



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
PROGRAMA RECURSO GENÉTICO NICARAGUENSE

TRABAJO DE DIPLOMA

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN REPRODUCCIÓN *IN*
***VITRO* DEL CULTIVO DE PIÑA**
(*Ananas comosus*. L. Merr) CULTIVAR MD-2

AUTORES

Br: DAVIA RAQUEL ROCHA MENDOZA
Br: SANTIAGO JAVIER TREMINIO REYES

ASESOR

ING. AGR. MARBELL AGUILAR MARADIAGA

MANAGUA, NICARAGUA

ABRIL 2008

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURA	iii
ÍNDICE DE CUADRO	IV
RESUMEN	V
AGRADECIMIENTOS	VI
DEDICATORIAS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1. GENOTIPO UTILIZADO	4
2.2. REACTIVOS QUÍMICOS, EQUIPOS Y ARTÍCULOS DE LABORATORIO, OTROS MATERIALES	4
2.2.1. Reactivos químicos	4
2.2.2. Equipos y artículos de laboratorio	5
2.2.3. Otros materiales	6
2.3. MEDIDAS DE ASEPSIA	6
2.4. EXPERIMENTOS	6
2.5. INDUCCIÓN DE CALLOS	6
2.5.1. Fuente de tejidos: hojas de plantas in vitro	6
2.5.2. Medios de cultivo	7
2.5.3. Fuente de tejidos: ápices meristemáticos	7
2.5.4. Medios de cultivo	8
2.5.5. Variables evaluadas y análisis estadístico	8
2.6. MULTIPLICACIÓN DE CALLOS	9
2.6.1. Medios de cultivo	9
2.6.2. Variables evaluadas y análisis estadístico	9
2.7. FORMACIÓN DE PLANTAS	10
2.7.1 Medios de cultivo	10

2.7.2. Variables evaluadas y análisis estadístico	10
2.8. FASE DE ENRAIZAMIENTO	10
2.8.1. Variables evaluadas y análisis estadístico	11
2.9. FASE DE ACLIMATIZACIÓN	11
2.9.1. Variables evaluadas y análisis estadístico	12
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1. FASE DE INICIACIÓN DE CALLOS	13
3.1.1. Fuente de tejidos: Explantes de hojas	14
3.1.2. Fuente de tejidos: ápices meristemáticos	15
3.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN DE CALLO	17
3.3. FORMACIÓN DE PLANTAS.	19
3.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO	21
3.5. FASE DE ACLIMATIZACIÓN	23
IV. CONCLUSIONES	26
V. RECOMENDACIONES	27
VI. BIBLIOGRAFIA	28
VII. PRESUPUESTO	32

ÍNDICE DE FIGURA

Figura	Contenido	Página
1	Explante de hoja de piña cultivar MD-2.	7
2	Ápices meristemáticos de piña, cultivar MD-2.	8
3	Explante de hoja.	14
4	Izquierda: callo friable. Derecho: formación de callo y plantas a las 4 semanas de iniciado.	16
5	Callos embriogénicos	18
6	Plantas con brotes axilares	20
7	Fase de enraizamiento a los 30 días. a) Plantas previamente enraizadas en sales MS al 100%, b) 0.50 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa, c) 1 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa, d) 0.50 mg/l de AIA y 40 mg/l de sacarosa, e) 1 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa.	23
8	Fase de aclimatización a los 45 días. De izquierda a derecha: a) Plantas previamente enraizadas en sales MS al 100%, b) medio con 0.50 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa, c) 1 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa, d) 0.50 mg/l de AIA y 40 mg/l de sacarosa, e) 1 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa.	24
9	Izq. Hojas sin variación morfológicas. Der. Hojas con espinas en el borde.	25

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro	Contenido	Página
1	Composición del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog 1962).	5
2	Variantes de medios de cultivo en la fase de inducción de callo: explante de hojas.	7
3	Variantes de medios de cultivo en la fase de inducción de callo.	8
4	Variantes de medios de cultivos en la fase de multiplicación de callos.	9
5	Variantes de medios de cultivos en la fase de formación de plantas.	10
6	Variante de medios de cultivos en la fase de enraizamiento.	11
7	Frecuencias observadas de inducción de callos, formación de plantas y número de raíces en cinco variantes de medio de cultivo a los 30 días después de establecidos.	15
8	Frecuencias observadas en formación de callos, formación de plantas y coloración de plantas en la fase de multiplicación de callos.	18
9	Frecuencias observadas en la fase de formación de plantas, emisión de raíces y color de plantas.	20
10	Efecto de dos concentraciones de AIA y dos concentraciones de sacarosa en las variables altura de planta, número de hojas y número de raíces.	22
11	Número de hojas, altura y sobrevivencia de planta en la fase de aclimatización.	24

RESUMEN

La piña es reconocida como una de las frutas más finas de las regiones tropicales y se denomina la reina de todas las frutas. En Nicaragua se consume principalmente como fruta fresca, refresco y otros productos derivados de la industrialización de la piña. Para el estudio de embriogénesis somática en piña cultivar MD-2 se realizaron diferentes variantes de medios de cultivo en las fases de inducción, multiplicación, formación de plantas, enraizamiento y aclimatación de plantas. En la fase de inducción de callos con el empleo de explantes de hojas no se produjo iniciación de callos, pero con explantes de ápices meristemáticos se obtuvieron los mejores resultados en los medios que contenían 1 mg/l de 2,4-D y 0 y 0.2 mg/l 6-Bencil-amino-purina. La multiplicación de callos fue mejor en los medios de cultivos que se le suministraron 2 mg/l de Ácido Indolacético y 1.8 mg/l de Acido-naftaleno-acético con agua de coco al 15% y 400 mg/l de carbón activado. La formación de plantas se favoreció en el medio de cultivo que contenía 0.38 mg/l de Ácido Indolbutírico y dos mg/l de 6Bencil-Amino-Purina. En la fase de enraizamiento de las plantas resultó ser mejor el medio de cultivo que contenía 0.5 mg/l de Ácido Indolacético y 40 g/l de sacarosa. En la fase de aclimatización de plantas los medios que previamente se desarrollaron en las cinco variantes de medios en la fase de enraizamiento presentaron los mejores resultados con respecto al porcentaje de sobrevivencia.

Palabras claves: cultivar, embriogénesis somática, inducción de callos, AIA (Ácido Indolacético), ANA (Ácido Naftalenacético), BAP (6-Bencil-Amino-purina), Kinetina, CW (Agua de coco), CH (Carbón Activado), AIB (Ácido Indolbutírico), MS (Murashige & Skoog).

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me ha dado la fuerza y voluntad para culminar mi carrera.

Al Ing. Marbell Aguilar por brindarme parte de su tiempo y su sabiduría.

A mi abuelita y tía Sras. Luz Rocha e Imalcin Rocha, a mis hermanos por haber confiado en mí, apoyándome incondicionalmente.

A mi esposo y mis suegros por haberme permitido cumplir parte de mis metas.

A las Sras. Tomasa Sevilla y Elena Noguera por acogerme en el seno de sus hogares como a una hija.

A mis amigos con quienes compartí parte de los momentos felices que viví en esta universidad.

Davia Rocha

A Dios por haberme dado la oportunidad de llegar a la cumbre de mis metas.

Al Ing. Marbell Aguilar por dedicarme tiempo y transmitirme un poquito de sus conocimientos para poder defenderme y realizar mi trabajo.

A la magnífica colaboración del Consejo Nacional Universitario (CNU), y a la cooperación de Suecia a través de ASDI y SAREC, que sin su apoyo financiero no hubiera sido posible realizar nuestro trabajo.

