

145
2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO DE ALGUNOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCION in vitro DE PIÑA (Ananas comosus L. MERR.) VIA ORGANOGENESIS E IDENTIFICACION ANATOMICA DE LA FORMACION DE BROTES ADVENTICIOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ESTELA ORTIZ MEDINA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Pág
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	4
1. Generalidades sobre la piña (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr).	4
2. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	6
3. Organogénesis.....	7
3.1 Iniciación de los brotes adventicios.....	10
3.2 Origen anatómico de los brotes adventicios.....	11
3.3 Factores que regulan la iniciación y desarrollo de los brotes adventicios	13
4. Micropropagación de piña.....	15
5. Anatomía de la hoja de piña.....	17
6. Mejoramiento genético a través de la inducción de mutaciones.....	19
6.1 Variación somaclonal	22
7. Variación genética en piña.....	23
III. MATERIAL Y METODOS	27
1. Material vegetativo.....	27
2. Medio de cultivo.....	27
2.1 Siembra.....	28
2.2 Condiciones de incubación.....	29
3. Determinación del efecto de varios constituyentes del medio de cultivo para la inducción de brotes adventicios.....	29
4. Tamaño del inóculo	32
5. Inducción de mutaciones.....	33

6. Preparación de material vegetativo para el estudio anatómico de los brotes adventicios.....	35
IV. RESULTADOS.....	37
1. Determinación del efecto de varios constituyentes del medio de cultivo para la inducción de brotes adventicios.....	37
2. Corte y tamaño del inóculo.....	43
3. Anatomía de la formación de los brotes adventicios.....	45
4. Inducción de mutaciones con Etil-metano-sulfonato.....	50
V. DISCUSION.....	52
1. Determinación del efecto de los constituyentes probados en el medio de cultivo.....	52
2. Anatomía de la formación de los brotes adventicios.....	58
3. Inducción de mutaciones.....	59
VI. CONCLUSIONES.....	62
VII LITERATURA CITADA.....	64

LISTA DE CUADROS

NUMERO		PAGINA
1	Medio de cultivo base para la inducción y proliferación de brotes adventicios <i>in vitro</i> de piña	28
2	Diferentes concentraciones de Sales Minerales (MS), caseína hidrolizada, ácido indolbutírico (AIB), benciladenina (BA) y sacarosa en la inducción de brotes adventicios de piña Cv. Cayena Lisa.....	30
3	Diferentes tratamientos de ac. indolbutírico (AIB) y benciladenina (BA) en la inducción de brotes adventicios de piña Cv. Cayena Lisa...	31
4	Distintas concentraciones y tiempos de inmersión de la solución mutagénica de etil-metano sulfonato (EMS) para la inducción de mutaciones en los brotes adventicios de piña.....	33
5	Efecto de las Sales Minerales (MS), caseína hidrolizada (CH), ac. indolbutírico (AIB), benciladenina (BA) en la inducción de brotes adventicios de piña Cv. Cayena Lisa a los 70 días de su establecimiento.....	39
6	Efecto del ac. indolbutírico (AIB) y benciladenina (BA) en la inducción de brotes adventicios de piña a los 70 días de su establecimiento.....	41
7	Efecto del tamaño del inóculo en la inducción de brotes adventicios de piña Cv. Cayena Lisa a los 70 días de su establecimiento.....	44
8	Efecto del Etil-metano-sulfonato (EMS) en la inducción de brotes adventicios de piña Cv. Cayena Lisa a los 70 días de su establecimiento.	51

LISTA DE FIGURAS

NUMERO		PAGINA
1	Esquema comparativo de hojas "con base" (a) v "sin base" (b).....	32
2	Corte transversal de hoja de piña al inicio de su inoculación. epidermis (e), hipodermis (h), tejido acuífero (a), mesófilo (m). 99x.	47
3	Corte transversal de la hoja a los 12 días de inoculada, mostrando divisiones periclinales de las células parenquimáticas que rodean al haz vascular. 247x.....	47
4	Corte transversal de la hoja a los 18 días de inoculada mostrando la presencia de meristemoides. haz vascular (hv). 91x	47
5	Corte longitudinal del meristemo apical de un brote adventicio originado de los meristemoides. 324x.	49
6	Corte longitudinal de un primordio de brote a los 27 días de establecido el inóculo. primordio foliar (p) 260x.....	49
7	Corte longitudinal del primordio de brote en una etapa más avanzada, se observan los primordios foliares más definidos. 260x.....	49

RESUMEN

La piña es un fruto partenocárpico que presenta autoincompatibilidad en la formación de semillas, provocando dificultades para promover su mejoramiento genético. La Organogénesis o producción de órganos adventicios *in vitro*, en combinación con la inducción de mutaciones ha probado ser una alternativa viable en el fitomejoramiento de especies cultivadas. Sin embargo, esta técnica está poco desarrollada en piña, por lo que el presente trabajo se centró en realizar estudios básicos para la inducción y desarrollo de los brotes adventicios.

Se utilizó como inóculos hojas completas de plántulas de piña cultivadas previamente *in vitro*, siendo mejores las hojas de 4.5 a 5.0 cm. sin corte en la base. Las concentraciones más adecuadas de los componentes probados en el medio de cultivo fueron: Sales Minerales (MS) 50 %, Δ c. indolbutírico 2.5 mg/l, benciladenina 5.0 mg/l y caseína hidrolizada 0 mg/l.

El desarrollo anatómico de los brotes adventicios desde el establecimiento del inóculo hasta el surgimiento de los primeros brotes fue aproximadamente a los 33 días de cultivo. Se detectó que éstos se originaron de grupos de células parenquimáticas adyacentes al haz vascular a los 12 días de inoculación. Después de numerosas divisiones celulares dieron la formación de meristemoides (18 días), posterior desarrollo de primordios de brote (27 días) y emergencia de los brotes adventicios bien constituidos (33 días).

Finalmente, se indujo mutaciones al inóculo con Etil-metano-sulfonato (EMS). La aplicación de este agente mutagénico redujo fuertemente el número de brotes por inóculo, así como su crecimiento. A pesar de no registrarse diferencias significativas en ninguna de las concentraciones probadas, se observó disminución en el ancho, color y brillantez de las hojas de los tratamientos en que se dió mayor tiempo de inmersión en la solución mutagénica.

I. INTRODUCCION

La pifia es un fruto tropical con una alta producción comercial en México, actualmente se cultiva en los Estados de Veracruz, Oaxaca, Nayarit, Jalisco y Tabasco, existiendo una densidad de siembra de 35,000 - 50,000 plantas/ha con un rendimiento de 46 a 50 ton/ha (Vizcaino y Pérez, 1976).

Generalmente la pifia produce polen y ovulos funcionales pero son autoincompatibles, desarrollando semillas sólo cuando ocurre polinización cruzada o inducida (Py, 1968). De esta manera, su propagación tradicional es vegetativa, enraizando las coronas que se forman encima del fruto o de los brotes laterales que surgen de distintas posiciones del tronco ó pedúnculo de la planta.

Esta irregularidad en la obtención de las semillas y su posterior germinación, han dificultado el desarrollo de programas de mejoramiento genético. Haciendo más lento la obtención de clones adecuados a las condiciones ambientales del país, por los métodos tradicionales.

La organogénesis o producción de órganos adventicios *in vitro* además de ser una vía de propagación altamente eficiente, ha probado

ser una técnica de gran utilidad en el fitomejoramiento de especies cultivadas, en combinación con la inducción de mutaciones. De esta forma, es posible tomar tejido diferenciado sin crecimiento, inducir mutaciones y posteriormente regenerar brotes adventicios disminuyendo o eliminando la aparición de quimeras. Broertjes y Keen (1980) mencionan que por este método se pueden obtener gran cantidad de individuos mutantes no quiméricos, lo que parece indicar que el origen de los brotes adventicios se da en última instancia a partir de una sola célula. Esto ha sido demostrado en numerosas especies herbáceas principalmente ornamentales (Broertjes y Van Harten, 1984) y en algunas alimenticias como la yuca y la papa (Van Harten, *et al*, 1981).

No obstante, en el caso de la papa esta técnica está poco desarrollada, siendo aún necesario realizar estudios básicos acerca de la inducción, diferenciación y desarrollo de los brotes adventicios en relación con los factores nutricionales y ambientales, así como anatómicos y fisiológicos del inóculo a partir del cual se induce la aparición de estos órganos. Además, la aplicación de agentes mutagénicos para la obtención de mutantes con alguna o algunas características valiosas.

En este sentido, los objetivos planteados en la presente investigación están enfocados a desarrollar estudios que permitan determinar algunos de los factores básicos en la producción de estos brotes adventicios, siendo los siguientes:

- 1.- Determinación del efecto de distintos componentes del medio de

cultivo (sales minerales, caseína hidrolizada, reguladores de crecimiento y sacarosa) en la inducción de brotes adventicios, a partir de hojas de plántulas de piña cultivadas *in vitro*.

- 2.- Determinación del tamaño de hoja más adecuado a utilizar como inóculo en la inducción de brotes adventicios.
- 3.- Identificación del desarrollo anatómico de la formación de los brotes adventicios.
- 4.- Prueba de tiempos y concentraciones de Etil-metano-sulfonato (EMS) en los inóculos para la inducción de mutaciones.

Se espera poder contribuir a la formación de un esquema de producción de brotes adventicios, que posteriormente, junto con la inducción de mutaciones pueda ser útil a los programas de mejoramiento genético.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Generalidades sobre la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.).

La piña es una planta herbácea perenne monocotiledónea, perteneciente a la familia Bromeliaceae. Es originaria del sur del Brasil, norte de Argentina y Paraguay (Collins, 1960). Actualmente su cultivo se ha ido extendiendo a zonas tropicales y subtropicales en un rango de temperatura de 16° a 32 °C y una precipitación de 1300 mm al año (Cobley, 1977).

Su tamaño es de 90 a 100 cm. con una inflorescencia terminal y una extensión de 130 a 150 cm. Sus hojas forman una roseta que rodea completamente al tallo llegando a formar de 70 a 80 en edad adulta, éstas varían de forma de acuerdo a su desarrollo y posición en la planta. El tallo es muy corto, de 25 a 30 cm. de largo y con entrenudos muy próximos entre sí (Py, 1968).

El fruto es múltiple y partenocárpico, formado por la fusión de 100 a 200 frutillas, cada una sostenida por brácteas entre sí y al

pedúnculo central. Generalmente no desarrolla semillas, no obstante cuando ocurre polinización cruzada o inducida se desarrollan de 2000 a 3000 semillas. Todos los cultivares diploides producen polen y óvulos funcionales pero son autoincompatibles. La mayoría requiere de polinización cruzada y desarrollan semillas sólo cuando ésta ocurre (Purseglove, 1972).

Aunado a esto, la difícil e irregular germinación de las semillas dificulta la propagación sexual de esta especie, siendo su propagación tradicional vegetativa, enraizando las coronas formadas en cima del fruto o los brotes laterales que surgen de distintas posiciones del tronco y pedúnculo de la planta.

La producción de la piña ocupa un lugar importante dentro del cultivo de especies frutales tropicales debido a las buenas características de sabor del fruto y producción comercial. Existen gran cantidad de cultivares que se agrupan de acuerdo a características tales como forma del fruto, color de la pulpa, sabor, presencia de espinas en las hojas, tamaño de la planta, etc. Uno de los grupos más ampliamente distribuido y comúnmente más empleado es el "Cayena", que se distingue por presentar fruto cilíndrico o algo cónico, anaranjado con pulpa amarilla, jugosa, dulce y con poca fibra, además de hojas lisas. Este grupo comprende los cultivares "Cayena lisa", "Baron Rothschild", "Guadalupe" y "Esmeralda" (León, 1987).

