bajo costo de la técnica empleada y la obtención de una alta tasa de supervivencia de las plantas (Hazarika, 2006).

Debido a la importancia agrícola, económica y medicinal que tiene la piña, se planteó establecer sistemas de regeneración *in vitro* vía Embriogénesis Somática y Organogénesis para la especie *Ananas comosus* (L.) Merr., como método de clonación de la misma.

2. ANTECEDENTES

2.1 Descripción botánica de *Ananas comosus* (L.) Merr.

2.1.1 Taxonomía

Ananas comosus (L.) Merr., pertenece a la División Spermatophyta, Subdivisión Angiosperma, Clase Monocotiledónea, Orden Poales, Familia Bromeliaceae, Género *Ananas*, Especie *Ananas comosus* (L.) Merr. y sus nombres comunes son: piña, ananá, abacaxi (Brasil) y pineapple (U.S.A.) (Badillo y col., 1985; Hoyos, 1989 y Judd y col., 1999).

2.1.2 Origen

La historia de las Bromeliáceas comienza con el descubrimiento de América en el año 1492, cuando Cristóbal Colón partió desde España en su segundo viaje rumbo hacia el Nuevo Mundo y es allí donde encuentra que este fruto es cultivado por los indígenas locales (Oliva-Esteva y Steyermark, 1987). Luego la piña fue llevada a España y de allí a Filipinas y Hawaii en el siglo XVI (Morton, 1987; citado en Australian Government, Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator, 2003).

2.1.3 Morfología y Anatomía

La piña es una monocotiledónea perenne, con inflorescencia terminal y frutos terminales múltiples. Las plantas adultas de piña son de hasta 1m. de alto y 0,5m de ancho. El tallo es un cilindro central, erecto que se continúa en el pedúnculo floral, luego en el eje central de la inflorescencia con brácteas grandes y coloreadas, para terminar en el ápice en una corona de hojas. La piña adulta

puede tener un máximo de 70-80 hojas alternas dispuestas en forma de roseta, formando un tanque basal (Py, 1969, citado por Santa Cruz y col., 2006), las hojas son simples, enteras, lineares, alargadas, con nerviación paralela, presentan estípulas caducas y pueden presentar márgenes lisos o espinosos (Judd y col., 1999)

La inflorescencia es en forma de racimo o panícula, consta de 50-200 flores individuales y hermafroditas. El fruto es bacciforme y está reunido en infrutescencia. El embrión es pequeño, las flores son normalmente auto-estériles, el desarrollo del fruto es partenocárpico y son de metabolismo CAM (Metabolismo Ácido de Crassulaceae) (Py, 1969, citado por Santa Cruz y col., 2006; Leal y Antoni, 1981, citados por Leal y Avilan, 1982; Badillo y col., 1985; Judd y col., 1999; Proença y Sajo, 2007).

En cuanto a la anatomía de la hoja de *Ananas comosus*, en condiciones de campo se describen las estructuras anatómicas características de bromeliáceas tales como: presencia de ceras, tricomas, epidermis cubierta con cutícula uniestratificada y la presencia de hipodermis. (Tomlinson y Metcalfe, 1969; Py y col., 1984, citado por Santa Cruz y col., 2006, Roth, 1991; Pacheco y col., 2008).

2.2 Importancia económica

Tailandia, Filipinas, Brasil y China son los principales productores de piña con cerca del 50% de la producción mundial. La Producción de piña en Venezuela para el año 2005 alcanzó el lugar 14 a nivel mundial con 320.000 toneladas métricas y el cultivo de este fruto se sitúa en el puesto número 13 con

respecto a los otros rubros producidos en el país (consultado en: <http://www.fao.org/es/>, 2008).

La importancia económica de la piña ha impulsado la investigación biotecnológica en el área del cultivo de tejidos vegetales en esta especie, donde se ha logrado el mejoramiento de la producción, tasa de crecimiento, producción de protoplastos, embriones somáticos y plantas libres de patógenos.

En Venezuela, la piña se cultiva en los Estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Monagas, Anzoátegui, Sucre y los márgenes del Río Orinoco en el Estado Amazonas (Leal y Avilan, 1982). En el Estado Amazonas el cultivo de la piña es realizado principalmente, por aborígenes de la etnia Piaroa, siendo esta actividad parte de su cultura ancestral. La población Piaroa está localizada en Betania del Topocho, Municipio Atures del Estado Amazonas; consta de unas 521 personas de las cuales el 75% se dedica a la actividad comercial y al cultivo de frutas, principalmente de la piña (García y col. 2008).

Según Leal y Antoni (1981a,b), la variedad de piña más cultivada en Venezuela es la Española Roja. Esta planta presenta hojas con láminas de coloración verde-rojiza (Fig. 1A) y con espinas pequeñas; el fruto es de tamaño mediano y de color externo amarillo-anaranjado. Por otra parte, la variedad Tabë Canä (una de las variedades de piñas cultivadas por los indígenas de la etnia Piaroa), posee hojas verdes (Fig. 1B), espinas en el margen, fruto grande, alargado y de color externo amarillo.

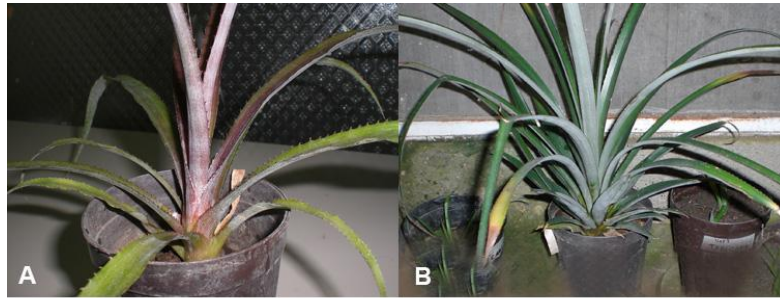


Fig. 1: A) Planta de *A. comosus* var. Española Roja y
B) Planta de *A. comosus* var. Tabë Canä.

2.3 Cultivo tradicional de la piña

La piña se propaga vegetativamente por brotes laterales y por el enraizado de las hojas de la corona. En el campo se pueden sembrar hasta 75.000 individuos por hectárea y la plantación se hace con brotes de 20 cm de altura, provenientes de propagación vegetativa y que son capaces de fructificar después de 15 a 18 meses de cultivo (García y Serrano, 2005).

Tradicionalmente en Venezuela, la siembra de la piña se realiza conjuntamente con otros cultivos como cambures, yucas, cítricos, etc. En la mayoría de los casos, el campesino troza, quema y luego planta los hijos o brotes a distancias aproximadas de 50 cm – 1.20 m entre hileras (Hoyos, 1989).

2.4 Cultivo *in vitro* de la piña

2.4.1 Micropropagación

La micropropagación se refiere al cultivo *in vitro* de cualquier estructura de una planta, sean células, tejidos u órganos. Su principal característica es que se lleva a cabo bajo condiciones asépticas y consiste en aislar cualquier parte de la planta (explante) y aportarle todas las condiciones físicas (luz, temperatura, humedad) y químicas (sales inorgánicas, pH, reguladores de crecimiento,

vitaminas, aminoácidos, proteínas, carbohidratos y agua) adecuadas para inducir la respuesta de los explantes o propágulos hacia un proceso determinado (Bernadett, 2000, citado por Sunshine, 2003).

Aunque los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el cultivo *in vitro*, hay muchos otros factores que han sido encontrados que pueden afectar la disponibilidad de un tejido particular hacia la propagación clonal masiva, por ejemplo el genotipo de la planta, el tipo de tejido y estado fisiológico del explante y las condiciones del cultivo (Guerra y col. 1999; Jiménez, 2001, Costa y col. 2003).

En la propagación clonal *in vitro* pueden identificarse cuatro etapas bien definidas, cada una con objetivos específicos: Fase 0: Fase Preparativa, Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos, Fase II: Multiplicación, Fase III: Enraizamiento y Fase IV: Aclimatación (Krikorian y col., 1991).

En la Fase 0 se debe tener en cuenta el estado fitosanitario, genético y fisiológico de la planta madre ya que tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes (Derebergh y Maene, citados por Jiménez, 1998) y consiste en obtener el mejor explante posible, el cual debe ser un tejido joven y libre de enfermedades. El objetivo de la Fase I es lograr el establecimiento de los cultivos asépticos y fisiológicamente vigorosos con los cuales se inicia el proceso de multiplicación (Jiménez, 1998). La Fase II se caracteriza por la producción del mayor número posible de propágulos a partir de explantes ya establecidos *in vitro* (Orellana, 1998). La Fase III tiene como objetivo

producir el enraizamiento de la planta para que ésta pueda sobrevivir a las condiciones de trasplante siendo capaz de absorber nutrientes del suelo. Por último, la fase de aclimatación corresponde a la transferencia de las plantas al medio ambiente (Krikorian y col., 1991).

2.4.1.1 Micropropagación clonal mediante yemas y microesquejes

La micropropagación clonal es considerada como la técnica de propagación vegetativa *in vitro* que implica la producción de plantas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta de la que se derivan (Krikorian y col., 1991). A través de esta técnica, un explante (yemas o microesquejes) de una planta madre, es cultivado en condiciones asépticas y se obtiene una descendencia uniforme denominada clones (Castillo, 2004).

Casale y García (1987), estudiaron la multiplicación clonal acelerada de piña empleando como explantes yemas axilares de hojas de plantas maduras de las variedades Española Roja, Brecheche y Nacional, encontrando que el mejor medio para el rompimiento de la latencia e inducción del crecimiento resultó ser el Murashige y Skoog, 1962 (MS), suplementado con 1,0 mg/L de ANA, 1,0 mg/L de IBA y 0,5 mg/L de BA para la variedad Española Roja, mientras que para las variedades Nacional y Brecheche el mejor medio de cultivo fue el MS suplementado con 2,0 mg/L de ANA, 2,0 mg/L de IBA y 1,0 mg/L de BA. Posteriormente, García y col. (2008), usando los mismos tratamientos, lograron resultados exitosos para la micropropagación de yemas de la variedad Española Roja y la variedad autóctona del Amazonas Tabë Canä.

Fitchet-Purnell (1993), Firoozabady y Gutterson (2003) y Gangopadhyay y col. (2005), establecieron sistemas de micropropagación usando meristemas de piña. Fitchet-Purnell usó el medio Murashige y Tucker (MT) suplementado con 2 mg/L de ANA, 2 mg/L de IBA y 2 mg/L de K; desarrollando plántulas que luego fueron multiplicadas en medio líquido MT con 2 mg/L de ANA y 2 mg/L de K.; por su parte, Firoozabady y Gutterson (2003), emplearon medio MS suplementado con 3 mg/L de BA y después de 2 semanas de inducido el callo, los cultivos fueron trasladados a un medio con 2 mg/L de BA y 2 mg/L de ANA para inducir la formación de brotes. Gangopadhyay y col. (2005), emplearon medio MS suplementado con 0,004 mg/L de BA y 0,0005 mg/L de AIA, extrayendo del medio microbrotes individuales (1,5 – 2,0mm) a los 30 días de cultivo, los cuales luego fueron encapsulados para la obtención de semillas sintéticas.

Teng y Teng y Yu (1997), realizaron micropropagación en *Ananas* a través del cultivo de nódulos inducidos a partir de bases de hojas, empleando un medio de cultivo MS suplementado con 0,5 - 1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA. Posteriormente, estos nódulos regeneraron el mayor número de brotes al ser transferidos a un medio suplementado con 0,1 - 0,5 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de BA.

Escalona y col. (1999), desarrollaron un procedimiento para la propagación masiva de plantas de piña empleando un sistema de inmersión temporal, obteniendo la mayor tasa de multiplicación (191,8 plantas/L) en medio MS suplementado con 2,1 mg/L de BA, 0,3 mg/L de ANA y 1 mg/L de PB a las 4 semanas de cultivo en inmersión temporal. Mientras que Hamad y col. (2008),

obtuvieron brotes de piña de la var. Cayena Lisa cultivada en medio MS suplementado con 3,25 mg/L de BA y 1,75 mg/L de AIA.

García y col., 2008, empleando también un sistema de inmersión temporal lograron obtener una producción de 300 plantas por explantes en la variedad Española Roja.

Saucedo y col., (2001), establecieron un sistema de propagación clonal *in vitro* de piña para las variedades Champaka y Hawaiana y encontraron una mayor respuesta en un medio de cultivo MS suplementado con 0.5 mg/L de BA, 1,0 mg/L de IBA y 1,0 mg/L de ANA, obteniendo el 47 y 56 % de supervivencia respectivamente. Para la proliferación de brotes la mejor combinación fue en un medio de cultivo MS suplementado con 3,5 y 4,0 mg/L de BA en la var. Champaka y la var. Hawaiana con 3,5 mg/L de BA.

Bastos, y col. (2002), establecieron un protocolo para la micropropagación de piña cultivar Perola, obteniendo los mejores resultados empleando para ello medio líquido MS complementado con 1,5 mg/L de BA utilizando secciones longitudinales de yemas como explante y en el segundo caso los mejores resultados fueron obtenidos empleando 1,0 y 0,5 mg/L de BA y ANA respectivamente.

Mogollón y col. (2004), establecieron la multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *A. comosus* var. Queen Australia a partir de brotes, obteniendo el mayor número de plantas por explante (38,6) a las ocho semanas

de cultivo usando el medio MS suplementado con 0,01 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de BA. Por otra parte, obtuvieron el mayor número de raíces por explante (28,4) al usar el medio MS suplementado con 2,0 mg/L de ANA.

Be y Debergh (2006), desarrollaron un protocolo para micropropagación de piña empleando medio MS líquido, suplementado con 0,8 – 1,0 mg/L de BA, obteniendo los mejores resultados (alrededor del 8 a 9 de plantas por explante) a las 8 semanas de cultivo.

Pasqual y col., (2008), estudiaron la influencia de diferentes concentraciones de BA en medio de cultivo MS, con el fin de establecer un protocolo para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de la piña ornamental. Después de 45 días de cultivo, obtuvieron la multiplicación de plantas ornamentales de piña en medio líquido MS con 1,5 mg/L de BA y el enraizamiento fue máximo en medio MS líquido en ausencia de reguladores del crecimiento.

2.4.1.2 Organogénesis

La organogénesis es un proceso de regeneración que implica la formación de órganos *de novo* a partir de pequeños grupos celulares meristemáticos, denominados meristemoides (Villalobos, 1990 y Orellana, 1998). Este proceso consiste en la formación de brotes y raíces en respuesta apropiada a las condiciones de cultivo *in vitro* (principalmente dependiendo del tipo y concentración de reguladores de crecimiento de plantas presentes en el medio de cultivo). Este tipo de desarrollo también se caracteriza por la presencia de

conexión vascular entre el tejido del explante y el tejido regenerado (Terzi y Lo Schiavo, 1990, citados por Jiménez, 2001).

La organogénesis *in vitro* ha sido clasificada dependiendo si el proceso es directo o indirecto (Hicks, 1994). En el tipo directo, los explantes son competentes para responder a la diferenciación por medio del estímulo con reguladores del crecimiento, y no requieren la formación previa de callo antes de inducir la respuesta, en cambio en el tipo indirecto, la regeneración de órganos ocurre previa formación de callo en el explante.

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

Actualmente, existen diferentes reportes de que se han desarrollado métodos para la organogénesis *in vitro* en piña como mecanismo de propagación masiva. Entre éstos se encuentran el estudio de Rahman y col. 2001 (citados por Roostika y Mariska, 2003), donde obtuvieron la proliferación *in vitro* de brotes a partir de segmentos de hojas de coronas de frutos maduros, en un medio MS suplementado con 0,2 mg/L de IBA y 0,2 mg/L de ANA. Por otra parte, Sripaoraya y col. (2003), reportaron que obtuvieron brotes adventicios a partir de bases de hojas cultivadas en un medio MS suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-D y 2,0 mg/L de BA.