A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente en todos los momentos y en mis estudios.

A mi abuela (q.e.p.d) por haberme regalado su cariño y acogedoras palabras de aliento.

A mi tía por haberme acogido en la humildad de su hogar.

A mis amigos por ser parte de mi enseñanza y regalarme momentos de tranquilidad.

A todos los profesores y personas que han puesto su granito de arena en la parte intelectual de mi ser.

Santiago Treminio

DEDICATORIAS

A Dios que me dio la vida y todo lo que en ella poseo.

A mi hijo Luís E. Silva R. quien es el tesoro más grande que tengo en mi vida y el motivo por el cual vivo y lucho día a día.

A mis padres Luís Rocha y Cristina Mendoza (q.e.p.d.) quienes estarían orgullosos de compartir esta dicha conmigo.

Davia Rocha

A Dios por regalarme el aliento de la vida y ampliar mi inteligencia cada día.

A mis padres y hermano: Santiago Treminio, Zulema Reyes y Jarín Treminio por ser el orgullo de mi profesión

Santiago Treminio

I. INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* L. Merr.), pertenece a la familia de las Bromeliáceas. Es originaria de América del Sur y más precisamente su centro de origen es Brasil (Samson, 1991). La piña a la llegada de los españoles estaba bien distribuida en toda América Tropical donde contribuía notablemente a la alimentación de las poblaciones autóctonas y era conocida como "ananas" que en el lenguaje guaraní significa "fruta exquisita". Fue ofrecida a los españoles como gesto de bienvenida y hospitalidad, los cuales la bautizaron con el nombre de piña. Posteriormente la llevaron a España de donde se propagó rápidamente hacia África, Filipinas, la India y el resto del mundo (Olaya, 1992).

La piña es reconocida como una de las frutas finas de las regiones tropicales y es denominada la reina de todas las frutas. La piña en Nicaragua se consume principalmente como fruta fresca, refrescos y otros productos que se obtienen de la industrialización de la piña (Olaya, 1992). Es uno de los rubros en los cuales se pueden obtener divisas mediante la exportación de fruta fresca, lo mismo para el consumo de la población (Olaya, 1992).

Una de las principales zonas productoras de piña en Nicaragua, es el municipio de Ticuantepe, con 2,500 productores que siembran aproximadamente 1,950 hectáreas. A pesar de ser un cultivo no tradicional, se ha ampliado la demanda de consumo en los mercados nacionales siendo su principal destino y en muy poca cantidad se exportan a Honduras y Costa Rica, abriendo una oportunidad para los productores nacionales ubicados en zonas aptas para este cultivo (García y García, 2004).

La piña es una planta autoestéril, por lo cual su producción de semilla es muy limitada, lo que conlleva a la forma asexual para su propagación, esta planta produce varios tipos de hijos, que son las distintas formas, por las cuales se pueden propagar (Sanson, 1991).

Para mejorar los rendimientos y la calidad de la piña, los productores demandan plantas sanas y de alta calidad genética de las diferentes variedades, lo cual es un inconveniente la no disponibilidad de material para siembra. Con el empleo de métodos tradicionales no se

dispone de gran cantidad de semilla y más cuando se requiere sembrar grandes extensiones de terreno.

Países productores de este cultivo han puesto en práctica la micropropagación en diversas especies de plantas, aprovechando las ventajas que esta técnica tiene en relación a los métodos convencionales de propagación, se pueden mencionar: facilita una propagación más rápida y en mayores volúmenes; se da el intercambio de germoplasma sin riesgos de diseminar plagas y enfermedades; se obtienen plantas libres de plagas y enfermedades; se incrementan los rendimientos (Jiménez, 1998).

La micropropagación además de ser una tecnología de alto costos, requiere de transferencias periódicas del material plantado a un medio fresco, después de 4-6 semanas, debido al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo y por él continua crecimiento y proliferación de los cultivos, la cual es rápidamente limitado por el tamaño de los contenedores de cultivo (Meane y Debergh, 1985 citados por Etienne y Berthouly, 2002).

Otra técnica de singular importancia es la embriogénesis somática que constituye una herramienta versátil de gran eficiencia en la multiplicación masiva de diferentes especies. La embriogénesis somática es un proceso biológico a partir del cual una célula o un grupo de células somáticas se comportan como un cigoto originando un embrión que posteriormente formará una planta (Aguilar, 2006).

Los embriones somáticos pueden obtenerse de varias fuentes de cultivos como: hojas jóvenes, hojas inmaduras, inflorescencias, pecíolos, entre otros. En algunos cultivos tiene ventajas sobre la micropropagación, cuando se emplean biorreactores que permiten una reducción en labor, tiempo y costo de las vitroplantas, altos coeficientes de producción de plantas y la uniformidad morfológica de las plántulas (Gómez, 1998).

Margara (1989) destaca que la totipotencia por medio de la embriogénesis somática ofrece una herramienta excelente para la micropropagación y el mejoramiento genético de plantas, así como la manipulación a nivel celular (mutagénesis, fusión de protoplastos, etc.) debido a que permite la regeneración de individuos a partir de células individuales.-

Debido a que la embriogénesis somática representa es una alternativa para mejorar la eficiencia de los procesos de reproducción masiva en el cultivo de piña, en el presente trabajo de tesis proponemos el siguiente objetivo:

Objetivo general:

Determinar el proceso de embriogénesis somática en el cultivar de piña MD-2, mediante el uso de los mejores medios de cultivo en las fases inducción de callos, multiplicación de callos, formación de plantas, enraizamiento y la respuesta a la aclimatización de las plantas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), de la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12 ½ carretera norte; con coordenadas 12⁰08' latitud norte y 86⁰10' longitud oeste a una altitud de 56 msnm en el departamento de Managua. El estudio se realizó en el período comprendido del mes de marzo de 2007 a febrero de 2008.

2.1. Genotipo utilizado

El estudio se realizó a partir plantas *in vitro* reproducidas por organogénesis directa en el segundo subcultivo de multiplicación del cultivar de piña MD-2.

2.2. Reactivos químicos, equipos y artículos de laboratorio, otros materiales

2.2.1. Reactivos químicos

En todos los experimentos se utilizó como medio básico las sales de Murashige & Skoog (1962) Cuadro 1. Para estimular el crecimiento de los tejidos se adicionaron diferentes reguladores de crecimiento como: ácido-3-Indolacético (AIA), bencilaminopurina (BAP o BA), ácido 2,4-diclorophenoxiacético (2,4-D), ácido-3- indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), kinetina. En todas las variantes de medios de cultivo se ajustó el pH a 5.8 con ácido clorhídrico (HCl) para reducir el pH o hidróxido de potasio (KOH) para aumentar. La cristalería se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaClO₃) al 1% y los medios de cultivo se gelificaron con Phytigel a razón de 3 mg/l. Se utilizó sacarosa en la fase de enraizamiento como fuente de energía, también se hizo uso de agar, agua destilada y agua de coco como componentes de los medios de cultivos y alcohol al 70% para mantener las medidas de asepsia en la cámara de siembra.

Cuadro 1. Composición del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog 1962).

Macroelementos mg/l		
1	NH ₄ NO ₃	1650.00
2	KNO ₃	1900.00
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
5	KH ₂ PO ₄	170.00
Microelementos mg/l		
6	MnSO ₄ .H ₂ O	22.30
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
8	H ₃ BO ₃	6.20
9	KI	0.83
10	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.02
Vitaminas mg/l		
13	Tiamina HCl	0.10
14	Myo-inositol	100.00
Azúcar g/l		
15	Sacarosa	30.00

2.2.2. Equipos y artículos de laboratorio

Equipos: Horno, mechero, marcadores, autoclave, cámara de flujo laminar, agitador electromagnético y potenciómetro, cámara fotográfica digital.