En México se siembra principalmente el cultivar "Cayena lisa", utilizando diferentes tipos de brotes como material de propagación.

Los "clavos" (brotes nacidos a partir del tallo a la altura del suelo o por debajo de éste), los "gallos" (brotes nacidos a partir del pedúnculo por debajo de la inflorescencia) y las "coronas" (localizadas en la parte superior de la inflorescencia). Estos materiales requieren de 18, 20 y 24 meses respectivamente desde su plantación hasta su cosecha (Vizcaino y Pérez, 1976). Hay poca producción de propágulos (clavos y coronas) de una planta por año, por lo que se requieren de varios años para tener material suficiente para producir en gran escala.

La propagación vegetativa por medio de técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, ha probado ser altamente eficiente en la producción rápida y masiva de materiales seleccionados de diferentes especies. Y en piña particularmente, se han obtenidos muy buenos resultados.

2. Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* .

Las técnicas de cultivo de Tejidos Vegetales consisten en extraer fragmentos de tejido joven de la planta, que se desinfecta y se hace crecer en un medio artificial controlado. Manejando condiciones nutricionales, hormonales, y ambientales específicas.

El cultivo puede darse a partir de diferentes inóculos como: secciones de hojas, tallos, raíces, meristemos, yemas axilares u órganos completos como anteras, óvulos, embriones, o bien de células

y protoplastos aislados.

Gamborg, *et al* (1976) mencionan que existen dos factores importantes que gobiernan el crecimiento y desarrollo del tejido inoculado: origen del explante y el medio de cultivo. Este último contiene elementos que satisfagan tanto las necesidades nutricionales como fisiológicas de las células del cultivo. Clasificando los componentes del medio en cinco grupos fundamentales: sales minerales, fuentes de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos.

Actualmente estas técnicas de cultivo *in vitro* están siendo empleadas con varios fines, tales como: propagación masiva rápida, obtención de plantas libres de virus, producción de metabolitos secundarios, desarrollo de variedades mejoradas vía ingeniería genética y variación somaclonal, obtención de plantas haploides y de híbridos intra e interespecíficos, fusión de protoplastos de diferentes especies genéticas y conservación de germoplasma, entre otras (Murashige, 1974; Conger, 1981).

3. Organogénesis.

La propagación masiva *in vitro* es el área de mayor avance dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, especialmente en aque-

llos cultivos que deben ser propagados asexualmente para mantener intacto su genotipo. Como el caso de muchas especies ornamentales y frutales, en vista de su heterocigocidad, esterilidad o incompatibilidad.

Uno de los procesos a través de los cuales puede lograrse la multiplicación vegetativa de estas plantas es la organogénesis. Esta técnica ha probado ser un método altamente eficiente como sistema de propagación, a la vez que ha sido utilizada con éxito en el mejoramiento genético a través de la inducción de mutaciones o bien mediante la transformación genética. El proceso se basa en la capacidad totipotencial de las células para dar lugar a la formación de órganos adventicios, cuando se le brindan los estímulos y condiciones adecuadas (Thorpe, 1978). La organogénesis puede dar origen a brotes foliares (caulogénesis) o bien a raíces (rizogénesis), Chagolla (1986).

Este método de regeneración de órganos da dos tipos de respuesta morfogénica: organogénesis directa, cuando las yemas adventicias surgen directamente del explante e indirecta cuando surgen mediante un callo intermediario (Yeoman, 1980). En la organogénesis indirecta se pueden inducir mutaciones o transformaciones genéticas en los propágulos, después de ciclos repetidos de multiplicación. Por lo que se le ha considerado en la obtención de variación somaclonal.

Por su parte, la organogénesis directa tiene un gran valor en el fitomejoramiento, ya que se ha registrado que el origen de los

órganos adventicios parece darse a partir de una sola célula (Broertjes y Van Harten, 1984). De esta manera, al ser combinada con la inducción de mutaciones, se incrementa la obtención de mutantes no quiméricos, ya que elimina o disminuye la aparición de quimeras (plantas formadas por 2 o más tejidos genéticamente diferentes). Estas en su mayoría son inestables y difíciles de propagar (Chagolla, 1986). Además, la selección diplóntica, o sea la competencia entre las células mutadas y no mutadas, se ve disminuida, haciendo más eficientes los programas de inducción de mutaciones.

Esta técnica se ha utilizado en un gran número de especies ornamentales como crisantemo, *Periplocactus*, clavel, violeta africana y begonia, entre otras (Broertjes y Van Harten, 1984) y algunas especies alimenticias como la yuca y la papa (Van Harten, et al, 1981) logrando obtener y comercializar mutantes sólidos no quiméricos (Broertjes y Van Harten, 1984).

En frutales existen pocos reportes en la obtención de yemas o brotes adventicios debido a la falta de metodologías que permitan inducir su aparición. Skirvin (1981) cita algunas especies en las cuales se ha podido obtener este fenómeno, como *Passiflora* spp y *Vanilla planifolia*. Mehra y Mehra (1974) obtuvieron formación de plántulas en almendro, Harada (1975) promovió brotes adventicios en Kiwi (*Actinidia chinensis*), Chagolla (1986) indujo producción de yemas adventicias en tallos de manzano y posteriormente promovió la diferenciación *in vitro* de brotes y raíces adventicias en hojas de piña (Chagolla, 1988). Sin embargo, aún se requieren numerosas investiga

ciones para poder entender los fundamentos y factores que regulan este fenómeno.

3.1 Iniciación de los Brotes Adventicios.

Al ser establecido el inóculo en el medio, existe un fenómeno de desdiferenciación celular, donde las células a través de divisiones continuas retornan a una etapa indiferenciada, para poder diferenciarse posteriormente a órganos específicos. Al respecto, Augé menciona que existen dos etapas de desdiferenciación, en la primera llamada histógena, se observa una disminución en el volumen de las vacuolas, desaparición de las moléculas especializadas, aumento del núcleo y el citoplasma de las células se hace más denso. Al término de estas primeras transformaciones, la célula empieza a dividirse. Posteriormente en la segunda etapa, denominada organógena, las células muestran el citoplasma aún más denso, vacuolas muy pequeñas y el núcleo más prominente. Siguen teniendo la capacidad de dividirse pero las células hijas se empiezan a organizar.

Tran Thanh Van (1980) en forma general, divide la organogénesis o aparición de los brotes adventicios en 3 etapas principales: 1) iniciación de puntos de división celular, 2) formación de meristemos o centros de regeneración de primordios de órganos y 3) desarrollo de brotes o raíces adventicias a partir de los primordios anteriores.

Thorpe y Murashige (1970) siguieron las etapas anteriores en callos de tabaco para determinar como se lleva a cabo el proceso. Observaron que se inicia con una acumulación previa de almidón en los puntos donde empieza a dividirse para dar paso a la formación de meristemoides. Estos consisten en masas esféricas de células de tipo meristemático, pequeñas, isodiamétricas con citoplasma denso y microvacuoladas. El crecimiento posterior de estos meristemoides generalmente produce pequeñas protuberancias que le dan al explante una apariencia nodular y que corresponde a los primordios de brotes adventicios.

Aunque el proceso no se conoce todavía del todo, se ha observado que los brotes adventicios regenerados a partir de órganos sometidos a irradiación, producen plantas no quiméricas. Esto parece indicar que se originan en última instancia a partir de una sola célula. Broertjes et al (1968) demostraron por inducción de mutaciones y observaciones cito-histológicas en distintas plantas ornamentales, que las células de la capa L-1 empiezan a desdiferenciarse, dando la formación de meristemoides. Posteriormente, junto con las células adyacentes se desarrollan los primordios de brote, hasta dar la formación del brote final. La mayoría de los mutantes originados por este método, son sólidos no quiméricos. Por lo que concluyen que los primordios de brote son formados por la división de una o pocas células originalmente.

3.2 Origen anatómico de los brotes Adventicios.

Las yemas adventicias no están determinadas filotáxicamente por el desarrollo del ápice meristemático, sino que se caracterizan por presentar un origen secundario a partir de los tejidos maduros de tallos, hojas, raíces, hipocótilos y cotiledones o a partir de los tejidos indiferenciados de callo (Esau, 1976).

Además, se ha observado que el origen anatómico de estas yemas adventicias es variable, dependiendo del órgano y especie de que se trate. Kato (1974) determinó que los brotes adventicios de hojas de *Kalanchoe pinnatifida* surgen de las células en empalizada, entre las capas de la epidermis y el xilema. A su vez Mikkelsen y Sink (1978) observaron en hojas con peciolo de *Sesuvia x Rianalis* que es tas se originan de las células epidérmicas; por otra parte Caruso (1974) identificó que los brotes adventicios pueden surgir del cambium vascular, floema y corteza en segmentos de tallo de *Alliaria officinalis*.

Raju (1975a) trabajando con hipocótilos de *Euphorbia corollata* clasifica el origen de los brotes adventicios como exógenos y endógenos dependiendo de las células de las cuales surgen. Las iniciales de los brotes exógenos surgen a partir de las células subepidérmicas de la corteza, y la de los brotes endógenos, de las células periféricas del tejido vascular (del periciclo). Determinando así, los brotes adventicios del hipocótilo como exógenos y los de las raíces como endógenos. Esto coincide con lo obtenido por Hicks (1987) quien obtuvo raíces adventicias originadas endógenamente de las células del xilema en microestacas de manzano cultivados *in vitro*.

En el desarrollo de los brotes adventicios se pueden distinguir dos estados de crecimiento: antes y después de la conexión vascular de éstos con los órganos que le dan origen (Raju, 1975b). El crecimiento inicial de los brotes es independiente de la conexión vascular, dándose la movilización de carbohidratos por simple difusión, sin mediación de la vascularización. Pero al formarse dicha conexión se acelera rápidamente el desarrollo de éstos, producido por el movimiento de las sustancias de la base a través del eje hipocotiledonar. Los brotes originados endógenamente suelen establecer vascularización más rápidamente que las exógenas debido a su mayor cercanía con el cámbium vascular.

3.3 Factores que regulan la iniciación y desarrollo de los Brotes Adventicios.

El desarrollo posterior de los brotes adventicios está determinado por la confluencia e interrelación de una gran cantidad de factores tanto hormonales, nutricionales y ambientales. Así como anatómicos y fisiológicos particulares de cada tejido u órgano y de cada cultivar o especie a partir del cual se induce la aparición de estos brotes (Chagolla, 1986).

Skoog y Miller (1957) mostraron que la organogénesis está gobernada por un balance hormonal de auxina-citocinina importante para la iniciación de brotes adventicios. En donde, un mayor nivel de citocinina sobre auxina induce la formación de brotes, y la relación

inversa de auxina sobre citocinina favorece la formación de raíces, en tanto que niveles altos de cualquiera de los dos inducen el crecimiento inorganizado de tejido (callo).

Evans, et al (1981) mencionan que la regeneración directa de órganos es estimulada comúnmente por altas concentraciones relativas de citocininas como benciladenina (BA), cinetina (K) y zeatina (Zn). Mientras que la organización indirecta, mediada por callos, es frecuentemente inducida por un nivel mayor de auxina sobre citocinina, principalmente ácido 2-4, diclorofenoxiacético (2-4,D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB). La inducción de callos y la posterior regeneración de órganos es estimulada por la ausencia de reguladores de crecimiento y en algunos casos sólo por citocininas.

El papel de las citocininas en la iniciación de brotes adventicios ha sido ampliamente comprobado. Sin embargo, es importante señalar que la efectividad de la aplicación de los reguladores de crecimiento depende de los contenidos hormonales endógenos y de la relación que guarden entre sí y con los demás factores que regulan la formación de estos brotes. Se ha demostrado que las citocininas en algunos casos son inefectivas en la promoción de este fenómeno, y en otros se ha observado que las auxinas, que normalmente son antagonistas lo favorecen (Chagolla, 1986).