Roostika y Mariska (2003), lograron establecer un sistema de organogénesis en piña, empleando para ello el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA, mientras que Akbar y col. (2003), establecieron organogénesis empleando meristemos apicales de coronas de piña cultivadas en medio MS suplementado con 1,5 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de K, obteniendo los primeros callos en el plazo de tres semanas, los cuales fueron subcultivados en medio MS con 1,5 mg/L de K y 0,5 mg/L de ANA produciendo un gran número de brotes.

Firoozabady y Gutterson, 2003 (citados por Roostika y Mariska, 2003), obtuvieron la formación *in vitro* de brotes de piña vía organogénesis, utilizando una combinación de 1,5 mg/L de BA y 0,5 mg/L de ANA.

En el año 2004, Firoozabady y Moy informaron que obtuvieron organogénesis directa y organogénesis indirecta en piña. El más alto nivel de regeneración por organogénesis directa se obtuvo en medio MS suplementado con 5mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA, obteniéndose un 99% de regeneración, mientras que por organogénesis indirecta, en el mismo medio se obtuvo el 86% de regeneración.

2.4.1.3 Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual las células somáticas, tanto del esporofito como del gametofito, se desarrollan para producir un embrión completo a partir de una sola célula, 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 y su origen puede ser unicelular o multicelular pero las células que lo originan no son producto de fusión gamética, capaces además de crecer y formar plantas completas.

Los primeros investigadores en obtener y desarrollar embriones somáticos *in vitro*, fueron Steward y col., (1958) y Reinert y col., (1985), a partir de tejidos de zanahoria. Desde estos primeros estudios, el número de especies de plantas superiores a partir de las cuales los embriones somáticos podrían ser obtenidos ha aumentado continuamente (Shinoyama y col., 2004).

La producción de embriones somáticos *in vitro* a partir del cultivo de células, tejidos y órganos puede ocurrir bajo dos patrones. En la embriogénesis somática directa, los embriones se originan directamente de tejidos a partir de una sola 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.

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 2,4-D en el medio

incrementa los niveles endógenos de auxina en el explante lo que favorece el establecimiento del gradiente polar de auxinas, y 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. (2005) en un sistema experimental empleando el cultivo de células en suspensión de *Daucus carota*, en un medio suplementado con 0,1 mg/L de 2,4-D (Fig. 2). Este modelo reveló la existencia de cuatro fases en el proceso de embriogénesis somática y aunque fue descrito en dicotiledóneas, puede ser extrapolado para monocotiledóneas.

Fase 0: También llamada fase de inducción o determinación; se inicia con células individuales competentes que pueden formar pequeños agregados celulares en presencia de auxinas en el medio de cultivo. Sin embargo en el resto de las fases, especialmente en la fase 1, las auxinas son inhibitorias de la embriogénesis.

Fase 1: Las agrupaciones celulares formadas en la fase 0 son capaces de desarrollarse en embriones cuando se elimina la auxina del medio, dando origen a las agrupaciones celulares en la fase 1 (estado 1). Por consiguiente esta fase es inducida transfiriendo las células a un medio sin auxina.

Fase 2: En ciertas partes de las agrupaciones celulares comienza una división celular rápida (estado 2), conduciendo a la formación de embriones globulares.

Fase 3: Desarrollo del embrión globular a embrión en forma de corazón y luego torpedo para el posterior desarrollo de la plántula. En el caso de las monocotiledóneas el embrión globular sufre un proceso de transición, en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro.

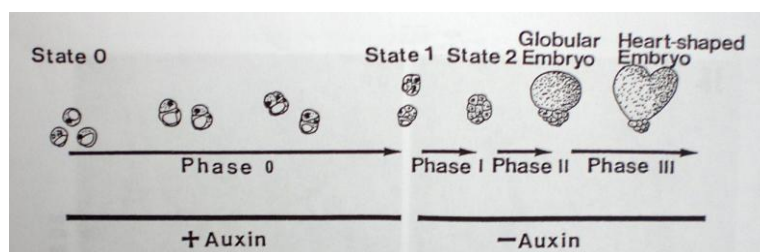


Fig. 2. Embriogénesis somática en *Daucus carota* (zanahoria) (Komamine y col., 2005).

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).

Daquinta y col. (1996), lograron establecer un sistema de embriogénesis somática indirecta en *Ananas comosus*, empleando como explante hojas de

plantas cultivadas *in vitro*, de la variedad Cayena lisa y Española Roja, obteniendo un 42% de formación de callos embriogénicos y un 45% de plantas obtenidas por embriogénesis somática, mientras que Roostika y Mariska en el 2003, lograron establecer un sistema de embriogénesis en piña en el cual se produjo simultáneamente tanto embriogénesis somática como organogénesis utilizando como explante bases de hojas, obteniendo un 86% de regeneración de brotes. En el primer caso, los investigadores emplearon un medio MS suplementado con una combinación de 2,5 mg/L de Dicamba y 0,5 mg/L de BA y en el segundo caso emplearon medio MS, suplementado con 5mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA.

Sripaoraya y col., (2003), desarrollaron un sistema de embriogénesis somática indirecta en bases de hojas de piña cultivadas en medio MS suplementado con 3 mg/L de Picloram y obtuvieron embriones somáticos en la superficie de los callos inducidos luego de transcurridos 21 días de la formación de los callos, alcanzando un máximo número de plantas al transferir los embriones somáticos en estado globular a un medio MS suplementado con 1 mg/L de BA.

Por otra parte, Firoozabady y Moy (2004), lograron inducir la embriogénesis somática en bases de hojas de piña empleando un medio MS suplementado con 10mg/L de PIC y 2 mg/L de TDZ. Este sistema fue poco eficiente ya que en 3 meses sólo del 15-30% de los explantes respondieron hacia la producción de embriones somáticos previa formación de callo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

3.1.1 Establecer un sistema de Embriogénesis Somática y de Organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr. (piña).

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en el establecimiento de la Embriogénesis somática y la Organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr. variedad comercial Española Roja y variedad autóctona del Amazonas Tabè Canä.

3.2.2 Comparar la respuesta embriogénica y organogénica de plantas de piña variedad comercial Española Roja y variedad autóctona del Amazonas Tabè Canä.

3.2.3 Caracterizar morfoanatómicamente bases de hojas de la planta madre y las plantas hijas mantenidas *in vitro* y *ex vitro*.

3.2.4 Demostrar el proceso que da origen a las plantas regeneradas (Embriogénesis somática u Organogénesis), a través de estudios histológicos.

3.2.5 Determinar si los procesos de Embriogénesis somática y Organogénesis ocurrieron de manera directa o indirecta, a través de estudios histológicos.

3.2.6 Realizar la aclimatación de las plantas de *Ananas comosus* de ambas variedades obtenidas por Organogénesis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Se utilizaron plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr., de la variedad comercial Española Roja y variedad autóctona del Amazonas Tabë Canä., obtenidas y mantenidas durante 8 meses en condiciones *in vitro*, proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

4.2 Obtención del explante

Los explantes empleados en la etapa de inicio del cultivo fueron segmentos de bases de hojas de aproximadamente 5 mm² provenientes de plantas micropropagadas de piña de ambas variedades, mantenidas en condiciones *in vitro*.

4.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados durante el ensayo estaban constituidos por las sales de Murashige & Skoog, 1962 (MS), suplementados con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol y 30 g/L de sacarosa. El pH de los medios fue ajustado a 5.8 con NaOH, se añadieron 8 g/L de agar como agente gelificante. Estos medios fueron distribuidos en frascos de vidrio 30 mL aproximadamente. Se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión.

4.3.1 Medios de inducción de Embriogénesis somática y Organogénesis

Para la inducción de la embriogénesis somática y la organogénesis, se probaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento detallados en las Tablas 2 y 3; dichos tratamientos se prepararon por duplicado, una serie para la siembra de la var. Española Roja y otra serie para sembrar la var. Tabë Canä.

Tabla 2. Composición de los medios para la inducción de la Organogénesis

Regulador de crecimiento			
Medio de cultivo	ANA (mg/L)	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)
MS1	---	---	---
MS2	5	0,25	---
MS3	---	---	2,5

MS1 Medio control. MS2 Medio reportado por Roostika y Mariska (2003).

Tabla 3. Composición de los medios para la inducción de la Embriogénesis Somática

Regulador de crecimiento				
Medio de cultivo	BA (mg/L)	PIC (mg/L)	2,4-D (mg/L)	TDZ (mg/L)
MS1	---	---	---	---
MS4	1	---	2,5	---
MS5	---	10	---	2
MS6	---	3	---	---

MS1 Medio control. MS5 reportado por Firoozabady y Moy (2004) y MS6 reportado por Sriparaya y col., (2003).

4.3.2 Medios para el desarrollo de los embriones somáticos

Una vez obtenidos los embriones en estado globular en los diferentes tratamientos, fueron transferidos a un medio sin reguladores de crecimiento (MSEmb1) y otro medio suplementado con 1mg/L de BA (MSEmb2), reportado por Roostika y Mariska (2003), para promover los siguientes estados de desarrollo.

4.4 Siembra de los explantes

Los explantes provenientes de plantas *in vitro* de *Ananas comosus* (L.) Merr. tanto de la variedad Española Roja como de la variedad Tabã Canã, se sembraron en los medios de inducción en cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia a razón de 10 secciones por frasco, con cinco réplicas cada uno, obteniendo un total de cincuenta (50) explantes por tratamiento.

4.5 Condiciones del cultivo *in vitro*

El material vegetal, fue incubado en una cámara de crecimiento a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, en total oscuridad durante el lapso de tiempo necesario para realizar la inducción de la embriogénesis somática y la organogénesis. Posteriormente, en las etapas siguientes de ambos procesos, los frascos fueron transferidos a condiciones de luz fluorescente continua, temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. El repique del material vegetal fue realizado cada dos meses.

4.6 Observaciones

En cada uno de los cultivos se llevaron a cabo análisis cualitativos y cuantitativos semanalmente. Las observaciones cualitativas se basaron en los siguientes aspectos: coloración de los explantes, coloración del callo, tipo de callo formado, neoformaciones e hiperhidricidad. Entre las características cuantitativas evaluadas se encontraron: tiempo de respuesta del explante, porcentaje contaminación de los explantes, porcentaje de explantes con formación de callo, promedio de embriones por explante, promedio de plantas regenerados por explante, índice de formación de brotes y porcentaje de plantas aclimatadas.

4.7 Caracterización morfoanatómica

A fin de establecer la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro*, se llevó a cabo un estudio anatómico del material vegetal de plantas de ambas variedades de piña, para así comprobar la naturaleza embriogénica u organogénica del proceso de regeneración *in vitro* y determinar si la organogénesis y la embriogénesis somática ocurrieron de forma directa o indirecta.

Por otra parte, con el fin de verificar si habían ocurrido cambios en la morfoanatomía de las hojas de las plantas hijas una vez llevada a cabo la organogénesis *in vitro* durante el período de experimentación, se realizó un estudio anatómico comparativo de las hojas de plantas madres mantenidas en vivero (a los 12 meses de cultivo), las plantas madres obtenidas y mantenidas *in vitro* (a los 8 meses de cultivo), las plantas hijas obtenidas por organogénesis y mantenidas *in vitro* (a los 8 meses de cultivo) y las plantas hijas obtenidas por organogénesis y mantenidas *ex vitro* (a los 8 meses de cultivo), tomando aleatoriamente una hoja de tres plantas de cada una de estas condiciones de cultivo. Se realizaron cortes a mano alzada del material vegetal en las diferentes etapas del proceso de regeneración, dichos cortes fueron coloreados con Azul de toluidina en solución acuosa al 1% y fijado en glicerina al 50%, siguiendo el protocolo de Roth (1964).

La morfología externa fue observada en un microscopio estereoscópico marca Zeiss KL1500, mientras que los cortes anatómicos fueron observados a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2 y un microscopio óptico

con luz polarizada marca Nikon OPTIPHOT; se tomaron fotografías en cada caso con una cámara digital CASIO EXILIM de 8.1 Mp acoplada a los mismos. El cálculo del aumento total de las fotografías fue realizado mediante la multiplicación del aumento del objetivo por el aumento del ocular.

4.8 Aclimatación

Para la fase de aclimatación se sembraron 30 plantas de cada variedad obtenidas por Organogénesis, con una altura aproximada de 6 cm.; en un sustrato conformado por tierra negra abonada y arena lavada en una proporción 1:1 y se colocaron durante 15 días en propagadores con alta humedad (80 – 93% de humedad relativa) y baja luminosidad ($10 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, densidad de flujo fotónico fotosintético (DFF)). Luego las plantas fueron transferidas a condiciones de vivero.

4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos para cada tratamiento se realizó a través de una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías y una prueba de Duncan con la ayuda del programa Statistica para Windows versión 5.5.

También se realizó el cálculo del Índice de Formación de Brotes (IFB) para ambas variedades mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IFB} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ brotes formados} \times \text{N}^{\circ} \text{ explantes con brotes}}{(\text{N}^{\circ} \text{ explantes cultivados})^2}$$

5. RESULTADOS

5.1 Establecimiento del cultivo

Las bases de hojas resultaron adecuadas como explantes para la regeneración de piña vía organogénesis y embriogénesis somática en las variedades Española Roja y Tabë Canã.

Durante el establecimiento del cultivo *in vitro*, se obtuvo un porcentaje mínimo de contaminación, lo cual era de esperarse ya que se estaba trabajando con explantes extraídos de plantas obtenidas y mantenidas *in vitro*, observándose en el caso de la organogénesis un 100% de explantes libres de contaminación para la var. Española Roja en los medios MS1 y MS3, y 98% en el medio MS2, mientras que en la var. Tabë Canã hubo un 100% de explantes libres de contaminación en el medio MS1 y MS2 y 90% en el medio MS3.

En la embriogénesis somática hubo un 100% de explantes libres de contaminación para la var. Española Roja en los medios MS1 y MS5, 99% en el medio MS4 y 90% en el medio MS6 y para la var. Tabë Canã fue obtenido un 100% de explantes libres de contaminación en el medio MS4, 90% en el medio MS5 y 95% en el medio MS6.

Es necesario destacar que el material vegetal de ambas variedades estudiadas, mostró indicios de oxidación durante el período de cultivo de ambos procesos, por lo cual dicho material fue transferido a medios con igual

composición química a la original y se les añadió 100 mg/L de ácido ascórbico para evitar la oxidación del material vegetal.

5.2 ORGANOGÉNESIS

5.2.1 Organogénesis de *A. comosus* var. Española Roja

5.2.1.1 Inducción del callo

Los explantes cultivados en el medio control sin reguladores de crecimiento (MS1), no presentaron ninguna respuesta en la etapa de inducción durante el tiempo de experimentación y en la mayoría de los casos se observó la oxidación de los mismos.

En la var. Española Roja, se observaron cambios morfológicos en los explantes a partir de la cuarta semana de cultivo en los dos medios con reguladores de crecimiento (MS2 y MS3), pudiéndose distinguir en todos los casos cierta deformación del explante y cambio de coloración del mismo de verde a amarillo. Al mes de cultivo, se observó la formación de un callo granular de consistencia friable y coloración amarillenta a marrón hacia los extremos donde se realizó el corte del explante (Fig. 3 A y B).

Cualitativamente, la cantidad de callo formado en el medio MS2 fue aproximadamente el doble de la cantidad de callo formado en el medio MS3, sin embargo las características de coloración y textura de los callos fueron las mismas en ambos medios. En algunos casos, el callo se formó únicamente en los extremos del explante y en otros en toda la superficie de éste.

A los 3 meses de cultivo, se obtuvo un 74% de formación de callos en el medio MS2 y un 38% en el medio MS3 (Tabla 4) y en todos los casos en que hubo formación del callo, éste sufrió un incremento progresivo del tamaño al transcurrir el tiempo de experimentación.