Artículos: tubos de ensayos (150 x 25 mm), frascos de vidrio de 200 ml, pinzas, pipetas, beakers, balanza analítica, escalpelos, cuchillas para escalpelos, placas petri esterilizadas, tijeras.

2.2.3. Otros materiales

Detergente, cinta adhesiva transparente, papel de aluminio, papel kraft, algodón.

2.3. Medidas de asepsia

En la limpieza de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio NaClO_3 en concentraciones de 1 % durante 24 horas, posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada y detergente y después se dejó escurrir durante 1 hora para evitar que quedaran residuos de agua. Previo a la siembra de los tejidos, las variantes de medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 120°C durante 20 minutos; a una atmósfera de presión. Los platos petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperatura de 180°C durante 1 hora. La cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 90 % y posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

2.4. Experimentos

Se establecieron experimentos para el estudio de cada una de las fases del proceso de embriogénesis somática: inducción de callos, la multiplicación de callos, la formación de plantas y su posterior enraizamiento y aclimatización.

2.5. Inducción de callos

2.5.1. Fuente de tejidos: hojas de plantas *in vitro*

Como explantes se utilizaron segmentos entre 2–3 mm tomados de la porción central de hojas basales (Figura 1) de plantas *in vitro* de aproximadamente 2 cm. de altura. Los explantes se establecieron en medios de cultivos de consistencia semi-sólidas en tubos de ensayo con dimensiones de 25 mm de diámetro y 150 mm de largo; se inocularon cinco explantes por frasco y cinco frascos por variante de medio de cultivo, para un total de veinte y cinco explantes por tratamiento. Una vez inoculados los explantes se llevaron al cuarto de crecimiento a condiciones 12 horas de luz natural y 12 horas de oscuridad a temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

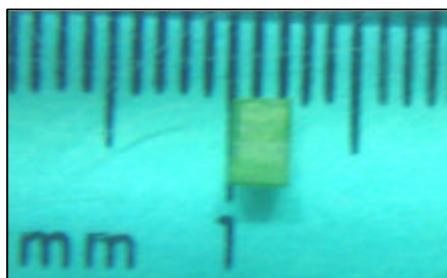


Figura 1. Explante de hoja de piña cultivar MD-2.

2.5.2. Medios de cultivo

Se estudiaron cinco variantes de medios de cultivo de consistencia semi-sólida y tres sustancias reguladoras de crecimiento ANA; AIB y Kinetina, de acuerdo a los resultados obtenidos por Matews y Rangan (1979). En el Cuadro 2, se presentan las variantes de medios de cultivo.

Cuadro 2. Variantes de medios de cultivo en la fase de inducción de callos con explantes de hojas.

Variantes de medios	Reguladores de crecimiento		
	ANA (mg/l)	AIB (mg/l)	Kinetina (mg/l)
1	1.80	2.00	1.32
2	1.80	2.00	2.63
3	1.80	2.00	5.25
4	1.80	2.00	7.88
5	1.80	2.00	10.50

2.5.3. Fuente de tejidos: ápices meristemáticos

Se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 2 mm de tamaño de plantas *in vitro* procedentes del segundo subcultivo. Los medios de cultivo se llevaron a condiciones similares a las detalladas en la sección anterior (Figura 2).

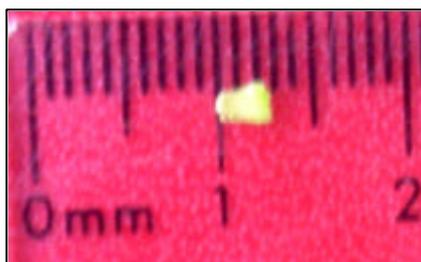


Figura 2. Ápice meristemático de piña cultivar MD-2.

2.5.4. Medios de cultivo

Se estudiaron dos sustancias reguladoras de crecimiento reportadas por Páiz (2006): como auxina el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 1, 2 y 3 mg/l y como citoquinina 6-bencil-amino-purina (BAP) en concentraciones de 0.2 mg/l (Cuadro 3).

Cuadro 3. Variantes de medios de cultivo en la fase de inducción de callos.

Variantes de Medios	Reguladores de crecimiento	
	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)
1	1.00	0.00
2	1.00	0.20
3	2.00	0.00
4*	2.00	0.20
5	3.00	0.00
6	3.00	0.20

* Medio de cultivo reportado por Matews y Rangan (1984).

2.5.5. Variables evaluadas y análisis estadístico

A las cuatro semanas se evaluaron en cada una de las variantes de medios de cultivo las variables: inducción de callos, brotes y callo con raíces. Para definir los mejores medios de cultivo de acuerdo a las frecuencias de las variables evaluadas se empleó el estadístico no paramétrico χ^2 o J_i^2 representada con el símbolo (χ^2). Los datos se procesaron en el programa MINITAB versión 15, cuyos resultados se utilizaron para establecer las diferencias estadísticas entre los medios de cultivos. Las frecuencias observadas se presentaron en arreglos estructurados en tablas de doble entrada, llamadas tablas de contingencia.

2.6. Multiplicación de callos

Después de permanecer 30 días en la inducción de callo, estos fueron transferidos a variantes de medios de cultivo teniendo como referencia los resultados obtenidos por Rangan y Matews (1980). Para facilitar su evaluación, se utilizaron placas petri plásticas esterilizadas con dimensiones de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura.

2.6.1. Medios de cultivo

Se emplearon medios de cultivo de consistencia semi-sólida y como reguladores de crecimiento AIA, BAP y AIB. Como activadores de sustancias hormonales y antioxidantes se agregó agua de coco (15% v/v) y carbón activado (400 mg/l) respectivamente (Cuadro 4). Para ello se seccionaron callos friables con peso aproximado de 100 mg y se sembró un número de 5 explantes por placa y cinco placas por tratamiento. Las condiciones ambientales de crecimiento fueron similares a las empleadas en los incisos 2.5.1 y 2.5.3.

Cuadro 4. Variantes de medios de cultivos en la fase de multiplicación de callos.

Medios de cultivo	Agua Coco (%)	Carbón activado	ANA (mg/l)	AIA (mg/l)	AIB (mg/l)
1	15	400 mg/l	0.00	0.00	0.00
2	15	400 mg/l	1.80	0.00	0.00
3	15	400 mg/l	2.00	0.00	0.00
4	15	400 mg/l	0.00	1.80	0.00
5	15	400 mg/l	0.00	2.00	0.00
6	15	400 mg/l	0.00	0.00	1.80
7	15	400 mg/l	0.00	0.00	2.00

2.6.2. Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluó el crecimiento de los callos conforme adaptación de la escala para variables cualitativas y cuantitativas reportadas en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) por Santana (1982), como son: formación de callo, callos y plantas, color amarillo, color verde. Para conocer el tratamiento que mejor favoreció la formación de callos, se empleó la prueba no paramétrica de χ^2 con similar arreglo al reportado en las secciones 2.5.1 y 2.5.3.

2.7. Formación de plantas

Los callos formados en la fase de multiplicación se dividieron en segmentos de aproximadamente 3 mm y se les sometieron a condiciones similares a las practicadas al experimento de la sección anterior. En el Cuadro 5, se presentan las siete variantes del medio de cultivo.