De los factores ambientales los más críticos para la iniciación de los brotes adventicios son la temperatura y la luz. Los que

se relacionan con el inóculo son: la edad, el tamaño, el tipo y posición del explante (Abrego, 1988). Así como factores a nivel celular como: determinación y competencia intrínseca de las células (Christianson y Warnick, 1983) y niveles de sensibilidad celular en un mismo órgano para dar respuesta a la brotación (Burgess, 1985).

Broertjes (1972) y Kato (1974) coinciden que a nivel fisiológico las hojas más jóvenes producen brotes adventicios más rápido y mayor número que las maduras. Sin embargo en *Pereskia* las hojas más viejas produjeron más brotes, aunque más pequeños en comparación con las hojas jóvenes (Brown, 1971 citado por Broertjes y Van Harten, 1984). Estas diferencias entre la madurez de las hojas pueden estar relacionados con el contenido endógeno de los reguladores de crecimiento (Kato, 1974).

El tamaño de la hoja así como la porción de ésta es un importante factor para la formación de brotes adventicios en monocotiledóneas. Broertjes (1972) comparó su formación en distintas secciones de hoja de *Ornithogalum* de la parte basal, media y superior, obteniendo una mayor producción en las secciones superiores, aunque los brotes de la parte basal fueron de mayor tamaño.

4. Micropropagación de pinya .

La capacidad morfogénica de la pinya bajo condiciones *in vitro* ha sido estudiada por diversos autores. Los explantes utilizados han

sido principalmente yemas axilares procedentes de la parte superior de la inflorescencia (Mathews y Rangan, 1979; Zepeda y Sagawa, 1981; Ramírez, 1984; García, 1984; Gutiérrez, 1988) y otras procedentes de los brotes laterales surgidos de distintas posiciones del tallo (clavos) y pedúnculos de la planta (gallos) (Drew, 1980; Mathews y Rangan, 1979; García, 1984; Gutiérrez, 1988; Wakasa, 1979). Otros autores han empleado meristemas apicales, tejidos meristemáticos, embriones híbridos y anteras (Laskhai, et al, 1974; Teo, 1974; Srinivasa, 1981; Wakasa, 1978, respectivamente, citados por Gutiérrez 1988).

En cuanto a la propagación via organogénesis se han utilizado segmentos de tallo y hoja (Poh y Rhoo, 1975); tejido floral (Wakasa 1979), tejidos de plántulas obtenidas *in vitro* (Mathews y Rangan, 1981 y Wakasa, 1978 citado por Gutiérrez, 1988) y hojas completas obtenidas de plántulas *in vitro* (Chagolla, 1988). También ha sido posible provocar organogénesis indirecta induciendo formación de callo y posterior regeneración de plantas de piña utilizando como inoculos plántulas cultivadas *in vitro* (Mathews y Rangan, 1981; Wakasa 1979).

El balance hormonal es uno de los factores más importantes en la regeneración directa e indirecta de la organogénesis. Se ha determinado que la inducción de brotes adventicios se ve estimulada por elevadas concentraciones de citocininas con respecto a las auxinas aplicadas exógenamente, y en muchas ocasiones sólo se requiere de citocininas como regulador de crecimiento (Conger, 1981; Murashige, 1977).

En los trabajos realizados en esta especie se muestra predominancia en el empleo de benciladenina (0.05 - 5 mg/l) tanto en la etapa de establecimiento como en la de proliferación del inóculo (Drew, 1980; Zepeda y Sagawa, 1981). Otros autores reportan el empleo de la cinctina de 2.0 a 10.0 mg/l (Mathews y Kanjan, 1979; 1981; Ramirez, 1984) y de zeatina de 0.5 a 5.0 mg/l (García, 1984).

5. Anatomía de la hoja de piña.

Las hojas de la piña forman una roseta que rodea completamente al tallo. Situadas las más jóvenes en el centro y las más antiguas al exterior. La base de la hoja es envolvente en el tallo y se abre en una forma lanceolada, acanalada, que termina en un ápice muy agudo. Su parte adaxial es cóncava, lisa y verde-oscuro o con áreas longitudinales rojizas, y la abaxial es convexa, acanalada longitudinalmente y cubierta de escamas o tricomas (Iedón, 1987).

Krauss (1949) distingue dos grandes grupos, ya que su forma es variable de acuerdo a su posición y desarrollo en la planta:

- 1) Hojas completamente desarrolladas, situadas en la parte basal del tallo. Son las más viejas. Se caracterizan por un limbo lanceolado y un estrechamiento o "cuello" justo encima de su base, de la que los bordes divergen claramente.
- 2) Hojas más jóvenes que presentan distinta gama en su desarrollo. No hay cuello y los bordes del limbo en su base divergen ligeramente en las más viejas, mientras que en las más jóvenes convergen.

Internamente, la hoja se diferencia en varios tipos de tejidos muy bien definidos. Krauss (1949) hace un estudio anatómico de la hoja de paja, determinando completamente su estructura. Esta consiste en la epidermis del haz, formada por una sola capa de células alargadas en sentido transversal, cubiertas por una cutícula que obstaculiza la pérdida de agua. Con frecuencia estas células están ocupadas por masas de sílice. La hipodermis formada por una o varias capas de células de esclerenquima. El tejido acuífero que se compone de varias capas de células de paredes delgadas y que ocupa de un cuarto hasta dos terceras partes de la hoja. La forma de sus células varía de acuerdo a la edad y condiciones del ambiente y su función es almacenar agua por periodos indefinidos.

El mesófilo constituido por numerosas capas de parénquima con abundantes cloroplastos. Este tejido ocupa la mayor parte de la hoja, está atravesado por fibras, haces vasculares y canales de aereación. Las primeras son de diverso tamaño y se hallan tanto cerca del tejido acuífero como hacia la parte inferior de la hoja. Son fuertes, suaves, blancas y resistentes. Los haces vasculares son de dos clases: unos pequeños y otros más grandes que alternan con los primeros, y están rodeados de bandas de esclerenquima, también fibras. Los canales aéreos se encuentran hacia la parte inferior del mesófilo y se comunican con los estomas. Finalmente la hipodermis, y epidermis. En esta última los estomas colocados en filas, ocupan las depresiones longitudinales o surcos. El envés de la hoja está cubierta de tricomas, dándole a la superficie el color blancuzco característico.

6. Mejoramiento Genético a través de la Inducción de Mutaciones.

Las mutaciones ocurren en los seres vivos alterando la estructura y función del organismo y su progenie, afectando principalmente el material hereditario (DNA y RNA). Estos cambios genéticos pueden resultar de un reacomodo o reordenación de las bases (mutaciones de punto), de partes de un cromosoma (delecciones, duplicaciones, traslocaciones, inversiones) ó de la sustracción o multiplicación de grupos enteros de cromosomas (aneuploidía y poliploidía respectivamente), Hartman y Kester (1988). En este sentido, las mutaciones pueden ser de gran importancia en el mejoramiento genético de las plantas, por ser un mecanismo de formación de nuevas variedades con caracteres hereditarios que pueden superar la calidad, productividad y resistencia de las ya establecidas (Favret, 1977).

Tradicionalmente han sido usados varios métodos para incrementar la variabilidad genética, seguidos por un proceso de selección para probar las características genotípicas deseadas. Uno de ellos es el entrecruzamiento o hibridación de las especies vegetales, con el cual se trata de combinar las características benéficas de diferente origen dentro de un genotipo (Broertjes y Van Harten, 1984). Otro es por selección natural donde se aplican deliberadamente presiones ambientales y de stress para las plantas, seleccionando las más resistentes.

Por otro parte, últimamente ha sido posible ampliar la variación genética natural y desarrollar caracteres deseables induciendo mutaciones por medios artificiales físicos y químicos (Favret, 1977). Los agentes mutagénicos físicos más usados son las radiaciones con rayos X, rayos Gamma y neutrones. Los químicos consisten principalmente de sustancias aquilantes derivadas de ácido sulfónico como etil-metano-sulfonato (EMS), metil-metano-sulfonato (MMS), y etil-amino (EI). Los primeros han sido más utilizados con este fin para plantas superiores, irradiando semillas, algunos órganos de las plantas ó las plantas enteras (Meneses, 1981). Aunque son pocos los trabajos en que se han aplicado agentes químicos, Broertjes y Van Van Harten (1984) opinan que dan una alta eficiencia en la producción de mutaciones, si la duración del tratamiento y la concentración son bien ajustadas.

La posibilidad de tratar los tejidos o las células *in vitro* induciendo mutaciones por medios artificiales da la posibilidad de alterar genes, logrando cambios espontáneos que pueden involucrar un solo gen (mutaciones puntuales) o varios, e incluso partes de un cromosoma (aberraciones cromosómicas), Devreux (1972). Las mutaciones puntuales se consideran de mayor utilidad en comparación a las aberraciones cromosómicas, ya que estas últimas frecuentemente causan reducción en la fertilidad y serios daños a las especies que se propagan por semilla (Broertjes y Van Harten, 1984).

El principal obstáculo en el mejoramiento genético a través de la inducción de mutaciones ha sido la formación de quimeras y la se

lección diplóntica. Ambas son causadas por la naturaleza multicelular del ápice del brote y tienden a disminuir las mutaciones obtenidas, resultando una baja frecuencia de plantas mutantes y probablemente un limitado espectro mutacional. Así mismo, el proceso de selección posterior no puede ser aplicado antes de que el estado de una quimera haya alcanzado cierta estabilidad (Broertjes y Van Harten, 1984).

Como ya se mencionó, una alternativa para resolver el problema anterior, es lo que se ha denominado como Técnica de Brotes Adventicios *in vivo* o *in vitro*, ya que se ha detectado que estos órganos generalmente se originan de una o pocas células (Broertjes, et al, 1968). La inducción de yemas adventicias combinada con la inducción de mutagénesis, ha logrado formar una gran cantidad de mutantes sólidos no quiméricos. Esto ha aumentado la frecuencia de las mutaciones obtenidas y ampliado el espectro mutacional (Broertjes y Van Harten, 1984). Así mismo, ha hecho más fácil el reconocimiento y la selección de tales mutaciones.

De esta manera la mejora genética por mutación es útil para cambiar características que tienen una herencia sencilla en sistemas génicos altamente desarrollados. Tiene ventajas en la introducción de características específicas en plantas que se multiplican vegetativamente, ya que el genotipo básico de la variedad es levemente alterado mientras se introducen las nuevas características, además el tiempo requerido para su producción es más corto (Sigürbjornsson, 1970). También son útiles en plantas altamente heterocigotas, no adecuadas para la mejora por selección de tipos recombinan-

tes en generaciones sucesivas después de la hibridación o de un posible tratamiento con un programa por retrocruzamiento (Allard, 1978).

6.1 Variación Somaclonal.

Otro factor importante para tratar los tejidos o células *in vitro* como generador de variabilidad genética es lo que se conoce como variación somaclonal. Esto se refiere a la variabilidad morfológica que se manifiesta en plantas regeneradas a partir de células o tejido inorganizado (callo) cultivado *in vitro* por largos periodos de tiempo. Larkin y Scowcroft (1981) propusieron el término "somaclon" al producto del ciclo de cultivo de tejidos. Esto es, al establecimiento del tejido *in vitro*, su posterior proliferación de células por varias generaciones y finalmente la regeneración de la nueva planta.