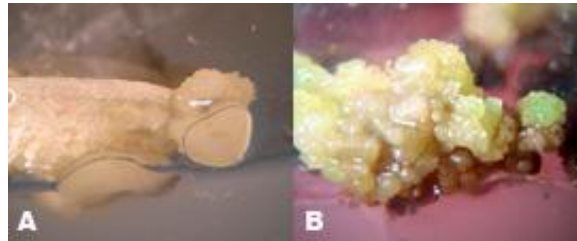


Fig. 3 Callo var . Esp. Roja, MS2: A) 3 meses de cultivo y B) 7 meses de cultivo.

Al séptimo mes de cultivo, el porcentaje de explantes con callo era de 84% en el medio MS2 y 76% en el MS3; encontrándose un mayor porcentaje de formación de callo en el medio MS2 con respecto al medio MS3 a lo largo de todo el período de experimentación.

5.2.1.2 Regeneración

A los 3 meses de cultivo los callos formados 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 raíces y/o brotes (Fig. 4).

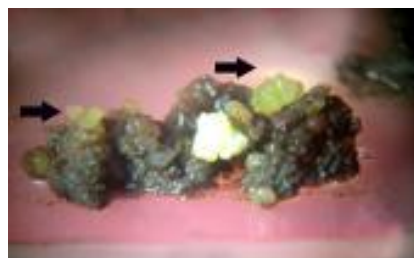


Fig. 4. Estructuras en callos var. Española Roja, MS2 a los 3 meses de cultivo.

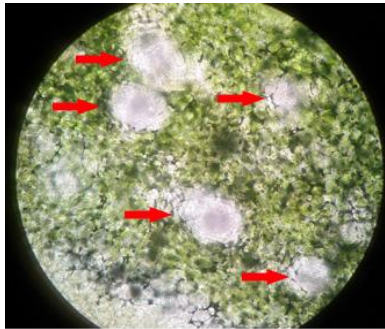


Fig. 5 Corte transversal de callo organogénico mostrando meristemoides (200X).

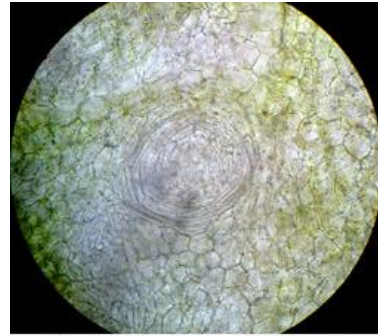


Fig. 6 Detalle Mesistemoide (400X).

Una vez realizado el corte anatómico, se comprobó que dichas estructuras correspondían a meristemoides (Fig. 5 y 6) 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. Estas zonas se encontraban en el interior del callo y estaban compuestas por células pequeñas, isodiamétricas, con citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes.



Fig. 7 Corte long. de yema var. Española Roja MS3 (200X).

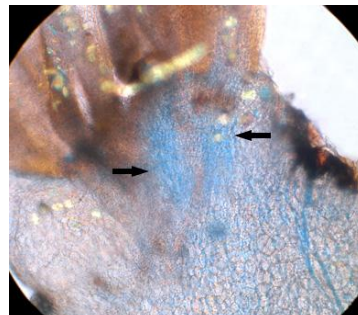


Fig. 8 Detalle de conexión vascular entre la yema y el callo, var. Española Roja, MS3 (300X). Visto con luz polarizada.

En la Fig. 7 se puede observar el corte longitudinal de una yema formada en el medio de MS3 a partir de callo organogénico a los 7 meses de cultivo y en la Fig. 8 se observa el detalle de la conexión vascular existente entre el brote y el tejido de origen (callo), dicha conexión presenta coloración azul al ser vista en un microscopio con luz polarizada.

Es interesante destacar que en la etapa de regeneración, pudo apreciarse la formación de raíces y brotes en un mismo explante (Fig. 9A) y en otros explantes ocurrió la formación solamente de raíces (Fig. 9B) o brotes (Fig. 9C).



Fig. 9 Var. Esp. Roja, MS2: A) Explante con brotes (Br) y raíces (R), B) Explante sólo con raíces y C) Explante sólo con brotes, todos a los 7 meses de cultivo.

A los 3,5 meses se obtuvieron los primeros brotes en el medio MS2 y a los 4 meses de cultivo se obtuvieron los primeros brotes en el medio MS3, siendo de mayor tamaño los brotes obtenidos en el medio de cultivo MS2 en un mismo lapso de tiempo. En el medio MS2 se obtuvo un promedio de 0,32 raíces/explante mientras que en el MS3 el promedio de raíces/explante fue menor (0,08). El promedio de plantas/explante en ambos medios de cultivo (MS2 y MS3) fue mayor al promedio de raíces por explante, ya que en el medio MS2 el promedio fue de 2,92 plantas/explante y en el medio MS3 de 0,67 plantas/explante (Tabla 4).

Estos brotes eran de color verde e inicialmente tenían una altura promedio de 2mm en ambos medios de cultivo y en el caso del medio MS2 (Figura 10A), dichos brotes alcanzaron una altura máxima de aproximadamente 8 cm a los 7 meses de cultivo, mientras que los brotes regenerados en el medio MS3, alcanzaron una altura máxima de 6,7 cm a los 7 meses de cultivo (Figura 10B).

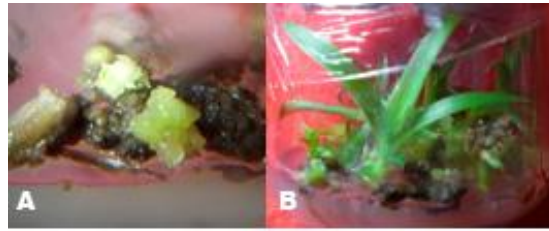


Fig. 10 Brotes de var. Esp Roja, MS2
a: A) 3.5 meses de cultivo y B) 7
meses de cultivo.

Tabla 4. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Organogénesis en segmentos de bases de hojas de piña var. Española Roja.

Medio de cultivo	% Formación de callo	Promedio Raíces/explante	Promedio Plantas/explante	Índice de formación de brotes
3 Meses de cultivo				
MS1	0	0	0	0
MS2	74	0,32	2,92	2,29
MS3	38	0,08	0,67	0,49
7 Meses de cultivo				
MS1	0	0	0	0
MS2	84	1,34	4,7	3,85
MS3	76	0,46	0,98	0,71

A los 7 meses de cultivo, en el medio MS2 se obtuvo un promedio de 1,34 raíces/explante y un promedio de 4,7 plantas/explante, mientras que en el medio MS3 se obtuvo un promedio de 0,46 raíces/explante y un promedio de 0,98 plantas/explante y en algunos casos, las raíces obtenidas llegaron alcanzar los 2 cm. de largo aproximadamente.

Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos aplicados (MS2 y MS3) con respecto a la formación de brotes, mientras que no hubo diferencias significativas entre ambos medios de cultivo para la formación de raíces (Tabla 6).

Las raíces que se formaron vía organogénesis directa, presentaron igual coloración a la del explante (Fig. 11B), numerosos pelos radicales y es de resaltar que dicha regeneración de raíces ocurrió en la región del explante que se encontraba más cercana al tallo antes de ser extraído de la planta madre y por lo general estas raíces eran de menor grosor que las regeneradas por vía organogénesis indirecta (Fig. 11A).



Fig. 11 Raíces de: A) var. Esp. Roja MS2 y B) var. Esp. Roja MS3.

La figura 12A muestra la formación de raíces a partir de callos, provenientes de explantes de la Var. Española Roja cultivados en el medio MS2, mientras que la figura 12B muestra la formación de raíces en la superficie foliar sin la formación previa de callo en el medio de cultivo MS3.



Fig. 12: A) Raíz (R) regenerada a partir de callo (C) var. Esp. Roja MS2 (100X) y B) Raíz regenerada sin formación de callo var. Esp. Roja MS3 (H= hoja) (40X).

5.2.2 Organogénesis de *A. comosus* var. Tabë Canä

5.2.2.1 Inducción del callo

En esta variedad tampoco hubo respuesta de los explantes cultivados en el medio control sin hormonas MS1. La respuesta de los explantes en el medio MS2 ocurrió a las tres semanas de cultivo y a partir de la cuarta semana de cultivo en el medio MS3 y de manera análoga a lo ocurrido en la var. Española Roja, se produjo la deformación y cambio de coloración del explante y luego la formación de un callo granular, friable y amarillento en la región donde se realizó el corte del explante (Fig. 13A). En esta variedad se observó la misma tendencia de mayor formación de callo en el medio de cultivo MS2 en relación al medio de cultivo MS3 durante todo el período de experimentación.

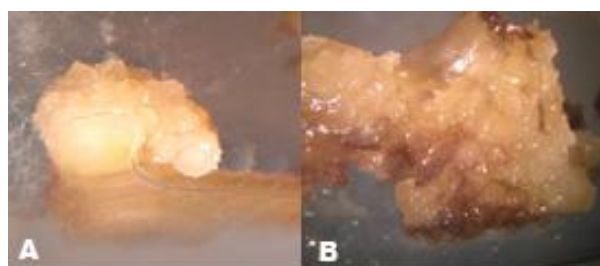


Fig. 13 Var. Tabë Canä, MS3: A) 3 meses de cultivo y B) 5 meses de cultivo.

A los 3 meses de cultivo, en el medio MS2 se obtuvo un mayor porcentaje de formación de callos en comparación con el medio de cultivo MS3; 84% y 10% respectivamente y a los 7 meses de cultivo se logró el 100% de formación de callo en el medio MS2 y 90% en el medio MS3 (Tabla 5).

Cualitativamente se pudo observar que los explantes cultivados en el medio MS2 presentaron aproximadamente el triple de cantidad de callo que los explantes cultivados en el medio MS3, y en ambos casos, los callos fueron de

aparición heterogénea, con zonas amarillentas translúcidas friables y con otras zonas compactas de coloración marrón (Fig. 13B).

5.2.2.2 Regeneración

A diferencia de lo ocurrido en la respuesta organogénica de la Var. Española Roja, en la var. Tabè Canà se produjo organogénesis sólo por vía indirecta en ambos medios de cultivo (MS2 y MS3). Este callo formado dio origen a raíces y brotes a partir de los dos meses de cultivo en el medio MS2 y a los tres meses en el medio MS3 (Fig. 14).

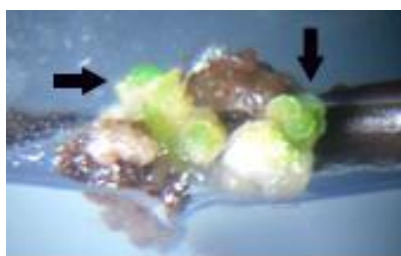


Fig. 14. Estructuras en callos var. Tabè Canà, MS2 a los 3 meses de cultivo.

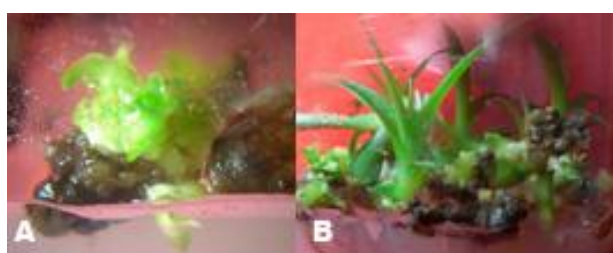
Tabla 5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Organogénesis en segmentos de bases de hojas de piña var. Tabè Canà.

Medio de cultivo	% Formación de callo	Promedio Raíces/explante	Promedio Plantas/explante	Índice de formación de brotes
3 Meses de cultivo				
MS1	0	0	0	0
MS2	84	1,78	3,43	3,13
MS3	10	0,44	0,79	0,71
7 Meses de cultivo				
MS1	0	0	0	0
MS2	100	5,54	4,98	4,98
MS3	90	1,4	1,78	1,60

A los 3 meses de cultivo hubo un promedio 1,78 de raíces por explante en el medio MS2 y de 0,44 en el medio MS3 y un promedio de 3,43 plantas por explante en el medio MS2 y de 0,79 en el medio MS3.

A los 7 meses de cultivo, en el medio MS2 se obtuvo un promedio de 5,54 raíces por explante y un promedio de 4,98 plantas por explante, mientras que en el medio MS3 se obtuvo un promedio de 1,4 raíces por explante y un promedio de 1,78 plantas por explante (Tabla 5).

Los brotes regenerados en el medio de cultivo MS2 alcanzaron una mayor altura promedio en comparación a los brotes obtenidos en el medio de cultivo MS3 en un mismo lapso de tiempo (7 y 6,2 cm respectivamente). Al igual que lo ocurrido en var. Española Roja, en esta variedad los brotes eran de color verde, con la diferencia que presentaron márgenes espinosos más temprano que las hojas de la var. Española Roja (Fig. 15 A y B).



**Fig.15 Brotes de var. Tabè Canà, MS2:
A) 4 meses de cultivo y B) 7 meses de cultivo.**

En la Fig. 16 se puede observar el corte longitudinal de yema formada en el medio de MS2 a partir de callo organogénico a los 7 meses de cultivo.



Fig. 16 Corte longitudinal de yema var. Tabë Canä, MS2 (100X).

Las raíces regeneradas en los dos medios de cultivo eran de color claro y presentaron numerosos pelos radicales (Fig.17 A y B), llegando a alcanzar una longitud máxima de 2 cm a los 7 meses de cultivo.

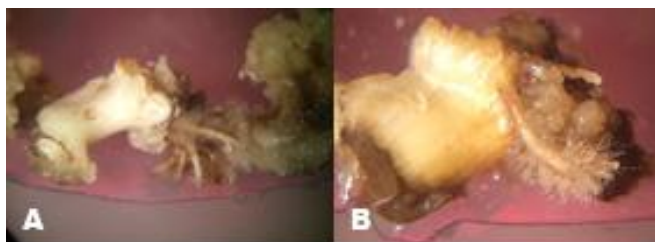


Fig. 17 Raíces de: A) var. Tabë Canä MS2 y B) var. Tabë Canä MS3.

Tabla 6. Comparación estadística de la respuesta organogénica de la var. Española Roja y var. Tabë Canä.

Medio de cultivo	% Formación de callo		Promedio Raíces/explante		Promedio Plantas/explante	
	Esp. Roja	Tabë Canä	Esp. Roja	Tabë Canä	Esp. Roja	Tabë Canä
MS1	0	0	0	0	0	0
MS2	84 a,b	100 c	1,34 a	5,54 b	4,7 a	4,98 a
MS3	76 a	90 b,c	0,46 a	1,4 a	0,98 b	1,78 c

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

Comparando las dos variedades, estadísticamente se encontró que: en cuanto a la formación de raíces, hubo diferencias significativas solamente en el medio de cultivo MS2 en la var. Tabë Canä. En el caso de la formación de brotes hubo diferencias significativas en el medio de cultivo MS3 tanto para la var. Española Roja como para la var. Tabë Canä, pero no hubo diferencias entre los

resultados obtenidos en el medio de cultivo MS2 para ambas variedades (Tabla 6).

5.3 Aclimatación

Del total de 30 plantas de la variedad comercial Española Roja y 30 plantas de la variedad autóctona del Amazonas Tabë Canã que fueron transferidas a tierra y mantenidas en los propagadores, se obtuvo un 100% de sobrevivencia en la var. Española Roja y un 90% de sobrevivencia en la var. Tabë Canã al final de los 3 meses que duró el período de aclimatación.

Es importante destacar que el crecimiento de dichas plantas fue lento para ambas variedades, ya que al ser transferidas las plantas tenían una altura promedio de 6 cm. y al finalizar la aclimatación, la mayoría de las plantas alcanzó los 9 cm., con algunas excepciones donde hubo plantas de la var. Española Roja que alcanzaron los 15 cm. de altura (Fig. 18A y B).