2.7.1. Medios de cultivo

Se estudio la respuesta a la combinación auxina- citoquinina como ANA, AIB, BAP Y KINETINA (Cuadro 5) con 5 explantes por frasco y 5 frascos por variante. El experimento se evaluó a las 6 semanas de establecidos.

Cuadro 5. Variantes de medios de cultivos en la fase de formación de plantas.

Variantes de Medios de cultivo	ANA (mg /l)	AIB mg /l	BAP mg /l	KINETINA m/gl
1*	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.80	0.38	0.00	2.10
3	1.80	0.00	0.00	2.10
4	0.00	0.38	0.00	2.10
5	1.80	0.38	2.00	0.00
6	1.80	0.00	2.00	0.00
7	0.00	0.38	2.00	0.00

* Medio testigo.

2.7.2. Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluó las variables plantas formadas, callos con raíces y coeficiente de multiplicación. Para conocer el tratamiento que mejor favoreció la formación de callos, se empleó la prueba no paramétrica de χ^2 con similar arreglo al reportado en las secciones 2.5.1 y 2.5.3.

2.8. Fase de enraizamiento

El estudio se realizó con plantas formadas en la fase final de la embriogénesis somática. Las plantas permanecieron durante 30 días en los medios de cultivo de consistencia semi-sólida que contenían las sales MS al 100% y diferentes concentraciones de AIA y sacarosa como se reporta en el Cuadro 6.

Las plantas fueron sembradas en frascos con capacidad de 200 ml y se les adicionó a cada uno 20 ml de medio de cultivo, a un pH regulado de 5.8; las condiciones ambientales fueron similares al experimento de multiplicación de callo. Se establecieron cuatro plantas por frasco, utilizando ocho frascos por variantes de medios de cultivo para un total de 32 explante.

Cuadro. 6. Variante de medios de cultivos en la fase de enraizamiento.

Variantes de medios de cultivo	Reguladores de crecimiento	
	AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)
1	0.0	30
2	0.5	30
3	1.0	30
4	0.5	40
5	1.0	40

2.8.1. Variables evaluadas y análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento a las cuatro semanas se evaluaron las variables longitud de planta (cm), número de hojas, número de raíces. Se utilizó un diseño BCA con arreglo bifactorial y para determinar el mejor tratamiento se practicó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller aceptándose un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

2.9. Fase de aclimatización

Con plantas que crecieron en cinco variantes de medios de cultivo de la fase de enraizamiento durante cuatro semanas y con un tamaño aproximadamente de 2.5 cm, se estudió la respuesta a la aclimatización en base a la morfología y fisiología de las plantas. Las plantas se sembraron en bolsas polietileno utilizando como sustrato orgánico compost, se les aplicó fertilizantes foliares y edáficos cada ocho días usando Mega Plus 5-4-2 y Humega respectivamente, a razón de 1ml/l de agua y después de un mes de transferidas se procedió a su evaluación.

2.9.1. Variables evaluadas y análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento se evaluaron las siguientes variables: porcentajes de sobrevivencia, número de hojas, altura y porcentaje de espinas. Como análisis estadístico se empleó un diseño de bloques completo al azar (BCA) y para definir el mejor tratamiento se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con $\alpha = 0.05$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Fase de iniciación de callos

Los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje radial, aislados por un tejido epidérmico y falta de conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. La embriogénesis somática similar a la organogénesis, muchos autores la clasifican en directa e indirecta (Tisserat *et al.* 1979).

De acuerdo con Lindsey y Jones (1992) la embriogénesis somática es directa cuando el desarrollo de los embriones se produce a partir de células somáticas del explante original, puede utilizarse para la micropropagación de un número limitado de especies. Es indirecta cuando el desarrollo del embrión es a partir de callo o suspensiones celulares.

Gómez (1998) señala que Fujimura y Komamine (1980) describen cuatro fases de detalles morfológicos en la embriogénesis somática de zanahoria, fases 0, 1, 2, 3. En la fase 0 la célula aislada por continuas divisiones forma los agregados celulares embriogénicos, con la presencia de auxina en el medio de cultivo. En la fase 1, es inducida por la transferencia de los agregados celulares a un medio libre de auxinas, es una fase relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación en los 3 primeros días. En la fase 2, ocurre una división celular rápida a los 4 días del cultivo en ciertas partes del agregado celular, dando lugar a la formación del embrión en estado globular. En la fase 3, se produce el continuo desarrollo del embrión al estado corazón y torpedo.

Villalobos *et al.* (1991) reportan que en el caso de las especies monocotiledóneas se reconocen únicamente las fases 0, 1 y 2, porque no se diferencian los estados corazón y torpedo, sino que el embrión globular sufre un proceso de transición, que se prolonga hasta llegar a formar el embrión maduro.

La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo estos reemplazados con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del explante, las cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos (Gómez, 1998).

3.1.1. Fuente de tejidos: Explantes de hojas

En las diferentes variantes de medios de cultivo no se logró la inducción de callos a partir de explantes de hojas. A los 10 días de permanecer en contacto con el medio de cultivo los explantes presentaron un color verde, después cambiaron gradualmente a colores amarillo, café y finalmente ocurrió la senescencia generalizada en las diferentes variantes (Figura 3).



Figura 3. Explante de hoja

No se obtuvieron los resultados reportados por Mathews y Rangan (1979) que lograron la inducción de callos a las cinco semanas con el empleo de explantes de hojas tomadas de plantas *in vitro* y diferentes combinaciones y concentraciones de ANA, AIA, AIB, kinetina y BAP como las utilizadas en el presente estudio. Estos resultados pueden deberse a lo señalado por Litz y Jarret, (1991), quienes reportan que entre los factores que afectan la respuesta morfológica del explante a la embriogénesis del callo está en dependencia del genotipo y del estado de desarrollo de la planta madre.

George (1993) citando a Street`s (1979), sugiere que los explantes primarios pueden estar compuestos de células o tejidos capaces de ser morfogenéticos (células competentes) y otros que son incapaces (células no competentes).

Vasil (1985) observó que aquellos segmentos de hojas en los cuales el tejido vascular está completamente diferenciado no dan lugar a la formación de callo.

Gómez (1998) identifica los siguientes factores que controlan la frecuencia de la embriogénesis somática: los tejidos donantes (genotipo y fuente de explante) constituyentes de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento (calidad, intensidad y duración de la luz, temperatura, intercambio gaseoso, subcultivos y selección de tejidos durante subcultivos).

La regeneración de acuerdo a un protocolo estandarizado es restringido y limitado a un número de cultivares dentro de una especie. La dificultad en la regeneración de ciertos genotipos es debido a muchos factores como: competencia, inducción y diferenciación (Litz y Gray, 1992).

3.1.2. Fuente de tejidos: ápices meristemáticos

El análisis de χ^2 reflejó que la inducción de callo fue mejor en los medios que contenían 1 mg/l de 2,4-D y la combinación de 1 ó 2 mg/l de 2,4-D con 0.2 mg/l de BAP, superando a las frecuencias de inducción obtenidas en los medios de cultivo a los que se les adicionaron 3 mg/l de 2,4-D con 0 ó 0.2 mg/l de BAP. Es de destacar que en el medio de cultivo con 1 mg/l de 2,4-D, también se obtuvieron los mejores resultados en las variables formación de brotes y callos con raíces. La respuesta de las plantas en las tres variables a los medios de cultivo que contenían 3 mg/l de 2,4-D en combinación con 0 y 0.2 mg/l de BAP fue estadísticamente inferior (Cuadro 7).