Este fenómeno de variación somaclonal ha sido observado en gran número de especies cultivadas. Comings, *et al* (1976 citado por Larkin y Scowcroft, 1981) reportaron variación somaclonal en tejidos cultivados de avena, mencionando que muchas de estas variantes fueron transmitidas a la generación posterior. Henke, *et al* (1978) reportaron variantes fenotipicos en plantas de arroz regeneradas de callo, tales como número de retoños por planta, longitud promedio de la panícula, tamaño de la planta y frecuencia en la fertilidad de la semilla. Por otra parte, Lat y Lantin (1976) evaluaron soma-

clones de caña de azúcar y encontraron diferencias morfológicas significativas en diámetro, longitud y peso de la caña.

Recientemente se han llevado a cabo avances significativos en las Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales para generar esta variación somaclonal, especialmente en el cultivo de callos, ya que estos cultivos pueden ser considerados como mutagénicos *per se*. Los cultivos de callos y células en suspensión mantenidos *in vitro* por grandes periodos de tiempo, usualmente dan inestabilidad citológica. Posteriormente estos cultivos dan origen después de regeneración a plántulas, las cuales son frecuentemente caracterizadas por cambios mutacionales de aneuploidía y poliploidía (Devreux, 1972).

Una de las contribuciones de la variación somaclonal al fitomejoramiento es que reduce aproximadamente el 50 % del lapso de tiempo convencional, lo que lleva a considerar el empleo de esta técnica como otra alternativa para la generación de variabilidad genética en plantas.

7. Variación Genética en Piña.

La multiplicación asexual del cultivar "Cayena Lisa" realizada posiblemente desde la antigüedad, tuvo la consecuencia de acumular en el curso de los siglos un número considerable de mutaciones somáticas tanto cuantitativas como cualitativas, que mantienen y constituyen las poblaciones que se conocen actualmente (Fy, 1968).

Collins y Kerns (1938) describen 30 tipos mutantes de este cultivar concernientes a la inflorescencia, fruto, hojas y plantas en general, acumuladas a través de largo tiempo en forma natural. Mencionan que las mutaciones en las especies propagadas asexualmente, como en este caso, pueden causar cambios continuos y graduales en el genotipo. Lo que resulta que las plantas actuales contengan varios genes distintos a los que existían anteriormente así como haber perdido algunos de los genes originales. La acumulación de estas mutaciones puede desempeñar un importante papel en el funcionamiento y aclimatización de las variedades.

Esto ha ayudado en cierta forma al mejoramiento genético de la piña ya que a través de la selección de tipos superiores en el campo y su posterior introducción, ha permitido constituir clones de plantas con características deseables. El fitomejoramiento de esta especie presenta ciertas dificultades debido a la autoincompatibilidad que existe para la formación de semillas además de su difícil e irregular germinación. Por lo que su mejoramiento ha sido a través de selección de importantes híbridos resultantes de cruces entre cultivares logrando obtener mutantes favorables con características deseables tales como: sistema radical más eficiente, mejor calidad del fruto, madurez uniforme, color intenso de la pulpa, sabor más dulce y resistencia a enfermedades, entre otras (Broertjes y Van Harten, 1984).

Por otro lado, se ha tratado de generar mutantes a través de cultivo de tejidos. Wakasa (1979) indujo variación somaclonal en es

ta especie por cultivos *in vitro* utilizando como inóculos, anteras, yemas axilares de clavos, gallos y coronas y tejido del fruto en diferentes medios. Las plantas regeneradas del fruto sufrieron modificaciones en el color de la hoja, espinas, cera y densidad foliar. Las plantas regeneradas de las yemas axilares de gallos y coronas variaron en la presencia y ausencia de espinas. Tal variación se atribuye a mutaciones somáticas en los progenitores, al explante empleado, a cambios en el número de cromosomas en las plantas obtenidas, a cambios morfológicos y genéticos durante la rediferenciación o regeneración y a las diferencias en las condiciones de cultivo. Posteriormente, reproduce experimentos y evalúa las variaciones surgidas entre las plantas regeneradas y esclarece la importancia de esta técnica en plantas autoincompatibles de propagación sexual, producción masiva de plantas no-variantes ya seleccionadas e inducción de variantes útiles para el fitomejorador.

Por su parte, Singh e Iyer (1974, citado por Broertjes y Van Harten, 1984) describen una técnica provechosa en la inducción de mutaciones en esta especie, aplicando los agentes mutagénicos: etil amino (EI), N-nitroso-N-metiluretano (NMU) y dietil-sulfonato (DES) separando "gallos" de plantas del Cv. "Queen" de 1 a 1.5 meses de edad. Su respuesta fueron mutaciones morfológicas, tales como plantas sin espinas, un factor económicamente significativo.

De esta manera es visto que la inducción de mutaciones en esta especie es completamente factible, aunque es importante tomar en cuenta que estas técnicas no substituyen, ni eliminan el trabajo de

los fitomejoradores convencionales, ya que las plantas obtenidas deben ser sometidas a numerosos estudios antes de obtener plantaciones comerciales. Sin embargo, en un programa de mejoramiento genético a través de la Técnica de Iniciación de Brotes Adventicios e inducción de mutaciones se aumenta la probabilidad de obtener plantas completas mutantes no quiméricas. Además se reduce el lapso de tiempo empleado, ya que la aparición de mutaciones genéticas tan lentas en la naturaleza, son aceleradas con las Técnicas de cultivo *in vitro*.

III. MATERIAL Y METODOS

1. Material Vegetativo

Se emplearon hojas de plántulas de pifia (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Cv. Cayena Lisa, cultivadas previamente *in vitro*. Este cultivar es el más ampliamente distribuido y se caracteriza por tener frutos grandes, cilíndricos, con un peso promedio de 2.3 a 3.6 kg. y de excelente sabor.

2. Medio de Cultivo

El medio de cultivo empleado en todas las siembras fue el de Murashige y Skoog (1962), complementado con mio-inositol, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina, ácido indolbutírico, bencil adenina, sulfato de adenina, sacarosa y como soporte agar Merck a distintas concentraciones de acuerdo a la etapa de inducción o proliferación del inóculo (Cuadro 1).

El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl al 0.1 N. El agar fue disuelto en horno de microondas. Se utilizaron tubos de ensaye

de 25mm x 150 mm para la etapa de inducción y frascos en la etapa de proliferación, con 10 y 20 ml. de medio respectivamente.

Los recipientes fueron sellados con papel aluminio y esterilizados en autoclave a 121°C con presión de 1.15 Kg/cm² durante 15min.

Cuadro 1. Medio de cultivo base para la inducción y proliferación de brotes adventicios in vitro de piña.

COMPONENTE	ETAPAS	
	inducción	proliferación
	(mg/l)	
Sales Minerales (MS)	*	100 %
Mio-inositol	100	100
Tiamina	1.0	1.0
Glicina	1.0	1.0
Ac. nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5
Sulfato de adenina	-	80
Ac. indolbutírico	*	var
Benciladenina	*	var
Caseína Hidrolizada	*	-
Sacarosa	*	30000
Agar Merck	5700	5700
pH	5.7	5.7

* componentes probados a distintas concentraciones
var= variable

2.1 Siembra

Se utilizaron como inóculos las hojas completas de las plantas de piña, tomando aquellas de mejor aspecto (sin daños, grandes

y de color brillante). Se separaron de la planta original con ayuda de pinzas y bisturí, cuidando de no dañarlas y evitando que traieran consigo yemas axilares del tallo. Se colocó una hoja en cada tubo con la base sumergida en el medio.

Durante este proceso el material se mantuvo bajo condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones.

2.2 Condiciones de incubación

Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación a una temperatura de 22° a 25°C, con un fotoperíodo de 16 horas luz, utilizando un reloj midtex ciclomaster. La intensidad lumínica fue de 1100 lux.

3. Determinación del efecto de varios constituyentes del medio de cultivo para la inducción de brotes adventicios

Con la finalidad de obtener un medio de cultivo eficaz en la formación de brotes adventicios se llevaron a cabo distintos tratamientos en los que se modificó las concentraciones de los siguientes componentes: Sales Minerales (Murashige y Skoog, 1962), caseína hidrolizada, ácido indolbutírico (AIB), benciladenina (BA) y sacarosa.

Se prepararon los medios nutritivos con las siguientes concentraciones: Sales Minerales (MS) 100y 50%, caseína hidrolizada 0 y 300 mg/l; AIB 1.0 y 5.0 mg/l, BA 0.0 y 1.0 mg/l y sacarosa 20,40 y 60 g/l (Cuadro 2.). Se complementaron con mioinositol 100 mg/l, tía

Cuadro 2. Concentraciones probadas de Sales Minerales (MS), caseína hidrolizada, ac. indolbutírico (AIB), benziladenina (BA) y sacarosa en la inducción de brotes adventicios de púa.

Trat.	sales minerales (MS) %	caseína hidrolizada	AIB (mg/l)	BA	Sacarosa (g/l)
1	100	0	1.0	0	20
2	100	300	1.0	0	20
3	100	0	1.0	0	40
4	100	300	1.0	0	40
5	100	0	1.0	0	60
6	100	300	1.0	0	60
7	100	0	5.0	1.0	20
8	100	300	5.0	1.0	20
9	100	0	5.0	1.0	40
10	100	300	5.0	1.0	40
11	100	0	5.0	1.0	60
12	100	300	5.0	1.0	60
13	50	0	1.0	0	20
14	50	300	1.0	0	20
15	50	0	1.0	0	40
16	50	300	1.0	0	40
17	50	0	1.0	0	60
18	50	300	1.0	0	60
19	50	0	5.0	1.0	20
20	50	300	5.0	1.0	20
21	50	0	5.0	1.0	40
22	50	300	5.0	1.0	40
23	50	0	5.0	1.0	60
24	50	300	5.0	1.0	60

mina 1.0 mg/l, piridoxina 0.5 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l y agar Merck 5.7 g/l, los cuales permanecieron constantes en todos los tratamientos.

Todos los tratamientos probados fueron aplicados en la primera etapa del sistema de cultivo *in vitro*, es decir en la etapa de inducción de brotes. Posteriormente fueron transferidos a un medio de proliferación para su multiplicación.

Una vez detectados los mejores tratamientos en la inducción de brotes adventicios, se probaron más concentraciones de los reguladores de crecimiento (ac.indolbutírico y benciladenina) ampliando los intervalos para determinar con mayor precisión las concentraciones más adecuadas. De esta manera se probaron cinco dosis de AIB: 0.0, 1.0, 2.5, 5.0 y 7.5 mg/l y cuatro dosis de BA: 0.0, 2.5, 5.0 y 7.5 mg/l teniendo un total de 20 tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diferentes tratamientos de ac. indolbutírico (AIB) y benciladenina (BA) en la inducción de brotes adventicios de piña cv. Cayena Lisa.

		AIB mg/l				
		0.0	1.0	2.5	5.0	7.5
BA	0.0	1	5	9	13	17
	2.5	2	6	10	14	18
	5.0	3	7	11	15	18
	7.5	4	8	12	16	20
	mg/l					

4. Tamaño del inóculo

Se probaron distintos tamaños de hoja para su inoculación, de acuerdo a su desarrollo en la planta madre :

- 1) Chicas (de 1.0 a 1.5 cm). Son las hojas más jóvenes de la roseta visibles exteriormente, situadas en el ápice del tallo. Presentan la base ligeramente convergente en los bordes.
- 2) Mediana (de 3.0 a 3.5 cm.). Están situadas en la parte central del tallo. Presentan una forma lanceolada típica, con la base ligeramente convergente en los bordes.
- 3) Grande (de 4.5 a 5.0 cm.). Se sitúan en la parte basal del tallo. Su base es ensanchada y está formada por tejidos no clorofílicos

Hubo 10 tubos por cada tratamiento, conteniendo un inóculo por tubo. Además se probaron hojas a las cuales se les cortó 3mm. de la base para evitar que trajeran consigo yemas axilares (hojas "sin base"). A las hojas "con base" no se les hizo este corte (Fig.1).