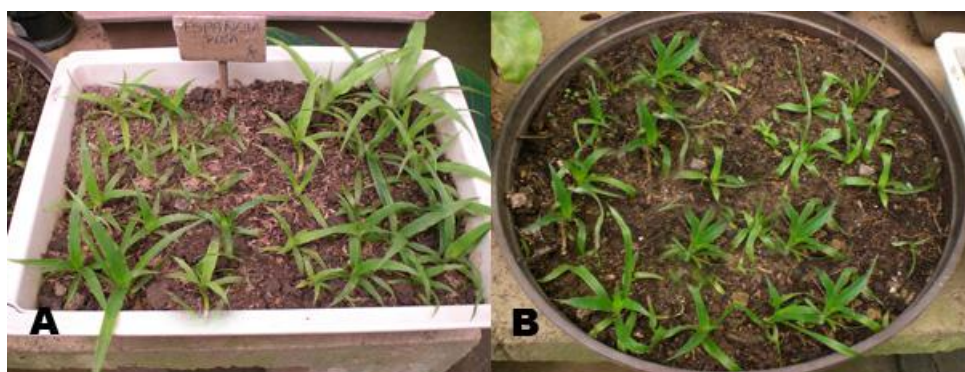


Fig. 18 Plantas aclimatadas durante 3 meses: A)var. Española Roja y B)var. Tabë Canã.

5.4 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

5.4.1 Embriogénesis somática de *A. comosus* var. Española Roja

5.4.1.1 Inducción del callo

Durante la etapa de inducción del callo, no se observó ninguna respuesta en los explantes cultivados en el medio MS1. Los cambios morfológicos observados en los explantes ocurrieron a partir de la cuarta semana de cultivo en los medios MS4 y MS6, mientras que en el medio MS5 estos cambios fueron perceptibles a partir de la quinta semana de cultivo. Al igual que lo ocurrido en el caso de la Organogénesis, se observó al inicio del proceso la deformación de las bases de hojas, el cambio de coloración de verde a amarillo y la formación de un callo friable y amarillento hacia los extremos donde se realizó el corte del explante (Fig. 19 A y B).

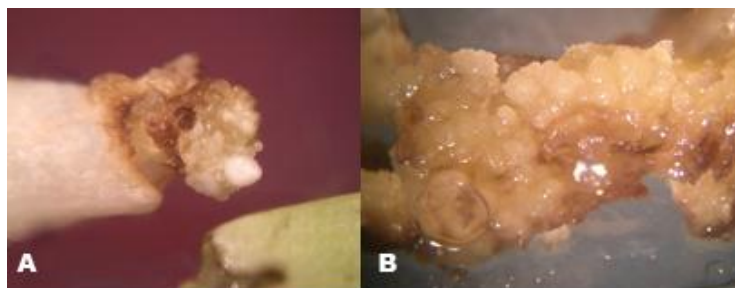


Fig. 19 Callo embriogénico de var. Española Roja, MS4: A) 3 meses de cultivo y B) 7 meses de cultivo.

La cantidad de callo formado en el medio de cultivo MS5 fue cualitativamente mayor a la cantidad de callo formado en los medios MS4 y MS6 (Fig. 20A, B y C) y por otra parte, el callo formado en el medio MS6 presentó características morfológicas diferentes a los obtenidos en los medios MS4 y MS5. Este callo se comenzó a formar a lo largo de las bases de hojas de forma paralela a las nervaduras; el tejido comenzó a engrosarse y luego se separó de manera

longitudinal por la zona donde se encontraban las nervaduras, quedando así conformadas unas estructuras en forma de fibras lineares (Fig. 20C), las cuales luego darían origen a embriones. Es necesario aclarar que el tejido se observa de color amarillento ya que durante toda la etapa de inducción del callo, el material vegetal fue mantenido en condiciones de oscuridad y por lo tanto se encuentra etiolado.

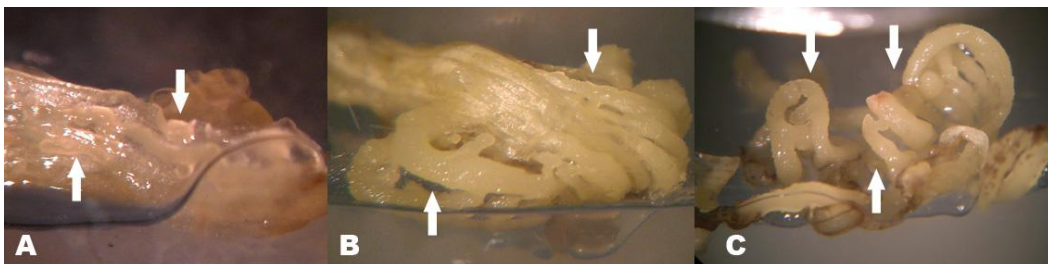


Fig. 20 Callo proveniente del medio MS6, var. Esp. Roja a: A) 3 meses de cultivo, B) 5 meses de cultivo y C) 7 meses de cultivo.

A los 3 meses de cultivo, se obtuvo un 38% de formación de callos en el medio MS4, 2% en el medio MS5 y 10% en el medio MS6 para la var. Española Roja (Tabla 7), observándose un incremento progresivo del tamaño del callo al transcurrir el tiempo de experimentación en todos los casos en que hubo formación del mismo.

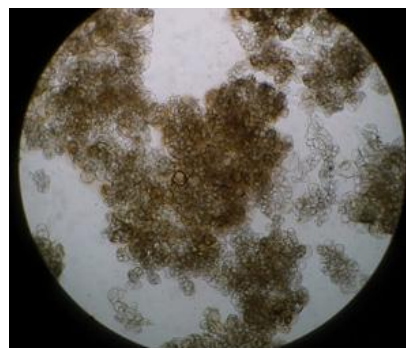


Fig. 21 *Squash* de Callo Embriogénico var. Española Roja, MS4 (100X).

En la Fig. 21 se puede observar un *squash* de callo embriogénico formado en el medio MS4, donde se observan las células que darán origen a los embriones somáticos, las cuales son de tamaño pequeño, redondeadas y presentan un contenido citoplasmático denso.

Tabla 7. Porcentaje de formación de callo en segmentos de bases de hojas de la variedad Española Roja.

Medio de cultivo	% Formación de callo
3 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	38
MS5	2
MS6	10
7 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	86
MS5	90
MS6	78

Al transcurrir el tiempo de experimentación, el callo se tornó heterogéneo, con zonas compactas de color marrón y con otras zonas granulares de color claro (Fig. 22), en la mayoría de los casos, el callo formado llegó a ocupar toda la superficie del explante y en otros casos, solamente los extremos.



Fig. 22 Callo embriogénico de var. Esp. Roja, MS5 a los 6 meses de cultivo.

Al séptimo mes de cultivo, el porcentaje de formación de callo fue de 86% en el medio MS4, 90% en el medio MS5 y 78% en el medio MS6, encontrándose un mayor porcentaje de formación de callo en el medio MS4 con respecto a los medios MS5 y MS6 a lo largo del período de experimentación (Tabla 7).

5.4.1.2 Regeneración

En la presente investigación ocurrió embriogénesis somática directa, es decir, hubo la formación de embriones somáticos sin la aparición de una etapa previa de callo en el 15% de los explantes de la var. Española Roja cultivados en el medio MS5. En la Fig. 23 se muestran embriones somáticos sin aislar, formados por vía directa. El explante, se observa con apariencia transparente a pesar de que no fue sometido a un proceso de aclarado.

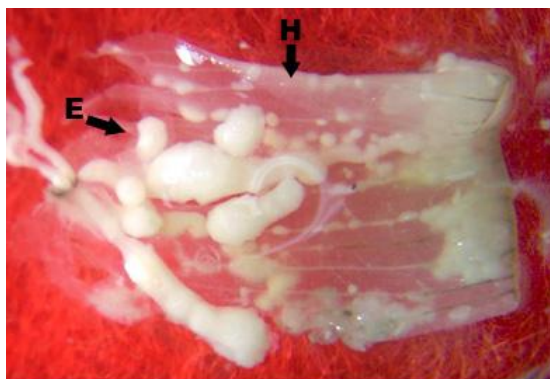


Fig. 23 Embriogénesis somática directa. var. Española Roja, MS5.

Estos embriones formados por vía directa se encontraban en el mesófilo del explante, en algunos casos rodeados por células del parénquima en empalizada a ambos lados y cubiertos por la epidermis del explante (Fig. 24A) y en otros casos, los embriones se encontraban hacia uno de los lados del mesófilo

dispuestos hacia el exterior de la hoja y estaban rodeados por una capa de epidermis (Fig. 24B).

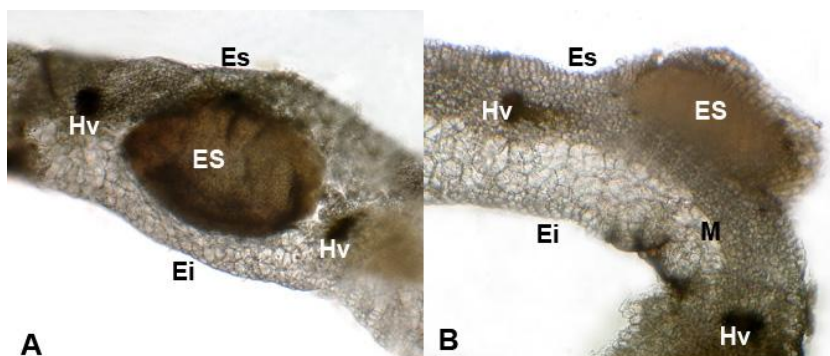


Fig. 24 Corte transversal de explante mostrando embrión somático (ES) directo proveniente de var. Española Roja, MS5: A) Ubicado en el interior del mesófilo (M) y B) Ubicado hacia el exterior del mesófilo. Hv (haz vascular), Es (epidermis superior), Ei (epidermis inferior). (200X)

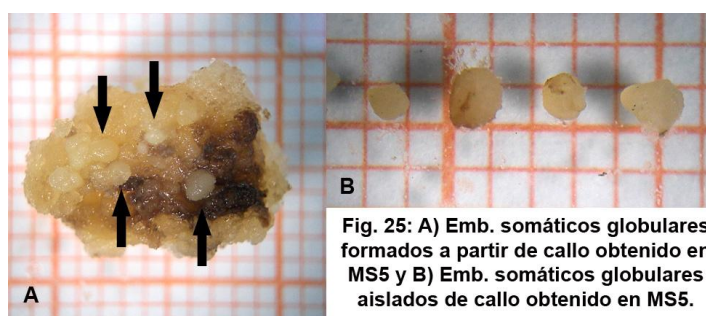
A las 10 semanas desde el inicio del cultivo, se obtuvo la formación de los primeros embriones somáticos en estado globular en el medio MS4, mientras que en los medios MS5 y MS6, este evento ocurrió a las 13 y 15 semanas de iniciado el cultivo respectivamente.

A los 3 meses de cultivo, se obtuvo un promedio de 0,34 embriones/explante en el medio MS4 (Tabla 9), y no hubo formación de embriones en los medios de cultivo MS5 y MS6. Llegado el séptimo mes de cultivo el promedio de embriones/explante aumentó a 4,42 en el medio MS4 y se obtuvo un promedio de 3,70 embriones/explante en el medio MS5 y 0,96 embriones/explante en el medio MS6 (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Embriogénesis somática en segmentos de bases de hojas de piña var. Española Roja.

Medio de cultivo	Promedio Embriones/explante
3 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	0,34
MS5	0
MS6	0
7 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	4,42
MS5	3,70
MS6	0,96

Los embriones globulares obtenidos eran de coloración blanquecina, superficie brillante, tamaño aproximado de 1-2 mm² (Fig. 25 A y B) y podían ser extraídos con facilidad del tejido circundante que les dio origen (callo).



5.4.1.3 Desarrollo de embriones somáticos

La formación de embriones en estado globular ocurrió en el medio de cultivo MS4 a los 5 meses de cultivo y dichos embriones fueron extraídos del callo o del mesófilo del explante (dependiendo de si fueron obtenidos por vía indirecta o directa), para luego transferirlos a los medios donde se llevó a cabo la continuación de los diferentes estadios de desarrollo embrionario.



Fig. 26 Embriones somáticos de var. Esp. Roja, MS6 en diferentes estadios de desarrollo.

La Fig. 26 muestra embriones somáticos en diferentes estadios de alargamiento extraídos del medio de cultivo MS6. Dicho alargamiento no se produjo de manera sincronizada en ninguno de los medios de cultivo encontrándose en todos los casos predominantemente mayor cantidad de embriones globulares que de embriones alargados.

Una vez obtenidos los embriones globulares de la variedad Española Roja, se realizaron dos siembras de los mismos en los medios MSEmb1 (sin reguladores de crecimiento) y MSEmb2 (1mg/L de BA, reportado por Roostika y Mariska en el 2003) para la continuación de las diferentes etapas de desarrollo. Estas siembras se realizaron dos semanas después de transcurridos los 3 y 5 meses de iniciado el cultivo. En la primera siembra, fueron sembrados un total de 17 embriones obtenidos en el medio MS4 y en la segunda fueron sembrados 204 embriones del medio MS4, 185 del medio MS5 y 48 del medio MS6 (Tabla 9).

Tabla 9. Número de embriones globulares de la var. Española Roja sembrados en los medios de cultivo para la siguientes etapas de desarrollo.

Medio de cultivo	Nro. de embriones sembrados en siembra 1	Nro. de embriones sembrados en siembra 2
MS1	0	0
MS4	17	204
MS5	0	185
MS6	0	48

En la primera siembra de los embriones somáticos, se observó la oxidación del 100% de éstos así que para la segunda siembra se procedió a añadir 100 mg/L de ácido ascórbico a los medios de cultivo para evitar la oxidación de los embriones somáticos y también se encontró que en los casos en que los embriones somáticos eran separados en grupos de 3–5 y conservaban pequeñas porciones de callo, el número de embriones oxidados o muertos era menor que cuando los embriones eran aislados completamente del callo, por lo tanto en las siembras posteriores se fraccionó el callo en pequeñas porciones que contenían un máximo de 5 embriones somáticos y estas secciones fueron subcultivadas en los medios de desarrollo MSEmb1 y MSEmb2.

Transcurridos 2 meses de sembrados los embriones somáticos en los medios MSEmb1 y MSEmb2, se produjo el desarrollo de los embriones somáticos provenientes del medio de cultivo MS5.

Tabla 10. Desarrollo de los embriones somáticos de piña var. Española Roja.

Medio de cultivo	Promedio Plantas/explante	ÍFB
3 Meses de cultivo		
MS1	0	0
MS4	0,34	0,02
MS5	0	0
MS6	0	0
8 Meses de cultivo		
MS1	0	0
MS4	2,92	0,46
MS5	2,80	0,34
MS6	0	0

Los embriones somáticos en estado alargado, al igual que los embriones somáticos en estado globular, eran de coloración blanquecina, pero a diferencia de los primeros, éstos presentaron suspensores (Fig. 27).

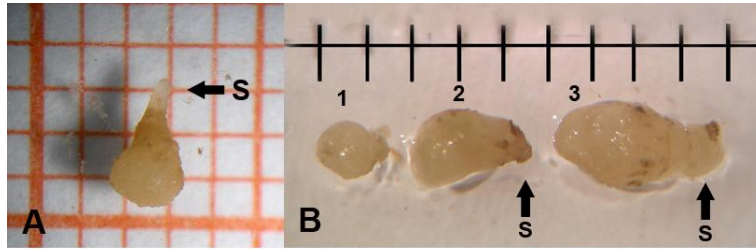


Fig. 27: A) Embrión somático alargado con suspensor (S) y B) Embrión somático globular (1), ES alargado 3mm de largo (2) y ES alargado 4mm de largo (3). Todos var. Esp. Roja, MS5.

En todos estos casos se produjo el desarrollo de los embriones somáticos que se formaron por vía indirecta pero no se produjo el desarrollo de los embriones somáticos formados por vía directa, los cuales permanecieron en estado globular.

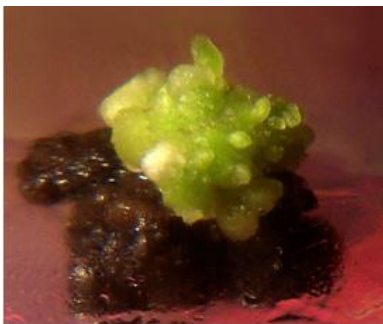


Fig. 28 Plantas de *A. comosus* obtenidas por el desarrollo de embriones somáticos provenientes de MS4 a los 4,5 meses de cultivo.



Fig. 29 Plantas de *A. comosus* var. Española Roja, MS4 a los 8 meses de cultivo.

En este caso se observó el desarrollo de un grupo de embriones en el medio de cultivo MSEmb1, los cuales dieron origen a un grupo de plántulas (Fig. 28 y 29), las cuales eran de una altura inicial aproximada de 2mm y luego de 8 meses de cultivo llegaron a alcanzar los 2 cm de altura aproximadamente. No se encontraron diferencias entre el desarrollo de los embriones somáticos en los medios MSEmb1 y MSEmb2.



Fig. 30 Corte longitudinal de embrión de var. Esp. Roja, MS5 (100X).

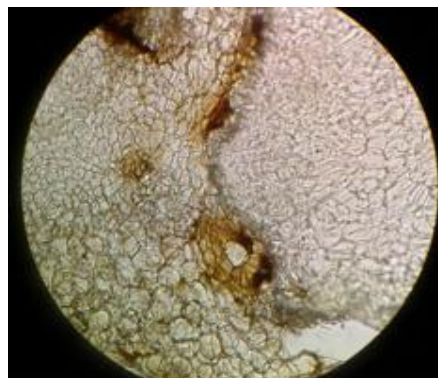


Fig. 31 Detalle de ausencia de conexión vascular entre el embrión y el callo (400X).

En la Fig. 30 se puede observar el corte longitudinal de un embrión desarrollado formado en el medio MS5 a partir de callo embriogénico a los 7,5 meses de cultivo y en la Fig. 31 se puede observar en detalle que no existe conexión vascular entre el embrión y el tejido que le dio origen (callo).

A los 8 meses de cultivo el promedio de plantas/explante obtenido en el medio de cultivo MS4 fue mayor que el obtenido en el medio MS5 (2,92 y 2,80, respectivamente) (Tabla 10) y estas plantas alcanzaron una altura promedio de aproximadamente 3 cm en los dos medios de desarrollo de embriones somáticos.

5.4.2 Embriogénesis somática de *A. comosus* var. Tabë Canä

5.4.2.1 Inducción del callo

Al igual que lo ocurrido en todos los casos anteriores, los explantes cultivados en el medio MS1 no manifestaron ningún tipo de respuesta y también se observó la oxidación de los mismos.

A partir de la cuarta semana de cultivo hubo formación de callo en los medios MS4 y MS5, mientras que en el medio MS6 ocurrió la formación de callo a la quinta semana de cultivo, siendo igual las características morfológicas de los callos formados en la var. Española Roja (Fig. 32 A y B).

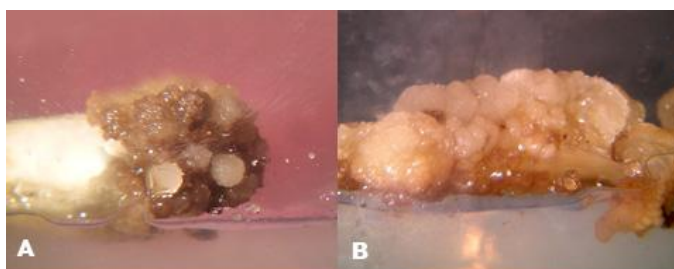


Fig. 32 Callo Embriogénico var. Tabè Canã, MS4 a: A) 3 meses de cultivo y B) 7 meses de cultivo.

A los 3 meses de cultivo el porcentaje de explantes con callos formado fue 16% en el medio MS4, 64% en el medio MS5 y 2% en el medio MS6 (Tabla 11), por lo que en medio de cultivo MS5 se obtuvo el mayor porcentaje de explantes con callos formado en la var. Tabè Canã en relación con la var. Española Roja (64% y 2% respectivamente).

Tabla 11. Porcentaje de formación de callo en segmentos de bases de hojas de la variedad Tabè Canã.

Medio de cultivo	% Formación de callo
3 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	16
MS5	64
MS6	2
7 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	88
MS5	100
MS6	92

Al séptimo mes de cultivo, se obtuvo un mayor porcentaje de explantes con callos formado para la var. Tabë Canä 88% en el medio MS4, 100% en el medio MS5 y 92% en el medio MS6, en comparación con el 86% obtenido en el medio MS4, 90% en el medio MS5 y 78% en el medio MS6 obtenidos en la var. Española Roja.

5.4.2.2 Regeneración

En esta variedad ocurrió embriogénesis somática únicamente por vía indirecta y una vez inducida la formación de los callos, se observó la aparición de los embriones somáticos a las 8 semanas de cultivo en el medio MS5, no siendo así en los otros dos medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento (MS4 y MS6), en los cuales no se logró la inducción del proceso de embriogénesis somática para esta variedad.

Al tercer mes de cultivo solamente ocurrió la formación de embriones somáticos en el medio MS5, donde se obtuvo un promedio de 2,26 embriones/explante (Tabla 12) y al séptimo mes de cultivo tampoco se logró la formación de embriones en los medios MS4 y MS6, mientras que en el medio MS5 se alcanzó un promedio de 5,26 embriones/explante, el cual es superior al alcanzado a este mismo tiempo de cultivo en la var. Española Roja (3,70 embriones/explante).

Tabla 12. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de Embriogénesis somática en segmentos de bases de hojas de piña var. Tabé Canä.

Medio de cultivo	Promedio Embriones/explante
3 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	0
MS5	2,26
MS6	0
7 Meses de cultivo	
MS1	0
MS4	0
MS5	5,26
MS6	0

Los embriones formados presentaron las mismas características morfológicas que los de la var. Española Roja (Fig. 33) y también y podían ser extraídos mecánicamente fácilmente del callo que les dio origen.

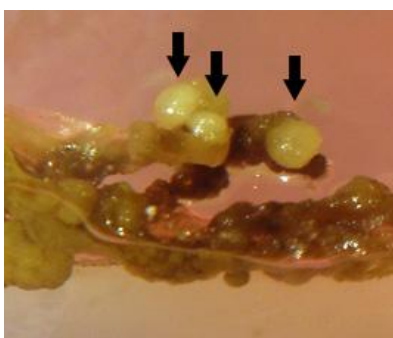


Fig. 33 Embriones somáticos de var. Tabé Canä obtenidos en MS5 a los 5 meses de cultivo.

5.4.2.3 Desarrollo de embriones somáticos

A los tres meses de cultivo se hizo el primer aislamiento de los embriones somáticos en estado globular y su posterior siembra en los medios de desarrollo MSEmb1 y MSEmb2, sumando un total de 113 embriones somáticos obtenidos en el medio MS5 (Tabla 13), luego se hizo una segunda siembra a los cinco

meses de cultivo, esta vez conformada por 150 embriones somáticos, para alcanzar un total de 263 embriones.

Tabla 13. Número de embriones globulares de la var. Tabë Canä sembrados en los medios de cultivo para las siguientes etapas de desarrollo.

Medio de cultivo	Nro. de embriones sembrados en siembra 1	Nro. de embriones sembrados en siembra 2
MS1	0	0
MS4	0	0
MS5	113	150
MS6	0	0

De igual manera que lo ocurrido en la var. Española Roja, una vez sembrados los embriones somáticos en estado globular en los medios de cultivo para desarrollo de los embriones (MSEmb1 y MSEmb2), se produjo el alargamiento de los mismos y finalmente la formación de las plantas a los 8 meses de cultivo.

Tabla 14. Desarrollo de los embriones somáticos de piña var. Tabë Canä.

Medio de cultivo	Promedio Plantas/explante	ÍFB
3 Meses de cultivo		
MS1	0	0
MS4	0	0
MS5	2,26	0,95
MS6	0	0
7 Meses de cultivo		
MS1	0	0
MS4	0	0
MS5	3,84	1,69
MS6	0	0

El desarrollo de los embriones somáticos provenientes del medio MS5, ocurrió a los 3 meses de sembrados en los medios MSEmb1 y MSEmb2, es decir, transcurridos 7 meses desde el inicio del cultivo, obteniéndose un promedio de 2,26 plantas/explante, el cual se incrementó a los 4 meses de sembrados en

los medios de desarrollo (8 meses desde el inicio del cultivo), llegando a alcanzar un promedio de 3,84 plantas/explante (Tabla 14). Este valor fue mayor al obtenido a partir de los embriones provenientes del medio MS5 para la var. Española Roja (2,80 plantas/explante).

Tabla 15. Comparación estadística de la respuesta embriogénica de la var. Española Roja y var. Tabë Canä.

Medio de cultivo	Promedio Embriones/explante		Promedio Plantas/explante	
	Var. Esp. Roja	Var. Tabë Canä	Var. Esp. Roja	Var. Tabë Canä
MS1	0 a	0 a	0 a	0 a
MS4	4,42 b	0 a	2,92 b	0 a
MS5	3,70 b	5,26 b	2,80 b	3,84 c
MS6	0,96 a	0 a	0 a	0 a

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

Estadísticamente, no hubo diferencias significativas en cuanto al promedio de embriones/explante entre los tratamientos aplicados en los medios MS6 (ambas variedades), MS1 (ambas variedades) y MS4 var. Tabë Cana y tampoco se encontraron diferencias significativas entre los medios MS5 (ambas variedades) y MS4 var. Española Roja también referido al promedio de embriones/explante. En cuanto al promedio de plantas/explante, hubo diferencias significativas solamente en el medio MS5 de la var. Tabë Cana (Tabla 15).

5.5 Comparación de la Organogénesis y la Embriogénesis somática para ambas variedades

Comparando ambos procesos de propagación clonal masiva, se obtuvo un mayor promedio de plantas/explante por organogénesis (4,7 para la var. Española Roja y 4.98 para la var. Tabë Canä) que por embriogénesis somática

(2,92 para la var. Española Roja y 3,84 para la var. Tabë Canä), a los 7 meses de cultivo.

Por otra parte, ambos procesos (organogénesis y embriogénesis somática) ocurrieron tanto por vía indirecta como por vía directa en la variedad comercial Española Roja, no siendo así en la variedad autóctona del Amazonas Tabë Canä.

5.6 Caracterización morfoanatómica de hojas de *Ananas comosus*

A continuación se presenta una tabla comparativa donde se muestran las características morfoanatómicas evaluadas en las hojas de piña de ambas variedades en las diferentes condiciones de cultivo evaluadas.

Tabla 16. Caracterización morfoanatómica de hojas de *Ananas comosus*.

Característica morfológica o anatómica	Var. Esp. Roja madre <i>ex vitro</i>	Var. Esp. Roja madre <i>in vitro</i>	Var. Esp. Roja hija <i>ex vitro</i>	Var. Esp. Roja hija <i>in vitro</i>	Var. Tabë Canä madre <i>ex vitro</i>	Var. Tabë Canä madre <i>in vitro</i>	Var. Tabë Canä hija <i>ex vitro</i>	Var. Tabë Canä hija <i>in vitro</i>
Coloración de la hoja	Rojiza	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Márgen espinoso	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si
Cutícula	Gruesa	Delgada	Delgada	Delgada	Gruesa	Delgada	Delgada	Delgada
Presencia de escamas peltadas	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Cristales de rafidio	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Líneas de haces vasculares	3 líneas, una central y dos laterales.	2 líneas	2 líneas	2 líneas	2 líneas	2 líneas	2 líneas	2 líneas
Aerénquima	Si	No	No	No	No	No	No	No

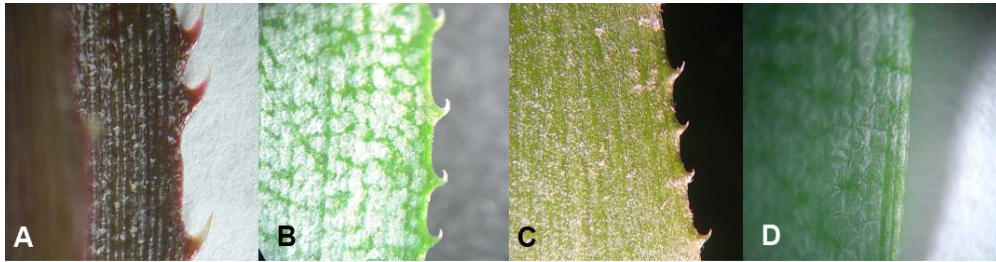


Fig. 34 Hojas de plantas de *A. comosus* var. Española Roja: A) Madre *ex vitro*, B) Madre *in vitro*, C) Hija *ex vitro* y D) Hija *in vitro*. Aumento 10X.

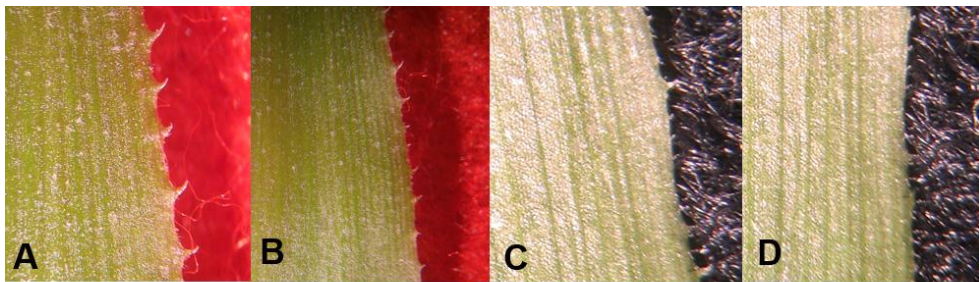


Fig. 35 Hojas de plantas de *A. comosus* var. Tabë Canä: a) Madre *ex vitro*, B) Madre *in vitro*, C) Hija *ex vitro* y D) Hija *in vitro*. Aumento 10X.

La Fig. 34 muestra las hojas de plantas de piña var. Española Roja, donde se puede observar que la hoja de la planta madre mantenida en vivero (Fig. 34A) es la única que presenta la coloración rojiza típica de esta variedad y las hojas de las plantas hijas obtenidas por organogénesis y mantenidas *in vitro* (Fig. 34D) presentaron márgenes sin espinas; este segundo aspecto difiere con lo encontrado en las hojas de la var. Tabë Canä obtenidas por organogénesis y mantenidas *in vitro*, las cuales presentaron hojas con márgenes espinosos (Fig.35 D) en un estado de desarrollo temprano en comparación con las hojas de la var. Española Roja obtenidas por organogénesis.

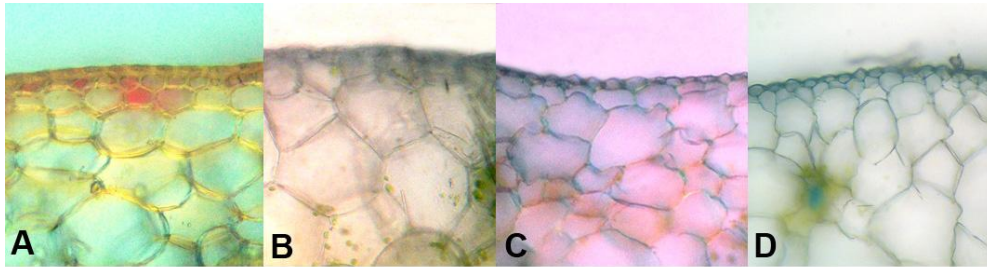


Fig. 36 Detalle de cutícula, epidermis e hipodermis de hojas de plantas de *A. comosus* var. Española Roja: A)Madre *ex vitro*, B)Madre *in vitro*, C)Hija *ex vitro* y D)Hija *in vitro*. Corte transversal, aumento 200X.

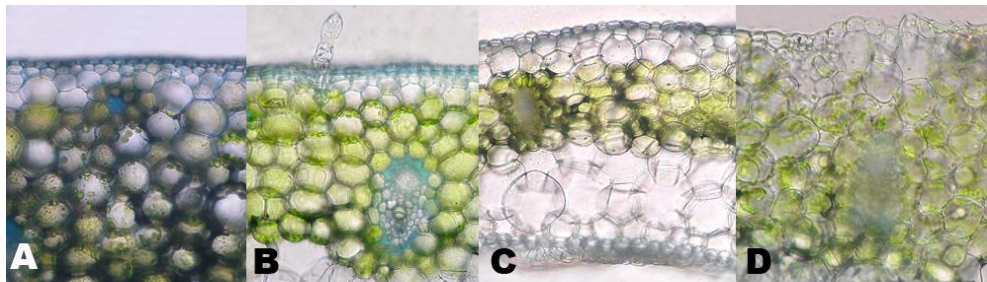


Fig. 37 Detalle de cutícula, epidermis e hipodermis de hojas de plantas de *A. comosus* var. Tabë Canä: A)Madre *ex vitro*, B)Madre *in vitro*, C)Hija *ex vitro* y D)Hija *in vitro*. Corte transversal, aumento 200X.

Las figuras 36 y 37 muestran detalles de la cutícula, epidermis e hipodermis de las hojas de las plantas de piña de ambas variedades en las diferentes condiciones de cultivo. En las hojas de plantas cultivadas y mantenidas *in vitro* (madres e hijas) de ambas variedades (Fig. 36 B y D y 37 B y D), se pudo observar una cutícula poco desarrollada, en comparación con las hojas de las plantas madres mantenidas *ex vitro* de ambas variedades (Fig. 36 A y C y 37 A y C). En las secciones transversales de la lámina foliar de las plantas de piña de ambas variedades mantenidas *in vitro*, se observó un parénquima acuífero constituido por células redondeadas de mayor tamaño que las células de la hipodermis.

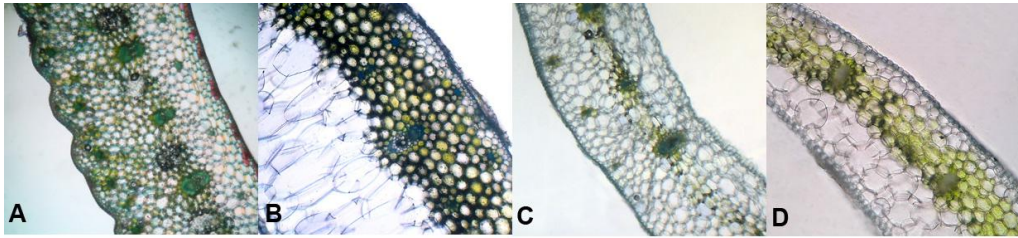


Fig. 38 Corte transversal de hojas de *A. comosus* mostrando disposición de haces vasculares: A) Madre *ex vitro* var. Esp. Roja (200X), B) Madre *ex vitro* var. Tabë Canä (300X), C) Hija *ex vitro* var. Esp. Roja (200X), y D) Hija *in vitro* Tabë Canä (200X).

En la Fig. 38 A se observan las hojas de las plantas madre de la var. Española Roja mantenida en vivero mostrando una línea de haces vasculares principales de mayor tamaño, acompañados por dos líneas de haces vasculares secundarios ubicados uno a cada lado del mesófilo, mientras que en las demás condiciones de cultivo de ambas variedades sólo se observó una línea de haces vasculares principales y otra lateral, una a cada lado del mesófilo (Fig. 38 B, C y D).

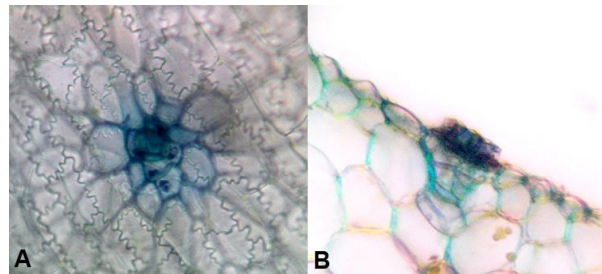


Fig. 39 Escamas de hojas de plantas de *A. comosus*
A) Vista paradérmica y B) Corte transversal.
Aumento 400X.

La Fig. 39 A y B muestra escamas peltadas multicelulares encontradas en la cara adaxial de la epidermis de las plantas de ambas variedades estudiadas creciendo tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

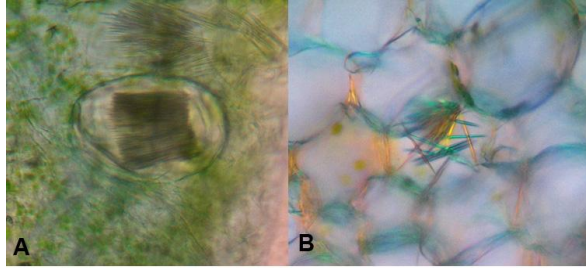


Fig. 40 Cristales de rafidio de hojas de plantas de A. comosus: A) Idioblasto con paquetes de cristales y B) Cristales dispersos. Aumento 400X.

La Fig. 40 A y B, muestra cristales de rafidio en las hojas de plantas de piña de ambas variedades, los cuales se encuentran con frecuencia en la hipodermis acuífera de las plantas de piña.

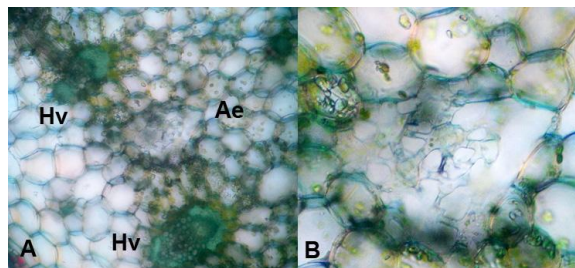


Fig. 41 Hojas de planta madre var. Española Roja: A) Disposición de aerénquima entre dos haces vasculares (300X) y B)Detalle de aerénquima (400X).

En la Fig. 41 se observa un corte transversal de las hojas de la planta madre de la var. Española Roja, en el cual se observaron cavidades aeríferas (aerénquima), ubicadas entre los haces vasculares principales conformadas por estructuras celulares en forma de discos con brazos largos, lo cual no se observó en ninguna de las otras hojas estudiadas.

6. DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento del cultivo

El bajo porcentaje de contaminación presentado en los cultivos durante el proceso de regeneración *in vitro*, se debió a la fuente de explantes empleados ya que el ensayo se llevó a cabo a partir de plantas obtenidas y mantenidas *in vitro*, lo cual demuestra la importancia que tienen las fases preparativas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, donde cumple un papel importante la selección del material vegetal a utilizar y su repercusión en la etapas de iniciación y establecimiento del cultivo. Por esta razón, para el cultivo *in vitro* se utilizan de forma mayoritaria plantas donantes mantenidas en condiciones *in vitro*, donde los tejidos son muy jóvenes, lo que facilita la reimplantación *in vitro*, mejora el proceso de selección y además éstos se encuentran por lo general libres de agentes contaminantes (Jiménez, 1998). Sin embargo también se le atribuye la presencia de agentes contaminantes como hongos y bacterias a la manipulación del material de vidrio y posibles errores en el manejo de las condiciones de asepsia.

Durante la presente investigación el tratamiento con ácido ascórbico fue adecuado para evitar la oxidación de los explantes. Este compuesto junto con el ácido cítrico y la L- cisteína son empleados para evitar la oxidación de los cultivos *in vitro* (Hurtado y Merino, 1987 y Pierik, 1990).

El uso de bases de hojas como explantes resultó satisfactorio para la propagación vía organogénesis en ambas variedades estudiadas de piña. Roostika y Mariska en el 2003 y Firoozabady y Moy en el 2004, llevaron a cabo

experimentos empleando secciones de diferentes regiones de la hoja de piña (ápice, región media y base), encontrando que sólo las bases de hojas fueron las únicas regiones de la hoja de piña que respondieron al proceso de regeneración, atribuyendo este hecho a que éstas se encuentran en las proximidades de los meristemas axilares o a regiones meristemáticas que contienen tejidos jóvenes con células de rápida división, que son aptas para la morfogénesis en el cultivo de tejidos.

6.2 Organogénesis de *A. comosus* variedades Española Roja y Tabë Canã

6.2.1 Inducción del callo

En ninguna de las dos variedades estudiadas de *A. comosus* se indujo la formación de callo en los explantes cultivados en el medio control sin reguladores de crecimiento (MS1), esto sugiere que para lograr la inducción de la respuesta organogénica fue necesario aplicar un estímulo hormonal a los explantes que modificara el balance hormonal endógeno de los mismos, ya que el existente no era adecuado por si solo para generar la formación de callo en ninguna de las dos variedades de piña empleadas.

En la variedad Española Roja hubo organogénesis por vía directa (sin la formación previa de callo) y organogénesis indirecta (con la formación previa de callo), mientras que en la variedad autóctona del Amazonas, solamente ocurrió organogénesis indirecta. Esto indica que a pesar de que se usó el mismo tipo de explante para las dos variedades, los explantes contenían concentraciones de hormonas endógenas diferentes y en el caso de la var. Española Roja, se infiere que en el tejido empleado como explante se encontraban células predeterminadas para el proceso de organogénesis.

El proceso de la organogénesis fue dividido en tres fases por Christianson y Warnick 1985 (citados por Mercier y col. 2003 y Hamasaki y col., 2006), trabajando con el género *Convolvulus*. Estas tres fases son: 1) adquisición de la competencia (la habilidad de responder a la inducción organogénica), 2) la inducción organogénica *per se*, durante la cual la célula se vuelve determinada para la formación de un órgano específico; y 3) la diferenciación morfológica y desarrollo, resultando en la formación de raíces y/o brotes visibles.

En las dos variedades estudiadas, se observó respuesta hacia la formación de callo en los medios donde se adicionaron reguladores de crecimiento, al mes de cultivo aproximadamente. Este resultado fue similar al reportado por Amin y col. (2005), los cuales obtuvieron organogénesis en *A. comosus* cv. Giant Kew a partir de bases de hojas a la cuarta semana de cultivo en un medio MS suplementado con 2,0 mg/L de 2,4-D y 2,0 mg/L de BA, logrando un máximo de 95% de callo formado. Este período de tiempo resultó ser superior al reportado por Sripaoraya y col. (2003), los cuales indican que obtuvieron la formación de callos a los 14 días de cultivo a partir de bases de hojas de piña cv. Phuket, en medio MS suplementado igualmente con 2,4-D y BA pero en concentraciones diferentes (0,5 y 2,0 mg/L respectivamente).

6.2.2 Regeneración

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 y raíces dependiendo fundamentalmente del balance auxina/citoquinina del medio de cultivo (Gómez, 1998).

Es importante destacar que a diferencia de lo reportado por otros autores, no fue necesaria la transferencia de los callos a un medio de regeneración de brotes ya que en esta investigación ocurrió la formación de raíces y/o brotes en los explantes en los mismos medios de inducción de callo.

En el medio MS2 (5 mg/L de ANA + 0,25 mg/L de BA) se obtuvieron resultados similares en ambas variedades de piña estudiadas (4,7 plantas/explante para var. Española Roja y 4,98 plantas/explante para la var. Tabë Canã) a los 7 meses de cultivo. Estos resultados son comparables con los reportados por Fitchet (1990, citado por Almeida y col., 1997) para la inducción de callos a partir de regiones apicales de coronas de piña cv. Reina, empleando un medio suplementado con una combinación de auxina y citoquinina (40 mg/L de ANA, 15% (v/v) de leche de coco y 400 mg/L de caseína hidrolizada), obteniendo un promedio de 6 plantas/explante.

Firoozabady y Gutterson en el 2003, también obtuvieron brotes de piña *in vitro* vía organogénesis, utilizando la misma combinación hormonal pero en diferente concentración (1,5 mg/L de BA y 0,5 mg/L de ANA) en medio MS al igual que Sripaoraya y col. (2003), los cuales obtuvieron brotes a partir de bases de hojas cultivadas en medio MS suplementado con otra combinación de auxinas y citoquininas (0,5 mg/L de 2,4-D y 2,0 mg/L de BA).

Por otra parte, Mattew y Rangan (1979, citados por Almeida y col., 1997), trabajando en organogénesis en piña empleando un medio de cultivo MS suplementado solamente con citoquinina (2,1 mg/L de K), reportaron el mismo

resultado promedio (4,7 plantas/explante) que los obtenidos en esta investigación en el medio de cultivo MS2.

Amin y col. (2005) usando un medio MS suplementado con una combinación de auxinas y citoquininas (0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de BA), regeneraron brotes de piña obtenidos a partir de callo organogénico logrando un promedio de 18,55 plantas/explante a las 6 semanas de cultivo, mientras que Rahman y col. 2001 (citados por Roostika y Mariska, 2003), empleando un medio de cultivo con una composición idéntica de reguladores de crecimiento obtuvieron rizogénesis *in vitro* a partir de segmentos de hojas extraídos de coronas de piña.

En el medio de cultivo MS3 suplementado solamente con auxina (2,5 mg/L de 2,4-D) se obtuvieron resultados contrastantes entre ambas variedades de piña a los 7 meses de cultivo (0,98 plantas/explante para var. Española Roja y 1,78 plantas/explante para la var. Tabë Canä). Aunque se ha reportado la inducción de la organogénesis en diferentes especies vegetales solamente con el uso de 2,4-D (Khanam y col., 2000 y Vidoz y col., 2004), esta auxina es empleada usualmente en la inducción de la embriogénesis somática; sin embargo, en la presente investigación arrojó resultados hacia la inducción de la organogénesis produciendo la regeneración de brotes y raíces. Sin embargo, a pesar de que se logró la inducción de la organogénesis en este medio (MS3), los resultados obtenidos son inferiores con respecto a los alcanzados en el medio MS2 en ambas variedades (4,7 plantas/explante para var. Española Roja y 4,98 plantas/explante para la var. Tabë Canä), los cuales contenían citoquininas.

En la presente investigación, en la variedad Española Roja se produjo una mayor cantidad de brotes que de raíces en el medio de cultivo MS2, mientras que en este mismo medio de cultivo en la variedad Tabë Canä, ocurrió mayoritariamente la formación de raíces. Esta diferencia en cuanto a la respuesta de dos variedades de una misma especie a un mismo tratamiento hormonal, podría estar relacionada principalmente con dos factores: el genotipo de ambas variedades, ya que el índice de propagación es diferente para cada especie y para distintas variedades o clones dentro de una misma especie (Orellana, 1998), y el segundo factor serían las concentraciones endógenas de hormonas existentes en el tejido vegetal, las cuales influyen en la respuesta hacia una vía organogénica tal como lo indicaran Skoog y Miller en el año 1957 (citado por Mercier y col. 2003) donde tanto la rizogénesis como la caulogénesis pueden ocurrir en algunas células o tejidos vegetales en respuesta a la manipulación de los niveles exógenos de hormonas y reguladores de crecimiento.

En la variedad Española Roja se logró rizogénesis directa en el medio MS3, y formación de raíces y vástagos vía organogénesis indirecta en el medio de cultivo MS2, lo que indica que si bien el medio de cultivo MS2 resulta ser más eficiente en la producción de brotes y raíces, éstos solamente se producen por la vía indirecta, mientras que en el medio MS3 se obtuvo organogénesis directa a pesar de que fue en una menor proporción.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Roostika y Mariska en el año 2003, los cuales establecieron un sistema de organogénesis en piña empleando yemas apicales sembradas en un medio MS suplementado con 5

mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA (igual al medio MS2 empleado), obteniendo un 99% de brotes vía organogénesis directa y un 86% de brotes vía organogénesis indirecta.

En la presente investigación no se realizaron estudios moleculares para verificar si ocurrieron cambios genotípicos en las plantas hijas obtenidas por ambos sistemas de regeneración *in vitro*, sin embargo, según Orellana (1998), la organogénesis directa es un método de propagación que implica una menor variación genética de las plantas regeneradas por esta vía, en relación a las plantas obtenidas mediante organogénesis indirecta, ya que la formación del callo se produce a través de una etapa de rápida división celular y es allí donde podrían ocurrir una mayor cantidad de mutaciones o alteraciones del material genético de la planta, pudiendo ocasionar diferencias en su fenotipo.

Según Pierik (1990), las raíces y los vástagos se forman por lo general de forma completamente independiente unos con respecto a los otros, es decir, que no existe conexión entre ellos, aunque se originen a partir de un callo al mismo tiempo.

6.3 Aclimatación

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 actividad fotosintética durante las primeras etapas de la planta bajo condiciones *in vitro* no es necesaria, ya que a la planta se le suministran los elementos básicos para su desarrollo mediante un medio nutritivo, encontrándose así en un estado semi-heterotrófico y pasando a un estado autotrófico al ser trasplantada al suelo (Hurtado y Merino, 1987).

La importancia de que se lleve a cabo la fase de aclimatación 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 y Santa Cruz y col., 2006).

En esta investigación se logró la aclimatación de las plantas de piña var. Española Roja y var. Tabë Canã obtenidas *in vitro* por Organogénesis (100% y 90% de plantas aclimatadas respectivamente), empleando para ello un sustrato compuesto con tierra negra abonada y arena lavada en proporción 1:1.

Este resultado es similar al obtenido por García y col. (2008), los cuales lograron un 100% de supervivencia de plantas micropropagadas de piña var. Española Roja, empleando un sustrato con igual composición que el usado en la presente investigación.

Por otra parte, Dal Vesco y col. (2001), realizaron trabajos en plantas micropropagadas *in vitro* de piña cv. Pérola, evaluando diferentes factores tales como el tamaño de las plantas a aclimatar y la composición del sustrato (compost

orgánico y arena en proporción 5:1), encontrando que independientemente del sustrato empleado, la tasa más alta de supervivencia (93,8%) se obtuvo cuando los brotes aclimatados eran de más de 7 cm de altura, lo cual es una medida similar a los 6 cm de altura promedio con los cuales se realizó la transferencia a tierra de las plantas aclimatadas en la presente investigación.

En estudios realizados por Moreira y col., (2006) en plantas micropropagadas de piña cv. Pérola, se indica la obtención de mejores resultados empleando tres tipos de sustratos: compost orgánico, una combinación de 50 % de tierra negra y 50 % de estiércol bovino y una combinación de 40% de tierra negra, 30% de estiércol bovino y 30% de Plantmax (turba negra comercial cribada y tratada), obteniendo un 95% de sobrevivencia en los tres casos reportados. Sin embargo, en la aclimatación realizada en esta investigación, se obtuvieron resultados superiores para la var. Española Roja (100% de supervivencia), sin emplear compuestos adicionales como el Plantmax, lo cual encarecería el costo de producción de las plantas.

6.4 Embriogénesis somática de *A. comosus* variedades Española Roja y Tabë Canä

6.4.1 Inducción del callo

Al igual que lo ocurrido con la organogénesis, no se produjo la respuesta de los explantes cultivados en el medio MS1 (sin reguladores de crecimiento), por lo cual se infiere que como ocurrió con la organogénesis, fue necesaria la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo que modificaran el balance hormonal de manera tal que ocurriera la embriogénesis somática.

En el desarrollo de los embriones somáticos a partir de un explante, en primer lugar se deben desdiferenciar las células ya diferenciadas y posteriormente iniciar la división. De esta forma se origina una masa no diferenciada de células parenquimáticas vacuoladas que conformarán el callo embriogénico (Kohlenbach, 1977; citado por Pierik, 1990). Estas se transforman en células ricas en citoplasma que se hacen embriogénicas por la influencia de la auxina.

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional (Gómez, 1998) y una vez que la inducción de la embriogénesis se ha logrado, no parece que existan diferencias fundamentales entre la embriogénesis somática directa e indirecta (Williams y Maheswaran, 1986, citados por Jiménez, 2001).

Sripaoraya y col. (2003), obtuvieron un máximo valor de explantes con callo embriogénico ($58.3 \pm 8.3\%$) a los 35 días de cultivo en medio MS suplementado con 3,0 mg/L de picloram. Este resultado fue superior al obtenido en la presente investigación a los 3 meses de cultivo en el medio de MS6, con idéntica composición de reguladores de crecimiento (3,0 mg/L de picloram) para las variedades Española Roja y Tabë Canä (10 y 2 % respectivamente), pero esta tendencia se revirtió a los 7 meses de cultivo ya que en este mismo medio (MS6), se obtuvo un 78% de explantes con callo para la var. Española Roja y un 92% explantes con callo para la var. Tabë Canä.

Por otra parte, Daquinta y col. (1996), indujeron embriogénesis somática en las variedades de piña Cayena lisa y Española Roja empleando un medio MS suplementado con una combinación de auxina/citoquinina (2,5 mg/L de Dicamba y 0,5 mg/L de BA) y obtuvieron un porcentaje de callo embriogénico menor (42%) en esta investigación en el medio MS4 suplementado también con una combinación de auxina/citoquinina (2,5 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de BA) se obtuvo un 86% de formación de callo para la var. Española Roja y 88% para la var. Tabë Canä.

Según Roostika y Mariska (2003), la embriogénesis somática indirecta ocurre cuando altas concentraciones de auxina (picloram, dicamba, y 2,4-D) son adicionadas a los medios de cultivo. Este fenómeno fue confirmado por Evans y col. (1981; citado por Roostika y Mariska, 2003), los cuales indicaron que generalmente altas concentraciones de auxinas y bajas concentraciones de citoquininas promueven una abundante proliferación celular con la consiguiente formación de callo.

En esta investigación los mayores porcentajes de formación de callo a los 7 meses de cultivo (90% para la var. Española Roja y 100% para la var. Tabë Canä), fueron obtenidos en el medio MS5 (10mg/L de PIC y 2 mg/L de TDZ). Este resultado difiere con lo reportado por Firoozabady y Moy (2004), los cuales obtuvieron del 15-30% de callo embriogénico, a partir de bases de hojas de piña empleando un medio MS suplementado con la misma composición de reguladores de crecimiento.

El thidiazuron es efectivo en inducir la regeneración *in vitro* de diferentes especies vegetales ya que actúa como una citoquinina artificial (Pierik, 1990). Según Hutchinson y col., (1996; citado en Shen y col., 2008), se ha reportado que este compuesto incrementa los niveles endógenos de auxinas, lo que podría explicar la efectividad del uso de TDZ en la producción de callo durante el presente estudio, ya que en el medio suplementado con TDZ (MS5), se obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo en ambas variedades (90% para la var. Española Roja y 100% para la var. Tabë Canä) a los 7 meses de cultivo. Además el medio MS5 estaba compuesto por una combinación de TDZ y PIC, siendo este último un compuesto utilizado como herbicida sistémico que actúa también como una auxina sintética (Jiménez, 2001). El picloram además de inducir callo embriogénico en piña ha sido efectivo en la embriogénesis somática de diferentes especies del género *Arachis* (Vidoz y col., 2006).

6.4.2 Regeneración

Según Pierik (1990), la producción de embriones somáticos a partir de callos puede tener lugar de forma exógena (en la periferia del tejido), tal como lo ocurrido en esta investigación, que los embriones somáticos formados por vía indirecta en ambas variedades, se encontraban en la parte externa del callo.

Al igual que lo ocurrido en el caso de la organogénesis, en la variedad comercial Española Roja se produjo embriogénesis somática tanto por vía directa (sin la formación previa de callo) como por la vía indirecta. Por el contrario, en la variedad autóctona del Amazonas Tabë Canä, ocurrió embriogénesis somática únicamente por vía indirecta. En este caso una vez más se pone de manifiesto el importante papel que juegan el genotipo y las concentraciones endógenas de los

reguladores de crecimiento en la competencia de un mismo tipo de explante proveniente de dos variedades diferentes de piña, ya que tanto la organogénesis como la embriogénesis somática directa ocurrieron en la misma variedad (Española Roja), la cual podría tener células predeterminadas para ambos procesos de micropropagación.

La respuesta embriogénica 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 preembriogénicamente (CsDPE). La embriogénesis somática indirecta ocurre en presencia de células no embriogénicas que deben sufrir varias divisiones mitóticas, hasta la formación de callo y adquirir la competencia embriogénica en presencia de auxinas (Gómez, 1998; Jiménez, 2001).

Daquinta y col. (1996), reportan la obtención de embriones somáticos en piña, semejantes a los embriones cigóticos, aunque no discuten acerca del promedio de embriones somáticos formados ni de su conversión a plantas.

6.4.3 Desarrollo de embriones somáticos

No se encontraron diferencias en la respuesta de los embriones somáticos cultivados en los medios de desarrollo MSEmb1 (sin reguladores de crecimiento) y MSEmb2 (1mg/L de BA), sin embargo, Firoozabady y Moy (2004) reportan haber obtenido mejores resultados en cuanto al desarrollo de los embriones de piña en un medio MS con idéntica composición al MSEmb2, donde lograron una

formación de 165 plantas provenientes de embriones somáticos, resultado que fue superior al obtenido para las variedades Española Roja y Tabë Canä.

En la presente investigación, no se logró la formación de plantas provenientes de los embriones obtenidos en el medio de cultivo MS6 (3mg/L de PIC), sin embargo, Sripaoraya y col. (2003), obtuvieron un promedio de $3,0 \pm 1,3$ plantas/explante en un medio MS suplementado con 1,0 mg/L de BA, en el cual se realizó el cultivo de los embriones somáticos de piña obtenidos en un medio con igual composición de reguladores de crecimiento que el medio MS6 (3mg/L de PIC).

Por otra parte, en los medios de desarrollo MSEmb1 y MSEmb2 se logró el desarrollo de las plantas provenientes del medio de cultivo MS5 (10mg/L de PIC y 2 mg/L de TDZ), obteniéndose para la var. Española Roja un promedio de 2,80 plantas/explante lo que equivale a un total 140 plantas y para la var. Tabë Canä un promedio de 3,84 plantas/explante lo que equivale a un total 192 plantas, resultados que son comparables a los obtenidos por Firoozabady y Moy (2004), los cuales reportaron el desarrollo de embriones somáticos de piña obtenidos en un medio de inducción con igual composición al MS5 logrando un total de 165 plantas provenientes de embriones somáticos desarrollados en medio MS suplementado con 1mg/L de BA.

Fujimura y col. (1980, citado por Litz y Jarret, 1991), han sugerido que las citoquininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos. Por otra parte, el hecho de que el número de embriones

somáticos oxidados o muertos fuese menor en los casos donde éstos eran mantenidos en grupos de 3–5 individuos y conservando pequeñas porciones de callo, se debe a la interacción positiva entre 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). Llevando este fenómeno a lo ocurrido en la presente investigación, el callo sirvió de nodriza a los embriones adheridos a este, suministrándoles nutrientes y reguladores de crecimiento a los cuales no tuvieron acceso cuando fueron aislados por completo del callo. Los embriones somáticos en estado alargado presentaron suspensores, los cuales son estructuras temporales que sirven para proveer de nutrientes al embrión desde el tejido que le dio origen (Mohan, 1984; Lindorf y col.,1999).

6.5 Comparación de la Organogénesis y la Embriogénesis somática para ambas variedades

En la presente investigación, se obtuvo un mayor promedio de plantas/explante por organogénesis que por embriogénesis somática, sin embargo, es importante destacar que el promedio de embriones/explante obtenido en el medio MS5 a los 7 meses de cultivo para la var. Tabë Canä (5,26), es mayor que el promedio de plantas/explante obtenido a los 7 meses de cultivo en el medio MS2 para esta misma variedad (4,98), lo cual implicaría que si se hubiese producido la conversión de la totalidad de los embriones somáticos a plantas del medio de cultivo MS5, el promedio de plantas/explante obtenidos en ese caso sería mayor por embriogénesis somática que por organogénesis, ya que

cada embrión daría origen a una nueva planta, por lo tanto, aquí se pone de manifiesto la importancia de la selección del medio de desarrollo de los embriones somáticos de manera tal de lograr la mayor producción de plantas por esta vía.

Por otra parte, la escogencia de una vía de propagación clonal dependerá de la especie y variedad en particular que se desea propagar masivamente ya que como es bien conocido, no todas las especies vegetales responden en la misma medida a los procesos de regeneración *in vitro* (Orellana, 1998) y de la finalidad con la que se realiza dicha propagación, ya sea la obtención de plantas libres de organismos patógenos, propagación clonal masiva, creación y conservación de bancos de germoplasma, producción y biosíntesis de metabolitos secundarios y fármacos de interés económico, mejoramiento e ingeniería genética, encapsulación y criopreservación de embriones somáticos, entre otros (Hurtado y Merino, 1987; Pierik, 1990 y Jiménez, 1998).

6.6 Caracterización morfoanatómica de bases de hojas de *Ananas comosus*

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 o mixótrofo (Denng y Donnelly, 1993, citado en Agramonte y col., 1998). Todo esto indica que los cambios fenotípicos son inducidos por las condiciones de cultivo, es decir, como

respuesta a la ausencia de factores estresantes que se presentan en los viveros y en el campo (Agramonte y col., 1998 y Hazarika, 2006).

Asimismo, en esta investigación dichas características fueron presentadas por todas las plantas cultivadas y mantenidas *in vitro* a las cuales se les realizó el estudio anatómico y estas características se revirtieron al realizar la aclimatación. Esto sugiere que dichas diferencias corresponden a cambios inducidos por las condiciones de cultivo *in vitro* y no por el proceso de regeneración al cual fueron sometidas.

Según Tomlinson y Metcalfe (1969), las escamas peltadas representan una variación natural distintiva para la familia Bromeliaceae, dichas escamas fueron encontradas en las plantas de ambas variedades estudiadas, tanto las mantenidas *in vitro* como las mantenidas *ex vitro*.

Según Madison (1977, citado por Santa Cruz y col., 2006), además de almacenar agua, la hipodermis tiene un papel importante en la economía de calor, especialmente en epífitas con el metabolismo ácido crasuláceo o CAM. La presencia de la hipodermis en las hojas desarrolladas *in vitro* en esta investigación no puede deberse a cualquiera de estos factores, teniendo en cuenta que la planta *in vitro* está sujeta a condiciones de poca luz y alta humedad.

En las secciones transversales de la lámina foliar de plantas micropropagadas de piña cultivadas *in vitro* y en el vivero, se pudo observar que éstas presentaron un mesófilo equifacial donde no se distinguen parénquima en

empalizada y parénquima esponjoso, contrariamente al mesófilo dorsiventral reportado por Santa Cruz y col. (2006) en la región central de la hoja y homogéneo hacia el margen de hojas de piña. En las dos condiciones de cultivo, la lámina foliar presentó un parénquima acuífero constituido por células grandes redondeadas, con paredes delgadas, planas o con leves ondulaciones. Pacheco y col., 2008 reportan que existe en el mesófilo una diferenciación entre parénquima de empalizada y esponjoso para *Ananas comosus* var. *Erectifolius* y según Esaú (1965; citado por Pacheco y col., 2008), las hojas desarrolladas bajo la acción de la luz directa del sol son más pequeñas, pero más gruesas y tienen más parénquima de empalizada que las hojas que se desarrollan en la sombra.

La presencia de hipodermis y el parénquima acuífero en las hojas cultivadas *in vitro* puede ser relacionada con la alta tasa de supervivencia de las plántulas de piña cuando son transferidas a un vivero.

Proença y Sajo (2007) reportan idioblastos que contienen cristales de rafidio constituídos por oxalato de calcio, los cuales fueron encontrados en la hipodermis acuífera. Estos cristales son particularmente abundantes en las hojas de las plantas cultivadas *in vitro* y esto puede corresponderse a la composición del medio de cultivo, el cual es rico en minerales como el calcio. Tomlinson, 1969; Sousa y col., (2005, citados en Proença y Sajo, 2007), reportan estos cristales como carácter diagnóstico de la familia Bromeliaceae.

Según Henslo (1911; citado en Santa Cruz y col., 2006), todos los grupos de monocotiledóneas que presentan canales de aire en las hojas tienen un antepasado acuático común. El desarrollo del aerénquima es una respuesta a

escasez de oxígeno y actúa como un reservorio de O₂ para los órganos subterráneos, que es la función principal de los canales de aireación en el medio silvestre de las plantas hidrófitas (Aliscioni, 2000; citado en Santa Cruz y col., 2006). En plantas terrestres como la piña, estas cadenas de aireación parecen jugar un papel regulador en el intercambio gaseoso entre la planta y el medio ambiente, esto podría explicar el hecho de que únicamente en las plantas madres mantenidas en vivero fue encontrada la presencia de aerénquima ya que éstas enfrentan condiciones ambientales estresantes a las que no están expuestas las plantas mantenidas *in vitro*.

7. CONCLUSIONES

- En esta investigación se logró el establecimiento de sistemas de embriogénesis somática y organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr., a partir de segmentos de bases de hojas de plantas de la variedad comercial Española Roja y la variedad autóctona del Amazonas Tabë Canä.
- Las bases de hojas de piña de ambas variedades estudiadas, cultivadas en los medios sin reguladores de crecimiento (MS1) durante el período de experimentación no presentaron ninguna respuesta en ambos procesos (embriogénesis somática y organogénesis).
- El tratamiento más eficiente para la inducción de la organogénesis en ambas variedades fue 5 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de BA (MS2), mientras que para la inducción de la embriogénesis somática resultó ser 10mg/L de PIC y 2 mg/L de TDZ (MS5).
- Haciendo la comparación entre los dos procesos de regeneración estudiados, se obtuvo que el promedio de plantas por explante fue mayor por organogénesis que por embriogénesis somática en las dos variedades de piña estudiadas, sin embargo, si se hubiese realizado la conversión de la totalidad de los embriones globulares a plantas, esta relación sería inversa.

- No se encontraron diferencias anatómicas entre las hojas de las plantas mantenidas *in vitro* (madres e hijas) con respecto a las hojas de las plantas madres mantenidas en vivero, salvo las características propias de las plantas cultivadas *in vitro*, las cuales se revirtieron al realizar la aclimatación.
- El no haber encontrado diferencias a nivel morfoanatómico en las hojas de las plantas estudiadas pudo resultar en la alta tasa de supervivencia de las plantas regeneradas vía organogénesis *in vitro* y dicha particularidad permite recomendar el sistema de organogénesis para la propagación y multiplicación de las variedades Española Roja y Tabõ Canã.
- Evidencias histológicas como la presencia de meristemoides y de conexión vascular entre los brotes y raíces con el tejido que les dio origen, demostraron la ocurrencia de organogénesis en ambas variedades de piña estudiadas.
- La formación de embriones somáticos y ausencia de conexión vascular entre éstos y el tejido que les dio origen demostró que hubo embriogénesis somática en ambas variedades de piña estudiadas.
- Evidencias histológicas demostraron que en la variedad comercial Española Roja se produjeron organogénesis y embriogénesis somática por las vías directa e indirecta, mientras que en la variedad autóctona del

Amazonas Tabë Canä, ambos procesos ocurrieron únicamente por la vía indirecta.

- El empleo de tierra negra abonada y arena lavada en proporción 1:1 resultó ser un buen sustrato para la aclimatación plantas de *Ananas comosus* de las variedades Española Roja y Tabë Canä obtenidas por organogénesis *in vitro*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., Jiménez, F. y 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, 193- 206 pp.
- Akbar, A., Karmakar, B. y Roy, S. 2003. Callus Induction and High-frequency Plant Regeneration of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) *Plant Cell Tissue Cult.* **13**: 109-116.
- Almeida, W., Matos, A. y Sousa, A. 1997. Effects of Benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* Proliferation of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) *Acta Hort. (ISHS)* **425**: 235-242.
- Amin, M., Rahman, M., Rahman, K., Ahmed, R., Hossain, M. y Ahmed, M. 2005. Large Scale Plant Regeneration *in vitro* From Leaf Derived Callus Cultures of Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Giant Kew] *Intl. J. Bot.*, **1**: 128-132.
- Badillo, V., Schnee, L. y Benitez, C. 1985. Clave de las Familias de Plantas Superiores de Venezuela. Editores Espasande, S.R.L. Séptima Edición, Caracas, Venezuela. 200-204 pp.
- Bastos, W., Silva, G., Pinheiro, A. y Pereira, M. 2002. Optimization of a Protocol for the Micropropagation of Pineapple. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal.* **24**: 296-300.
- Be, L., Debergh, P. 2006. Potential Low-Cost Micropropagation of Pineapple (*Ananas comosus*). *South African Journal of Bot.* **72**:191-194.
- Casale, I. y García, E. 1987. Multiplicación Clonal Acelerada de Tres Variedades de Piña. *ACEVIV. Boletín Científico*, **2**: 3-15.

- Castillo, A. 2004. Propagación de Plantas por Cultivo *In Vitro*: Una Biotecnología que nos Acompaña Hace Mucho Tiempo. Disponible en: www.inia.org.uy/publicaciones/documentos
- Christianson, M. y Warnick, A. 1983. Competence and Determination in the Process of *in vitro* Shoot Organogenesis. *Environmental Biology*. **95**: 228-293.
- Costa, C., Da Silva, M., Silva, F., Pimentel, C., Vianna P., Ibrahim, M. 2003. Concentrações de ANA e BAP na Micropropagação de Abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no Cultivo Hidropônico das Plântulas Obtidas *in vitro*. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, **25**: 501-504.
- Dal Vesco, L., de Almeida, A., Zaffari, G., Onofre, R., Dos Reis, M. y Guerra, M. 2001. Improving Pineapple Micropropagation Protocol Through Explant Size and Medium Composition Manipulation. *Fruits*, 2001, **56**: 143-154.
- Daquinta, M. A., Cisneros, A., Rodriguez, Y. Escalona, M., Pérez, M.C., Luna, I. y Borroto, C.G. 1996. Somatic Embryogenesis in Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Acta Hort. (ISHS)* **425**: 251-258.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y. y Borroto, C. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) Micropropagation in Temporary Immersion Systems. *Plant Cell. Rep.***18**: 743–748.
- Firoozabady, E. y Gutterson, N. 2003. Cost-Effective *in vitro* Propagation Methods for Pineapple. *Plant Cell. Rep.* **21**: 844–850.

- Firoozabady, E. y Moy, Y. 2004. Regeneration of Pineapple Plants Via Somatic Embryogenesis and Organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **40**: 67–74.
- Fitchet-Purnell, M. 1993. Maximum Utilization of Pineapple Crowns for Micropopagation. First International Pineapple Symposium. *Acta Hort.* **334**: 325-330.
- García, E., Garay, A., Vargas, T. y Blanco, H. 2008. Micropropagación Clonal Masiva de Piña (*Ananas comosus*). *MIBE*. **5**: 181-184.
- García, M. y Serrano, H. 2005. La Piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), Algo Más Que Un Fruto Dulce y Jugoso. *ContactoS* **56**: 55-61.
- Gangopadhyay, G., Bandyopadhyay, T., Poddar, R., Gangopadhyay, S. y Mukherjee, K. 2005. Encapsulation of Pineapple Micro Shoots in Alginate Beads for Temporary Storage. *Current Science*, **88**: 25 pp.
- Gómez, R. 1998. Embriogénesis Somática. En: J. N. Pérez Ponce (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. 57-59 pp.
- Guerra, M., Dal Vesco, L., Pescador, R., Schuelter, A. y Nodari, R. 1999. Estabelecimento de um Protocolo Regenerativo Para a Micropropagação do Abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília, **34**: 1557-1563.
- Gutiérrez, J. y Squeo F. 2004. Importancia de los Arbustos en los Ecosistemas Semiáridos de Chile. *Ecosistemas*, **13**: 10 pp.
- Hamad, A. y Mat. Taha, R. 2008. Effect of Sequential Subcultures on *in vitro* Proliferation Capacity and Shoot Formations Pattern of Pineapple

- (*Ananas comosus* L. Merr.) Over Different Incubation Periods. *Scientia Hort.* **117**: 329-334.
- Hamasaki, R., Purgatto, E. y Mercier, H. 2006. Glutamine Enhances Competence for Organogenesis in Pineapple Leaves Cultivated *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.*, **17**: 383-389.
 - Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological Disorders in *In Vitro* Culture of Plants. *Scientia Hort.* **108**: 105-120.
 - Hicks, G. 1994. Shoot Induction and Organogenesis *in vitro*: A Developmental Perspective. Review. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30**: 10-15.
 - Hoyos, J. 1989. Frutales en Venezuela. Monografía N° 36. Sociedad de Ciencias Naturales, La Salle. Caracas, Venezuela. 54-59 pp.
 - Hurtado, D. y Merino, M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, S. A. de C. V. México D.F., México. 49-81, 154-158 pp.
 - 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. 13-24 pp.
 - Jimenez, V. 2001. Regulation of *in vitro* Somatic Embryogenesis with Emphasis on the Role of Endogenous Hormones. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, **13**: 196-223.
 - Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E. y Stevens, P. 1999. Plants Systematics. A Phylogenetic Approach. Sinauer Associated Publishers. Massachusetts, U.S.A. 199-201 pp.
 - Khanam, N. Khoo, C. y Khan, A. 2000. Effects of Cytokinin/Auxin Combinations on Organogenesis, Shoot Regeneration and Tropane

- Alkaloid Production in *Duboisia myoporoide*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **62**: 125-133.
- Krikorian, A. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. y Mroginski, L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia. 95-125 pp.
 - Komamine, A., Murata, N. y Nomura, K. 2005. Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Cultures – Morphology, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **41**: 6-10.
 - Leal, F. y Antoni, M. 1981a. Clave Para la Identificación de las Variedades Comerciales de Piña (*Ananas comosus*). *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* **29**: 13-24.
 - Leal, F. y Antoni, M. 1981b. Descripción y Clave de las Variedades de Piña Cultivadas en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* **29**: 51-79.
 - Leal, F. y Avilan, L. 1982. Áreas Potenciales para el Desarrollo de Diferentes Especies Frutícolas en el País. III La Piña. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*, **12**: 283-300.
 - Lindorf, H., De Parisca, L. y Rodríguez, P. 1999. Botánica: Clasificación, Estructura, Reproducción. Ediciones de la Biblioteca, Universidad Central de Venezuela., Caracas, Venezuela. 188-192 pp.
 - Litz, R. y Jarret, R. 1991. Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. En: Roca, W. y Mroginski, L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia. 143-172 pp.
 - Mercier, H., Souza, B., Kraus, J., Hamasaki, R. y Sotta, B. 2003. Endogenous Auxin and Cytokinin Contents Associated with Shoot

- Formation in Leaves of Pineapple Cultured *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.*, **15**: 107-112.
- Mogollón, N., Díaz, J. y Hernández, N. 2004. Multiplicación Clonal y Enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 21 Supl. **1**: 15-21.
 - Mohan, B. 1984. Embryology of Angiosperms. Primera edición. Editorial Springer-Verlag. Berlin, Alemania. 377-434 pp.
 - Moreira, M., Guedes, J., Pasqual, M., Borges, C. y Bortolotti, A. 2006. Efeito de Substratos Na Aclimatização de Mudas Micropropagadas de Abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciênc. Agrotec., Lavras*. **30**: 875-879.
 - Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-479.
 - Orellana, P. 1998. Propagación vía Organogénesis. En: J. N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. 151-178 pp.
 - Oliva-Esteva, F. y Steyermark, J. A., 1987. Las Bromeliaceae de Venezuela. E. Armitano Editores, Caracas, Venezuela. 100-103 pp.
 - Pasqual, M., Santos, F., Figueiredo, M., Junqueira, K, Rezende, J. y Ferreira, E., 2008. Micropropagação do Abacaxizeiro Ornamental. *Hort. Bras.* **26**: 45-49.
 - Pacheco, E.; Alves, O.; Borges, F. y Ferreira, R., 2008. Estructura Foliar de Curauá em Diferentes Intensidades de Radiação Fotossinteticamente Activa. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, **43**: 163-169.
 - Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 181-224 pp.

- Proença, S. y Sajo, M., 2007. Anatomia Foliar de Bromélias Ocorrentes em Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Bot. Bras.* **21**: 657-673.
- Roostika, I. y Mariska, I. 2003. *In vitro* Culture of Pineapple by Organogenesis and Somatic Embryogenesis: Its Utilization and Prospect. *Buletin AgroBio.* **6**: 34-40.
- Roth, I. 1964. Microtecnia Vegetal. Ediciones UCV. Imprenta Universitaria, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 96 pp.
- Roth, I. 1991. Anatomía de las Plantas Superiores. 3ra edición. Universidad Central de Venezuela, Ediciones de la Biblioteca. Caracas, Venezuela. 332 pp.
- Rout, G.R., Mohapatra, A. y Mohan, S. 2006. Tissue Culture of Ornamental Pot Plant: A Critical Review on Present Scenario and Future Prospects. *Biotechnology Advances.* **24**: 531–560.
- Santa Cruz, S., Graciano-Ribeiro, D., Batista, J., Aquino, T. y Copati, L., 2006. Anatomia Foliar de Plantas Micropropagadas de Abacaxi. *Pesq. Agrop.* Brasil, Brasília, **41**: 185-194.
- Saucedo, S., Ramos, L., Varas, E. y Carmigniani, F. 2001. Propagación Clonal *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merr) Variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* **1**: 49-54.
- Shen, X., Kane, M. y Chen, J. 2008. Effects of Genotype, Explant Source, and Plant Growth Regulators on Indirect Shoot Organogenesis in *Dieffenbachia* Cultivars. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **44**: 282–288.
- Sharp, W., Sondhal, M., Caldas, L. y Maraffa, G. 1980. The Physiology of *in vitro* Asexual Embryogenesis. *Hort. Rev.* **2**: 268-310.

- Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. y Kazuma, T. 2004. A Simple and Efficient Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from leaves of Chrysanthemum [*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. *Plant Biotechnology*. **21**: 25-33.
- Sripaoraya, S., Marchant, R., Brian, P. y Davey, M. 2003. Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis and Organogenesis in Commercial Pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* **39**: 450–454.
- Sunshine, L. 2003. Nociones Básicas del Cultivo de Tejidos *in vitro*, o Micropropagación Vegetal. Centro Técnico Productivo Socialista Florentino. Disponible en: www.florentino.gob.ve/
- Teng, W. 1997. An Alternative Propagation Method of *Ananas* Through Nodule Culture. *Plant Cell Rep.* **16**: 454–457.
- Teng, W. y Yu, L. 1997. *In vitro* Propagation of *Ananas* Through Nodule Culture. *Acta Hort. (ISHS)* **447**: 199-204.
- The Biology & Ecology of Pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) in Australia, 2003. Australian Government, Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator. 1-25 pp.
- The Biology of *Ananas comosus* var. *comosus* (Pineapple). 2008. Australian Government, Department of Health and Ageing; Office of the Gene Technology Regulator. 1-43 pp.
- Tochi, B., Wang, Z., Xu, S. y Zhang, W. 2008. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. **7**: 513-520.

- Tomlinson P.B y Metcalfe, E., 1969, *Anatomy of the Monocotyledons*. 446 pp.
- Vidoz, M., Rey, H., y Mroginski, L. 2004. Regeneración *in vitro* de plantas de *Arachis correntina* (Leguminosae) mediante organogénesis a partir de hojas inmaduras. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 1-3 pp.
- 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. **105**: 29-32.
- Williams, E. y Maheswaran, G. 1986. Somatic Embryogenesis: Factor Influencing Coordinated Behaviour of Cell as Embryogenic Group. *Ann. Bot.* **57**: 443-462.
- Página web del Jardín Botánico de Missouri <http://www.tropicos.org/>
- Página web del Angiosperm Phylogenetic Group (APG) <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Página web de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación <http://www.fao.org/es/>