Cuadro.7. Frecuencias observadas de inducción de callos, formación de plantas y callos con raíces en cinco variantes de medios de cultivo a los 30 días después de establecidos.

Reguladores de Crecimiento		Variables								
		Inducción de callos			Brotes			Callos con raíces		
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Si	No	χ^2	Si	No	χ^2	Si	No	χ^2
1.00	0.00	24	1	a	25	0	a	25	0	a
1.00	0.20	25	0	a	24	1	a	24	1	a
2.00	0.00	17	8	b	1	24	b	1	24	bc
2.00	0.20	20	5	ab	1	24	ab	24	1	a
3.00	0.00	6	19	c	0	5	c	2	23	b
3.00	0.20	13	12	bc	1	2	bc	1	24	bc

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para χ^2 con $\alpha = 0.05$ y 5 gl. La comparación entre los medios se realizó verticalmente.

En todas las variantes de medio de cultivo los callos formados se distribuyeron en toda la superficie de los ápices meristemáticos, dispuestos en pequeños grupos de callos de consistencia friable, además se observó en algunos explantes la activación ápices meristemáticos y yemas axilares (Figura 4).



Figura 4. Izquierda: callo friable. Derecha: formación de callos y plantas a las cuatro semanas de inducidos.

Mathews y Rangan (1979) reportan la inducción de callos a partir de brotes axilares extraídos de plantas *in vitro* obteniendo los mejores resultados en el medio constituido por las sales MS más 10 mg/l de ANA. Escobedo y Romero (2003) reportan mejores resultados en formación de callos en el medio de cultivo con 0.4 mg/l de BAP y 10 mg/l de ANA en el cultivar Champaka y con 0.2 mg/l de BAP en el cultivar MD-2.

Como material de explante pueden utilizarse con éxito varios tejidos, pero el origen del tejido del explante puede ejercer un profundo efecto en el comportamiento del desarrollo posterior del callo (Lindsey y Jones 1992). Gómez (1998) también destaca que varias partes de una planta pueden responder diferente en idénticas condiciones de cultivo, las diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explante. Rugeni (1988) y Cañas *et al.* (1987) citados por Litz y Gray (1992), resaltan que el papel de las auxinas en la inducción de la embriogénesis somática está relacionado con la metilación del ADN, lo cual resulta en la disminución o cese de la expresión del programa genético de la célula.

Diversos autores, mencionados por Gómez (1998), establecen una fuerte correlación entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de 2,4-D en el proceso de

desdiferenciación y de diferenciación *in vitro*. Usualmente se emplea el 2,4-D, porque aparentemente estimula o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo.

Pliego y Barceló (2001) recomiendan que en la fase de iniciación de callo en plantas leñosas se deba utilizar una alta concentración de auxina, normalmente 2,4-D o una combinación de auxina-citoquinina. Este efecto no fue observado en el presente estudio en piña donde los mejores resultados se favorecieron con concentraciones de 1 mg/l de 2,4-D y una baja concentración de BAP.

Jiménez (1995) determinó que en caña de azúcar (*Saccharum spp.*) fue necesaria la presencia de 2,4-D para la formación de embriones somáticos, debido a que juega un rol fundamental en los procesos de desdiferenciación, inducción de callo, formación de callo, también reporta que en bajas concentraciones de 2,4-D predomina la formación de raíces adventicia, mientras que con altas concentraciones de 2,4-D no se producen raíces y en cambio tiene lugar la formación de callos.

3.2. Fase de multiplicación de callo

En la variable formación de callos el análisis de χ^2 reflejó mejor respuesta estadística en los medios de cultivo que se le suministraron las tres auxinas en concentraciones de 1.8 y 2 mg/l de ANA ó 2 mg/l tanto de AIA como de AIB. En los medios que se desarrollaron callos con plantas con mejor respuesta estadística fue a los que se les adicionaron 2 mg/l de AIA y 1.80 ó 2 mg/l de AIB. El color verde de los callos se presentó en igual frecuencia en los medios con 1.8 mg/l de las auxinas ANA, AIA y AIB. Mientras la coloración amarilla fue estadísticamente superior en el medio testigo y a los que se le agregaron 2 mg/l de ANA o de AIA (Cuadro 8).

Cuadro 8. Frecuencias observadas en formación de callos, formación de plantas y coloración de las plantas en la fase de multiplicación de callo.

Auxinas (mg/l)	Variables											
	Formación de callos			Callos y plantas			Color amarillo			Color verde		
	Si	No	? ²	Si	No	? ²	Si	No	? ²	Si	No	? ²
Testigo 0.0	20	10	b	2	28	b	10	20	ab	2	28	d
ANA 1.8	27	3	a	0	30	c	7	23	bc	9	21	a
ANA 2.0	26	4	a	0	30	c	10	20	ab	2	28	d
AIA 1.8	20	10	b	2	28	b	7	23	bc	9	21	a
AIA 2.0	28	2	a	8	22	a	11	19	a	6	24	b
AIB 1.8	17	13	bc	5	25	ab	2	28	c	9	21	a
AIB 2.0	24	6	ab	5	25	ab	9	21	b	5	25	c

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para ?² con $\alpha = 0.05$ y 6 gl.

La densa agrupación de los embriones en los explantes, aunque resultaron fáciles de separar, no se realizó su conteo para evitar los riesgos de contaminación que afectara la siguiente fase de estudio. En número reducido de explantes además de formarse callos embriogénicos se desarrollaron plantas, respuesta que parece estar directamente vinculada a la capacidad de diferenciación embriogénica del genotipo del cultivar MD-2, que permite reducir el tiempo entre una fase y otra (Figura 5).



Figura.5. Callos embriogénicos

Es posible que los diferentes elementos que contiene el agua de coco en combinación con las tres concentraciones de auxinas adicionadas a los medios de cultivo, interactúen en una mayor o menor sinergia de acuerdo a las concentraciones utilizadas en el presente estudio. El agua de coco adicionada a las variantes de medios de cultivo resultó determinante para que se indujera la formación de callos embriogénicos. Mathews y Rangan (1980) en el

cultivo de piña lograron un mayor crecimiento de callos en un medio de cultivo constituido por las sales MS (1962) y la adición de 10 mg/l de ANA, agua de coco al 15% volumen sobre volumen (v/v) y 400 mg/l de carbón activado.

De acuerdo con Roca y Mroginski (1991), el agua de coco tiene un efecto sobre el crecimiento de los callos debido a que contiene auxinas, difenilurea y vitaminas llevando a cabo reacciones catalíticas en el metabolismo de las células durante el proceso de embriogénesis. La respuesta favorable a la reproducción por embriogénesis somática observada en el cultivar MD-2, permite potenciar el uso de biorreactores para la producción de plantas a gran escala como la técnica denominada Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA). Las técnicas de micropropagación a partir de meristemas o de ápices caulinares demandan mucho trabajo y requieren de grandes espacios en el laboratorio, además el costo de producción de las plantas es muy alto, imposibilitando su adquisición a los productores (Jiménez, 1998). Otra técnica recomendada por Villalobos y Thorpe (1991), es el empleo de suspensiones celulares, considerada como el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia en base al número de plantas regeneradas por unidad de tiempo.

3.3. Formación de plantas.

De acuerdo a resultados estadísticos de χ^2 la formación de plantas fue superior en el medio de cultivo que contenía de 0.38 mg/l AIB y 2 mg/l de BAP. El mayor número de callos con raíces se presentó en los medios testigo y en el que contenía 1.8 mg/l ANA, 0.38 mg/l AIB y 2.10 mg/l Kinetina. También el tratamiento testigo presentó el mejor coeficiente de multiplicación con promedio de 4.28 brotes por explante y los menores coeficientes se alcanzaron en los medios que contenían 2.10 mg/l de kinetina combinados con 1.80 de ANA y 0.38 de AIB respectivamente (Cuadro 9 y Figura 6).

Cuadro 9. Frecuencias observadas en la fase de formación de plantas, emisión de raíces y color de plantas.

Reguladores de crecimiento (mg/l)				Variables						
				Plantas formadas			Callos con raíces			Coeficiente de Multiplicación
ANA	AIB	Kin	BAP	Si	No	? ²	Si	No	? ²	
0.00	0.00	0.00	0.00	9	16	ab	8	17	ab	4.28
1.80	0.38	2.10	0.00	6	19	b	9	16	a	2.28
1.80	0.00	2.10	0.00	2	23	d	2	23	b	1.60
0.00	0.38	2.10	0.00	3	22	c	1	24	c	0.72
1.80	0.38	0.00	2.00	3	22	c	0	25	c	2.24
1.80	0.00	0.00	2.00	3	22	c	0	25	c	3.52
0.00	0.38	0.00	2.00	12	13	a	0	25	c	3.36

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para ?² con a = 0.05 y 6 gl.

Las variantes de medios de cultivo que contenían 2.10 mg/l de kinetina con 1.80 mg/l de ANA o con 0.38 mg/l de AIB fue baja la producción de plantas formadas, la producción de callos con raíces y el coeficiente de multiplicación. En las variables plantas formadas y coeficiente de multiplicación resultó mejor la combinación de BAP con AIB que BAP con ANA. En el medio de cultivo que se le adicionó 1.80 mg/l de ANA y 2.00 mg/l de BAP puede resultar apropiado para continuar subcultivando los embriones, considerando la baja frecuencia de formación de plantas que en el se produce (Figura 6).



Figura 6. Plantas con brotes axilares

Conforme a la dinámica de crecimiento observada durante la fase de formación de plantas, nos sugiere que es posible potenciar un número mayor de plantas que se transfieran a la fase de enraizamiento, prolongando el tiempo de permanencia para la formación de plantas de seis semanas como se realizó en el presente estudio a una permanencia de ocho semanas.

Gómez (1998) destaca que las citoquininas en el medio de cultivo juegan un papel importante en la germinación o producción de plantas porque contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y multiplicación de callos.

Liu (1994) dice que la incorporación de citocinina suele ser determinante en el proceso de formación de plantas también conocida como germinación de embriones; debido a que durante esta fase la histodiferenciación compensa el efecto negativo inducido por las auxinas sobre el desarrollo de los meristemas. Para la germinación de embriones de (*Musa* spp) se requieren concentraciones bajas de auxinas, como AIA y AIB a diferencia de las *Ananas* spp que necesitan alta concentración de auxinas (Marroquín, 1991). Según Bieberach (1995) en estudios de embriogénesis somática de plátano menciona que las auxinas son importantes para la inducción del estado embriónico, pero en las etapas siguientes la presencia de las auxinas puede inhibir la formación y el desarrollo de plantas.

En los resultados obtenidos no se observaron cambios morfológicos o variantes somaclonales como los reportados en embriogénesis somática como un problema observado por Litz y Jarret (1991), en cuanto a la obtención de una gran cantidad de embriones anormales con las siguientes características: a) de diferente forma, dobles, triples o en racimos que dan lugar a tallos múltiples b) variaciones en número y morfología de los cotiledones c) anomalías en el meristemo apical d) germinación prematura e) pérdida del potencial morfogenético con el tiempo.

3.4. Fase de enraizamiento

De acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Waller y Duncan el mejor resultado en altura de planta se obtuvo con la adición de 0.50 mg/l AIA y 30 (g/l) de sacarosa. En la variable número de hojas no se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos,

mientras que en la variable número de raíces resultó estadísticamente mejor con 0.50 mg/l de AIA y 40 (g/l) de sacarosa (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de dos concentraciones de AIA y dos concentraciones de sacarosa en las variables altura de planta, número de hojas y número de raíces.

Regulador de crecimiento AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)	Variables		
		Altura de planta	Número de hojas	Número de raíces
0.00	30	3.14 b	3.78 a	2.25 b
1.00	30	2.80 bc	3.72 a	2.78 b
1.00	40	2.43 c	3.66 a	2.53 b
0.50	30	3.75 a	3.53 a	2.31 b
0.50	40	3.21 b	4.00 a	4.47 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con $\alpha = 0.05$ y 4 gl.

Los resultados reflejan que hubo efecto en las plantas de acuerdo a la combinación de los niveles de sacarosa con el AIA, vinculado al efecto sinérgico que se produce cuando se adicionan estas dos sustancias (Figura 7).

Quero (2004) en el cultivar de piña Española Roja experimentó con cuatro dosis de ANA 0,0; 0,25; 0,5 y 1,0 mg/l logrando el proceso de rizogénesis en todos los tratamientos, pero el mayor número de raíces lo alcanzó con 0,5 mg/l de ANA. En la mayoría de los cultivos para enraizamiento se recomienda elevar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces (Orellana 1998). Para Jiménez (1995) las vitroplantas procedentes de medios de cultivo con mayores concentraciones de sacarosa favorecen una mayor sobrevivencia en la aclimatización debido posiblemente a una mejor adaptación para soportar el estrés hídrico, motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unidos a una mejor constitución morfológica de las vitroplantas.

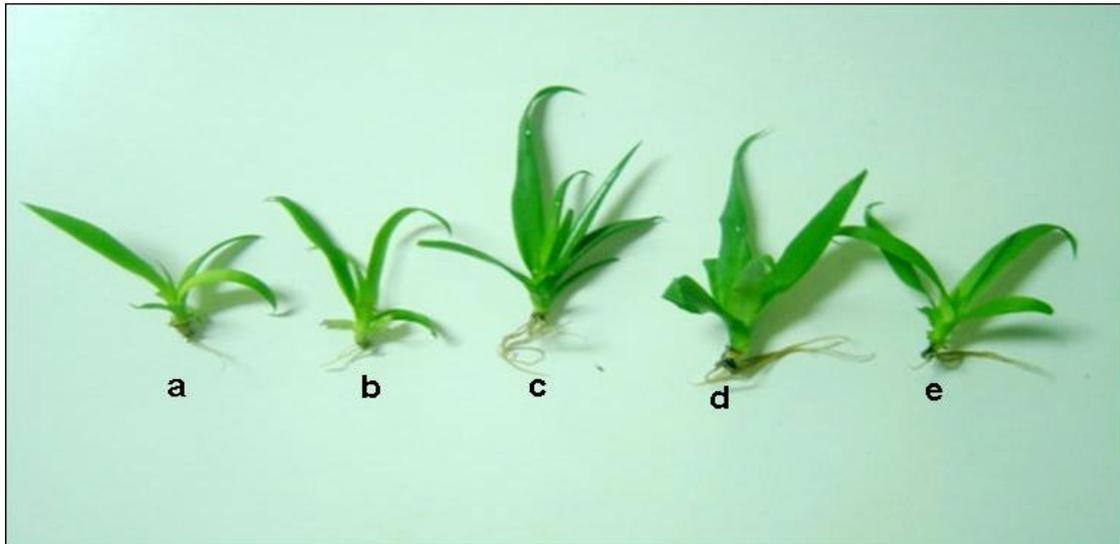


Figura 7. Fase de enraizamiento a los 30 días. Plantas previamente enraizadas en sales MS al 100%, b) 0.50 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa c) 1 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa d) 0.50 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa e) 1 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa.

En la mayoría de los medios de cultivo para enraizamiento se recomienda elevar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces (Maretzki y Hiraki 1980; citados por Caldera y López 2002). Las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de las raíces, debido a que en general, pueden incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, además de que incrementa su crecimiento (Hurtado y Merino, 1994). Rangan y Mathews (1980) reportan que obtuvieron mayor desarrollo y crecimiento de raíces en el medio White modificado por Rangaswamy (1961) con adiciones de 0.05 mg/l de ANA y 0.40 mg/l de AIB.

3.5. Fase de aclimatización

Para estudiar el efecto residual de las concentraciones de AIA y de sacarosa adicionadas a las plantas durante la fase de enraizamiento, en la fase de aclimatización se evaluaron las plantas de forma separada conforme a su procedencia del medio de cultivo.

Similar a la fase de enraizamiento en la variable número de hojas en las cinco variantes de medios de cultivo no presentaron diferencias significativas entre si, con una probabilidad del 95%; mientras que en la variable altura de planta el mejor resultado se obtuvo en el medio de cultivo que tenía las combinaciones de 0.5 mg/l de AIA con 30 g/l de sacarosa

En los diferentes medios de cultivo se obtuvo una alta sobrevivencia de plantas entre el 96.87 y el 100%. También en todos los medios de cultivo se presentaron plantas con espinas en los bordes de las hojas, carácter morfológico que se apreció en mayor porcentaje en los medios que contenían 1.00 mg/l de AIA con 30 ó 40 g/l de sacarosa, presentando el menor resultado el medio de cultivo sin AIA con 9.40% (Cuadro 11 y Figura 8).

Cuadro 11. Número de hojas, altura y sobrevivencia de planta en la fase de aclimatización.

Variante de medios de cultivo		Variables			
AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)	Número de hojas	Altura de planta (cm)	Sobrevivencia (%)	Espinas (%)
0.00	30	6.29 a	3.47 b	96.87	9.40
0.50	30	5.66 a	4.63 a	100.00	15.60
1.00	30	6.41 a	3.79 ab	100.00	25.00
0.50	40	7.19 a	3.71 ab	96.87	21.90
1.00	40	6.32 a	3.29 b	100.00	25.00

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con $\alpha = 0.05$ y 4 gl.

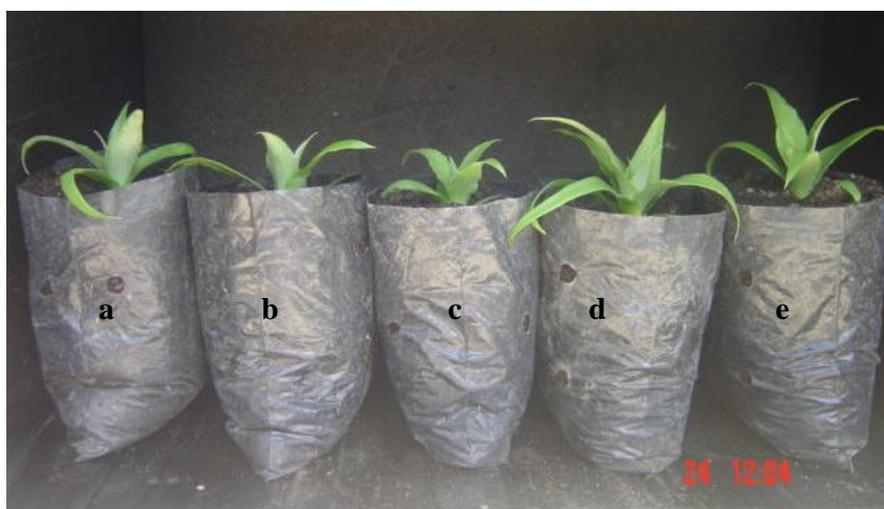


Figura 8. Fase de aclimatización a los 45 días. De izquierda a derecha: a) Plantas previamente enraizadas en sales MS al 100%, b) medio con 0.50 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa c) 1 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa d) 0.50 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa e) 1 mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, no reflejan diferencias sustantivas en el efecto de la sacarosa con relación a la sobrevivencia de plantas. Jiménez (1995) reporta que en el cultivo de caña de azúcar a mayores concentraciones de sacarosa es mayor la sobrevivencia de plantas en la fase de aclimatización, atribuyendo dicho efecto a una mayor adaptación para soportar el estrés hídrico motivado por la condición de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unidos a una mayor constitución morfológica de las vitroplantas.

La única característica morfológica considerada como variante somaclonal observada durante la fase de aclimatización fue la presencia de espinas en los bordes de las hojas, carácter en los tejidos que se produce posiblemente debido al efecto residual de las sustancias reguladores del crecimiento y otras sustancias orgánicas como la sacarosa que se agregaron individual o en combinación en las fases de iniciación, multiplicación, formación de plantas y enraizamiento, capaces de provocar estas variantes somaclonales en el cultivar MD-2 (Figura 9). Resultados similares en el cultivar Cayenne reportan Firoozabad y Moy (2004) destacando la aparición de espinas en porcentajes de 5% de plantas derivadas de procesos de organogénesis y de 21% con plantas regeneradas de procesos de embriogénesis somática.



Figura 9. Izquierda: hojas sin variaciones morfológicas. Derecha: hojas con espinas en los bordes.

IV. CONCLUSIONES

1. Con el empleo de explantes de hojas de plantas *in vitro* no se produjo la inducción de callos en las diferentes variantes de medios de cultivo. Mientras que con explantes de ápices meristemáticos la inducción fue posible, resultando los mejores medios los que contenían 1 mg/l de 2,4-D y la combinación de 1 y 2 mg/l de 2,4-D con 0.2 mg/l de BAP.
2. La multiplicación de callos fue mejor en los medios de cultivo que se le suministraron concentraciones de auxinas de 2 mg/l de AIA y con 1.80 mg/l de ANA. Se desarrollaron callos con plantas con mejor respuesta estadística en el medio que se le adicionó 2 mg/l de AIA.
3. La formación de plantas fue mejor en el medio de cultivo con 0.38 mg/l AIB y 2 mg/l de BAP. El número de plantas con raíces fue superior en medio que contenía 1.8 mg/l ANA, 0.38 mg/l AIB y 2.10 mg/l Kinetina. El mejor coeficiente de multiplicación con promedio de 4.28 brotes por explante se obtuvo en el medio de cultivo testigo y los menores coeficientes se alcanzaron en los medios que contenían 2.10 mg/l de kinetina combinados con 1.80 de ANA y 0.38 de AIB respectivamente.
4. El mejor resultado en número de raíces resultó en el medio de cultivo con 0.50 mg/l de AIA y 40 (g/l) de sacarosa, mientras que en altura de planta se obtuvo con la adición de 0.50 mg/l AIA y 30 (g/l) de sacarosa. En número de hojas no se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos.
5. En la fase de aclimatización las plantas que previamente se desarrollaron en las cinco variantes de medios de cultivo de enraizamiento, presentaron una sobrevivencia de plantas entre el 96.87 y el 100%.