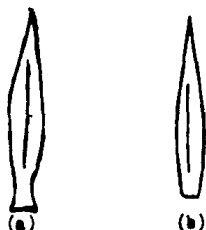


Fig.1. Esquema comparativo de hojas "con base" (a) y "sin base" (b).

5. Inducción de Mutaciones

Con la finalidad de inducir mutaciones en los brotes adventicios se utilizó el agente mutagénico Etil-metano-sulfonato (EMS). Este fué aplicado a los inóculos en las siguientes concentraciones: 0.0, 0.25 y 0.50 % con distintos tiempos de inmersión: 20, 40 y 60 min., probando un total de 12 tratamientos (Cuadro 4).

Las soluciones mutagénicas se prepararon disolviendo el mutágeno en agua destilada. Su esterilización se efectuó filtrando con Millipore de 22μ de tamaño de poro dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente se sumergió la base de las hojas durante el tiempo correspondiente de acuerdo al tratamiento.

Cuadro 4. Distintas concentraciones y tiempos de inmersión en la solución mutagénica de etil-metano sulfonato (EMS) para la inducción de mutaciones en los brotes adventicios de pifia.

Tratamiento	EMS [%]	Tiempo de inmersión (min)
1	0	20
2	0	40
3	0	60
4	0.25	20
5	0.25	40
6	0.25	60
7	0.50	20
8	0.50	40
9	0.50	60

Las hojas se sembraron 48 horas antes en el medio de cultivo, con el fin de que se aclimataran a éste y su efecto fuera menos drástico. Después de sumergir la base de las hojas en la solución mutagénica, se lavaron con agua destilada estéril durante 15 min. y se sembraron nuevamente en tubos conteniendo medio nuevo.

En todos los tratamientos la unidad experimental fue un tubo de ensaye conteniendo una hoja como inóculo con 10 repeticiones cada uno. Se manejó un diseño completamente al azar y se hizo análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey.

Aquellas hojas que desarrollaron brotes fueron transferidas a un medio de proliferación para su desarrollo y multiplicación posterior, a los 45-50 días de su establecimiento.

Los parámetros a evaluar en todos los tratamientos fueron:

- 1) Porcentaje de brotación. Se cuantificaron los tubos que desarrollaron brotes.
- 2) Número de brotes por tubo. Se cuantificaron todos los brotes emergidos.
- 3) Tamaño de brotes. Se clasificaron en tres categorías para una mejor determinación de la longitud de éstos: pequeños (P) brotes menores de 1.0 cm, medianos (M) brotes entre 1.1 y 3.0 cm y grandes (G) brotes mayores de 3.1 cm.
- 4) Presencia o ausencia de meristemoides. Se detectaron como pequeños nódulos en la base del explante.
- 5) En el caso de inducción de mutaciones se hicieron observaciones de cambios morfológicos que pudieran aparecer como coloración,

tamaño de brotes, brillantez, etc.

- 6) Cuantificación del porcentaje de contaminación, así como el de hojas sin respuesta. Siendo aquellas que se secaron sin desarrollar brotes o meristemoides.

G. Preparación del material vegetativo para el estudio anatómico de los brotes adventicios.

Con el objeto de determinar el origen y desarrollo anatómico de los brotes adventicios se tomaron secciones de la base de la hoja (5-6 cm de longitud) a distintos días después de establecidos en el medio de cultivo de inducción. Los cortes fueron fijados en FAA, la cual consiste en una solución de formaldehído 5 %, ac. acético glacial 5 % y alcohol etílico 90 %, manteniéndolos durante 24 horas. Posteriormente los tejidos fueron deshidratados con alcohol etílico (50%, 70%, 96%, 100% y 100% en forma secuenciada). Luego se pasaron a alcohol-xileno (1:1) y xileno (100%) para infiltrar. El tejido permaneció 4 horas en cada solución.

Enseguida se pasaron a parafina (52-54°C) para incluirlos en bloques. Se realizaron cortes transversales en el micrótopo de 12 μ de espesor. Los cortes fueron montados en portaobjetos con adhesivo de Hupt (gretina.5%, sulfato de cromo y potasio 0.005% y fenol 0.01%) y puestas a secar en una platina a 35°C.

El proceso de tinción consistió en la desparafinación e hidratación gradual con alcohol etílico. Se tñó con zafranina y verde rápido. Se montó con Bálsamo de Canadá, dejándolos secar totalmente antes de observarlos al microscopio óptico .

IV. RESULTADOS

1. Determinación del efecto de varios constituyentes del medio de cultivo para la inducción de brotes adventicios.

Los resultados obtenidos en los tratamientos donde se probó las distintas concentraciones de Sales Minerales (MS), caseína hidrolizada, AIB, BA y sacarosa muestran una gran variabilidad de respuesta a la emergencia de brotes adventicios. En general, se observó un bajo porcentaje de brotación en todos ellos. El tratamiento 20 fué el que registró el mayor porcentaje (de 30%), seguido por el 17 y 22 con un 20 % de brotación. Existiendo casi un 50 % de tratamientos en donde no se obtuvo respuesta (Cuadro 5).

De acuerdo a la variabilidad de estos resultados, su análisis estadístico fué hecho a través de la técnica de bloques completamente al azar tomando las concentraciones de sacarosa 20, 40 y 60 g/l como bloques de los demás constituyentes. Con la comparación de medias por la prueba de Tukey, se analizó el efecto de los tratamientos en la inducción de brotes.

A partir de este análisis estadístico, se encontró que la concentración de las Sales Minerales (MS) en relación con los demás componentes constituyen el factor más importante en la iniciación de estos brotes. Se dió un mayor porcentaje de brotación en aquellos tratamientos que lo contenían al 50 %, los cuales fueron el 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23 y 24. En estos mismos tratamientos se observa el mayor número promedio de brotes por tubo que comprende una intervalo de 11 a 32 brotes por inóculo (Cuadro 5).

Respecto a la caseína hidrolizada, se registró que estadísticamente no hubo significancia al aplicarse o no al medio de cultivo. Sin embargo, se observó que en aquellos tratamientos que la contenían junto con las Sales Minerales al 50 %, se dió el mayor número de brotes por inóculo (tratamientos 20,22 y 24).

En cuanto a la sacarosa no se pudo analizar debidamente, ya que sus valores fueron utilizados como bloques para el análisis estadístico. En adelante se consideró utilizar la concentración de 30 g/l utilizada por Chagolla (1988).

Analizando el efecto de los reguladores de crecimiento se observó que hubo un mayor porcentaje de brotación, así como mayor número de brotes por tubo en los tratamientos donde la relación de auxina-citocinina fué de 5.0 y 1.0 mg/l respectivamente. De esta manera se detectó que los mejores tratamientos fueron el 11, 20, 22, 23 y 24, siendo iguales estadísticamente.

Cuadro 5. Efecto de Sales minerales (MS), caseína hidrolizada (CH), ac. indolbutírico (AIB) y benciladenina (BA) en la inducción de brotes adventicios en pifia Cv. Cayena Lisa a los 70 días de su establecimiento.

Trat.	MS (%)	CH (mg/l)	AIB (mg/l)	BA (mg/l)	tubos sembrados	tubos con brotes %	# de brotes/ tubo	# de brotes/ tamaño		
								P ^a	M ^y	G ^a
1	100	0	1.0	0	10	-				
2	100	300	1.0	0	10	-				
3	100	0	1.0	0	10	10	12ab ^y	12		
4	100	300	1.0	0	10	-				
5	100	0	1.0	0	10	10	2a	2		
6	100	300	1.0	0	10	-				
7	100	0	5.0	1.0	10	10	6a	6		
8	100	300	5.0	1.0	10	-				
9	100	0	5.0	1.0	10	-				
10	100	300	5.0	1.0	10	-				
11	100	0	5.0	1.0	10	10	20b	20		
12	100	300	5.0	1.0	10	-				
13	50	0	1.0	0.0	10	-				
14	50	300	1.0	0	10	-				
15	50	0	1.0	0	10	10	3a	2	1	
16	50	300	1.0	0	10	-				
17	50	0	1.0	0	10	20	13ab	13		
18	50	300	1.0	0	10	10	7a	3		
19	50	0	5.0	1.0	10	10	12ab	12		
20	50	300	5.0	1.0	10	30	19b	13	3	2
21	50	0	5.0	1.0	10	10	11ab	10	1	
22	50	300	5.0	1.0	10	20	32b	32		
23	50	0	5.0	1.0	10	10	21b	21		
24	50	300	5.0	1.0	10	10	18b	17	1	

^aValores con la misma letra son iguales estadísticamente, según prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

^b=brotes < 1 cm. ^y=brotes de 1.1 a 3.0 cm. ^c=brotes > 3 cm.

^P=pequeños ^M=mediano ^G=grandes

Los tubos en donde hubo formación de nuevos brotes fueron transferidos a un medio de proliferación para su multiplicación a los 45-50 días de su establecimiento. Una vez transferidos, los brotes obtenidos se agruparon en tres categorías de acuerdo a su tamaño: P= brotes menores de 1.0 cm. de longitud, M= brotes de 1.1 a 3.0cm y G= brotes mayores de 3.1 cm. Se observó que la mayoría de los tratamientos en que se obtuvo brotación, los brotes fueron del tamaño más pequeño (P), seguido del tamaño mediano (M) y posteriormente el grande (G). Este último sólo se registró en el tratamiento 20, lo que denota un lento desarrollo de los brotes.

Debido al bajo porcentaje de brotación obtenido, se procedió a probar mayores intervalos de los reguladores de crecimiento: AIB y BA. Esto con el fin de determinar con mayor precisión su efecto en la iniciación de los brotes adventicios. Las concentraciones probadas anteriormente fueron muy distantes entre sí y fue poco claro deducir su efecto.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 6. Donde se observa que sólo el 50 % de ellos dieron respuesta a la formación de brotes.

En los tratamientos 11 y 16 se registró el mayor porcentaje de tubos con brotes, 50 y 40% respectivamente. Así como el mayor número de brotes por explante, 28.0 y 26.5 en cada uno. Ambos contenían una mayor concentración de citocinina sobre auxina, 5.0 mg/l de BA y 2.5 mg/l de AIB el primero, y 7.5 mg/l de BA y 5.0 mg/l de AIB el

segundo, resultando ser los mejores estadísticamente. En orden de-
 creciente los tratamientos 17, 14, 13, 20, 10, 8, 19 y 7 también in-
 dujeron brotación, siendo muy variable la relación citocinina-auxina
 entre ellos.

**Cuadro 6. Efecto del ac. Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA)
 en la inducción de brotes adventicios de pino a los 70
 días de su establecimiento.**

Tratamiento	AIB (mg/l)	BA	tubos sembrados	tubos con brotes %	# \bar{x} de		# \bar{x} de		
					brotes/tubo	brotes/tamaño	P ^a	M ^b	G ^c
1	0.0	0.0	10	-					
2	0.0	2.5	10	-					
3	0.0	5.0	10	-					
4	0.0	7.5	10	-					
5	1.0	0.0	10	-					
6	1.0	2.5	10	-					
7	1.0	5.0	10	10	4.0 ^v	4.0			
8	1.0	7.5	10	20	9.5 ^{ab}	9.0	0.5		
9	2.5	0.0	10	-					
10	2.5	2.5	10	20	10.5 ^b	10.5	0.5		
11	2.5	5.0	10	50	28.0 ^e	19.4	7.2	1.4	
12	2.5	7.5	10	-					
13	5.0	0.0	10	20	17.5 ^c	16.5	1.0		
14	5.0	2.5	10	10	23.0 ^d	23.0			
15	5.0	5.0	10	-					
16	5.0	7.5	10	40	26.5 ^{de}	22.5	3.0	1.0	
17	7.5	0.0	10	20	23.0 ^d	17.0	5.0	1.0	
18	7.5	2.5	10	-					
19	7.5	5.0	10	10	7.0 ^{ab}	7.0			
20	7.5	7.5	10	30	16.6 ^c	13.6	3.0		

^vValores con la misma letra son estadísticamente iguales, según la
 prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) $MSM=9.28$
 #brotes < 1.0 cm y brotes de 1.1 - 9.0cm x brotes > de 9.0cm
 P^a pequeños M^b medianos G^c grandes

La auxina parece tener un efecto más significativo en la promoción de brotes adventicios, ya que la ausencia de esta fitohormona inhibió completamente su formación a pesar de tener distintas concentraciones de BA.

Con respecto al tamaño de los brotes, se encontró que en la mayoría de los tratamientos los brotes registrados fueron los de la categoría más pequeña, con un intervalo de 4 a 23 brotes por inóculo, siguiéndole los brotes medianos de 0.5 a 7.2. Los brotes grandes sólo se registraron en los tratamientos 11, 16 y 17, en una proporción muy baja de un brote promedio por inóculo.

El porcentaje de contaminación fué nulo, lo cual indica buen manejo en las condiciones estériles del cultivo. Sin embargo se observó un gran porcentaje de tubos sin respuesta, en donde las hojas inoculadas se fueron secando gradualmente, sin mostrar ningún cambio aparente en la base como hinchazones, callo o meristemoides.

Cabe señalar que en la mayoría de los inóculos, a las primeras horas de incubación, presentaron un ennegrecimiento de las células dañadas en la parte donde se realizó el corte al tejido. Dicho ennegrecimiento pudo deberse a la oxidación de sustancias de naturaleza fenólica y ser tóxico para algunos inóculos. Se ha detectado que las células muertas anulan el intercambio entre el inóculo y el medio nutritivo, provocando su muerte. Probablemente esto sucedió, ya que un gran porcentaje de hojas se fueron secando gradualmente.

Después de la oxidación a los primeros días de cultivo, se distinguió una hinchazón en aquellos inóculos que no fueron afectados. Posteriormente estas hinchazones originaron meristemoides de color café blanquecino, aproximadamente a los 12-14 días de su establecimiento. A partir de estos meristemoides se fue dando gradualmente la formación de los primordios de brote y del brote adventicio bien de finido.

No hubo formación de callo en ninguno de los tratamientos probados. Sin embargo, varios inóculos que desarrollaron meristemoides se quedaron en este estado de desarrollo, amarillandose las hojas poco a poco, hasta secarse totalmente.

2. Corte y tamaño de inóculo.

Una vez estudiado el efecto de los niveles de AIB y BA en la inducción de brotes adventicios se eligió el tratamiento II (por ser el que registró mejor respuesta en la brotación), para evaluar el efecto del corte y tamaño del inóculo en la obtención de estos brotes. Los resultados del efecto de estos factores se aprecia en el Cuadro 7. Los inóculos a los que se les seccionó la base no desarrollaron brotes, mientras que a los que se les omitió este corte, respondieron favorablemente. El porcentaje de brotación fue bajo, siendo 60 % el valor más alto para el tamaño de hoja mayor (de 4.5 a 5.0cm). Estas hojas están situadas en la parte basal del tallo.

Se hicieron cortes anatómicos tanto en hojas "sin base" como "con base", pensando que estas últimas podían tener yemas axilares en su base (traídas consigo al hacer el corte de la plántula original). Sin embargo, no se detectaron en ninguna de ellas. Esto sugiere que puede existir algún otro factor organogénico en el extremo basal de las hojas que favorece la inducción de los brotes adventicios.

Cuadro 7. Efecto del tamaño del inóculo en la inducción de brotes adventicios de pñna cv. Cayena Lisa a los 70 días de su establecimiento.

Trat.	tamaño del explante	tubos sembrados	tubos con brotes %	# x̄ de brotes tubo	# x̄ de brotes/tamaño		
					P ^u	M ^v	G ⁿ
1	chico	10	30	5.6	5.6		
2	medio	10	30	8.6	6.0	2.6	
3	grande	10	60	9.6	7.1	2.5	
4	chico ^v	10	-	-			
5	medio ^v	10	-	-			
6	grande ^v	10	-	-			

g=brotes < 1.0 cm y= brotes de 1.1-2.0 cm x=brotes > de 2.0 cm
^v sin base.
P=pequeños M=medianos G=grandes

Las hojas "con base" desarrollaron el mayor porcentaje de tubos con brotes y el mayor número de brotes por tubo. Obteniendo 9.6

brotos promedio en las hojas más grandes a los 70 días de establecimiento. Seguido del tamaño medio (8.6) y chico (5.6), los cuales en su mayoría desarrollaron brotes de menor tamaño (menores de 1.0 cm) Se detectó la presencia de meristemoides a esta fecha, principalmente en las hojas "con base" de tamaño chico y grande. Estos meristemoides se observan como masas de células pequeñas de tipo meristemático, con núcleos prominentes y citoplasma denso, detectado por su fuerte tinción.

No hubo contaminación de los inóculos, pero en las hojas donde no se obtuvo respuesta se observó el mismo fenómeno de secado gradual del tejido, sin desarrollo de ninguna estructura visible.

3. Anatomía de la formación de brotes adventicios.

Los cortes anatómicos fueron hechos a distintos tiempos de desarrollo, desde el establecimiento del inóculo hasta la aparición del brote bien constituido, siendo aproximadamente a los 33 días de cultivo.

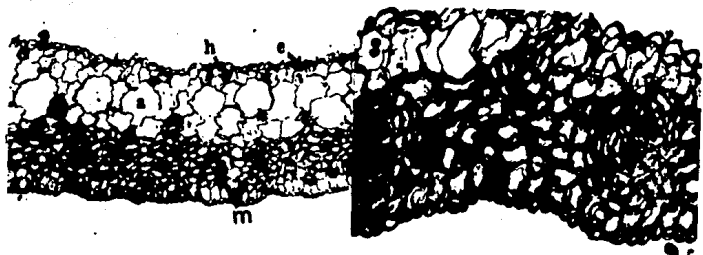
A los primeros días se observó la estructura anatómica normal de la hoja, de acuerdo a Krauss (1949), sin cambios aparentes: la epidermis superior (formada por un solo estrato de células), la hipodermis (formada por 2 ó 3 estratos de células), el tejido acuífero (constituido por varias capas de células que ocupan un cuarto de

grosor de la hoja), el mesófilo (constituido por numerosas células parenquimáticas con abundantes cloroplastos, atravesado por haces vasculares y algunos espacios intercelulares) y por último, la hipodermis y epidermis del envés, ésta última con presencia de estomas (Fig 2).

A los 6 días de desarrollo, se observó la formación de un pequeño callo cicatrizal en la base de las hojas, debido a la división de las células al nivel de los cortes, aunque en algunos no se detectó o fue poco visible.

A los 12 días las células adyacentes al haz vascular presentaron aumento en el tamaño del núcleo y se tiñeron más densamente, comenzando a dividirse en un sentido periclinal a éste (Fig.3). No todos los haces vasculares presentaron este patrón al mismo tiempo, en algunos se observó posteriormente.

A los 18 días de su establecimiento se observó con mayor claridad una gran división celular, donde toda la región de las células densamente teñidas fue aumentando de tamaño. Aparentemente como resultado de las divisiones celulares, agrandamiento de las células y adición de más células del parénquima adyacente. En esta etapa se dió la primera evidencia de la formación de meristemoides. Se detectó como un grupo de células pequeñas de tipo meristemático con citoplasma denso y aparentemente no vacuolado. Se diferenció claramente de las células de otros tejidos, ya que el citoplasma de estas células se tiñó más densamente que el de las circundantes (Fig 4). Los



- Fig 2. Corte transversal de la hoja de pino al inicio de su inoculación. epidermis (e), hipodermis (h), tejido vascular (a), mesófilo (m). 90x.
- Fig 3. Corte transversal de la hoja a los 12 días de su inoculación, mostrando divisiones periclinales de las células que rodean el haz vascular. 247x.
- Fig 4. Corte transversal de la hoja a los 18 días de inoculación, mostrando los meristemoides. haz vascular (hv). 91x.

meristemoides variaron considerablemente de tamaño, no mostrando su polaridad aún. Su desarrollo fué a partir de las células derivadas originalmente del parenquima adyacente al floema, en donde se observó gran división celular. Los meristemoides y células adyacentes involucradas ocasionaron engrosamientos e hinchazones en la base del inóculo, dándole una apariencia nodular.

Después de 24 días de cultivo se detectó la formación de meristemas apicales, originados de los meristemoides (Fig 5). También empezó la organización celular para la formación de tejido vascular de novo con diferenciación de elementos cribosos y traqueales. Hay división de las células a partir de los haces vasculares, entre el haz original y el meristemo apical.

A los 27 días de incubación aparecen los primordios de brote, mostrando los vástagos foliares (Fig 6). Los cuales se desarrollaron rápidamente, observándose muy bien definidos a los 30 días de establecimiento (Fig. 7). Finalmente a los 33 días se da la emergencia de los primeros brotes sobre la superficie de la hoja.

Es importante señalar que no todos los brotes surgieron al mismo tiempo, además de que varió el número de brotes surgidos por inóculo ocasionando diferencias en su desarrollo.



Fig 5. Corte longitudinal del meristemo apical de un brote ad venticio, originado de los meristemoides. 324x.

Fig 6. Corte longitudinal de un primordio de brote a los 27 días de establecido el inóculo. *primordio foliar (pf)*. 200x.

Fig 7. Corte longitudinal del primordio de brote en una etapa más avanzada, se observan los primordios foliares más definidos *(pf)*. 200x.

4. Inducción de mutaciones con Etil-metano-sulfonato.

A partir de los resultados obtenidos en los tratamientos anteriores se decidió utilizar las siguientes concentraciones en el medio de cultivo: Sales minerales (MS) 50%, IBA 2.5 mg/l, BA 5.0 mg/l y sacarosa 30 g/l. Así como hojas grandes (4.5 a 5.0 cm) "con base" como inóculos para la inducción de brotes adventicios. Esto para probar el efecto del agente mutagénico Etil-metano-sulfonato (EMS), en la iniciación y desarrollo de los brotes adventicios.

En los resultados obtenidos (Cuadro 8) se observa que la aplicación de este agente redujo fuertemente la formación de brotes adventicios, al igual que la formación previa de meristemoides. El mayor porcentaje de brotación se registró en el tratamiento 8, que correspondió únicamente al remojo del explante en agua durante 20 min. Siguiéndole los tratamientos 6 y 9 con un 20 % de brotación, conteniendo 0.25 y 0.50% de EMS respectivamente, con un tiempo de inmersión de 60 min. No obstante, estadísticamente no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, no pudiendo atribuir una mejor respuesta a determinada concentración de EMS probada.

Se observaron algunos cambios morfológicos en los brotes de los tratamientos 7, 8 y 9, como disminución en el ancho de la hoja, así como menor color y brillantez. Estos tratamientos correspondieron a los de mayor concentración del mutágeno (0.50 %). Otro factor detectado fue el lento desarrollo de los brotes surgidos por inóculo, ya que el único tamaño cuantificado fue el más pequeño, de bro-

tes menores de 1.0 cm. Estos datos fueron registrados al mismo tiempo que los experimentos anteriores, a los 70 días de establecidos.