V. RECOMENDACIONES

- 1.** En la fase de iniciación utilizar la auxina 2,4-D adicionando en concentraciones 1 mg/l o en combinación de 1 ó 2 mg/l de 2,4-D con 0.2 mg/l de BAP.
- 2.** Emplear medios de cultivo para la multiplicación de callos que suministren auxinas de la siguiente manera: 1.8 y 2 mg/l de ANA o 2 mg/l tanto de AIA como de AIB.
- 3.** En la fase de multiplicación de callos, utilizar el medio que se le adicionó 1.80 mg/l de ANA y 2.00 mg/l de BAP en el estudio de la respuesta de los callos cuando son reproducidos en subcultivos sucesivos.
- 4.** Realizar experimentos en la fase de formación de plantas con mayor período de tiempo.
- 5.** Emplear la misma metodología en nuevos estudios para tener una mejor precisión en los resultados obtenidos y elaborar una guía metodológica que sirva como soporte a futuros trabajos.
- 6.** Llevar a campo las plantas obtenidas en el experimento de embriogénesis somática para evaluar posibles variaciones somaclonales.

VI. BIBLIOGRAFIA

AGUILAR, M. 2006. Aspectos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Única edición. Managua, Nic. 57 p.

BIEBERACH, C. 1995. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de (*Musa* sp.). Tesis Magister Scientiae. Centro agronómico de investigación y enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 84 p.

CALDERA, L y J, LÓPEZ. 2002. Mejoramiento de la eficiencia de propagación *in vitro* de plátano (*Musa* AAB cv. Enano). Tesis. Universidad Nacional Agraria Managua, Nic. 41p.

ESCOBEDO, L y B, ROMERO. 2003. Micropropagación y formación de callo de los cultivares de piña champaka y MD-2. Disponible en línea: www.uaaan.mx. Revisada el 8 de enero del 2008. 1p.

ETIENNE, H y M, BERTHOULY. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231.

FIROOZABADY, B. C y A. B, MOY. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. Disponible en línea: www.bioone.org. Revisada el 24 de marzo del 2008. 1p.

GARCÍA, M y G GARCÍA. 2004. Experiencia de mujeres productoras y procesadoras de piña de Ticuantepe. Disponible en línea: www.iica.int.ni. Revisada el 15 de febrero del 2008. Managua, Nic. P 6.

GÓMEZ, R. 1998. Embriogénesis somática. En: propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. J. N. Pérez Ponce (ed.). Santa Clara, Cuba. P 57-59.

HURTADO, D y M, MERINO. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, DF. P 49-85.

- JIMÉNEZ, E.** 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villas. 93 p.
- JIMÉNEZ, G.** 1998. Cultivos de ápices y meristemas. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp. 45-46.
- LINDSEY, K y M, JONES.** 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Ed Acribia, S.A. Zaragoza, España. 276 p.
- LITZ, R y R, JARRET.** 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (eds.) Roca, W. y Mroginski, L. Cali, Colombia. P 143-172.
- LITZ, R. y D, GRAY.** 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlang, F.A and Litz, R.E (eds.). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CAB International, Wallingford: 3-34 .
- LIU, W.** 1994. Expressions of desiccation – induced – lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the phases tanniasomatic embryos, plant. 194p.
- MATEWS, V y T, RANGAN.** 1979. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant in vitro cultures of pineapple. Scientia Hortic. 11: p 319-328.
- MARGARA, J.** 1989. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ed. Mundi-Prensa. 232 pp.
- MARROQUIN, C.** 1991. Suspensiones celulares y embriogénesis somática p 69-76. En *Musa acuminata ssp. Malaccensis*. Tesis MSc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 114 p.

- MURASHIGE, T y F SKOOG.** 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- OLAYA, C. I.** 1992. Frutas de América Tropical y subtropical: historia y uso. Ed. Norma S.A. Bogotá, Colombia. P 64-71.
- PÁIZ, E.** 2006. Organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo de quequisque (*Xanthosoma* spp. L. Schott), cultivar Masaya. Tesis de Ingeniero Agrónomo. UNA. Managua, Nic. 79 p.
- PLIEGO, F y BARCELÓ.** 2001. Morfogénesis *in vitro*. En: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y aplicaciones. (Eds.) J. L Caballero, V. Valpuesta y J. Muñoz. Córdoba, España. P 233-242.
- QUERO, A. P.** 2004. Propagación *in vitro* y evaluación en la fase de vivero de la piña (*Ananas comosus* L. Merr). C.V Española Roja. Disponible en línea: www.bibagr.ucla.edu.ve. revisada el 23 de marzo del 2008. 1p.
- RANGAN, T.S y V.H, MATHEWS.** 1980. Growth and multiple plantlet formation in lateral bud, leaf explant and callus culture of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). In plant cell cultures: Results and perspectives (F. Sala, B.Parisi, R. Cella and O. Ciferri, eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amstardam Pp 301-304.
- ROCA, W. y L, MROGINSKI.** 1991. Cultivos de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. En: Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* Editores técnicos, CIAT, Colombia, p 19-40.
- SANTANA, N.** 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en las variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) *in vitro*. Cultivos tropicales, Vol. 4, N^o. 3.

- SAMSON, J.** 1991. Fruticultura Tropical. Ed. LIMUSA, S. A. Zaragoza, España p 229-258.
- TISSERAT, B; ESAN, E y T, MURASHIGE.** 1979. Somatic embryogénesis in angiosperms. Hort. Rev.1.p 1-78.
- VASIL, I. K.** 1985. Somatic embriogénesis and it`s consequences in the Gramineae Pp. 31-48 in the Henke *et al.* (eds) 1985 (q.v).
- VILLALOBOS, V; MEJÍA, J; y H, ESCOBAR.** 1991. Micropropagación de opuntias y agaves. En: Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones (Eds) Roca y Mroginski. Cali, Colombia: Pp 643-662.
- VILLALOBOS, V; y T, THORPE.** 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski. Eds.), cultivo de tejidos en la agricultura. 6: p 127-141.

VII. PRESUPUESTO

Insumo	Unidad de medida	Cantidad	Costos Unitario	Costos C\$	Costos \$	Total
Reactivos varios		1	6970	6970	366.84	6970
Cristalería	diversas	1	1400	1400	73.69	1400
Semilla (hijos)	unidades	200	5	1000	52.63	1000
Combustible y lubricantes						
Diessel	Gln	10	70	2150	113.16	2150
Lubricantes	Lts	2	45	270	14.21	270
Viáticos						
Conductor	días	2	175.50	351	18.47	351
Estudiantes (2)	días	4	175.50	702	36.95	702
Materiales y herramientas						
Lienza	M	100	0.30	30	1.58	30
Papel bond 40	resma	6	87.75	526.50	27.71	526.50
Bateras (AA)	unidad	1	105	105	5.53	105
Tabla de campo	unidad	2	30	60	3.16	60
Tinta imp./color	cartucho	1	700	700	36.84	700
Tinta imp./negro	cartucho	1	700	700	36.84	700
Materiales de laboratorio						
Alcohol	l	20	40	1600	84.21	1600
Cloro	l	30	14	420	22.10	420
Algodón	R	8	80	640	33.68	640
Azúcar	Lb	10	5	50	2.63	50
Desinfectante	L	20	30	600	31.58	600
Pinzas	unidad	6	111	666	35.05	666
Escarpelo	unidad	2	280	560	29.47	560
Cuchillas para	Caja	1	850	850	44.74	850
Escarpelo (#1)						
Marcadores indelebles	Unidad	10	31	310	16.31	310
Papel aluminio	R	2	185	370	19.47	370
Cuchillos	unidad	2	50	100	5.26	100
Plástico	R	2	320	640	33.68	640
Imprevisto				1236.10	65.06	1236.10
Total				23006.1	1210.85	23006.1