Cuadro 8. Efecto del Etilmetano-sulfonato (EMS) en la inducción de brotes adventicios de pinya Cv. Cayena Lisa a los 70 días de su establecimiento.

Trat.	EMS (%)	tiempo inmersión (min)	tubos sembrados	tubos con brote %	# \bar{x} de brotes/tubo	# \bar{x} de brotes/tamaño		
						P ^u	M ^y	G ⁿ
1	0.0	20	10	80	2.7 ^a	2.7		
2	0.0	40	10	10	-			
3	0.0	60	10	10	4.0 ^a	4.0		
4	0.25	20	10	10	-			
5	0.25	40	10	10	6.0 ^a	6.0		
6	0.25	60	10	20	1.5 ^a	1.5		
7	0.50	20	10	10	3.0 ^a	3.0		
8	0.50	40	10	10	5.0 ^a	5.0		
9	0.50	60	10	20	3.5 ^a	3.5		

^u = brotes < de 1.0 cm, ^y = brotes des. 1 a 3.0 cm, ⁿ = brotes > de 3.0 cm
^a = valores con la misma letra son iguales estadísticamente.
P=pequeño M=mediano G=grandes

En general, no se observaron grandes diferencias fenotípicas entre sí, por lo que se requiere un seguimiento continuo del desarrollo de estas plántulas hasta su establecimiento y producción en campo para detectar con mayor seguridad los cambios provocados.

V. DISCUSION

Los resultados permitieron observar el fenómeno totipotencial de las células vegetales para dividirse y dar la formación de nuevas plantas. Logrando promover la formación de brotes adventicios en los órganos cultivados *in vitro*, y su posterior desarrollo a plántulas completas.

1. Determinación del efecto de los constituyentes probados en el medio de cultivo.

El medio de cultivo es determinante para el desarrollo del inóculo en las técnicas de cultivo *in vitro*. Este contiene elementos que satisfacen tanto las necesidades nutricionales como fisiológicas de las células del cultivo. Por lo que se logró determinar concentraciones favorables de algunos constituyentes esenciales para la inducción y desarrollo de brotes adventicios en esta especie. Estas fueron: Sales Minerales (MS) 50%, AIB 2.5 mg/l y BA 5.0 mg/l.

Las sales minerales (MS) favorecieron el desarrollo de brotes adventicios en una concentración de 50 % en forma significativa. Se ha demostrado que la fórmula de Murashige y Skoog es adecuada para

una gran variedad de especies, así como para distintas partes de una planta, por contener grandes cantidades de macronutrientes y altas concentraciones de nitrógeno en forma de nitratos. El hecho de ser más efectiva al diluirla a la mitad sugiere que la inducción de los brotes adventicios no requiere de altas concentraciones de sales en su fase inicial. Posiblemente a que las células se encuentran en un estado de "ambientación" previo a su activación.

Por otro lado se observó que la adición de caseína hidrolizada no tuvo efectos significativos en la formación de brotes. Sin embargo junto con la aplicación de sales minerales al 50% se observó una tendencia a mejorar la brotación. A pesar de ello, esta mezcla de aminoácidos parece no ser esencial en el desarrollo de los brotes adventicios (específicamente en pifia) y bastarse únicamente de su contenido endógeno. Contrario a los efectos favorables que se han detectado en la aplicación de este compuesto en otras especies, principalmente en cultivos de callos y células en suspensión.

Respecto a los reguladores de crecimiento, ha sido varias veces mencionado que las citocininas intervienen principalmente en la promoción de la división celular e inducción y desarrollo de brotes, en una relación mayor de citocinina sobre auxina. Mientras que la formación de raíces se promueve en un radio mayor de auxina sobre citocinina. Particularmente, en este caso hubo varios de los tratamientos en donde no se establece esta relación (Cuadro 6). Sin embargo, se ha observado que la acción de las citocininas es más significativa en presencia de las auxinas, sugiriendo de este modo un

no que además de la influencia hormonal pueden existir otros factores involucrados, tales como determinación y competencia intrínseca de las células. Al respecto, Christianson y Warrick (1985) mencionan que existen una serie de eventos celulares desde que se establece el inóculo hasta la aparición de brotes reconocibles, que determinan las respuestas favorables a la iniciación de nuevos órganos. Estos eventos principian con la inducción de ciertas células para cambiar su destino, dirigiéndolas por un desarrollo específico que determina su diferenciación. Posteriormente al iniciarse el proceso de diferenciación morfológica, se da cierta competencia entre las células del tejido para responder a señales específicas y características de las sustancias hormonales. Lo que explica que no todas las células logren responder positivamente a la formación de nuevos órganos.

Por otra parte, Burgess (1985) menciona que en la respuesta celular a ciertas condiciones está implicada la sensibilidad intrínseca de las células, por lo que no se puede atribuir la falta de respuesta únicamente a concentraciones de reguladores de crecimiento o cualquier otro constituyente del medio, sino que pueden ser distintos niveles de sensibilidad del explante.

Además, es importante tomar en cuenta que existe gran interrelación entre todos los componentes probados en el medio de cultivo, por lo que sus efectos están combinados, afectando así la formación de brotes adventicios.

Finalmente con respecto al tamaño del inóculo probado para la inducción y formación de estos brotes, se encontró que las hojas grandes "con base" respondieron en un mayor porcentaje de brotación y en un mayor número de brotes por explante. Este hecho sugiere que las hojas más grandes son mejores para la iniciación y desarrollo de los brotes adventicios. De acuerdo a la clasificación de Krauss (1949) éstas corresponden a las hojas adultas más jóvenes y generalmente las más largas cuando ha finalizado su crecimiento, estando situadas en la parte media del tallo. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las hojas tomadas como inóculo corresponden a plántulas aún, por lo que no han alcanzado su desarrollo final. Lo que se deduce que una de las características favorables para la inducción de estos brotes está dado en el tamaño de la hoja, ya que en sí, la planta es joven ontogénicamente, pues proviene a su vez de tejidos jóvenes.

Al respecto, Hartman y Kester (1988) mencionan que la capacidad de regeneración de órganos de las partes juveniles de las plantas es mayor que las tomadas de la fase madura, tendiendo a producir raíces y ramas adventicias con mayor facilidad. Así mismo en los sistemas de cultivo de tejidos, la regeneración de nuevos órganos (hojas, ramas, raíces) en explantes y propágulos está fuertemente influenciado por la fuente del tejido en relación con su madurez. En consecuencia, la manipulación del estado juvenil puede ser un factor primordial para lograr la propagación eficaz.

Por otra parte, se observó una inhibición total de los brotes

en las hojas a las cuales se les seccionó la base. Comprobando posteriormente que no correspondía a una extracción de yemas axilares que pudieran estar en la base al momento de separarlas de la planta original, ya que tampoco se observaron en las hojas "con base". De acuerdo a lo mencionado por Burgess (1985) la respuesta a este fenómeno puede estar dado en los distintos niveles de sensibilidad intrínsecos de las células. Donde probablemente el nivel de sensibilidad de respuesta esté confinado a las células más cercanas al tallo, ya que sólo respondieron los inóculos a los que se les omitió el corte. Los factores antes mencionados en la respuesta a los reguladores de crecimiento también pueden estar influenciando en la inducción de nuevos brotes.

Es importante tomar en cuenta el alto porcentaje de hojas sin respuestas ocasionadas por el ennegrecimiento de la base. El corte realizado en la separación de la planta madre, pudo provocar oxidación de sustancias fenólicas, quizás tóxicas para algunos inóculos. Compton y Preece (1986) mencionan que durante la excisión de los explantes de la planta original, son dañados los tejidos, ocasionando la aparición de varios compuestos que son oxidados por peroxidasas o polifenoloxidas tornándolos café o negros. De esto resulta un oscurecimiento tanto del tejido como del medio de cultivo. Estos compuestos *in vivo* pueden funcionar como protectores al tejido dañado en la invasión de organismos patógenos, pero *in vitro* los productos oxidados son autoinhibitorios y pueden ser tóxicos, causando la muerte del explante.

2. Anatomía de la formación de brotes adventicios

El estudio histológico de la formación de los brotes adventicios surgiere que éstos surgen de células cercanas al haz vascular. Aunque no pudo ser detectado si una sola célula comenzó a dividirse para dar la formación de meristemoides o si fue la división simultánea de numerosas células. De acuerdo a la clasificación de Raju (1975a) estos brotes corresponden a brotes adventicios endógenos, por originarse de tejidos internos de la periferia del tejido vascular. Su conexión vascular es más rápida por su cercanía con este tejido.

Después de establecido el inóculo en el medio, se observó inicialmente la formación de un callo cicatrizal (en algunos inóculos no se detectó) ocasionado por división de las células situadas al nivel del corte. Este fenómeno es muy importante, ya que la estimulación creada por estas divisiones parece inducir a la desdiferenciación, retornando a una etapa indiferenciada. González^{*} (comunicación personal) asegura que todo desarrollo vía organogénesis conlleva la formación de callo (aunque sea poco visible), como evento necesario en la desdiferenciación de las células para su posterior diferenciación en órganos específicos.

Las características que presentaron estas células durante el evento de desdiferenciación corresponde a lo mencionado por Auge

*Dr. Néctor González. Centro de Fruticultura. Colegio de Postgraduados.

(1986), tanto en la etapa histógena como organógena. A pesar de que no hubo una clara división en el término de una etapa y el comienzo de la otra, se observó claramente los cambios celulares que inician la activación. Estas células se distinguieron por una mayor tinción del citoplasma y aumento en el tamaño del núcleo.

El desarrollo de los brotes adventicios concuerda con lo reportado por Tran Thanh Van (1980), al dividir en tres etapas la aparición de estos brotes: 1) iniciación de puntos de división celular 2) formación de meristemoides o centros de regeneración de primordios de órganos y 3) desarrollo de brotes adventicios a partir de los primordios anteriores. Cabe mencionar que el desarrollo de estos eventos no fué al mismo tiempo para todos los inóculos, sino que algunos lo hicieron posteriormente. Así como también se detectó gran variabilidad en el número de brotes originados por explante.

3. Inducción de Mutaciones.

En la inducción de mutaciones con Etil-metano-sulfonato (EMS) se encontró un bajo porcentaje de brotación, siendo mayor en los tratamientos que se les dió más tiempo de inmersión en la solución mutagénica. Sin embargo, no hubo significancia estadística en ninguno de ellos, no pudiendo determinar si las concentraciones probadas de EMS fueron muy pequeñas para inducir la formación de brotes adventicios o si al contrario, fueron muy altas. Por tanto, es necesario probar más intervalos para obtener cambios significativos y así de-

tectar las mejores concentraciones. No obstante, se debe tener cuidado en el tiempo de aplicación del mutágeno, ya que existen varios reportes en los que a un tiempo y concentración elevada se producen daños fisiológicos considerables e incluso mutaciones letales en las plantas. Contrario a los fines de mejoramiento genético, en donde es necesario la selección de tratamientos que produzcan máximos porcentajes de mutaciones con menor mortalidad y daños fisiológicos posibles.

Las mutaciones provocadas sólo fue posible cuantificarlas en función de los cambios morfológicos observados. Se notaron cambios poco evidentes en la disminución del ancho, color y brillantez de las hojas en los tratamientos que contenían una mayor concentración de la solución mutagénica. Así como disminución en el número de brotes surgidos por explante y lento desarrollo de éstos. Estos cambios fueron provocados probablemente por el mutágeno. Sin embargo, para comprobar si se produjeron algunas mutaciones, es necesario hacer estudios cariotípicos que muestren los cambios ocasionados en el material genético.

Singh e Iyer (1974 citado por Broertjes y Van Harten, 1984) reportaron mutaciones importantes con la aplicación de varios agentes mutagénicos, como plantas sin espinas. Al igual que Wakasa (1979), quien obtuvo modificaciones en color de la hoja, presencia y ausencia de espinas y otras variantes útiles obtenidas por variación somaclonal. Por lo que es necesario seguir el desarrollo de las plántulas obtenidas, desde su establecimiento hasta su producción en

VI. CONCLUSIONES

1. Es posible desarrollar brotes adventicios a partir de hojas completas de plántulas de piña cultivadas *in vitro*.
2. La inducción de brotes adventicios no parece requerir altas concentraciones de sales minerales en su fase inicial, ya que se obtuvieron mejores resultados al aplicarlas al 50 %.
3. La aparición de brotes adventicios no presentó un patrón específico en la combinación de ambos reguladores de crecimiento (AIB y BA). Sin embargo, la dosis a la cual se registró mayor porcentaje de brotación corresponde a un ratio mayor de citocinina sobre auxina: 5.0 mg/l de BA y 2.5 mg/l de AIB. La ausencia de AIB inhibió completamente la formación de brotes.
4. La caseína hidrolizada no tuvo efectos significativos en su adición al medio de cultivo. Aunque parece tener gran interrelación con las Sales Minerales al 50 %, ya que favoreció el desarrollo de brotes.

5. Las hojas "con base" y de mayor tamaño (4.5 a 5.0 cm) fueron las más adecuadas para el desarrollo de los brotes. Esto parece estar relacionado con la madurez de sus tejidos, especialmente a nivel de la base

6. La iniciación de los brotes adventicios se dió por organogénesis directa. Inicialmente se detectó desdiferenciación celular a través de numerosas divisiones para diferenciarse posteriormente en órganos específicos.

7. A partir del desarrollo anatómico de los brotes se detectó que éstos surgen consistentemente de las células parenquimáticas adyacentes al haz vascular (12 días). Después de numerosas divisiones celulares dieron la formación de meristemoides (18 días), posterior desarrollo de primordios foliares (27 días) y emergencia de los brotes adventicios (33 días).

8. La aplicación de Etil-metano-sulfonato (EMS) redujo fuertemente el número de brotes por inóculo, así como su crecimiento. A pesar de no registrarse diferencias significativas, se observaron algunos cambios fenotípicos, siendo necesario seguir el establecimiento y desarrollo en campo de estas plántulas para determinar la efectividad de tales cambios.

VII. LITERATURA CITADA

- Abrego, A.J.L. 1988. Diferenciación de brotes adventicios *in vitro* a partir de plántulas de fresa (*Fragaria vesca*) cultivar "Fresno". Tesis de Lic. en Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hgo., Morelia Mich. 50 p
- Allard, R.W. 1978. Principios de la mejora Genética de las plantas. Omega. S.A. Barcelona, España. 498 p.
- Auge, R. 1986. Fenómenos fisiológicos vinculados a la realización de cultivos *in vitro*. In: Cultivo *in vitro*. Vidalie, H. (ed). Científica. México D.F. pp 9-42.
- Broertjes, C., B. Haccius y S. Weidlich. 1968. Adventitious bud formation isolated leaves and its significance for mutation breeding. *Euphytica* 17:321-344.
- Broertjes, C. 1972. Improvement of vegetatively propagated plants by ionizing radiation. In: Induced mutations and Plant Improvement. IAEA. Vienna pp. 293-299.
- Broertjes, C. y A. Keen. 1980. Adventitious shoot: Do they develop from one cell?. *Euphytica* 29:73-87.
- Broertjes, C. y A.M. Van Harten. 1984. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops an interpretive literature review. Elsevier Scientific Publishing Co. New York. 316 p
- Burgess, J. 1985. Hormones and cell differentiation In: An introduction to plant cell development. Cambridge University Press pp. 129-153.

- Caruso, J.L. 1974. *In vitro* bud formation in stem segments of *Ananas alluoolma*. New Phytol. 73:441-443.
- Cobley, L.S. 1977. An introduction to the Botany of Tropical Crops. Longman, London and New York pp 178-181.
- Collins, J.L. 1960. The pineapple: botany, cultivation and utilization. London. Leonard Hill. 294 p.
- Collins, J.L. y K.R. Kerns. 1938. Mutation in the pineapple. A study of thirty inherited abnormalities in the Cayenne variety. Journal of Heredity 29:162-172.
- Compton, E. y J.E. Preece. 1986. Exudation and Explant Establishment. In: Feature Article 2. Newsletter IAFTC. No. 50 pp. 9-18
- Conger, B.V. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC. Press. Inc. Boca Raton, Florida. 273 p
- Chagolla, N.J.G. 1986. Inducción de yemas adventicias en el tallo de 7 cultivares de manzano. Tesis de Maestría. Centro de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de Méx. 64 p.
- Chagolla, N.J.G. 1988. Inducción de brotes y raíces adventicios a partir de hojas de piña cultivadas *in vitro*. Resúmenes del XII Congreso de la SOMEFI. Chapingo, Edo. de Méx..
- Christianson, M.L. y D.A. Warnick. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot Organogenesis. Developmental Biology 95:288-293.
- Devreux, M. 1972. *In vitro* culture and Mutation Breeding. In: Induced mutation in vegetatively propagated plants. IAEA Vienna, Austria. pp 41-51.
- Drew, R.A. 1980. Pineapple tissue cultured unequalled for rapid multiplication. Queensland Agricultural Journal. Sep-Oct. pp. 447-451.
- Esau, K. 1976. Anatomía Vegetal. Omega. S.A. Barcelona, España. 684 p.

- Evans, D.A., W.R. Sharp y C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: Plant, Tissue Culture, Methods and its Applications in Agriculture, Thorpe, T.A. (ed) Academic Press. pp 45-114.
- Favret, E.A. 1977. El mejoramiento de las plantas por inducción de mutaciones en Latinoamérica. In: Induced mutations in Vegetatively Propagated plants. IAEA. Vienna, Austria. pp 49-59
- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe y I.K. Vasil. 1976. Plant Tissue culture media. *In vitro*. Vol. 2(7):473-478.
- García, R.G. 1984. Propagación de la piña americana (*Ananas comosus*) por cultivo de tejidos *in vitro*. XOPA Revista de Agricultura 4(2):20-32.
- Gutiérrez, E.M.A. 1988. Efecto de la Benciladenina, Ac. Indolbutírico, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de piña (*Ananas comosus* L. Merr.). Tesis de Maestría. Centro de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. 70 p.
- Harada, H. 1975. *In vitro* organ culture of *Stellaria chinensis* P1, as a technique for vegetative multiplication. J. Hort. Sci. 50, 81-83.
- Hartman, H.T. y D.E. Kester. 1988. Propagación de plantas. Principios y prácticas. CECOSA. México. 759 p.
- Henke, R.R., M.A. Mansur y M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling derived calli of rice (*Oryza sativa*). *Plant. Physiol.* 44:11-14.
- Hicks, G.S. 1987. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro* an anatomical study. *Can. J. Bot.* Vol. 65: 1913-1920.
- Kato, Y. 1974. Bud formation on excised *Stellaria chinensis* leaf fragments. *Plant Cell Physiol.* 15(21):363-372.
- Krauss, K. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* L. Merr. II. The leaf. *Bot. Gaz.* 110(3):333-405.
- Larkin, P.J. y W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a Novel Sour

ce of Variability from cell cultures for Plant Improvement
Theoretical and Applied Genetics Vol.60:197-214.

- Lat, J.B. y M.M.Latin. 1976. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. Philippine J.Crop Sci. Vol.1:117-123.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. IICA. San José Costa Rica, pp 83-87.
- Mathews, V.H. y T.S.Rangan. 1979. Multiple plantlets in lateral buds an leaf explants *in vitro* cultures of pineapple. Scientia Horticulturæ. 11:319-328.
- Mathews, V.H. y T.S.Rangan. 1981. Growth and regeneration of plantlets in callus culture of pineapple. Scientia Horticulturæ 14:227-234.
- Mehra, A. y P.N.Mehra. 1974. Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in almond. Botanical Gazette. 135(1):61-73.
- Meneses, P.M.A. 1981. Efecto del Etil-metano-sulfonato sobre crecimiento de coleóptilos y plántulas de cebada. Tesis de Lic. en Biología. UNAM. México. D.F.
- Mikkelsen, E.P. y K.C.Sink 1978. Histology of adventitious shoot and root formation of leaf petiole cuttings of *Begonia* x *Klimalis* Fotsh 'Afrodite peach'. Scientia Horticulturæ. 8:179-192.
- Murashige, T. y F.S.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 5:473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Physiol. 25:135-166.
- Murashige, T. 1977. Clonal crops through tissue culture. In: Plant, Tissue Culture and Its Bio-Technological Applications. Harz. W., E. Reinhard and M.H. Zenk. (eds) Springer Verlag. Berlin, Heidelberg and New York. pp 392-403.

- Foh, T.H. y C.B. Khoo. 1975. Tissue culture of pineapple. Proc. Nat. Plant Tissue Culture Symp. Kuala Lumpur, pp 51-58.
- Furseglove, J.W. 1972. Tropical crops. Monocotyledons. Longman Inc. New York, pp 75-91.
- Py, C. 1968. La piña tropical. Blume, Barcelona, España, 278 p.
- Raju, M.V.S. 1975a. Experimental studies on Leafy Spurge (*Euphorbia esula* L.) I. Ontogeny and Distribution of buds and shoots on the hypocotyl. Bot. Gaz. 136(3):254-261.
- Raju, M.V.S. 1975b. Experimental studies on Leafy Spurge (*Euphorbia esula* L.) II. Starch distribution and vasculature in relation to apical dominance. Bot. Gaz. 136(3):262-268.
- Ramírez, A.L. 1984. Reproducción de la piña (*Ananas comosus* L. Merr) mediante cultivo de tejidos. Cultivos Tropical, Vol. 6(3) 681-695.
- Rojas, G.M. y H. Ramírez. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Limusa, México, 240 p.
- Sigurbjornsson, B. 1970. Manual of Mutation Breeding .Cap. 1 Int. Atm mic. Energy Agency. Vienna, Austria. 237p.
- Skirvin, R.M. 1981. Fruits crops. In: Cloning Agricultural Plants via *in vitro* Techniques. Conger B.V. (ed) CRC Press Inc. Florida pp. 52-124.
- Skoog, F. y C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in Plant Tissue cultured *in vitro* Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-130.
- Thorpe, T.A. y T. Murashige. 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus. Can. J. Bot. 48:277-285.
- Thorpe, T.A. 1978. Regulation of organogenesis *in vitro* In: Propagation of higher plants through tissue culture a bridge between research and application. Univ. of Tennessee. Symp. Proc. April 16-19. pp 87-101.

- Tran Thanh Van, M. 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. Int.Rev. Cytol. Suppl. 11 A. pp 175-194 p.
- Van Harten, A.M., H. Bouter y C. Broertjes. 1981. *In vitro* adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.) II. Significance for Mutation Breeding. Euphytica 30:1-8.
- Vizcaino, C.P. y V. Pérez. 1976. La Piña. Determinación de las épocas de plantación. Boletín Informativo del Programa Nal. de la Piña. CONAFRUT. No. 7. CONAFRUT. México.
- Wakasa, K. 1979. Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. Japan. J. Breeding. 29(1):13-22.
- Yeoman, M.M. 1980. Plant Cell Culture Technology. Botanical Monographs. Vol. 23 Blackwell Scientific Publications. 375 p.
- Zepeda, C. y Y. Sagawa. 1981. *In vitro* propagation of pineapple. Hort-Science. 16(4):495.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA