

Universidad de Ciego de Avila
Centro de Bioplasmas

TESIS

Metodologías para la Obtención de Plantas Haploides
en Piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill].

Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias
Agrícolas.

Autor: *Ing. Reinerio Benega García.*

Tutor: *Dra. María Caridad González Cepero.*

Co-Tutor: *Dra. Miriam Fátima Isidró Pérez.*

Ciego de Avila

Síntesis

El presente trabajo se realizó en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Avila con el objetivo de establecer metodologías que permitan la obtención de plantas haploides en piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill]. Se emplearon cinco cultivares de piña (Española roja Pinareña, Piña blanca, Cayena lisa de Oriente, Cayena lisa de México y Cayena lisa Serrana) y tres métodos para la obtención de plantas haploides: cultivo *in vitro* de anteras y óvulos aislados y la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado.

Se lograron establecer por primera vez en el mundo tres metodologías de trabajo para la obtención de plantas haploides en piña, a través del cultivo *in vitro* de anteras y óvulos aislados, así como la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado. En el cultivo *in vitro* de anteras y óvulos aislados las metodologías incluyeron la preparación, desinfección y selección de las inflorescencias para el cultivo *in vitro* y los medios de cultivo para la formación de embriones, callos y regeneración de las plántulas. En el cultivo *in vitro* de anteras la extracción de los botones florales en la sección basal de las inflorescencias y la eliminación de sólo 1/3 de las brácteas subyacentes antes de realizar la desinfección con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ influyó en los bajos niveles de contaminación (0.05%). En el cultivo *in vitro* de óvulos aislados resultó favorable la utilización de una doble desinfección con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

El uso del Dicamba (4.0 y 6.0 mg.L^{-1}) favoreció la inducción de los callos y la formación de los embriones. Los mejores resultados en la maduración de los embriones y formación de las plántulas se logró con la adición al medio de cultivo MS de 1.0 y 1.5 mg.L^{-1} de Thidiazuron durante los primeros 15 días de cultivo y posterior transferencia de los callos embriogénicos a medios MS + BAP/ANA ($2.1:0.3 \text{ mg.L}^{-1}$). Los estudios histo-citológicos demostraron que los embriones y callos formados se originaron a partir de las microsporas y de las células haploides del saco embrionario y la regeneración de las plántulas se obtuvo a través de la embriogénesis haploide indirecta.

En la partenogénesis *in situ*, las radiaciones gamma de ^{60}Co afectaron la viabilidad del polen y el crecimiento *in vitro* del tubo polínico. Las fecundaciones realizadas en Cayena lisa Serrana demostraron que la formación y características de las semillas resultaron dependientes de las dosis de radiaciones suministradas al polen del cultivar Española roja Pinareña. Estas diferencias se relacionaron con las afectaciones en las divisiones de las células espermatocíticas provocadas por las radiaciones gamma.

Se logró obtener plantas haploides ($n=25$ cromosomas) en los tres métodos de haploidización y en cuatro de los cinco genotipos ensayados. En las técnicas de haploidización *in vitro*, el cultivo de anteras brindó los mejores resultados al responder a la formación de plantas haploides tres genotipos: Española roja Pinareña (13.5%), Cayena lisa de Oriente (12.0%) y Piña blanca (5.7%). En el cultivo *in vitro* de óvulos sólo el cultivar Española roja Pinareña (14.0%) respondió. En la partenogénesis *in situ* se logró obtener plantas haploides en el genotipo ensayado, Cayena lisa Serrana (8.0%). Las variables anatómicas de las hojas, densidad estomática y el número de cloroplastos resultaron las más relacionadas con los niveles de ploidía de las plantas.

| Indice | Págs. |
|--|--------------|
| 1.0 | 1 |
| Introducción..... | |
| 2.0 Revisión | 4 |
| Bibliográfica..... | |
| 2.1 Generalidades sobre el cultivo de la piña..... | 4 |
| 2.1.1 Posición sistemática, origen y distribución de <i>Ananas</i> | 4 |
| 2.1.2 Características botánicas y algunas consideraciones sobre la genética del cultivo..... | 5 |
| 2.2 Avances en la propagación y mejoramiento de la piña mediante los métodos biotecnológicos..... | 8 |
| ... | |
| 2.2.1 Perspectivas y tendencias del mejoramiento genético de la piña..... | 10 |
| 2.3 Haploides en las plantas cultivadas..... | 10 |
| | 10 |
| 2.3.2 Descubrimiento de la androgénesis. Morfogénesis <i>in vitro</i> del grano de polen..... | 10 |
| 2.4 Interés de las plantas haploides..... | 11 |
| 2.4.1 Uso de los haploides en el mejoramiento genético de las plantas cultivadas..... | 11 |
| | |
| 2.4.2 Otras utilidades de los haploides en las plantas cultivadas..... | 14 |
| 2.5 Métodos para la obtención de plantas haploides. Factores que la regulan..... | 15 |
| 2.5.1 Haploidización <i>in vitro</i> | 16 |
| 2.5.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de anteras o microsporas..... | 16 |
| 2.5.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de óvulos u ovarios..... | 18 |
| 2.5.2 Haploidización <i>in vivo</i> | 19 |
| 2.5.2.1 Partenogénesis <i>in situ</i> inducida mediante polinización con polen irradiado..... | 20 |
| | |
| 2.5.2.2 Otros métodos de haploidía..... | 22 |
| 3.0 Materiales y Métodos..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 3.0.1 Procedimientos generales..... | 24 |
| 3.1 Métodos de obtención de plantas haploides..... | 25 |
| 3.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de anteras..... | 26 |
| 3.1.1.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo <i>in vitro</i> | 26 |
| 3.1.1.2 Dinámica de desarrollo de las microsporas y su relación con diferentes caracteres morfológicos de las inflorescencias..... | 27 |
| 3.1.1.3 Efecto de los medios de cultivo en la formación de embriones y callos..... | 27 |
| 3.1.1.4 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas..... | 28 |
| 3.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de óvulos aislados..... | 29 |
| 3.1.2.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo <i>in vitro</i> | 29 |
| 3.1.2.2 Efecto de los medios de cultivo y los estadios de desarrollo del saco embrionario en el proceso morfogénico de formación de callos..... | 30 |
| 3.1.2.3 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas..... | 31 |
| 3.1.3 Partenogénesis <i>in situ</i> inducida mediante polinización con polen irradiado.... | 32 |
| 3.1.3.1 Efecto radiobiológico de las radiaciones gamma de ⁶⁰ Co en polen del cultivar Española roja Pinareña..... | 32 |
| 3.1.3.2 Efecto de las polinizaciones en Cayena lisa Serrana con polen irradiado de Española roja Pinareña..... | 33 |
| 3.2 Caracterización citogenética de las plantas regeneradas en los diferentes métodos de obtención de haploides..... | 34 |
| 3.2.1 Conteo cromosómico..... | 34 |
| 3.2.2 Caracterizaciones anatómicas en hojas de plantas regeneradas en los diferentes niveles de ploidía..... | 35 |
| 3.3 Métodos estadísticos empleados en el procesamiento de los resultados..... | 36 |
| 4.0 Resultados y Discusión..... | 38 |
| 4.1 Métodos de obtención de plantas haploides..... | 38 |
| 4.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de | 38 |

| | |
|---|----|
| anteras..... | |
| 4.1.1.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo <i>in vitro</i> | 38 |
| 4.1.1.2 Dinámica de desarrollo de las microsporas y su relación con diferentes caracteres morfológicos de las inflorescencias..... | 40 |
| 4.1.1.3 Efecto de los medios de cultivo en la formación de embriones y callos..... | 43 |
| 4.1.1.3.1 Origen de la morfogénesis..... | 43 |
| 4.1.1.3.2 Efecto del Dicamba y las concentraciones de sacarosa en la formación y crecimiento de callos..... | 45 |
| 4.1.1.4 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas..... | 48 |
| 4.1.1.4.1 Ontogénesis de los embriones..... | 48 |
| 4.1.1.4.2 Efecto de diferentes concentraciones de BAP/Dicamba en la formación de los embriones y regeneración de plántulas..... | 50 |
| 4.1.1.4.3 Efecto del Thidiazuron en la formación de los embriones y regeneración de plántulas..... | 51 |
| 4.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de óvulos aislados..... | 58 |
| 4.1.2.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo <i>in vitro</i> | 58 |
| 4.1.2.2 Efecto de los medios de cultivo y los estadios de desarrollo del saco embrionario en el proceso morfogénico de formación de callos..... | 59 |
| 4.1.2.2.1 Efecto del Dicamba en la formación de los callos..... | 60 |
| 4.1.2.2.2 Efecto del estadio de desarrollo del saco embrionario en la formación de los callos..... | 61 |
| 4.1.2.2.3 Efecto de tres fuentes de carbono en la formación de los callos..... | 63 |
| 4.1.2.3 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas..... | 66 |
| 4.1.3 Partenogénesis <i>in situ</i> inducida mediante polinización con polen irradiado..... | 70 |
| 4.1.3.1 Efecto radiobiológico de las radiaciones gamma de ⁶⁰ Co en polen del cultivar Española roja Pinareña..... | 70 |
| 4.1.3.2 Efecto de las polinizaciones en el cultivar Cayena lisa Serrana con polen | |

| | |
|--|-----|
| irradiado del cultivar Española roja | 72 |
| Pinareña..... | |
| 4.2 Caracterización citogenética de las plantas regeneradas en los diferentes métodos de haploidía..... | 77 |
| 4.2.1 Conteo cromosómico..... | 77 |
| 4.2.2 Caracterizaciones anatómicas en las hojas de plantas regeneradas en los diferentes niveles de ploidía..... | 81 |
| 4.3 Metodologías propuestas para la obtención de plantas haploides en piña [<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill] mediante el empleo de las técnicas de haploidización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 85 |
| 5.0 Conclusiones..... | 87 |
| 6.0 Recomendaciones..... | 89 |
| 7.0 Referencias..... | 90 |
| 8.0 Anexos..... | 109 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| 2,4-D | Acido 2,4 dicloro-phenoxi-acético. |
| ADN | Acido desoxirribonucleico. |
| AIA | Acido Indolacético. |
| ANA | Acido Naftalen-acético. |
| BAP | 6-Bencil-amino-purina. |
| CH | Caseína Hidrolizada. |
| Dicamba | 3,6 Dicloro-metoxi-benzoico. |
| FAA | Formol-Alcohol-Acido acético. |
| Flordimex | Acido 2-cloro-etilfosfónico |
| Flordimex | Acido-2-cloro-etil-fosfónico. |
| GA ₃ | Acido-3-Giberélico. |
| MCPA | Acido 4-cloro-2-metil-phenoxi-acético |
| RFLPs | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism.</i> |
| rpm | Revoluciones por minutos. |
| TDZ | Thidiazuron [1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-harnstoff]. |

A Juana, Rayner y Nalvis; mi madre, mi hijo y mi esposa.

1.0 Introducción

La piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] es el tercer frutal tropical más importante y se cultiva en todos los países tropicales y subtropicales (Loeillet, 1997). La producción mundial de piña ascendió en 1998 a 12 493 740 ton. (FAO, 1998). Sin embargo, alrededor del 70% de la producción mundial que se comercializa como fruta fresca así como el 90% de la piña que se emplea para la industria pertenecen al cultivar Cayena lisa (Leal y Coppens, 1996), debido a los altos rendimientos, calidad de la fruta y la poca espinosidad que facilita el manejo del cultivo. Ello se convierte en un verdadero riesgo para la piñicultura mundial (Leal y Antoni, 1978).

En Cuba, a pesar de haberse iniciado los trabajos de introducción y selección de genotipos de Cayena lisa desde 1968 (Ramírez, 1989), en la actualidad es el cultivar Española roja el que ocupa más del 85% del total de las áreas cultivadas, debido a su rusticidad y adaptación a las condiciones de cultivo.

Los trabajos de mejoramiento genético en el cultivo de la piña se realizan mediante las técnicas de selección e hibridación (Williams y Fleish, 1993). Sin embargo, la mejora por hibridación requiere de mucho tiempo para la obtención de los genotipos mejorados (15 años) con una gran inversión de recursos materiales y humanos ya que es necesario producir más de 30 000 híbridos en cada cruce para encontrar las mejores combinaciones (Cabot, 1987; Coppens y Duval, 1995). Esto ha implicado un pobre desarrollo en la genética y mejoramiento de esta especie.

Durante las últimas décadas, los progresos obtenidos en la inducción *in vitro* de haploides y su utilización en la genética de las células y en los programas de mejoramiento de los cultivos como arroz, trigo, cebada y tabaco han demostrado la eficiencia de estos métodos y despertado el interés entre los mejoradores de plantas (Bajaj, 1983; Ferrie et al., 1995). El área de obtención de haploides tiene un enorme potencial no sólo por acortar considerablemente los programas de

mejoramiento genético y la obtención de variedades con altos rendimientos y resistencia a enfermedades, sales, drogas e insectos sino también para el desarrollo de estudios genéticos, bioquímicos, la identificación de marcadores para la selección y los trabajos de transformación de plantas (Chu, 1982; Bajaj, 1983; Luckett y Darvey, 1992; Kott, 1996; Yves, 1998).

La obtención de haploides a través del cultivo de anteras y óvulos, así como la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado, es una realidad en diferentes especies (Chu, 1982; Suenaga y Nakajima, 1989; Zhang y Lespinasse, 1992). Sin embargo, en el cultivo de la piña no se han ensayado ninguna de estas técnicas.

Para el cultivo de la piña, especie que se propaga vegetativamente y con un alto grado de heterocigosis, la producción de plantas haploides representaría un paso significativo para desarrollar nuevas estrategias de mejoramiento genético que permitirían acortar considerablemente el ciclo de mejora. Ello podría ser posible debido a que la frecuencia de aparición de gametos superiores es de 1/100 con el empleo de los progenitores homocigóticos (Gupta, 1997) y de 1/10 000 con el uso de progenitores heterocigóticos (Cabot, 1987).

Teniendo en cuenta las ventajas que ofrecen las plantas haploides para los estudios genéticos, biotecnológicos y para los programas de mejoramiento se propone como hipótesis de trabajo la siguiente: *Es posible obtener plantas haploides en piña con el empleo de las técnicas de haploidización "in vitro" e "in vivo"*; a partir de la cual se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer metodologías para la obtención de plantas haploides en genotipos de piña a partir del cultivo *in vitro* de anteras, óvulos aislados, así como la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado.
2. Monitorear el proceso morfogenético en el cultivo *in vitro* de anteras y óvulos aislados mediante el empleo de las técnicas histológicas.

3. Caracterizar los principales eventos citológicos y anatómicos de los individuos regenerados en los diferentes métodos de obtención de haploides.

A continuación se relaciona la novedad teórica y científica, así como el valor práctico del trabajo de tesis:

◇ **Novedad Teórica.** Las plantas haploides en piña abren nuevas posibilidades para el estudio de la herencia de caracteres. La duplicación cromosómica inducida o espontánea permitirá el cruzamiento de homocigóticos y la obtención de segregaciones para definir su herencia biológica, lo cual contribuiría a su identificación mediante los marcadores moleculares y el establecimiento de mapas genéticos en esta especie altamente heterocigótica. Existirían además posibilidades para encontrar híbridos con efectos de heterocis a partir del cruzamiento entre líneas isogénicas.

◇ **Novedad Científica.** Se obtuvieron por primera vez en el mundo plantas haploides en piña mediante las técnicas de haploidización *in vitro* e *in vivo*.

◇ **Valor Práctico.** Se describen tres metodologías para la obtención de plantas haploides en diferentes genotipos de piña a partir del cultivo *in vitro* de anteras, óvulos aislados y la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado. Se definen además rangos de valores anatómicos de las hojas que permiten relacionar las plantas regeneradas en los métodos de haploidización con los niveles de ploidía de las mismas.

3.0 Materiales y Métodos

3.0.1 Procedimientos generales.

Para el desarrollo del trabajo investigativo se emplearon los cultivares de piña Española roja Pinareña, Piña blanca, Cayena lisa de Oriente, Cayena lisa de

México y Cayena lisa Serrana procedentes del Banco de Germoplasma activo del Centro de Bioplasmas, los cuales se plantaron sobre un suelo Ferralítico rojo (Hernández, 1995) en la Unidad de Ciencia y Técnica *Juan Tomás Roig* de la Universidad de Ciego de Avila. Las atenciones culturales se siguieron de acuerdo a las recomendaciones del Instructivo Técnico del cultivo (MINAG, 1989). A los 12 meses de plantados se indujo en Noviembre artificialmente la floración en forma escalonada con una mezcla de Flordimex (0.1031 mL.L^{-1}), carbonato de sodio (0.4 g.L^{-1}) y urea (20 g.L^{-1}). Las inflorescencias se colectaron entre las 7 y 8 de la mañana y se trasladaron en bolsas plásticas para evitar la desecación de los tejidos. Para evaluar el estadio de desarrollo de las microsporas se siguió por el método de *squash* (Piccirilli y Arcioni, 1991). La observación de los diferentes estadios de desarrollo de las microsporas se realizó con el microscopio óptico marca Opton con aumento de 40x.

El medio de cultivo basal que se empleó fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS), el cual se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.2 kg.cm^{-2} de presión durante 15 minutos. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 previo a la esterilización. Se emplearon 10 mL de medio/placa Petri y todas las operaciones de inoculación y transferencia se realizaron en cabinas de flujo laminar.

La formación y crecimiento de los callos, así como la germinación de los embriones inmaduros, se realizaron en condiciones de oscuridad y a 28°C de temperatura. Para la regeneración de las plántulas, los cultivos se incubaron a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16 h con un flujo de fotones fotosintéticos de 15 a $18.75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ suministrado por lámparas fluorescentes del tipo *cool white*.

Se realizaron cortes histológicos a los tejidos obtenidos a partir del cultivo de anteras y óvulos aislados de los diferentes cultivares estudiados. Se realizó el monitoreo de la morfogénesis durante los procesos de formación de callos,

embriones y regeneración de las plántulas. Se utilizó la técnica histológica de inclusión en parafina como describe Johansen (1940).

Se usó la técnica de tinción doble de safranina y *fast green* para buscar contraste entre el tejido del explante y el callo que se forma a partir del mismo. Otra técnica que se usó fue la de hematoxilina y eosina para diferenciar las células meristemáticas de las demás células. Para el estudio histo-citológico de las muestras, los cortes teñidos se montaron en bálsamo de Canadá y se realizaron las observaciones en el microscopio óptico Opton (60x).

Las plántulas regeneradas en los diferentes métodos ensayados se separaron individualmente y se transfirieron a un medio sólido MS + ANA (1.0 mg.L^{-1}) + gelrite (1.65 g.L^{-1}) (Daquinta, 1998). A partir de los 45 días de cultivo las plántulas se adaptaron a condiciones *ex vitro* en las casas de vegetación durante seis meses. Para la aclimatación de las plántulas a condiciones *ex vitro* se emplearon bandejas plásticas con 40 pocillos de 100 cm^3 de capacidad y un sustrato compuesto por una mezcla de suelo Ferralítico rojo y cachaza (2:1, en volumen), el cual se esterilizó con formol al 2%. Las plántulas crecieron en condiciones de iluminación reducida al 70% mediante una malla plástica o saram y el riego se realizó por infiltración.

3.1 Métodos de obtención de plantas haploides.

Para la obtención de plantas haploides en piña se desarrollaron dos métodos *in vitro*, el cultivo de anteras y óvulos aislados, así como un método *in vivo*, la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado (Figura

1). Se realizaron caracterizaciones histo-citológicas de la morfogénesis en el cultivo de anteras y óvulos aislados. Además, las plantas regeneradas en los diferentes métodos haploides se caracterizaron mediante las técnicas citogenéticas para conocer los niveles de ploidía de las mismas. A continuación se detallan los experimentos realizados.

3.1.1 Cultivo *in vitro* de anteras.

3.1.1.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo *in vitro*.

Para establecer el método de desinfección en el cultivo *in vitro* de las anteras se procedió a utilizar inflorescencias en estado inmaduro (48 días de inducida la floración) del cultivar Española roja Pinareña. Se siguieron dos procedimientos para la desinfección:

1. La inflorescencia se sumergió primero en una solución de etanol (70%) durante cinco segundos y luego 10 minutos en una solución de hipoclorito de calcio (1%). Se realizaron dos o tres enjuagues con agua destilada estéril.
2. El pedúnculo se separó por la base de la inflorescencia, se eliminó la corona y 1/3 de las brácteas. La inflorescencia se sumergió durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de calcio (1%) seguido de dos o tres enjuagues con agua destilada estéril.

Para la extracción y cultivo *in vitro* de las anteras cada botón floral se separó individualmente desde la base de la inflorescencia: sección basal, sección media y sección apical. Se separaron las brácteas subyacentes, sépalos, pétalos y las anteras se extrajeron asépticamente y se ubicaron en placas Petri (60x15 mm) que contenían medio MS solidificado con gelrite (1.65 g.L⁻¹). Se cultivaron 50 anteras por cada placa Petri y 400 anteras en cada tratamiento. A los 15 días se

determinó el número de anteras contaminadas en cada una de las secciones de las inflorescencias.

3.1.1.2 Dinámica de desarrollo de las microsporas y su relación con diferentes caracteres morfológicos de las inflorescencias.

Para estudiar la relación entre el estadio de desarrollo de las microsporas y diferentes caracteres morfológicos se utilizaron inflorescencias del cultivar Española roja Pinareña, las que se colectaron a partir de los 43 días y hasta los 61 días de inducida la floración. Se extrajeron cuatro botones florales desde la sección basal, centro y apical de la inflorescencia respectivamente. Se determinó la longitud de los botones florales (mm) y de las anteras (mm) así como los estadio de desarrollo de las microsporas en tétradas, uninucleados y uninucleados tardíos (incluyeron la primera metafase y anafase haploide, poco antes de la formación del núcleo vegetativo y generativo).

Cada día se emplearon dos inflorescencias y cuatro botones florales de cada una de las tres secciones analizadas. Se relacionaron los diferentes estadios de desarrollo de las microsporas con las dos variables morfológicas analizadas.

3.1.1.3 Efecto de los medios de cultivo en la formación de embriones y callos.

Con el objetivo de establecer los medios de cultivo en el proceso morfogénico de formación de callos y embriones se utilizaron las anteras provenientes de inflorescencias de los cultivares Española roja Pinareña, Piña blanca, Cayena lisa de Oriente, Cayena lisa de México y Cayena lisa Serrana colectadas a los 48 días de inducida la floración. Se seleccionaron las anteras incluidas en los botones florales con una relación de longitud de 8.4:3.8 mm.

Para determinar el medio de cultivo de mejor respuesta en el proceso de morfogénesis se realizaron dos experimentos:

1. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa.

- ◇ Medio MS + Dicamba/BAP (2.0:0.4 mg.L⁻¹)(Benega et al., 1996) + sacarosa (0, 3, 6, 9 y 12%).

1. Efecto de diferentes concentraciones de Dicamba.

Con el objetivo de incrementar la eficiencia del proceso de morfogénesis se ensayaron las siguientes concentraciones de Dicamba en el medio de cultivo:

- ◇ Medio MS + Dicamba (0, 2, 4, 6 y 8 mg.L⁻¹) + BAP (0.4 mg.L⁻¹) + sacarosa (9%).

A las nueve semanas de cultivo se evaluó el número de anteras que formaron callos, se contabilizaron y se transfirieron a un medio de crecimiento MS + Dicamba/BAP (2.0:0.5 mg.L⁻¹) + arginina (5 mg.L⁻¹) (Espinosa, 1997).

3.1.1.4 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas.

Para lograr la formación de embriones y la regeneración de las plántulas a partir de los callos se realizaron dos experimentos:

1. Efecto de diferentes concentraciones de BAP/Dicamba.

- ◇ Medio MS + BAP/Dicamba (0.0:0.0; 2.0:0.0; 4.0:0.0; 2.0:0.3 y 4.0:0.3 mg.L⁻¹).

2. Efecto de diferentes concentraciones de Thidiazuron (TDZ).

Se emplearon dos variantes en medio MS con diferentes concentraciones de TDZ (0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 y 3.0 mg.L⁻¹):

- a. Cultivo continuado durante 45 días.
- b. Cultivo durante 15 días y posterior transferencia a medio MS + BAP/ANA (2.1:0.3 mg.L⁻¹)(Daquinta, 1998) durante 30 días.

En cada caso el medio MS se solidificó con gelrite (1.65 g.L⁻¹). Se utilizaron 20 callos [63.4 a 65.4 mg de masa fresca (MF)]/tratamientos, los cuales provenían de dos subcultivos realizados en los medios de crecimiento. A los 15 días de transferidos los callos a los medios de regeneración se evaluaron el número de embriones/mg de callos y el número de plántulas regeneradas/mg de MF de los callos. Los embriones se tomaron en estado globular.

3.1.2 Cultivo *in vitro* de óvulos aislados.

3.1.2.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo *in vitro*.

Para establecer el método de desinfección para el cultivo *in vitro* de óvulos aislados, las inflorescencias del cultivar Española roja Pinareña se colectaron a los 48 días de inducida artificialmente floración, momento donde se observó en la sección basal de las inflorescencias los mayores porcentajes de microsporas en estadio de desarrollo uninucleado. Para la desinfección de las inflorescencias se evaluaron tres procedimientos:

1. Se eliminó la corteza de la inflorescencia hasta cerca de la base del cáliz y se realizaron dos o tres cepillados con agua jabonosa y enjuagues en agua corriente. El tejido sincarpo se sumergió primero en una solución de hipoclorito de calcio (2%) durante diez minutos y después cinco minutos en una solución de hipoclorito de calcio (0.5%).
2. La corteza de la inflorescencia se eliminó hasta cerca de la base del cáliz y se sumergió primero en una solución de hipoclorito de calcio (2%) durante 20 minutos y luego cinco minutos en una solución de hipoclorito de calcio (0.5%).

3. Alrededor de 1/3 de las brácteas se eliminaron y se le realizó una doble desinfección al tejido sincarpo con el uso de una solución de hipoclorito de calcio, primero al 2% durante 20 minutos y luego al 0.5% durante cinco minutos. Entre ambas desinfecciones la corteza de la inflorescencia se eliminó hasta cerca de la base del cáliz.

Para la extracción y cultivo *in vitro* de los óvulos aislados, luego de dos o tres enjuagues del tejido sincarpo en agua destilada estéril, cada ovario de la sección basal del tejido sincarpo de los cultivares en estudio se separó del tejido sincarpo y se ubicaron dentro de las placas Petri (120x20 mm) con unas gotas de agua destilada estéril para evitar la desecación de los tejidos. Se eliminó la pared del ovario y los óvulos aislados se cultivaron en el medio MS, solidificado con gelrite (1.65 g.L⁻¹). Se cultivaron 100 óvulos aislados/placa Petri (60x15 mm) y se realizaron observaciones para determinar el número de óvulos contaminados y los que murieron.

3.1.2.2 Efecto de los medios de cultivo y los estadios de desarrollo del saco embrionario en el proceso morfogénético de formación de callos.

Para determinar el efecto de los medios de cultivo y los estadios de desarrollo del saco embrionario en el proceso morfogénético de formación de callos en el cultivo *in vitro* de los óvulos aislados se realizaron tres experimentos:

1. Efecto de diferentes concentraciones de Dicamba.

◇ Medio MS modificado (50% de sales) + Dicamba (0, 2, 4, 6 y 8 mg.L⁻¹) + BAP (0.4 mg.L⁻¹).

2. Efecto del estadio de desarrollo del saco embrionario.

El estadio de desarrollo de las microsporas se empleó como prueba indirecta para determinar la edad del saco embrionario. Los estadios de desarrollo

analizados en las microsporas incluyeron: 1. microsporas en estadio uninucleado hasta principio de la primera mitosis haploide; 2. microsporas desde la primera mitosis haploide hasta el grano de polen binucleado; 3. desde los granos de polen binucleado hasta los granos de polen maduros, cinco días antes de la antesis.

Los óvulos aislados de los cultivares en estudio se cultivaron en:

- ◇ Medio MS modificado (50% de sales) + Dicamba/BAP ($4.0:0.4 \text{ mg.L}^{-1}$).

3. Efecto de tres fuentes de carbono.

- ◇ Medio MS modificado (50% de sales) + Dicamba/BAP ($4.0:0.4 \text{ mg.L}^{-1}$) + tres fuentes de carbono (0.0876 M): sacarosa, glucosa y maltosa.

Cada ovario se extrajo del tejido sincarpo en el estado de desarrollo uninucleado de las microsporas, en el caso donde se analizó el efecto de diferentes concentraciones de Dicamba y las tres fuentes de carbono en el proceso morfogénico de formación de callos.

Se sembraron 100 óvulos aislados/placa Petri (60x15 mm) y 400 óvulos aislados/tratamiento. En cada caso el medio de cultivo se solidificó con agar-agar (5.4 g.L^{-1}). A los 45 días de cultivo se analizó el número de óvulos aislados que formaron callos/tratamiento.

Para lograr el crecimiento de los callos obtenidos del cultivo *in vitro* de los óvulos aislados, éstos se transfirieron dos veces cada 15 días a medio MS + Dicamba/BAP ($2.0:0.5 \text{ mg.L}^{-1}$) + arginina (5 mg.L^{-1}) + gelrite (1.65 g.L^{-1})(Espinosa, 1997).

3.1.2.3 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas.

Para determinar los medios de cultivo más favorables en la formación de embriones y regeneración de las plántulas se utilizaron 20 callos (63.4 a 65.4 mg de MF)/tratamiento, los cuales provenían de dos subcultivos realizados en los medios de crecimiento. Se realizaron dos experimentos:

1. Efecto de diferentes concentraciones de BAP/Dicamba.

◇ Medio MS + BAP/Dicamba (0.0:0.0; 2.0:0.0; 4.0:0.3; 2.0:0.3 y 4.0:0.3 mg.L⁻¹)

2. Efecto de diferentes concentraciones de TDZ.

Se emplearon dos variantes en medio MS con diferentes concentraciones de TDZ (0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 y 3.0 mg.L⁻¹):

- a. Cultivo continuado durante 45 días.
- b. Cultivo durante 15 días y posterior transferencia a medio MS + BAP/ANA (2.1:0.3 mg.L⁻¹)(Daquinta, 1998) durante 30 días.

En cada caso el medio de cultivo se solidificó con gelrite (1.65 mg.L⁻¹). A los 15 días de transferidos los callos a los medios de regeneración se analizó el número de embriones formados/mg de callos y a los 45 días de cultivo el número de plántulas regeneradas/mg de callos. Los embriones se tomaron en estado globular.

3.1.3 Partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado.

3.1.3.1 Efecto radiobiológico de las radiaciones gamma de ^{60}Co en polen del cultivar Española roja Pinareña.

Con el objetivo de conocer el comportamiento del crecimiento *in vitro* del grano de polen se procedió a realizar el estudio del efecto radiobiológico de las radiaciones gamma de ^{60}Co en el polen, para lo cual se colectaron flores recién abiertas durante cuatro días consecutivos. Se dispusieron doce estambres sobre un portaobjeto y se colocaron dentro de una placa Petri (120x20 mm), la cual contenía un algodón humedecido y se selló con Parafilm[®]. Las muestras se irradiaron en un Gamma-Cell, en el Laboratorio de Técnicas de Irradiación (LTI) del CENSA (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria) con rayos gamma de ^{60}Co (potencia de dosis, $0.16 \text{ kGy} \cdot \text{min}^{-1}$). Las dosis suministradas a los granos de polen fueron 0; 1; 2; 3; 4; 5 y 6 kGy). Para la dosis de 0 kGy las muestras se transportaron para y desde la fuente de irradiación.

Los granos de polen recién irradiados se prepararon y se establecieron en un medio de cultivo estéril (Wee y Rao, 1979). A las seis horas de cultivo se analizaron los porcentajes de granos de polen viables y la longitud del tubo polínico en cada una de las dosis de radiaciones. Se consideraron granos de polen viables, aquellos cuya longitud del tubo polínico había sobrepasado la longitud del diámetro de éstos. En cada una de las dosis de radiación se observaron 400 granos de polen.

3.1.3.2 Efecto de las polinizaciones en Cayena lisa Serrana con polen irradiado de Española roja Pinareña.

Para conocer el efecto de las polinizaciones con polen irradiado, cada día y en horas de la tarde las flores del cultivar Cayena lisa Serrana se emascularon y se cubrieron un día antes de la antesis. El polen del cultivar Española roja Pinareña se colectó y se irradió con rayos gamma de ^{60}Co (potencia de dosis, $0.16 \text{ kGy} \cdot \text{min}^{-1}$). Se realizaron dos experimentos:

1. Irradiaciones de polen a dosis de 0.00; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00; 1.25; 1.50; 1.75 y 2.00 kGy.
2. Irradiaciones de polen a dosis de 0.0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9 y 1.0 kGy.

Para suministrar los rangos de dosis de 0.0 a 2.00 kGy se valoró como criterio de radiosensibilidad la viabilidad y crecimiento *in vitro* del tubo polínico y en el caso del rango de dosis comprendidas entre 0.0 y 1.0 kGy se siguió como criterio de radiosensibilidad la formación de embriones y regeneración de las plántulas del primer experimento.

El polen irradiado del cultivar Española roja Pinareña se empleó para fecundar cada día cuatro flores recién abiertas del cultivar Cayena lisa Serrana. Los granos de polen recién irradiados se prepararon y se establecieron en un medio de cultivo estéril según se describe en el enunciado 3.1.3.1. A las seis horas de cultivo se analizaron la viabilidad *in vitro* y las divisiones mitóticas del polen.

Para los procedimientos de tinción, los granos de polen germinados se colocaron en una solución de azul de toluidina (0.05%) y las preparaciones se incubaron durante 12 h a 5°C. Se analizaron 20 tubos polínicos en cada dosis de radiación para conocer las divisiones mitóticas haploides de los mismos. Se siguió el procedimiento descrito por Arias et al., (1997).

Entre los 45 y 50 días las semillas inmaduras formadas a partir de los frutos fecundados del cultivar Cayena lisa Serrana se colectaron y se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio (1%) durante diez minutos, seguido de dos o tres enjuagues con agua destilada estéril. Para lograr la germinación de los embriones inmaduros cada semilla se cortó individualmente y éstos se extrajeron asépticamente y se colocaron en placas Petri (60x15 mm) que contenían un medio de cultivo estéril [MS (sales 50%) + BAP/ANA/GA₃ (1.0:0.3:0.5 mg.L⁻¹) + sacarosa (2%) + CH (300 mg.L⁻¹) + gelrite (1.65 g.L⁻¹)].

Las semillas inmaduras se clasificaron en semillas completas (SC), semillas sólo con embriones (SCE) y semillas vacías (SV). A los 15 días de cultivo se evaluaron el número de embriones germinados y el número de plántulas desarrolladas en cada dosis de radiación. El análisis de las características de las semillas en las diferentes dosis de radiaciones se realizó con respecto a la dosis de 0 kGy (Anexo 1).

Luego de dos semanas de cultivo se contabilizó el número de embriones germinados y se transfirieron a un medio de regeneración, con igual composición que el medio de germinación de embriones, durante 30 días.

3.2 Caracterización citogenética de las plantas regeneradas en los diferentes métodos de obtención de haploides.

3.2.1 Conteo cromosómico.

Para realizar el estudio del cariotipo se utilizaron 800 plantas del cultivar Española roja Pinareña, 35 plantas del cultivar Piña blanca y 100 plantas del cultivar Cayena lisa de Oriente, las cuales habían sido regeneradas en el cultivo de anteras. Se emplearon además 800 plantas del cultivar Española roja Pinareña regeneradas a partir del cultivo de óvulos aislado y 25 plantas del cultivar Cayena lisa Serrana obtenidas en la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado. Todas las cuales fueron aclimatadas durante seis meses en las casas de vegetación y se cortaron entre las 7 y 8 de la mañana los ápices de las nuevas raíces (2 mm) de las plantas.

Las muestras se pre-trataron y fijaron en soluciones de ∞ Bromo-naftaleno y FAA (3:1, en volumen). Luego de la hidrólisis y la tinción de las raíces con el reactivo de Schiff, se procedió al aplastado de las raíces por el método de *squash*. Se efectuó la tinción con aceto-orceína (4%). Para la observación microscópica se

empleó el microscopio óptico Opton con aumentos de 1000x, 1250x y 1600x (Anexo 2). Se analizaron cinco metafases en tres raíces por cada muestra.

3.2.2 Caracterizaciones anatómicas en las hojas de las plantas regeneradas en los diferentes niveles de ploidía.

Con el objetivo de relacionar los caracteres anatómicos de las hojas y los diferentes niveles de ploidía, se realizaron cortes del tejido del mesófilo de la epidermis inferior de las hojas *D* en las plantas con seis meses de aclimatación, regeneradas de los diferentes métodos de obtención de haploides. La preparación se montó en un portaobjeto con una gota de Lugol (1%). Las observaciones se realizaron en el microscopio de campo claro.

Se realizó el conteo de diez estomas por muestra y se analizaron diez muestras por cada una de las 20 plantas seleccionadas en cada nivel de ploidía. Se utilizó un aumento de 400x. Se determinaron la densidad estomática (mm^{-2}), el largo y ancho de los estomas (mm) y el número de cloroplastos por célula estomática. Se determinó la densidad de los estomas (número de estomas. mm^{-2}) mediante la relación: Número de estomas contados en el campo/área observada (A) con 40x, donde $A=\pi.r^2=0.159 \text{ mm}^2$. Los valores de largo y ancho de los estomas se multiplicaron por el factor 2.5 para 40x.

3.3 Métodos estadísticos empleados en el procesamiento de los resultados.

Para la realización de los experimentos se aplicaron diseños completamente aleatorizados. Se plantearon las hipótesis de los análisis de varianza y se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza.

Para determinar las variables [contaminación (%) en anteras y óvulos, viabilidad *in vitro* del polen (%), crecimiento *in vitro* del tubo polínico, semillas formadas, contenido de las semillas formadas(% , datos no transformados), plántulas regeneradas, división de las células espermáticas (%) y características

anatómicas de las hojas], evaluadas en los en los experimentos 3.1.1.1; 3.1.2.1; 3.1.3.1; 3.1.3.2 y 3.2.2, se realizaron análisis de varianza simple, donde se consideró como factores el método de desinfección y las dosis de radiaciones (kGy). En las variables que lo requirieron se realizaron análisis de regresiones. En el análisis de la variable división de las células espermáticas para lograr el mejor ajuste, la ecuación $y = A + B/x + C/x^2$ se transformó como $y = A + B/(x+10^{-4}) + C/(x^2 + 10^{-4})$.

Para relacionar las variables días de inducida la floración, longitud del botón floral y de las anteras vs estadíos de desarrollo de las microsporas del experimento 3.1.1.2 se realizaron análisis de regresión.

Para determinar las variables [formación de callos (%), formación de embriones/mg de MF de callos y formación de plántulas/embriones), evaluadas en los experimentos 3.1.1.3; 3.1.1.4; 3.1.2.3 y 3.1.2.2 se realizaron análisis de varianza bifactorial, donde se consideró como factores los medios de cultivo y los genotipos de piña. En el experimento 3.1.2.2 los factores analizados fueron genotipos de piña y estadíos de desarrollo de las microsporas.

Para determinar la variable (porcentajes de plantas en los diferentes niveles de ploidía, datos no transformados), evaluada en el experimento 3.2.1 se realizó un análisis de proporciones. En el caso que se encontró diferencias entre las proporciones se realizó la prueba de Z^2 .

En los experimentos 3.1.1.1; 3.1.1.3; 3.1.1.4; 3.1.2.1; 3.1.2.2; 3.1.2.3; 3.1.3.1 y 3.1.3.2, las comparaciones de las medias se realizaron según la prueba de los rangos múltiples de Duncan para $p < 0.05$ mediante el paquete *SPSS*. Todas las curvas expresadas en este trabajo se ajustaron mediante la aplicación del programa *CURVEFIT* (Thomas, 1987). El programa brinda 25 sistemas de ecuaciones, de las cuales se escogieron en cada caso las de mayor ajuste y correspondencia con el proceso biológico evaluado.

4.0 Resultados y Discusión

4.1 Métodos de obtención de plantas haploides.

4.1.1 Cultivo *in vitro* de anteras.

4.1.1.1 Establecimiento del método de desinfección de las inflorescencias para el cultivo *in vitro*.

Como primer paso para desarrollar la metodología del cultivo *in vitro* de anteras en piña se procedió a comparar la eficiencia de dos métodos de desinfección de las inflorescencias (Figura 2). Al analizar el procedimiento que brindó mejores resultados en la desinfección de tres secciones de las inflorescencias (basal, media y apical), se demostró que en ambos métodos los porcentajes de contaminación aumentaron significativamente a medida que las muestras se tomaron desde la sección basal de las inflorescencias hasta la sección apical de las mismas. El segundo método de desinfección mostró en general los menores valores de contaminación de las anteras, y sólo se observó el 0.05% de contaminación en la sección basal de las inflorescencias.

Los bajos niveles de contaminación en la sección basal de las inflorescencias se debieron a que las partes inferiores de las inflorescencias luego de emerger del tallo de las plantas de piña, permanecieron menos tiempo expuestas a los diferentes agentes contaminantes del ambiente. Por otra parte, la sección basal de las inflorescencias al emerger de la terminación del pedúnculo permanece más protegida por las hojas de las plantas del polvo u otros agentes contaminantes.

La desinfección de las inflorescencias con una solución de hipoclorito de calcio (1%) durante 10 minutos resultó más favorable que cuando se utilizó una doble desinfección: primero con etanol (70%) durante cinco segundos y luego 10 minutos en hipoclorito de calcio (1%). Sin embargo, no sólo el método de

desinfección utilizado en la siembra *in vitro* de las anteras favoreció los bajos niveles de desinfección sino también el procedimiento de preparación de las inflorescencias que se empleó (Figura 3).

Aunque las muestras se colectaron en las mismas condiciones para desarrollar los dos métodos de desinfección de las inflorescencias, la eliminación de alrededor de 1/3 de las brácteas subyacentes, así como la corona y los restos del pedúnculo resultaron más favorables para la asepsia del cultivo *in vitro* que cuando no se realizó (primer método). Ello permitió que la solución desinfectante llegara además con mayor facilidad a las diferentes partes de las inflorescencias que se encontraban expuestas a los agentes contaminantes.

Las metodologías de desinfección de las inflorescencias significan uno de los pasos más importantes en el inicio del estudio de la respuesta de los diferentes genotipos al cultivo de anteras. Todas las especies de plantas que responden a los cultivos haploides cuentan con un método eficiente de desinfección y extracción de las anteras (Chu, 1982; Bajaj, 1983; Ferrie y Keller, 1995).

El hipoclorito de calcio ha sido seleccionado para la desinfección de inflorescencias de diferentes especies por su alta efectividad en el control de los agentes contaminantes. Kieffer et al., (1993) emplearon el hipoclorito de calcio al 3% durante 15 minutos para lograr controlar la contaminación en *Brassica oleracea* L. convar. *acephala* (DC.). Por su parte, Coumans y Zhong (1995) en el cultivo de microsporas de *Heliantus annuus* recomiendan la utilización del hipoclorito de calcio al 4% + unas gotas de Tween 80 durante 10 minutos. Sin embargo, en especies como *Triticum aestivum*, *Solanum phureja* y *Brassica napus*, los mejores resultados en la desinfección de las anteras se obtuvieron con la utilización del hipoclorito de sodio o el etanol (Rybczynski et al., 199; Snider y Veilleux, 1994; Ferrie et al., 1995).

En piña, el hipoclorito de calcio ha sido empleado con buenos resultados en la desinfección de yemas de corona y tejido sincarpo para la realización de los trabajos de micropropagación *in vitro* y variación somaclonal (Mathews y Rangan, 1981; Ramirez y Santana, 1986; Wakasa, 1989; Daquinta, 1998).

En el cultivo de la piña no se conocían hasta la fecha, trabajos sobre desinfección de anteras, por lo que la metodología desarrollada en el cultivar Española roja Pinareña permitió iniciar los estudios sobre la respuesta al cultivo de anteras de los diferentes genotipos de piña ante los medios y condiciones de cultivo.

4.1.1.2 Dinámica de desarrollo de las microsporas y su relación con diferentes caracteres morfológicos de las inflorescencias.

Al iniciarse el estudio de los estadios de desarrollo de las microsporas en tétradas, uninucleado y uninucleado tardío y su relación con los diferentes caracteres morfológicos en la sección basal de las inflorescencias, se observó que existió una relación marcada entre éstos (Figura 4).

La dinámica del estadio de desarrollo de las microsporas en tétradas, uninucleado y uninucleado tardío se desplazaron a medida que se incrementaron los días transcurridos luego de la inducción floral. Los mayores porcentajes de microsporas en tétradas se observaron a los 46 días, con un valor promedio máximo de 94.1%.

A partir de los 46 días comienzan a observarse los primeros estadios de desarrollo uninucleado del polen con 5.9%, con un incremento de estos valores entre los 47 y 49 días de inducida la floración. Los mayores porcentajes (97.2%) de polen uninucleado se observaron a los 48 días.

A los 49 días de inducida la floración se observaron los primeros estadios de desarrollo uninucleado tardío de las microsporas (2.8%). Los valores continúan

incrementándose para obtener el máximo porcentaje (95.31%) a los 50 días de realizada la inducción artificial de la floración.. A partir de los 51 días de inducida la floración estos valores comienzan a decrecer desde 75.81% hasta 3.02%.

En las relaciones que se establecieron entre los caracteres morfológicos de las inflorescencias con los tres estadios de desarrollo de las microsporas se observaron similares curvas de tendencia y ecuaciones de regresión, que las observadas en el análisis de los días. Se observaron incrementos en la longitud del botón floral de las inflorescencias con los diferentes estadios de desarrollo de las microsporas (Figura 5).

El estadio de desarrollo de las microsporas en tétradas se relacionó con las menores longitudes del botón floral. A partir de 7.2 mm de longitud del botón floral comenzaron a aparecer los primeros porcentajes de microsporas en tétradas (40.02%). Estos valores se incrementaron hasta obtener los máximos porcentajes (97.8%) a longitudes de 7.6 mm. Estos estadios de desarrollo decrecieron con longitudes superiores a 7.6 mm.

A medida que decrecieron los estadios de desarrollo de las microsporas en tétradas comenzaron a aparecer los uninucleados. En longitudes del botón floral de 8.4 mm se observaron los mayores porcentajes (97.22%) de microsporas en este estadio de desarrollo. A partir de estas longitudes del botón floral comienzan a decrecer estos valores, desde 80.08% con 8.6 mm hasta 15.60% y 0.00% con 8.8 y 9.0 mm de longitud del botón floral respectivamente. En cuanto al estadio de desarrollo uninucleado tardío de las microsporas, los mayores porcentajes (97.90%) se observaron a longitudes del botón floral de 9.0 mm.

Similar tendencia a la observada entre los diferentes estadios de desarrollo de las microsporas y la longitud del botón floral se apreció con el incremento de la longitud de las anteras (Figura 6). Los mayores porcentajes de microsporas en tétradas se alcanzaron con longitudes que oscilaban entre los 3.0 y 3.4 mm. En

este rango de longitudes de las anteras, los mayores porcentajes (97.80%) de microsporas en tétradas se observaron con 3.2 mm. A longitudes de las anteras de 3.8 y 4.6 mm le correspondieron los mayores porcentajes de microsporas en estadios de desarrollo uninucleado y uninucleado tardío, con 93.05 y 97.18% respectivamente.

El estudio demostró que las relaciones de longitud del botón floral/anteras de 7.6:3.2 mm favorecieron los mayores porcentajes de microsporas en el estadio de desarrollo de tétradas en las inflorescencias de piña colectadas a los 46 días de inducida la floración artificial. Por su parte, las relaciones de longitud del botón floral/anteras de 8.4:3.8 mm y 9.0:4.6 mm mostraron los mayores porcentajes de microsporas en los estadios de desarrollo uninucleado y uninucleado tardío a los 48 y 50 días de inducida la floración artificial en piña.

Los desplazamientos de los diferentes estadios de desarrollo de las microsporas, a medida que se incrementaron las longitudes de los botones florales y el de las anteras se debió evidentemente a que el proceso ontogenético de desarrollo de las microsporas en el grano de polen transcurre en el tiempo (McCormick, 1993) con el consiguiente aumento de las estructuras morfológicas de las inflorescencias.

En los trabajos de hibridaciones en piña, se demostró por Benega et al., (1994) que desde la base hasta la parte apical de las inflorescencias abren cada día de tres a siete flores y que todo el proceso dura alrededor de 21 días. Las observaciones realizadas además demostraron que los botones florales en la sección basal de las inflorescencias comienzan a abrir entre los 60 y 61 días de inducida artificialmente la floración.

En general se encontró una estrecha relación entre las variables estudiadas, donde se obtuvieron coeficientes de correlación y determinación superiores a 0.90*. Ello evidenció que los estadios de desarrollo de las microsporas

estudiados evolucionaron en más de un 90% con el aumento de los días de inducida la floración, las longitudes del botón floral y de las anteras.

Al igual que muchos otros estudios sobre androgénesis *in vitro*, estos resultados permitirán utilizar los caracteres externos de las flores para la realización de los trabajos masivos de cultivo *in vitro* de las anteras en piña. Este método resulta más económico y práctico que los laboriosos métodos de tinción.

Biddington y Robinson (1991) en trabajos sobre androgénesis en *Brassica oleraceae var. gemmifera*, establecieron las anteras cuando los botones florales presentaron entre 3.5 y 4.5 mm de longitud y una relación pétalo/antera de 2.3 y 3.4 mm. De igual forma, Ekiz y Konzak (1991) relacionaron el color y tamaño de las anteras con el estado de desarrollo óptimo de las microsporas en *Triticum aestivum* L. Por otra parte, Wijesekera et al., (1999) identificaron el estado de desarrollo de las microsporas en *Camellia sinensis* L., con el tamaño y color de las anteras. Estos autores concluyeron que los mayores porcentajes de microsporas en estadios uninucleados se obtuvieron cuando las anteras presentaron una coloración amarillo claro o amarillo.

Presentaron entre 3.5 y 4.5 mm de longitud y una relación pétalo/antera de 2.3 y 3.4 mm. De igual forma, Ekiz y Konzak (1991) relacionaron el color y tamaño de las anteras con el estado de desarrollo óptimo de las microsporas en *Triticum aestivum* L. Por otra parte, Wijesekera et al., (1999) identificaron el estado de desarrollo de las microsporas en *Camellia sinensis* L., con el tamaño y color de las anteras. Estos autores concluyeron que los mayores porcentajes de microsporas en estadios uninucleados se obtuvieron cuando las anteras presentaron una coloración amarillo claro o amarillo.

4.1.1.3 Efecto de los medios de cultivo en la formación de embriones y callos.

4.1.1.3.1 Origen de la morfogénesis.

Al evaluar la respuesta de los diferentes genotipos de piña al cultivo *in vitro* de anteras (Figura 7.1) se observó el inicio de un tipo de morfogénesis *in vitro* diferente a los descritos por Wakasa (1989) y Daquinta (1998). Los análisis histocitológicos revelaron que los núcleos de las microsporas en estadio uninucleado (Figura 7.2) que contenían las anteras en los espacios que existían entre los lóculos de las mismas, comenzaron a experimentar los procesos de la mitosis haploide. Este evento significó el primer paso de la morfogénesis en el cultivo *in vitro* de las anteras (Figuras 5.3 a 5.6).

A los siete días de cultivo se observaron dos núcleos vegetativos simétricos dentro del contenido de una misma microspora (Figura 7.3). Este proceso de división mitótica continua y entre los 21 y 30 días las estructuras multicelulares incrementaron el número de las células en el interior de una misma microspora. Se observó además un núcleo generativo pequeño, el cual no sufrió las divisiones mitóticas. Las divisiones del núcleo vegetativo y atrofiamiento del núcleo generativo pudieran indicar el camino A del desarrollo esporofítico en piña. Ello estaría en correspondencia con los estudios realizados en otras especies de plantas por Raghavan (1986).

Entre las estructuras multicelulares se formó además una fina pared celular (Figuras 7.3 y 7.4). Un incremento dinámico del tamaño de las microsporas se observó a partir de los 30 días de cultivo (Figura 7.5). Esto permitió la formación de un embrión globular entre los 35 y 40 días (Figura 7.6).

Los embriones globulares formados se caracterizaron por la presencia de una epidermis. La presencia de la epidermis significó el primer signo visual del proceso de diferenciación que conllevó luego a la formación de los embriones.

Algunos embriones en estados tardíos se caracterizaron por la presentar un suspensor (Figura 7.6). Sin embargo, no en todas las estructuras embriogénicas que se observaron se apreció la presencia de un suspensor. En la mayoría de los

casos no se logró este tipo de estructura y las divisiones posteriores de estos tejidos dieron origen a la formación de callos androgénicos.

En estos estudios la diferenciación de las células que formaron los suspensores no se observó en estados tempranos de desarrollo de las estructuras multicelulares. Rybczynski et al., (1992) tampoco pudieron diferenciar las células que dan origen al suspensor en estadíos temprano de la microsporogénesis en los trabajos realizados en *Triticum aestivium* L. Sin embargo, Sunderland et al., (1979) pudieron diferenciar en estados tempranos las células que le dieron origen al suspensor y al cuerpo de los embriones obtenidos en el cultivo de microsporas en *Hordeum vulgare* L. Los estudios confirmaron una de las similitudes que existen entre la embriogénesis somática y la obtenida a partir del cultivo de microsporas.

Este tipo de evento es bien conocido en la embriogénesis zigótica en piña. En estos estudios, desde las primeras divisiones mitóticas se determina la función de las células derivadas. En este caso, una de las células desarrolla en un embrión globular y la segunda célula en un suspensor (Rao y Wee, 1979).

A partir de las nueve semanas de cultivo, las paredes de las anteras se rompieron y aparecieron por diferentes partes pequeños callos desde el interior de las mismas (Figura 8). Este rompimiento de las paredes de las anteras se debió al incremento en número y tamaño de las estructuras multicelulares que se formaron en el interior de las mismas. La mayoría de estos callos aparecieron fundamentalmente en la zona donde el filamento unido al conectivo se separó de la antera (Figura 9). Los callos obtenidos presentaron una coloración que varió desde amarillo a amarillo cremoso.

Se ha demostrado que el crecimiento y la morfogénesis *in vitro* se regulan por la interacción y el balance entre los reguladores del crecimiento aplicados en el medio de cultivo y las sustancias producidas endógenamente (George, 1997).

Estos últimos pueden ser modificados o favorecidos mediante cortes a los tejidos cultivados *in vitro*. Ello pudo ser la causa de que se observaran mayor cantidad de callos en la zona donde se separó el conectivo de las anteras.

Las paredes de las anteras juegan un papel esencial en las respuestas de las microsporas en cultivo. Los cortes realizados a las anteras posibilitan un balance hormonal endógeno favorable en la zona de excisión. Ello condujo a la existencia de mayor respuesta de las microsporas que se encuentran en esa zona. Autores como Osolnik et al., (1993) demostraron en *Brassica oleraceae* var. *capitata* que los mayores valores de formación de callos se obtuvieron cerca de los cortes realizados a las puntas de las anteras.

4.1.1.3.2 Efecto del Dicamba y las concentraciones de sacarosa en la formación y crecimiento de callos.

Al iniciarse el estudio de la respuesta al cultivo de anteras en diferentes cultivares de piña se encontró que los valores de formación de los callos estuvo fuertemente influenciada por el genotipo y las concentraciones de sacarosa adicionada a los medios de cultivo (Figura 10). De los cinco genotipos ensayados sólo los cultivares Cayena lisa de Oriente, Española roja Pinareña y Piña blanca presentaron respuesta. Los cultivares Cayena lisa de México y Cayena lisa Serrana resultaron recalcitrantes en las condiciones de cultivo ensayadas.

En el cultivar Cayena lisa de Oriente los porcentajes de formación de los callos se incrementaron significativamente con la adición al medio de cultivo de 3 a 9% de sacarosa, observándose en los medios que contenían 9% de sacarosa los mayores porcentajes, 12.0%. Sin embargo, estos valores decrecieron hasta 2.17% cuando se incrementó el nivel de sacarosa en el medio de cultivo hasta 12%.

Similares resultados se obtuvieron en el cultivar Española roja Pinareña. En este genotipo los mayores valores de formación de callos (3.57%) se obtuvieron con la

adición al medio de cultivo de 9% de sacarosa. Estos valores difirieron significativamente a los obtenidos con 3 y 6% de sacarosa respectivamente, entre los cuales no existieron diferencias importantes. Por su parte, la adición de 12% de sacarosa en el medio de cultivo no favoreció la formación de los callos en este cultivar.

En el cultivar Piña blanca se observaron los valores de respuestas más bajos, con sólo el 1.0% en los medios que contenían 9% de sacarosa. Otras concentraciones de sacarosa inhibieron la respuesta de las anteras de este genotipo de piña.

Los medios de cultivo que presentaban concentraciones de sacarosa al 9% resultaron favorables para la formación de callos. Sin embargo, estas respuestas resultaron aún insuficientes. Las especies de plantas que presentan una alta respuesta *in vitro* se adaptan a un gran rango de condiciones para el cultivo de tejidos. En contraste, las especies recalcitrantes presentan un estrecho rango de condiciones apropiadas tanto para la formación de callos como para la regeneración de las plántulas.

El potencial hídrico del medio de cultivo puede influir en los rangos de división de las células o los sucesos en la morfogénesis de las células o los tejidos. El uso de altas concentraciones de sacarosa es comúnmente planteada en los trabajos realizados sobre el cultivo de anteras, donde la adición de 5 a 20% de sacarosa al medio de cultivo resultó favorable para el desarrollo de embriones haploides a partir de las microsporas de *Asparagus officinalis* L. (Wolyn y Feng, 1993), presumiblemente debido a una regulación osmótica de la morfogénesis. La presencia de altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo evita la formación de callos desde las células diploides de las anteras que imposibilitarían el crecimiento de los embrioides derivados del polen (Bajaj, 1983).

Las mayores respuestas a la formación de los callos en los diferentes cultivares

ensayados se obtuvo cuando se incrementaron las concentraciones de Dicamba en un medio con 9% de sacarosa (Figura 11). Sin embargo, existieron diferencias importantes una vez más entre los genotipos y el tipo de medio de cultivo utilizado. En estas condiciones respondieron cuatro de los cinco genotipos ensayados y los mayores valores de formación de los callos (56.66%) se obtuvieron con el empleo de 6 mg.L^{-1} de Dicamba en el cultivar Cayena lisa de Oriente.

En el cultivar Española roja Pinareña no existió diferencias significativas en la formación de los callos al comparar la respuesta en los medios con 4 y 6 mg.L^{-1} de Dicamba. En ambos medios de cultivo la respuesta resultó muy similar, 16.68 y 17.24% respectivamente. Por su parte, en el cultivar Piña blanca se observaron las mayores respuestas (2.13%) en los medios de cultivo que contenían 4 mg.L^{-1} de Dicamba como regulador del crecimiento. Estos valores difirieron significativamente de los obtenidos con 2 y 6 mg.L^{-1} de Dicamba respectivamente.

El efecto de los reguladores del crecimiento tales como el ANA, 2,4-D y AIA habían sido probados para la formación de callos no embriogénicos a partir de hojas de vitroplántulas y tejido sincarpo en piña (Wakasa, 1989). Sin embargo, la adición del Dicamba a los medios de cultivo logró incrementar en tales explantes los valores de formación de los callos, así como las características embriogénicas de los éstos (Daquinta et al., 1997). El Dicamba se considera una potente auxina clorinada con excelentes resultados en el crecimiento y formación de los callos en especies vegetales donde otros reguladores del crecimiento no presentaron respuestas (Zhou et al., 1991).

Nyochembeng y Garton (1998) obtuvieron los mayores porcentajes de formación de callos en *Xanthosoma sagittifolium* cuando adicionaron 3 mg.L^{-1} de Dicamba en el medio de cultivo MS. Estos autores concluyeron que la combinación del Dicamba con las citoquininas tuvo un efecto desfavorable en la formación de los

callos.

Los callos que se transfirieron a los medios de crecimiento MS + Dicamba/BAP (2.0:0.5 mg.L⁻¹) + arginina (5 mg.L⁻¹) mostraron un crecimiento favorable. Ello permitió cultivarlos a los 15 días para incrementar la masa fresca de los mismos. Al momento de transferir los callos para los medios de regeneración presentaban similares características embriogénicas (Figura 12.1) que los callos obtenidos a partir de los segmentos de hojas de vitroplántulas de piña descritos por Daquinta (1998), apariencia compacta y nodular.

4.1.1.4 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas.

4.1.1.4.1 Ontogénesis de los embriones.

Los estudios histo-citológicos realizados en los callos provenientes de las microsporas en el cultivo *in vitro* de las anteras demostraron que se formaron nódulos concéntricos en la periferia de los mismos (Figura 12.2). Estos nódulos variaron en tamaño y su crecimiento resultó más activo.

Los nódulos se desprendieron con facilidad de la masa de los callos y se formaron estructuras conocidas como proembriones (Figura 12.3). Estas estructuras continuaron diferenciando hasta obtener los embriones en estados de desarrollo más avanzados (Figura 12.4). Esta vía de formación de embriones significó el primer signo visual de un tipo de embriogénesis indirecta a partir del cultivo de anteras.

Como se pudo apreciar, esta vía de formación de embriones tuvo un origen multicelular ya que los embriones se originaron a partir de *clusters* de las células que conformaban las estructuras no diferenciadas de los callos obtenidos. Sin embargo, se observó además un origen unicelular de los embriones, el cual resultó muy diferente al descrito con anterioridad. En este tipo de embriogénesis

se observaron células en activa división mitótica (Figura 12.5). Estas células se caracterizaron por presentar un núcleo grande altamente basofílico con paredes celulares gruesas.

Michaux-Ferrière y Schwendiman (1992) al estudiar este tipo de origen en la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L señalaron que las modificaciones de la pared celular se debieron a la gelificación de la lámina media en estas células. Los autores observaron además dos o más células bajo una misma envoltura como es característico de las células embriogénicas y aunque en menor número, también aparecieron células parenquimáticas.

Las células embriogénicas aisladas continuaron en activa diferenciación y división mitótica hasta formarse los embriones (Figura 12.6 y 13.1) mediante el proceso de embriogénesis haploide indirecta a través de la formación de los callos androgénicos. Estos resultados confirmaron tanto el origen multicelular como el unicelular de formación de los embriones en el cultivo *in vitro* de las anteras de piña.

Rodríguez et al., (1996) y Daquinta (1998) en estudios realizados en embriogénesis somática con el cultivo de hojas de vitroplántulas de piña también encontraron que los embriones somáticos tuvieron un origen tanto unicelular como multicelular. Similares resultados se obtuvieron en los trabajos sobre embriogénesis somática de *Elaeis guineensis* Jacq. y *Musa sp.*, donde los cortes histológicos demostraron que la formación de embriones resultó a través del proceso unicelular y multicelular (Schwendiman et al., 1990; Schoofs, 1997).

Michaux-Ferrière et al., (1992) concluyeron que en *Hevea brasiliensis* el origen unicelular de los embriones era transitorio y sólo conllevó a la formación de proembriones. En este caso, el proceso multicelular fue el que propició la formación de los embriones somáticos.

En *Theobroma cacao* L., Alemanno et al., (1996) demostraron que los embriones

somáticos tuvieron un origen multicelular; aunque simultáneamente se observaron células embriogénicas, las cuales sólo dieron lugar a proembriones. Los autores concluyeron que la falta de formación de los embriones somáticos a través de la embriogénesis unicelular se debió quizás al empleo de un medio de cultivo inadecuado.

4.1.1.4.2 Efecto de diferentes concentraciones de BAP/Dicamba en la formación de los embriones y regeneración de plántulas.

Una vez que los cultivos de callos embriogénicos se transfirieron a los medios de proliferación de plántulas en medios MS combinado con BAP/Dicamba sólo se observó el fenómeno de la rizogénesis. Por su parte, todos los callos que se cultivaron en medio MS sin suplemento de reguladores del crecimiento murieron a los pocos días de cultivo.

Este efecto del Dicamba en el proceso de rizogénesis reitera la reconocida acción como auxina de este regulador del crecimiento del tipo clorinado. Aunque se ensayaron bajas dosis de Dicamba y altas de BAP, la acción de la citoquinina por los sitios activos de las células de los tejidos cultivados *in vitro* se saturaron rápidamente por la acción del Dicamba. Ello favoreció la emisión de raíces en vez de brotes, en los embriones que se originaron de la masa de los callos.

El Dicamba en combinación con el BAP favoreció la proliferación y formación de estructuras embriogénicas en los callos obtenidos por el cultivo *in vitro* de anteras, pero no resultó efectivo en los trabajos de regeneración de las plántulas. Sin embargo, Daquinta et al., (1997) observaron un efecto contrario cuando lograron regenerar plantas de los callos obtenidos de hojas de vitroplántulas en medios con relaciones de BAP/Dicamba, aunque los valores de regeneración resultaron bajos.

4.1.1.4.3 Efecto del Thidiazuron en la formación de los embriones y regeneración de plántulas.

Los estudios histo-citológicos también demostraron la formación de embriones en los callos que se cultivaron en los medios MS con diferentes concentraciones de TDZ. Estos callos mostraron una coloración verde claro y a partir de los 15 días comenzaron a desarrollar los primeros esbozos foliares (Figura 13.2). Algunos de estos embriones androgénicos aislados se separaron de los callos y cultivados en medio MS + TDZ comenzaron a crecer y a desarrollar las raíces y el coleóptilo luego de dos o tres días de cultivo (Figura 13.3).

Al evaluar la influencia del cultivo continuado durante 45 días en medios con diferentes concentraciones de TDZ se encontró que existió una influencia marcada entre los genotipos y las concentraciones de este regulador del crecimiento en su respuesta a la formación de los embriones y plántulas (Tabla 3). La formación de callos embriogénicos se observó en los cuatro genotipos que presentaron respuestas, aunque los mayores valores de formación de los embriones/mg de MF de callos (2.0187) se obtuvieron en el cultivar Española roja Pinareña con la adición al medio de cultivo de 1.5 mg.L^{-1} de TDZ. Sin embargo, éstos valores no difirieron significativamente de los obtenidos en el rango de dosis comprendidas desde 1.0 hasta 3.0 mg.L^{-1} de TDZ.

Cayena lisa de Oriente resultó el segundo cultivar de mejor comportamiento con 1.5296 embriones/mg de MF de callos, los cuales se observaron a dosis de 1.5 mg.L^{-1} de TDZ. Sin embargo, aunque estos resultados no difirieron de los obtenidos con la dosis de 2.0 mg.L^{-1} (1.3668). Por su parte, en el cultivar Piña blanca no se encontraron diferencias significativas en la formación de los embriones en dosis comprendidas desde 0.5 hasta 1.5 mg.L^{-1} de TDZ (0.7351 , 0.7460 y 0.7690). Similar comportamiento se observó en el cultivar Cayena lisa de México, donde no se observaron diferencias significativas en los valores de formación de callos a dosis comprendidas desde 0.5 a 2.0 mg.L^{-1} de TDZ. Estos valores no resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en el cultivar Piña blanca en las condiciones de cultivo ensayadas.

A pesar de los valores obtenidos en la formación de embriones con la adición de TDZ al medio de cultivo, muy pocos de éstos germinaron (Figuras 13.4 y 13.5a). Existió además una fuerte dependencia del genotipo y de las concentraciones de TDZ adicionada a los medios de cultivo en su respuesta a la formación y eficiencia de las plántulas. Los mayores valores de formación de plántulas se obtuvieron en Española roja Pinareña con 0.00713 plántulas/mg de MF de callos como promedio/mg de callos en dosis de 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Ello significó la obtención de sólo 9.18 plántulas promedio en el tratamiento y una eficiencia de 0.3532% plántulas/embriones formados.

El cultivar Cayena lisa de Oriente presentó una frecuencia de sólo 0.00359 plántulas/mg de MF de callos al adicionar al medio de cultivo 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ, lo que representó un promedio de 4.62 plántulas en el tratamiento. La eficiencia en la regeneración de las plántulas fue de 0.2347%, la cual resultó significativamente menor que los valores obtenidos en el cultivar Española roja. El cultivar Piña blanca mostró similares resultados, con sólo 0.00216 plántulas/mg de MF de callos a dosis de 1.5 mg.L⁻¹, para un promedio de sólo 2.78 plántulas en el tratamiento. Estos valores resultaron significativamente diferentes de los obtenidos con las demás dosis de TDZ. En este cultivar, la eficiencia de formación de las plántulas fue de 0.2808%. Estos valores de eficiencia resultaron superiores a los obtenidos en el cultivar Cayena lisa de Oriente y no presentaron diferencias significativas importantes con la eficiencia que se encontró en el cultivar Española roja Pinareña.

Concentraciones de TDZ superiores a 2.0 mg.L⁻¹ no resultaron favorables para la regeneración de las plántulas tanto en el cultivar Cayena lisa de Oriente como en Piña blanca. Los callos embriogénicos cultivados en los medios de regeneración del cultivar Cayena lisa de México no presentaron respuesta en las condiciones de cultivo ensayadas.

Tabla 3. Efecto del cultivo continuado en TDZ durante 45 días en la formación de embriones, plántulas y eficiencia en la regeneración de callos provenientes del cultivo *in vitro* de anteras.

| Genotipos | TDZ (mg.L ⁻¹) | Formación/mg de MF de callos: | | Eficiencia (%) (plántulas/embriones) |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---|
| | | embriones | plántulas | |
| Española roja Pinareña | 0.0 | 0.4104 ^c | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 1.4680 ^b | 0.00024 ^{gh} | 0.0163 ^c |
| | 1.0 | 1.8173 ^a | 0.00100 ^f | 0.0550 ^c |
| | 1.5 | 2.0187 ^a | 0.00713 ^a | 0.3532 ^a |
| | 2.0 | 1.9178 ^a | 0.00249 ^c | 0.1298 ^{bc} |
| | 2.5 | 2.0220 ^a | 0.00359 ^b | 0.1775 ^b |
| | 3.0 | 1.9129 ^a | 0.00248 ^c | 0.1296 ^{bc} |
| Piña blanca | 0.0 | 0.1183 ^{de} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 0.7351 ^c | 0.00062 ^g | 0.0843 ^c |
| | 1.0 | 0.7460 ^c | 0.00094 ^f | 0.1260 ^{bc} |
| | 1.5 | 0.7690 ^c | 0.00216 ^d | 0.2808 ^{ab} |
| | 2.0 | 0.1476 ^{de} | 0.00007 ^{gh} | 0.0474 ^d |
| | 2.5 | 0.0000 ^e | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 3.0 | 0.0000 ^e | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| Cayena lisa de Oriente | 0.0 | 0.2564 ^{de} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 0.8624 ^c | 0.00025 ^{gh} | 0.0289 ^c |
| | 1.0 | 1.1881 ^{bc} | 0.00174 ^e | 0.1465 ^{bc} |
| | 1.5 | 1.5296 ^b | 0.00359 ^b | 0.2347 ^b |
| | 2.0 | 1.3668 ^b | 0.00147 ^e | 0.1076 ^{bc} |
| | 2.5 | 0.6835 ^{cd} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 3.0 | 0.5985 ^{cd} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| Cayena lisa de México | 0.0 | 0.1504 ^{de} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 0.6656 ^{cd} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 1.0 | 0.7187 ^{cd} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 1.5 | 0.5748 ^{cd} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 2.0 | 0.5425 ^{cd} | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 2.5 | 0.0000 ^e | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| | 3.0 | 0.0000 ^e | 0.00000 ^h | 0.0000 ^c |
| ES X (±) | - | 0.2381 [*] | 0.0028 [*] | 0.0428 [*] |

* Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para p<0.05.

Como se pudo apreciar en el experimento anterior, el cultivo continuado durante 45 días de los callos en medios con diferentes concentraciones de TDZ favoreció la formación de embriones pero no la regeneración de las plántulas. En los tratamientos se observó una baja eficiencia en la regeneración de las plántulas en los tres genotipos que presentaron respuestas.

Los experimentos que se realizaron con la supresión del TDZ en el medio de cultivo MS a los 15 días de cultivarse los callos brindaron resultados similares de formación de embriones que los obtenidos cuando los callos se mantuvieron en un cultivo continuado con TDZ durante 45 días (Tabla 4). De esta forma existieron diferencias entre los genotipos y las concentraciones de TDZ adicionada en el medio de cultivo durante los primeros 15 días. En Española roja se obtuvieron los mayores valores de formación de embriones/mg de MF de callos, con un promedio de 2.0503 a concentraciones de 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Sin embargo, estos valores no resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en dosis comprendidas desde 0.5 a 3.0 mg.L⁻¹ de TDZ.

El cultivar Cayena lisa de Oriente nuevamente resultó el segundo de mejor comportamiento en la formación de los embriones. Los mayores valores (1.5420 embriones/mg de MF de callos) se observaron con 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ, aunque éstos no difirieron estadísticamente de los obtenidos con 1.0 (1.1643 embriones/mg de MF de callos) y 2.0 mg.L⁻¹ (1.3577 embriones/mg de MF de callos) de TDZ. En el cultivar Piña blanca se obtuvieron similares respuestas en dosis 0.5; 1.0 y 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ, con valores de 0.7668, 0.7413 y 0.7619 embriones/mg de MF de callos respectivamente. El cultivar Cayena lisa de México presentó los valores más bajos de formación de embriones/mg de MF de callos. En este genotipo se obtuvieron 0.6599 embriones/mg de MF de los callos en los medios que contenían 1.0 mg.L⁻¹ de TDZ. Estos valores no resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en el cultivar Piña blanca.

Luego de transferir los callos embriogénicos a los medios MS con una relación BAP/ANA (2.1:0.3 mg.L⁻¹) se observaron altas frecuencias de regeneración de plántulas (Figura 13.5b) en comparación con los resultados obtenidos sin la supresión del TDZ a los 15 días del medio de cultivo (Figura 13.5a). La variedad Española roja Pinareña continuó mostrando los mejores resultados con 0.42674 plántulas/mg de MF de callos, lo que representó una frecuencia de 549.64 plántulas promedios regeneradas en los callos que provenían de los medios con 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Estos valores de regeneración de plántulas difirieron significativamente de los resultados obtenidos en los callos que provenían de las restantes dosis de TDZ adicionadas a los medios de cultivo durante los primeros 15 días.

Tabla 4. Efecto del TDZ en la formación de embriones, regeneración de las plántulas y eficiencia de éstas al ser transferidos los callos a los 15 días a medios con BAP/ANA (2.1:0.3 mg.L⁻¹) en el cultivo *in vitro* de anteras.

| Genotipos | TDZ (mg.L ⁻¹) | Formación/mg de MF de callos: | | Eficiencia (%) (plántulas/embriones) |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---|
| | | Embriones | plántulas | |
| Española roja Pinareña | 0.0 | 0.4354 ^c | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 0.5 | 1.4651 ^{ab} | 0.01674 ^f | 1.1425 ^g |
| | 1.0 | 1.7203 ^{ab} | 0.07825 ^c | 4.5485 ^c |
| | 1.5 | 2.0503 ^a | 0.42674 ^a | 20.813 ^a |
| | 2.0 | 1.9419 ^a | 0.11670 ^b | 6.0096 ^b |
| | 2.5 | 2.0121 ^a | 0.07061 ^c | 3.5090 ^d |
| | 3.0 | 1.8851 ^a | 0.04988 ^d | 2.6462 ^e |
| Piña blanca | 0.0 | 0.1097 ^d | 0.00000 ^j | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 0.7668 ^{bc} | 0.00099 ^{ij} | 0.1296 ⁱ |
| | 1.0 | 0.7413 ^{bc} | 0.00979 ⁱ | 1.3218 ^g |
| | 1.5 | 0.7619 ^{bc} | 0.01222 ^g | 1.6039 ^f |
| | 2.0 | 0.1152 ^d | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 2.5 | 0.0514 ^{cd} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 3.0 | 0.0000 ^d | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| Cayena lisa de Oriente | 0.0 | 0.2319 ^c | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 0.5 | 0.8706 ^{bc} | 0.00259 ^h | 0.2969 ⁱ |
| | 1.0 | 1.1643 ^b | 0.01680 ^f | 1.4430 ^g |
| | 1.5 | 1.5420 ^{ab} | 0.03937 ^e | 2.5532 ^e |
| | 2.0 | 1.3577 ^{ab} | 0.00979 ⁱ | 0.7211 ^h |

| | | | | |
|-----------------------|----------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | 2.5 | 0.7565 ^{bc} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 3.0 | 0.5092 ^{cd} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| Cayena lisa de México | 0.0 | 0.1245 ^{cd} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 0.5 | 0.6457 ^c | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 1.0 | 0.6599 ^{bc} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 1.5 | 0.6478 ^c | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 2.0 | 0.5246 ^{cd} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 2.5 | 0.0966 ^{cd} | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | 3.0 | 0.0000 ^d | 0.00000 ^j | 0.0000 ⁱ |
| | ES X (±) | - | 0.2961 [*] | 0.0047 [*] |

* Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para $p < 0.05$.

Los cultivares Cayena lisa de Oriente y Piña blanca mostraron también incrementos significativos en los valores de regeneración con frecuencias de 0.03937 y 0.01222 plántulas como promedio/mg de MF de callos provenientes de los medios con 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Estos valores representaron 50.71 y 15.74 plántulas regeneradas en el tratamiento. En estos cultivares, los mejores resultados también se alcanzaron en los callos que provenían del medio de cultivo con 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Concentraciones superiores a 2.0 mg.L⁻¹ de TDZ resultaron desfavorables para la posterior formación de las plántulas tanto en el cultivar Cayena lisa de Oriente como en Piña blanca. La variedad Cayena lisa de México se mantuvo como un genotipo recalcitrante en las condiciones de cultivo ensayadas.

La mayor eficiencia en la regeneración de los brotes se obtuvo en el cultivar Española roja Pinareña con 20.8135%. Estos valores resultaron significativamente superiores a los obtenidos en los cultivares Cayena lisa de Oriente y Piña blanca, donde los mejores valores de eficiencia resultaron 2.5532 y 1.6039% en los callos que provenían del medio de cultivo que contenía 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Las plántulas regeneradas mediante el cultivo de anteras de los cultivares Española roja Pinareña, Cayena lisa de Oriente y Piña blanca mostraron un crecimiento favorable cuando se aclimataron en las casas de vegetación (Figura 13.6).

En el cultivo de anteras o microsporas, al igual que en otros sistemas de cultivo de tejidos, la eficiencia en la formación de embriones y regeneración de las plantas depende entre otros factores del genotipo y del medio de cultivo empleado. Cai et al., (1991) concluyeron que el genotipo y el medio de cultivo en el cultivo de anteras de *Hordeun vulgare* L. resultaron determinantes en los trabajos de regeneración de las plántulas, y los valores de eficiencia oscilaron entre los 8.57 y 13.8%/embriones en los medios que contenían maltosa y celubiosa. En el cultivo de anteras en *Zea maiz*, los mayores valores de eficiencia en la regeneración de las plántulas (2.3 y 2.7%/embriones) se obtuvieron adicionando al medio de cultivo carbón activado (Buter et al., 1993). Por su parte, en los genotipos de *Hordeun vulgare*, la eficiencia en la regeneración de las plántulas osciló entre 2.73 y 28.89%/embriones (Piccirilli y Arcioni, 1991; Devaux et al., 1993).

La mayor regeneración de los brotes al ser transferidos los embriones a los 15 días a medios de cultivo con una relación diferente de citoquinina/auxina, se debió a que el TDZ es persistente en los tejidos de las plantas. Por esta razón, los cultivos de tejidos se transfieren continuamente a medios frescos, se exponen a medios sin TDZ o a medios con una combinación diferente de citoquinina (Murthy et al., 1998). Por otra parte, el BAP y el ANA son dos de los reguladores del crecimiento de más amplio uso en la micropropagación de la piña (Daquinta, 1998; Escalona, 1999). De ello resultó además los valores favorables de plántulas formadas.

En el cultivo de tejidos se conoce que cuando un explante se expone a la acción de una sustancia o regulador del crecimiento por un corto período de tiempo se dice que éste ha recibido un pulso. En ocasiones, el uso continuado de un regulador del crecimiento puede inhibir la acción de su efecto en los tejidos, lo cual se evita transfiriendo los tejidos a medios con un tipo diferente de regulador del crecimiento (George, 1993).

El TDZ es una fenilurea con alta actividad como citoquinina. Este regulador del crecimiento se ha utilizado para la regeneración de plántulas en especies recalcitrantes como en el caso del cultivo de anteras de manzano, lino (Sarwar y Skirvin, 1997; Chen et al., 1998) y otras muchas especies (Mertens et al., 1996; Sarwar y Skirvin, 1997; Visessuwan et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Sinha et al., 1999). Recientemente el TDZ se empleó con buenos resultados en la micropropagación de *Cryptanthus sinuosos*, una *Bromelia* endémica del Brasil (Carneiro et al., 1998).

4.1.2 Cultivo *in vitro* de óvulos aislados.

4.1.2.1 Establecimiento del método de desinfección y preparación de las inflorescencias para el cultivo *in vitro*.

Los métodos de desinfección de las inflorescencias tuvieron una marcada influencia en los porcentajes de contaminación y muerte de los óvulos cultivados *in vitro*, con diferencias altamente significativas en los tres métodos ensayados (Figura 14). En el primero los valores de contaminación y muerte de los óvulos aislados fueron de 10.0 y 12.5% respectivamente. En el segundo procedimiento estos valores resultaron significativamente más bajos, 7.5 y 5.0%, pero aún negativos. Los mejores resultados se obtuvieron con el tercer procedimiento, donde los valores de contaminación y muerte resultaron significativamente inferiores (0.25 y 1.75% respectivamente) a los obtenidos con los demás métodos.

Es evidente que la doble desinfección con hipoclorito de calcio disminuyó considerablemente los porcentajes de contaminación en los tres métodos ensayados. Los estudios demostraron que al aumentar la concentración de este agente desinfectante, los valores de contaminación se redujeron en un 2.5% en el segundo método cuando se comparó con el primero. Sin embargo, no

presentaron la eficiencia en los porcentajes de contaminación que se logró con el tercer procedimiento de desinfección. Sin dudas el cepillado con agua jabonosa y la eliminación de la corteza de las inflorescencias antes de realizar la doble desinfección, tuvieron influencias negativas.

El cepillado de las inflorescencias con agua jabonosa produjo resquebrajaduras y heridas en el tejido sincarpo, que permitieron la entrada hacia el interior del tejido de los agentes contaminantes. Por su parte, la eliminación de la corteza en los primeros métodos antes de realizar la primera desinfección provocó una manipulación adicional al tejido sincarpo, lo que facilitó la entrada de los agentes contaminantes e hizo posible que el hipoclorito de calcio penetrara más al tejido y provocara mayores porcentajes de muerte de los óvulos cultivados *in vitro*.

Los mejores resultados obtenidos en la desinfección de la inflorescencia para la siembra de los óvulos con el tercer método se debieron además al procedimiento de preparación de las inflorescencias (Figura 15). Luego de coleccionar las inflorescencias se eliminó sólo 1/3 de las brácteas subyacentes, además de los restos del pedúnculo y de la corona, de esta forma y aunque en la primera desinfección se empleó una alta concentración de hipoclorito de calcio (2%) la misma no afectó los óvulos contenidos dentro de los ovarios. Por el contrario, se favoreció la desinfección de la corteza de las inflorescencias. Una segunda desinfección con concentraciones de hipoclorito de calcio más bajas (0.5%) durante cinco minutos, resultó favorable para eliminar cualquier agente contaminante luego de separar la corteza del tejido sincarpo en condiciones estériles.

En los trabajos realizados sobre ginogénesis en *Hordeun vulgare* L., los mejores resultados en la desinfección de la superficie de las espigas resultó la utilización de una solución de hipoclorito de sodio (2.8%) durante cinco minutos (Castillo y Cistué, 1993).

Similar al cultivo *in vitro* de anteras, el método de desinfección logrado para el cultivo de los óvulos aislados es el primer paso para obtener respuestas eficientes en los trabajos sobre ginogénesis en piña. Por su parte, los resultados obtenidos en el cultivar Española roja Pinareña permitieron iniciar los trabajos sobre los medios y condiciones de cultivo que afectan el cultivo *in vitro* de óvulos aislados en diferentes genotipos.

4.1.2.2 Efecto de los medios de cultivo y los estadios de desarrollo del saco embrionario en el proceso morfogenético de formación de callos.

Luego de realizar el cultivo *in vitro* de los óvulos aislados (Figura 16.1), los estudios histo-citológicos realizados (Figura 16.2) demostraron que a los 25 días de cultivo las células que conforman el saco embrionario experimentaron el proceso de endomitosis y se dividieron para dar lugar a la formación de callos (Figura 16.3). En este caso, el incremento de la masa del callo provocó la salida del mismo principalmente por la zona del funículo (Figura 16.4) y continuó creciendo una vez que el callo hizo contacto con el medio de cultivo. Luego de las cuatro semanas el callo rodeó todo el tejido somático del explante (Figura 16.5). Sin embargo, no siempre el callo se originó de las células haploides del saco embrionario. En ocasiones las células haploides degeneraron y el tejido somático sufrió divisiones mitóticas para dar lugar a la formación de los callos (Figura 16.6).

Aunque los estudios histo-citológicos en piña no revelaron cual de las células del saco embrionario originó la proliferación de los callos, se conocen en los trabajos realizados en *Helianthus annuus* que la célula huevo del saco embrionario se dividió para dar lugar a la formación de embriones haploides (Yang et al., 1986). Por su parte, en *Oriza sativa*, el desarrollo esporofítico se obtuvo de una de las sinérgidas (Zhou et al., 1986). Sin embargo, al igual que en *Ananas comosus*

aún se desconoce el origen de las plántulas haploides ginogenéticos en *Allium cepa* L. (Keller, 1990b).

4.1.2.2.1 Efecto del Dicamba en la formación de los callos.

Al analizar la respuesta a la formación de los callos en el cultivo *in vitro* de óvulos aislados, se observó que existió una fuerte dependencia en la interacción que se estableció entre los genotipos y las concentraciones de Dicamba adicionada al medio de cultivo (Figura 17). De los cinco genotipos ensayados, sólo dos presentaron respuesta a la formación de los callos en las condiciones de cultivo ensayadas, Cayena lisa Serrana y Española roja Pinareña. Las mayores respuestas se observaron en Cayena lisa Serrana, con el 35.68% de formación de los callos en los medios que contenían 4 mg.L⁻¹ de Dicamba. Los porcentajes de formación de callos en los medios que contenían 2 y 6 mg.L⁻¹ de Dicamba resultaron significativamente inferiores, 12.68 y 24.11% respectivamente.

La respuesta a la formación de callos en el cultivar Española roja Pinareña resultó similar a los logrados con el cultivar Cayena lisa de Oriente, aunque los valores resultaron significativamente inferiores. Los mayores valores de formación de callos (24.76%) se obtuvo con la adición al medio MS de 4 mg.L⁻¹ de Dicamba. Los valores de formación de callos con 2, 6 y 8 mg.L⁻¹ de Dicamba resultaron significativamente inferiores al compararlos con la dosis de 4 mg.L⁻¹ de TDZ. Los genotipos Piña blanca, Cayena lisa de Oriente y Cayena lisa de México resultaron recalcitrantes a la formación de los callos en las condiciones de cultivo ensayadas.

Castillo y Cistué (1993) señalan que en el cultivo de óvulos aislados de *Hordeum vulgare* las mejores respuesta se obtuvieron en un medio N₆ con la adición de una combinación de reguladores del crecimiento que incluía un compuesto clorinado, MCPA. En *Lolium multiflorum* los mejores resultados se obtuvieron con 0.2 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Humlehn y Nitzsche, 1995). Por su parte, en *Gerbera*

jamesonii la respuesta a la formación de los callos resultó dependiente del tipo de medio de cultivo empleado (Ahmim y Vieth, 1996). Estos autores encontraron la mayor respuesta en medios modificados MS ($\frac{1}{2}$ de las sales) y una combinación de reguladores del crecimiento AIA/BAP (0.1:2.0 mg.L⁻¹).

Los resultados obtenidos demostraron por primera vez la posibilidad de obtener morfogénesis indirecta a partir del cultivo *in vitro* de óvulos aislados en piña. Hasta el momento sólo se había logrado obtener callos a partir del tejido sincarpo y de las hojas de las vitroplántulas de piña (Wakasa, 1989; Daquinta y Benega, 1997).

4.1.2.2.2 Efecto del estadio de desarrollo del saco embrionario en la formación de los callos.

El estadio de desarrollo del saco embrionario influyó marcadamente en los porcentajes de inducción de callos en cada uno de los genotipos analizados (Figura 18). De los cinco genotipos ensayados, cuatro presentaron respuesta a la formación de los callos en dependencia del estadio de desarrollo de las microsporas. Los cultivares Cayena lisa Serrana y Española roja Pinareña presentaron respuesta a la formación de callos en los tres estadios de desarrollo del saco embrionario analizados, aunque los mayores valores (50.94 y 38.98 % respectivamente) correspondieron al estadio uninucleado y la primera mitosis haploide de las microsporas.

Similar comportamiento mostró la variedad Cayena lisa de Oriente, donde los mayores valores de formación de callos (6.22%) se obtuvieron en el primer estadio de desarrollo de las microsporas. Estos valores resultaron significativamente superiores a los obtenidos el estadio que correspondió desde la primera mitosis haploide hasta el grano de polen binucleado. Los óvulos cultivados en el estadio de desarrollo de las microsporas desde polen binucleado hasta polen maduro no respondieron a la formación de los callos. Por su parte, el

cultivar Piña blanca presentó similares respuestas a la formación de los callos en los dos primeros estadios de desarrollo de las microsporas. Estadios de desarrollo superiores al binucleado no favorecieron la formación de los callos en este genotipo.

El cultivar Cayena lisa de México no respondió a la formación de callos en ninguno de los tres estadios analizados. Este genotipo resultó de nuevo recalcitrante a la formación de los callos en las condiciones de cultivo establecidas.

El mejor comportamiento de los óvulos en estadios tempranos de desarrollo se debió a que este tejido estaba morfogenéticamente más maduro que los tejidos que se encontraban en estadios de desarrollo más avanzados. Raghavan, (1986) y Kieffer et al., (1993) señalan que el incremento en la incidencia del desarrollo embriogénico en los granos de polen cultivados en el estadio uninucleado se debe aparentemente a su proximidad a un estado favorable en el ciclo mitótico en el cual se percibió.

Aunque es difícil determinar el estadio de desarrollo del saco embrionario, éste se relaciona con los estadios de desarrollo de las microsporas como método indirecto. Varios autores han correlacionado los estadios de desarrollo del saco embrionario con los de las microsporas o con caracteres anato-morfológicos de las plantas para permitir una mayor respuesta de los óvulos, así como la repetibilidad de los resultados. En Cebada se obtuvo una correlación entre el estadio de desarrollo del saco embrionario y el polen (Castillo y Cistué, 1993). Estos autores demostraron que el estadio de desarrollo del ovario resultó uno de los factores más importantes en la ginogénesis y los rangos de inducción de los callos y regeneración de las plántulas en el estadio de desarrollo del polen binucleado resultaron casi dos o tres veces superiores a los obtenidos en el estadio de desarrollo trinucleado. Por otra parte, Schwenkel y Winkelmann (1998) relacionaron la longitud de los pétalos florales con el estadio de desarrollo del

saco embrionario en los trabajos realizados en la embriogénesis somática a partir del cultivo de óvulos en *Cyclamen presicum* L.

4.1.2.2.3 Efecto de tres fuentes de carbono en la formación de los callos.

Semejante a los resultados en la respuesta de los óvulos en dependencia del estadio de desarrollo de las microsporas relacionadas con el saco embrionario, se encontró que existió una respuesta diferencial entre los genotipos en la formación de los callos de acuerdo a la fuente de carbón adicionada al medio de cultivo (Figura 19). El cultivar Cayena lisa Serrana nuevamente mostró los mejores resultados con 79.49% de respuesta cuando se adicionó sacarosa al medio de cultivo. Estos resultados resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en los medios con glucosa como fuente de carbono.

En el cultivar Española roja Pinareña no se encontraron diferencias significativas entre la sacarosa y la glucosa en su respuesta a la formación de los callos, estos valores oscilaron entre los 34.65 y 35.27%. Por su parte, los cultivares Piña blanca (3.38%) y Cayena lisa de Oriente (6.11%), mostraron los mayores niveles de formación de callos en los medios con glucosa.

La adición al medio de cultivo del disacárido maltosa no resultó favorable en la formación de los callos en ninguno de los cinco genotipos que se ensayaron. La variedad Cayena lisa de México tampoco respondió a ninguna de las tres fuentes de carbono que se evaluaron.

De acuerdo a la respuesta que presentaron los diferentes genotipos en estudio, se desarrollaron dos tipos de callos: el primero amarillo crema o amarillo con apariencia compacta y estructuras nodulares, el cual continuó creciendo y rodeó completamente el óvulo. Estos callos luego de ser transferidos a los medios de proliferación continuaron creciendo y formando estructuras embriogénicas. Estos tipos de callos se desarrollaron en los óvulos cultivados de los genotipos

Española roja Pinareña, Piña blanca y Cayena lisa de Oriente.

El segundo tipo de callo se obtuvo en el cultivar Cayena lisa Serrana, estos presentaron aspecto mucilaginoso y textura blanda tal como describe Daquinta (1998) en los trabajos de embriogénesis somática en piña el tipo de callo no embriogénico. Por otra parte, estos callos no continuaron en activa división mitótica luego de ser transferidos a los medios de proliferación. Por otra parte, el cultivar Piña blanca presentó el 20% de los callos con estructura nodular y compacta, mientras los restantes (80%), resultaron ser del segundo tipo. Similar comportamiento se obtuvo en la Cayena lisa de Oriente donde el 18.18% de éstos pertenecieron al primer tipo de callo, mientras que el 81.82% presentaron el mismo aspecto que aquellos obtenidos en Cayena lisa Serrana. Ello demostró una vez más que existió una alta influencia del genotipo tanto en su respuesta a la formación de los callos como a la textura de los mismos en dependencia de la fuente de carbono adicionada al medio de cultivo.

Los azúcares presentan dos funciones en los medios de cultivo, como fuente de carbón y como regulador osmótico. El crecimiento de las células depende de la utilización del compuesto carbono para la formación de los principales componentes de las células y como fuente de energía (George, 1997). Las diferencias en los resultados entre la sacarosa, la glucosa y la maltosa en su influencia sobre la formación de los callos (diferenciación de las células mediante el proceso de mitosis) pudieron deberse a un efecto de estos azúcares sobre el potencial hídrico del medio de cultivo y a la asimilación de esta por las células de los tejidos cultivados.

A diferencia de la maltosa, la sacarosa es muy inestable en el medio de cultivo y se hidroliza rápidamente a fructuosa y glucosa, incrementando así el potencial hídrico del medio de cultivo. Este efecto resultó al parecer favorable para los genotipos Cayena lisa Serrana y Española roja Pinareña respectivamente. Sin embargo, no favoreció las respuestas de los cultivares Cayena lisa de Oriente y

Piña blanca, los cuales resultaron más selectivos a la glucosa debido quizás a que necesitaron menos potencial osmótico en el medio o que los productos de la degradación de la fructuosa para ser incorporada a los procesos de la glicólisis inhibieron esta respuesta en los medios con sacarosa.

Roberts-Oehlschlager et al., (1990) encontraron que la hidrólisis de la maltosa en el cultivo de anteras de *Hordeum spontaneum* C. Kock resultó alrededor de 20 veces menores que para la sacarosa. En este sentido Navarro-Alvarez et al., (1994) demostraron en los medios de cultivo de anteras en *Triticum aestivium* L., que la sacarosa se hidrolizaba rápidamente a glucosa y fructosa en los primeros cuatro días de cultivo y la maltosa se mantuvo estable. Por su parte, Drew et al., (1993) demostraron que los productos de la degradación de la fructuosa inhibieron el crecimiento *in vitro* de los brotes en *Carica papaya* L.

La fuente de carbono en el medio de cultivo es uno de los factores que influye en la respuesta de las diferentes especies al cultivo de óvulos. Castillo y Cistué (1993) y Metwally et al., (1998b) encontraron en *Hordeum vulgare* y *Cucurbita pepo* que los mayores rangos de inducción de callos se obtuvieron con el uso de sacarosa más melibiosa y sacarosa respectivamente. Keller (1990b), Kieffer et al., (1993), Hansen et al., (1994); Orshinsky y Sadasivaiah (1994); Williams et al., (1998) obtuvieron los mejores resultados en el cultivo de óvulos, ovarios y anteras con el uso de diferentes tipos de fuentes de carbono: sacarosa, melibiosa + sacarosa y glucosa en especies de *Allium cepa* L., *Brassica oleraceae* L. covar. *acephala* (DC.) Alef., *Beta vulgaris* y *Triticum aestivium* L. respectivamente.

4.1.2.3 Efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de embriones y regeneración de plántulas.

El uso continuado del TDZ en el cultivo *in vitro* de óvulos aislados brindó resultados similares en la formación y maduración de los embriones que los

obtenidos en el cultivo de anteras, aunque en este caso sólo respondieron los cultivares Española roja Pinareña, Piña blanca y Cayena lisa de Oriente (Tabla 5). Los mayores valores de formación de embriones (1.3200 embriones/mg de MF de callos) se obtuvieron en el cultivar Española roja Pinareña a la dosis de 1.0 mg.L⁻¹ de TDZ. Dosis de TDZ inferiores o superiores a 1.0 mg.L⁻¹ conllevaron a una disminución significativa de estos valores.

El cultivar Cayena lisa de Oriente resultó el segundo de mejor comportamiento, aunque no se observaron diferencias significativas en la formación de embriones/mg de MF de callos en las dosis de 0.5, 1.0 y 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Similar comportamiento se apreció en el cultivar Piña blanca al no existir diferencias significativas en dosis comprendidas desde 0.5 hasta 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ. Sin embargo, estos resultados fueron significativamente inferiores a los obtenidos en el cultivar Cayena lisa de Oriente.

Al analizar la formación de plántulas/mg de MF de callos, se observó que existió una fuerte influencia del genotipo. De los tres cultivares que respondieron a la formación de los embriones, sólo el cultivar Española roja Pinareña logró regenerar plántulas, aunque estos valores resultaron muy bajos (Figura 20a). Las concentraciones de TDZ adicionadas a los medios de cultivo resultaron además determinantes en la respuesta de este genotipo. Los mayores valores de regeneración de las plántulas se obtuvieron con 1.0 mg.L⁻¹ de TDZ, 0.0022 plántulas/mg de MF de callos. Ello representó la formación de 2.86 plántulas promedio en el tratamiento. Estos valores de regeneración de las plántulas presentaron una eficiencia de sólo 0.3197% cuando se analizaron con respecto a los embriones formados/mg de MF de callos.

Tabla 5. Efecto del cultivo continuado en TDZ durante 45 días en la formación de embriones, plántulas y eficiencia en la regeneración de callos provenientes del cultivo *in vitro* de óvulos aislados.

| Genotipos | TDZ (mg.L ⁻¹) | Formación/mg de MF de callos: | | Eficiencia (%) (plántulas/embriones) |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---|
| | | embriones | plántulas | |
| Española roja Pinareña | 0.0 | 0.2158 ^f | 0.00019 ^f | 0.0880 ^e |
| | 0.5 | 0.4925 ^d | 0.00119 ^{bc} | 0.2416 ^b |
| | 1.0 | 1.3200 ^a | 0.00222 ^a | 0.3197 ^a |
| | 1.5 | 1.0872 ^b | 0.00139 ^b | 0.1279 ^d |
| | 2.0 | 0.5984 ^c | 0.00111 ^c | 0.1856 ^c |
| | 2.5 | 0.5843 ^c | 0.00106 ^d | 0.1814 ^c |
| | 3.0 | 0.3274 ^e | 0.00072 ^e | 0.1588 ^c |
| Piña blanca | 0.0 | 0.0098 ⁱ | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 0.0696 ^h | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 1.0 | 0.0737 ^h | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 1.5 | 0.0475 ^{hi} | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 2.0 | 0.0253 ⁱ | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 2.5 | 0.0000 ⁱ | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 3.0 | 0.0000 ⁱ | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| Cayena lisa de Oriente | 0.0 | 0.0110 ⁱ | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 0.5 | 0.1214 ^g | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 1.0 | 0.1279 ^g | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 1.5 | 0.0934 ^g | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 2.0 | 0.0905 ^{gh} | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 2.5 | 0.0764 ^h | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |
| | 3.0 | 0.0757 ^h | 0.00000 ^f | 0.0000 ^c |

| | | | | |
|----------|---|---------|----------|---------|
| ES X (±) | - | 0.0204* | 0.00016* | 0.0421* |
|----------|---|---------|----------|---------|

* Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para $p < 0.05$.

Los bajos valores de formación de plántulas obtenidos con el uso continuado del TDZ en los medios de cultivo pudieron estar relacionados con su alta actividad como citoquinina y no debiera considerarse como un efecto fitotóxico. Se conoce que el TDZ presenta una alta actividad como citoquinina y que a bajas concentraciones tienen un mayor efecto en la proliferación de los brotes cuando se compara con las citoquininas del grupo de las aminopurinas empleadas a altas concentraciones (Huetteman y Preece, 1993; Murthy et al., 1998). Ello pudo ser la causa de la baja formación de plántulas con el uso continuado del TDZ en el medio de cultivo.

Al analizar la formación de embriones/mg de MF de callos en los medios de cultivo con TDZ durante los primeros 15 días de cultivo, se observó que existieron diferencias entre los genotipos evaluados (Tabla 6). El cultivar Española roja resultó el de mejor comportamiento, con valores de 1.3978 y 1.0099 embriones/mg de MF de callos en los medios de cultivo con 1.0 y 1.5 mg.L^{-1} de TDZ. Estos medios resultaron significativamente superiores a las demás variantes empleadas. En los cultivares Piña blanca y Cayena lisa de Oriente, los valores de formación de embriones/mg de MF de callos no resultaron significativamente diferentes en todas las dosis de TDZ empleadas.

Luego de los callos embriogénicos ser transferidos a los 15 días en medios de cultivo MS con una combinación de BAP/ANA ($2.1:0.3 \text{ mg.L}^{-1}$) se observaron mayores valores de formación de plántulas/mg de MF de callos que los obtenidos en el cultivo continuado con TDZ. Existió un incremento además en la regeneración de las plántulas en Española roja Pinareña (Figura 20b). Este cultivar resultó el único que respondió en las condiciones ensayadas. Las mayores valores de regeneración ($0.3380 \text{ plántulas/mg de MF de callos}$) se presentaron en los callos que provenían del medio con 1.0 mg.L^{-1} de TDZ, ello

permitió obtener 435.34 plántulas promedio en el tratamiento. Estos valores resultaron significativamente diferentes a los observados en los callos embriogénicos que provenían de las demás dosis de TDZ. Por su parte, la eficiencia en la formación de las plántulas se incrementó con valores de hasta 24.1820%.

Los cultivares Piña blanca y Cayena lisa de Oriente se mantuvieron como genotipos recalcitrantes a la formación de las plántulas en las nuevas condiciones de cultivo ensayadas.

Castillo y Cistué (1993), sólo obtuvieron 0.95 y 0.50 plántulas de 5.24 y 5 callos formados en el cultivo de óvulos de dos genotipos de *Hordeum vulgare*. En *Cyclamen persicum* la regeneración de las plantas resultó dependiente del genotipo (Schwenkel y Winkelmann, 1998). Los autores refieren que de los cuatro genotipos que respondieron a la formación de los callos, uno de ellos resultó recalcitrante.

Tabla 6. Efecto del TDZ en la formación de embriones y en la regeneración de las plántulas y eficiencia de éstas al ser transferidos los callos a los 15 días a medios con BAP/ANA (2.1:0.3 mg.L⁻¹) en el cultivo *in vitro* de óvulos aislados.

| Genotipos | TDZ (mg.L ⁻¹) | Formación/mg de MF de callos: | | Eficiencia (%) (plántulas/embriones) |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---|
| | | embriones | plántulas | |
| Española roja Pinareña | 0.0 | 0.0199 ^c | 0.00021 ^d | 1.0553 ^d |
| | 0.5 | 0.5372 ^b | 0.11745 ^{bc} | 21.8633 ^b |
| | 1.0 | 1.3978 ^a | 0.33800 ^a | 24.1809 ^a |
| | 1.5 | 1.0099 ^a | 0.19450 ^b | 19.2593 ^d |
| | 2.0 | 0.5559 ^b | 0.12142 ^{bc} | 21.8421 ^{ab} |
| | 2.5 | 0.5425 ^b | 0.09948 ^c | 18.3373 ^e |
| | 3.0 | 0.4603 ^b | 0.09668 ^{bc} | 21.0298 ^c |
| Piña blanca | 0.0 | 0.0142 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 0.5 | 0.0742 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 1.0 | 0.0770 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 1.5 | 0.0410 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 2.0 | 0.0096 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 2.5 | 0.0056 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |

| | | | | |
|------------------------|-----|---------------------|----------------------|---------------------|
| | 3.0 | 0.0000 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| Cayena lisa de Oriente | 0.0 | 0.0142 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 0.5 | 0.1114 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 1.0 | 0.1378 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 1.5 | 0.1019 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 2.0 | 0.0942 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 2.5 | 0.0746 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| | 3.0 | 0.0654 ^c | 0.00000 ^d | 0.0000 ^f |
| ES X (±) | - | 0.1942 [*] | 0.0493 [*] | 1.1683 [*] |

* Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para $p < 0.05$.

El problema de la elongación de los brotes se pudo eliminar en un gran número de especies al transferirlos a un segundo medio sin TDZ o con un balance diferente de reguladores del crecimiento (Huetteman y Preece, 1993). Aunque no se conoce todavía la molécula receptora de citoquinina en piña, es posible que existieran diferencias entre los genotipos analizados en su mayor o menor afinidad por el TDZ que de las citoquininas del tipo de las aminopurinas. En este sentido, los embriones obtenidos en Española roja Pinareña presentaron mayor afinidad por las concentraciones de TDZ empleadas que los demás genotipos. De ello resultó la gran influencia del genotipo en su respuesta a la formación de los brotes. Las plantas del cultivar Española roja Pinareña que se aclimataron en las casas de vegetación mostraron un crecimiento favorable (Figura 21).

El efecto de las citoquininas es más notable en el cultivo de tejidos para estimular la división celular y controlar la morfogénesis. Adicionados a los medios de proliferación, estos compuestos superan la dominancia apical y liberan las yemas laterales. El TDZ es un tipo de citoquinina que se ha utilizado en la micropropagación de un gran número de especies (Kim et al., 1997; Claxton et al., 1998; Faure et al., 1998; Lakshmi Sita et al., 1998; Lin et al., 1998; Murthy et al., 1998; Raviv et al., 1998). En las plantas medicinales, el TDZ también ha tenido un gran efecto en la estimulación de la proliferación de brotes, y mejoró la formación de los callos (Kim et al., 1997; Sudhakar Johnson et al., 1997; Al-Juboory et al., 1998; Nyochembeng y Garton, 1998).

1 De ello resultó la gran influencia del genotipo en su respuesta a la formación de los
2 brotes. Las plantas del cultivar Española roja Pinareña que se aclimataron en las casas de
3 vegetación mostraron un crecimiento favorable (Figura 21). El efecto de las
4 citoquininas es más notable en el cultivo de tejidos para estimular la división
5 celular y controlar la morfogénesis. Adicionados a los medios de proliferación,
6 estos compuestos superan la dominancia apical y liberan las yemas laterales. El
7 TDZ es un tipo de citoquinina que se ha utilizado en la micropropagación de un
8 gran número de especies (Kim et al., 1997; Claxton et al., 1998; Faure et al.,
9 1998; Lakshmi Sita et al., 1998; Lin et al., 1998; Murthy et al., 1998; Raviv et al.,
10 1998). En las plantas medicinales, el TDZ también ha tenido un gran efecto en la
11 estimulación de la proliferación de brotes, y mejoró la formación de los callos (Kim
12 et al., 1997; Sudhakar Johnson et al., 1997; Al-Juboory et al., 1998;
13 Nyochembeng y Garton , 1998).

El efecto de las citoquininas es más notable en el cultivo de tejidos para estimular la división celular y controlar la morfogénesis. Adicionados a los medios de proliferación, estos compuestos superan la dominancia apical y liberan las yemas laterales. El TDZ es un tipo de citoquinina que se ha utilizado en la micropropagación de un gran número de especies (Kim et al., 1997; Claxton et al., 1998; Faure et al., 1998; Lakshmi Sita et al., 1998; Lin et al., 1998; Murthy et al., 1998; Raviv et al., 1998). En las plantas medicinales, el TDZ también ha tenido un gran efecto en la estimulación de la proliferación de brotes, y mejoró la formación de los callos (Kim et al., 1997; Sudhakar Johnson et al., 1997; Al-Juboory et al., 1998; Nyochembeng y Garton , 1998).

4.1.3 Partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado.

4.1.3.1 Efecto radiobiológico de las radiaciones gamma de ^{60}Co en polen del cultivar Española roja Pinareña.

Al evaluar el efecto radiobiológico de los radiaciones gamma en polen del cultivar Española roja Pinareña se observó una dependencia de la viabilidad del polen y el crecimiento *in vitro* del tubo polínico con las diferentes dosis de radiaciones (Figuras 22 y 23). Ello se demostró por los altos valores de correlación y coeficientes de determinación encontrados entre las dos variables estudiadas y las dosis de radiaciones.

Las variables analizadas disminuyeron significativamente con el incremento de las diferentes dosis de radiación. Sin embargo, en las dosis de radiación de 0 y 1 kGy, no existieron diferencias significativas tanto en los valores de viabilidad (50.16 y 48.70% respectivamente) como en el crecimiento *in vitro* del tubo polínico (555.67 y 549.7 μm respectivamente). Por otra parte, a partir de la dosis de 1 kGy comenzaron a diferenciarse significativamente los valores de reducción de viabilidad y crecimiento *in vitro* del tubo polínico.

Existió además un decrecimiento absoluto de los valores de viabilidad y longitud del tubo polínico con la mayor dosis de radiación (6 kGy). Para la viabilidad y el crecimiento *in vitro* del polen en el cultivar Española roja Pinareña, el $\text{GR}_{(20)}$ se alcanzó entre los 2 y 2.2 kGy y el $\text{GR}_{(50)}$ en las dosis comprendidas entre 3.4 y 3.8 kGy respectivamente.

Este estudio permitió conocer además la alta radio-resistencia del polen en el cultivar de piña Española roja Pinareña, que resultó incluso superior a los resultados obtenidos en otras especies de plantas (Cuny y Roudot, 1991; Rohilla y Khanna, 1993). Los resultados tienen una alta correspondencia con los obtenidos por Cuny y Roudot (1991) los cuales señalaron la necesidad de altas

dosis de radiación (4 kGy) para alcanzar la completa inhibición del tubo polínico en los estudios realizados con polen irradiado de la especie *Cucumis melo* L. Los autores encontraron además un efecto retardado en la velocidad de crecimiento del tubo polínico con el incremento de las dosis de radiación. En variedades de *Hordeum vulgare* L., y *Triticum aestivium* L. se observaron además reducciones de la viabilidad y el crecimiento *in vitro* del tubo polínico a medida que se incrementaron las dosis de radiaciones (Rohilla y Khanna, 1993).

Un buen conocimiento de la radiosensibilidad del polen es esencial para entender los diferentes procesos fisiológicos inducidos en el polen irradiado. Estos pueden ser obtenidos por un análisis de la germinación *in vitro* del grano de polen. Los porcentajes de granos de polen germinados y el crecimiento polínico *in vitro* brinda una idea del poder germinativo *in vivo* y la aptitud del polen irradiado para penetrar en el estilo y los óvulos (Cuny y Roudot, 1991; IAEA, 1995, González, 1998).

Resultó evidente que las radiaciones gamma de ^{60}Co afectaron las estructuras y contenido nuclear de los granos de polen. Ello imposibilitó la formación o normal crecimiento de los tubos polínicos de los granos de polen irradiados cultivados *in vitro*. Muhanna et al., (1991) demostraron en *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi Dulieu* que los rayos gamma provocaron afectaciones cariológicas y citológicas en la ontogénesis y viabilidad *in vitro* del grano de polen, donde los autores refieren rupturas de las células del tapete localizadas en las células madres del polen.

De esta forma, el conocimiento de la radiosensibilidad en piña permitió iniciar los trabajos sobre polinización con polen irradiado con vistas a obtener plantas haploides. En este sentido se pudiera utilizar como primer criterio de radiosensibilidad para realizar las primeras polinizaciones con polen irradiado con vistas a lograr plantas haploides en el cultivar Cayena lisa Serrana la GR₍₂₀₎. Este 20% de reducción de la viabilidad y crecimiento *in vitro* del tubo polínico en

Española roja Pinareña se obtuvo en las dosis comprendidas entre los 0 y 2.0 kGy.

4.1.3.2 Efecto de las polinizaciones en el cultivar Cayena lisa Serrana con polen irradiado del cultivar Española roja Pinareña.

Al analizar los resultados de las fecundaciones realizadas en el cultivar Cayena lisa Serrana con polen irradiado del cultivar Española roja Pinareña, a rangos de dosis de 0 a 2.0 kGy, se encontró que la viabilidad *in vitro* del polen se afectó a medida que aumentaron las dosis de radiaciones (Tabla 7). Sin embargo, no existieron diferencias significativas importantes entre las dosis de 0 y 1.25 kGy. En estos rangos de dosis de radiación los valores de viabilidad *in vitro* del polen irradiado se encontraron entre 38.01 y 42.02%. Por otra parte, a partir de la dosis de 1.50 kGy se observaron valores de viabilidad *in vitro* del polen irradiado significativamente inferiores.

Similares afectaciones ocurrieron al evaluar la influencia de las polinizaciones con polen irradiado en la formación de semillas, embriones germinados y plántulas regeneradas. El número promedio de semillas formadas decreció a medida que aumentaron las dosis de radiaciones. Los mayores valores se observaron con la dosis de 0 kGy (112.38). En las dosis de 1.75 y 2.0 kGy no se logró obtener semillas.

Tabla 7. Efecto de las polinizaciones en el cultivar Cayena lisa Serrana con polen irradiado del cultivar Española roja Pinareña.

| Dosis | Viabilidad <i>in vitro</i> | Semillas | Embriones | Plántulas |
|-------|----------------------------|----------|-----------|-----------|
|-------|----------------------------|----------|-----------|-----------|

| (kGy) | <i>vitro</i> (%) | formadas | germinados | regeneradas |
|----------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 39.43 ^{ab} | 112.38 ^a | 98.34 ^a | 84.63 ^a |
| 0.25 | 38.01 ^b | 94.26 ^b | 4.23 ^b | 2.01 ^b |
| 0.50 | 38.48 ^b | 2.83 ^{cd} | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| 0.75 | 41.15 ^a | 1.94 ^{cd} | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| 1.00 | 42.02 ^a | 4.28 ^c | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| 1.25 | 40.28 ^{ab} | 3.01 ^{cd} | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| 1.50 | 31.63 ^d | 1.17 ^{de} | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| 1.75 | 35.21 ^c | 0.00 ^e | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| 2.00 | 32.16 ^d | 0.00 ^e | 0.00 ^c | 0.00 ^c |
| ES X (±) | 2.59 [*] | 1.82 [*] | 0.84 [*] | 0.31 [*] |

* Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para $p < 0.05$.

El efecto del polen irradiado resultó más marcado en los embriones germinados y plántulas formadas. Sólo los embriones obtenidos en la dosis de radiación de 0.25 kGy germinaron (4.23), aunque estos valores resultaron significativamente inferiores a los obtenidos con el control (98.34). De los 4.23 embriones germinados como promedio sólo se obtuvieron 2.01 plántulas promedio.

En este experimento se obtuvieron muy bajos valores de regeneración de plántulas debido al marcado efecto del polen irradiado sobre los parámetros estudiados. Ello pudo deberse quizás a las altas dosis de radiaciones utilizadas en estos estudios iniciales. En este aspecto se conoce que las dosis de radiaciones utilizadas en los trabajos de partenogénesis *in situ* no debieran ser tan alta como para que inhiba la germinación del tubo polínico, pero sí lo suficientemente elevada para que provoque disturbios en la fertilización normal y de esta forma evitar el desarrollo de embriones híbridos diploides (Cuny y Roudot, 1991; Zhang y Lespinasse, 1991).

Como consecuencia de los resultados obtenidos con anterioridad se realizó el segundo experimento sobre fecundación con polen irradiado con dosis comprendidas entre 0 y 1.0 kGy (Tabla 8). Los resultados demostraron que los porcentajes de viabilidad *in vitro* del polen irradiado en el cultivar Española roja Pinareña no se afectaron por las diferentes dosis de radiación que se aplicaron.

De igual forma, la viabilidad *in vitro* del polen irradiado no tuvo un efecto significativo sobre la formación de las semillas, ya que se observó una tendencia al decrecimiento de estos valores hasta la dosis de 0.6 kGy. A partir de esta dosis de radiación se observaron incrementos y decrecimientos en los valores de formación de semillas.

Tabla 8. Efecto de las polinizaciones en el cultivar Cayena lisa Serrana con polen irradiado del cultivar Española roja Pinareña.

| Dosis (kGy) | Viabilidad <i>in vitro</i> (%) | Semillas formadas | Embriones germinados | Plántulas regeneradas |
|-------------|--------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| 0 | 40.40 ^b | 120.18 ^a | 111.75 ^a | 103.24 ^a |
| 0.1 | 41.78 ^{ab} | 88.24 ^b | 50.42 ^b | 23.53 ^b |
| 0.2 | 38.39 ^b | 83.33 ^b | 5.98 ^c | 2.51 ^c |
| 0.3 | 42.51 ^{ab} | 53.75 ^c | 2.57 ^d | 0.00 ^d |
| 0.4 | 40.87 ^{ab} | 13.28 ^d | 0.94 ^d | 0.00 ^d |
| 0.5 | 38.48 ^b | 3.05 ^f | 0.00 ^e | 0.00 ^d |
| 0.6 | 42.67 ^{ab} | 3.12 ^f | 0.00 ^e | 0.00 ^d |
| 0.7 | 41.15 ^{ab} | 2.08 ^f | 0.00 ^e | 0.00 ^d |
| 0.8 | 42.73 ^{ab} | 5.27 ^e | 0.00 ^e | 0.00 ^d |
| 0.9 | 41.92 ^{ab} | 7.03 ^e | 0.00 ^e | 0.00 ^d |
| 1.0 | 43.02 ^a | 6.91 ^e | 0.00 ^e | 0.00 ^d |
| ES X (±) | 2.37 [*] | 1.88 [*] | 1.48 [*] | 0.53 [*] |

* Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para p<0.05.

A medida que aumentaron las dosis de radiaciones se encontró una fuerte inhibición en la germinación de los embriones y conversión de éstos a plántulas. Dosis superiores a 0.2 y 0.4 kGy suprimieron la germinación de los embriones y la regeneración de las plántulas respectivamente. Además de la dosis de 0 kGy (103.24), sólo respondieron a la regeneración de las plantas las dosis de 0.1 y 0.2 kGy con 23.53 y 2.51 de plántulas como promedio respectivamente. Ello posibilitará contar con mayor número de plantas en la realización de los análisis de las técnicas citogenéticas.

Al analizar la viabilidad *in vitro* del polen irradiado en manzano y cacao, Zhang y

Lespinasse (1991) y Falque et al., (1992) no encontraron diferencias significativas a dosis comprendidas entre 0 y 0.1 kGy. Por su parte, Adu-Ampomah et al., (1991) encontraron un gran efecto de las dosis de radiaciones sobre la germinación del polen en *Theobroma cacao* L., a dosis comprendidas de 0 y 0.08 kGy. En este aspecto, Rohilla y Khanna (1993) concluyeron que los porcentajes de germinación del polen en *Hordeum vulgare* L., y *Triticum aestivium* L., no presentaron un efecto significativo sobre la formación de las semillas.

Al polen irradiado también se le encontró un efecto marcado en el contenido de las semillas formadas en cada una de las dosis empleadas (Figuras 24, 25 y 26). Se encontraron tres tipos de semillas: semillas vacías, las cuales sólo presentaron el tegumento; semillas sólo con embrión, las que estaban desprovistas del endospermo; y las semillas completas, o sea que presentaban endospermo + embrión.

El contenido de las semillas resultó dependiente de las dosis de radiaciones cuando se analizó con respecto a los valores obtenidos con el testigo (0 kGy). Los menores porcentajes (2.52%) de semilla vacías se obtuvieron con el testigo (Figura 24). Estos valores se incrementaron significativamente hasta la dosis de 0.7 kGy. A partir de los 0.7 kGy y hasta 1.0 kGy se observaron valores similares de formación de semillas vacías. Similar comportamiento mostraron las semillas que presentaron sólo embriones (Figura 25). Los menores porcentajes se obtuvieron con el testigo, para luego incrementarse significativamente los mismos hasta las dosis de 0.5 y 0.6 kGy. A partir de estas dosis de radiaciones existió un decrecimiento absoluto de los porcentajes de semillas que presentaron sólo embriones.

Al analizar los porcentajes de semillas completas se observó un comportamiento diferente a los obtenidos con las semillas vacías y sólo con embriones (Figura 26), donde los mayores porcentajes se obtuvieron con el testigo, 96.57%. Una

reducción significativa se observó con el incremento de las dosis de radiaciones. A partir de la dosis de 0.5 kGy se observaron valores absolutos de decrecimiento de las semillas completas formadas.

En los estudios realizados en diferentes genotipos de *Malus x domestica*, Zhang y Lespinasse (1991) encontraron afectaciones en la formación de los frutos, el número y el contenido de éstas al realizar polinizaciones con polen irradiado. Similares resultados se obtuvieron en *Theobroma cacao* por Falque et al., (1992) donde las radiaciones gamma del polen afectaron todas las variables analizadas.

Las diferencias en el número de semillas formadas y el contenido de éstas en las diferentes dosis de radiación (a pesar de no existir diferencias en la viabilidad *in vitro* del polen) se explicaron cuando se estudiaron las divisiones mitóticas haploides de los núcleos del polen (Figura 27). Los sucesos típicos de la mitosis haploide se observaron con el testigo (0 kGy). Durante la elongación del tubo polínico, el núcleo generativo inicialmente localizado en el grano de polen (Figura 27.1) emigró en el tubo (Figuras 27.2 y 27.3) y se dividió en dos células espermáticas (Figura 27.4).

Los altos valores de formación de semillas completas observados en el testigo (0 kGy), se explican al analizar las divisiones mitóticas haploides normales que ocurrieron durante el desarrollo ontogénico del crecimiento *in vitro* del tubo polínico. Sin embargo, las radiaciones gamma afectaron esta segunda división mitótica haploide provocando perturbaciones en la fecundación (Figura 28). Ello posibilitó que el proceso de fecundación resultara incompleto con consecuencias desfavorables para la formación de semillas completas y semillas sólo con embriones y favorables a su vez para que se incrementaran los valores de semillas vacías.

El mecanismo de inducción de la partenogénesis mediante la utilización de las radiaciones gamma de ^{60}Co pudiera estar determinado por los efectos anteriores.

Al existir perturbaciones en las divisiones mitóticas de las células espermáticas es posible que los núcleos polares se fertilizaran con un núcleo generativo, sin que ocurriera la fertilización de la oosfera con lo cual se obtendría un albumen triploide normal y un embrión haploide. Esto justificaría la posible formación de plantas haploides con el empleo de este método en piña.

Existió un decrecimiento de las divisiones de las células espermáticas con el incremento de las dosis de radiaciones. La DL_{50} se alcanzó entre los 0 y 0.1 kGy, lo que demuestra una alta sensibilidad de las células generativas a las radiaciones gamma de ^{60}Co . Por su parte, una completa inhibición de la segunda mitosis haploide del polen se observó a partir de 0.5 kGy.

Grant et al., (1980) observaron inhibición de la segunda mitosis del polen en *Nicotiana*, con rangos de dosis de 0.25 a 1.0 kGy. Por otra parte, Lecuyer et al., (1991) en *Malus* no encontraron alteraciones cuantitativas de la segunda mitosis haploide del polen con radiaciones gamma comprendidas entre los 0.5 y 5.0 kGy respectivamente.

5.0 Conclusiones

1. Se establecieron tres metodologías para la obtención de plantas haploides en piña a partir del cultivo *in vitro* de anteras, óvulos aislados y la partenogénesis *in situ* inducida mediante polinización con polen irradiado.
2. En el cultivo *in vitro* de anteras y óvulos aislados, el Dicamba resultó favorable para la formación de embriones y callos. Los mayores valores de formación de

plántulas se obtuvieron cultivando los callos embriogénicos primero durante 15 días en medios MS + TDZ, y luego transfiriendo éstos a medios con BAP/ANA.

3. En la partenogénesis *in situ*, las variables analizadas se relacionaron con las radiaciones gamma de ^{60}Co . Las afectaciones que presentaron las divisiones de las células espermáticas del grano de polen a 0.1 kGy resultaron la causa de la inducción de las plantas haploides en el cultivar Cayena lisa Serrana.

4. Los estudios histo-citológicos realizados en el cultivo de anteras demostraron que los embriones y callos se formaron a partir de las microsporas. En el cultivo de óvulos aislados, la formación de los callos ocurrió tanto a partir de las células haploides del saco embrionario como del tejido somático.

5. Las variables citológicas y anatómicas analizadas en las hojas se relacionaron con los diferentes niveles de ploidía de las plantas regeneradas en los métodos de obtención de plantas haploides. Las plantas haploides presentaron menor densidad estomática que las plantas diploides, pero mayor que las plantas triploides. La longitud y ancho de los estomas, así como el número de cloroplastos dentro de las células estomáticas se incrementó con los niveles de ploidía de las plantas.

6. El método de haploidización y el genotipo tuvieron un efecto marcado en la obtención de plantas haploides. El cultivo *in vitro* de anteras brindó los mejores resultados y los genotipos con mayor respuesta resultaron: Española roja, Cayena lisa de Oriente, Cayena lisa Serrana y Piña blanca.

6.0 Recomendaciones

1. Emplear las metodologías del cultivo *in vitro* de anteras y la partenogénesis *in situ* mediante polinización con polen irradiado para la obtención de plantas haploides en los genotipos de piña de interés.
2. Utilizar los caracteres citológicos y anatómicos de las hojas como método indirecto para realizar los *screening* masivos de los niveles de ploidía de las plantas que se obtengan en el programa de haploides en piña.
3. Continuar los trabajos en el programa de haploides hasta obtener los progenitores homocigóticos e incorporarlos a los programas de mejoramiento genético del cultivo de la piña.
4. Considerar los aportes científicos de esta tesis para su uso en los programas de estudio de la enseñanza superior y de postgrado especializado.

7.0 Referencias

- Adu-Ampomah Y, Novak FJ, Klu GYP, Lamptey TVO (1991)** Use of irradiated pollen as mentor pollen to induce self-fertilization of two self-incompatible-upper Amazon cacao clones. *Euphytica* 51:219-225
- Ahmim M, Vieth J (1996)** Production de plantes haploides de *Gerbera jamesonii* par culture *in vitro* d'ovules. *Can.J.Bot.* 64:2344-2357
- Aitcken-Christie J (1995)** Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. En: (Aitcken-Christie J, Kozai T, Smith MAL, eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht p. 1-18
- Akashi R, Hashimoto A, Adachi T (1993)** Plant regeneration from seed-derived embryogenic callus and cell suspension cultures of bahiagrass (*Paspalum notatum*). *Plant Science* 90:73-80
- Aldemita RR, Zapata FJ (1991)** Anther culture of rice: effects of radiation and media components on callus induction and plant regeneration. *Cereal Research Communications* 19(1-2):9-32
- Alemanno L, Berthouly M, Michaux-Ferrière N (1996)** Histology of somatic embryogenesis from floral tissue cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:187-194
- Al-Juboory KH, Skirvin RM, Williams DJ (1998)** Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Horticulturae* 72:171-178
- Almeida WAB, AP de Matos, A da Souza (1997)** Effects of Benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae* 425:235-242
- Amrani N, Sarrafi A, Alibert G (1993)** Genetic variability for haploid production in crosses between tetraploid and hexaploid wheat with maize. *Plant Breed.* 110:123-128

- Arias E, Benega R, Isidrón M, Cisneros A, Aragón A, Martínez J (1997)** Tinción de núcleos polínicos en piña para evaluar su división *in vitro* en programas de mejoramiento. *Cultivos Tropicales* 18(1):24-26
- Bajaj YPS (1983)** *In vitro* production of haploids. En: (Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y, eds). *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol 1. *Techniques for Propagation and Breeding*. MacMillan Publisher, New York p. 228-287
- Benega R, Isidrón M, Martínez J, Arias E, Pérez S, Marrero P (1994)** Estudio sobre la dinámica de la apertura floral y estructuras anatómicas de las hojas en dos cultivares de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) (I). *Centro Agrícola* 21(3):29-38
- Benega R, Isidrón M, Cisneros A, Arias E, Daquinta M, Companioni L (1996)** Inducción de callos en anteras de piña. *Cultivos Tropicales* 17(1):72-74
- Benega R, Isidrón M, Daquinta M, Cisneros A, Arias E, Martínez J, Hidalgo M (1997a)** Estudio comparativo entre dos cultivares de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae* 425:171-177
- Benega R, Cisneros A, Isidrón M, Ramos JA, Martínez J, Pérez G, Arias E, Hidalgo M (1997b)** Obtención y selección de híbridos promisorios de piña entre Cayena lisa Serrana y Española roja. *Cultivos Tropicales* 18(3):72-75
- Bensaad ZM, Hennerty MJ (1996)** Effects of cold pretreatment, carbohydrate source and gelling agents on somatic embryogenesis from anthers of *Vitis vinifera* L. cvs. 'Regina' and 'Reichensteiner'. *Acta Horticulturae* 440:504-509
- Bhowmik G y Bhagabati A (1975)** Self-incompatibility studies in pineapple (*Ananas comosus* L.). *Indian Agric.* 19(2):259-265
- Bhowmik G (1977)** Meiosis in two varieties of pineapple. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 37(1):1-4
- Biddington NL, Robinson HT (1991)** Ethylene production during anther culture of Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:169-177

- Biddington NL, Robinson HT, Lynn JR (1993)** ABA promotion of ethylene production in anther culture of Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and its relevance to embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 88:577-582
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham M, Bergner AD (1922)** A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55:646-647
- Brewbaker JL, Gorrez DD (1967)** Genetics of self-incompatibility in the monocot genera, *Ananas* (Pineapple) and *Gasteria*. *Am. J. Bot.* 54:611-616
- Brown GK (1989)** Stigma types in *Bromeliaceae*. A systematic survey. *Systematic Botany* 14(1):110-132
- Buter B, Pescitelli SM, Berger K, Schmid JE, Stamp P (1993)** Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. *Plant Cell Reports* 13:79-82
- Cabot C (1987)** Practice of pineapple breeding. *Acta Horticulturae* 196:25-36
- Cai A, Szarejko I, Polok K, Maluszynski M (1992)** The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. *Plant Breeding* 109:218-226
- Camargo FC, Smith LB (1968)** A new species of *Ananas* from Venezuela. *Phytologia* 16(6):464-465
- Carneiro LA, Cândido MSD, Araujo RFG, Fonseca MHPB, Crocomo OJ, Mansur E (1998)** Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, endemic stoloniferous *Bromeliaceae* specie from Río de Janeiro, Brazil. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4(3-4):152-158
- Castillo AM, Cistue L (1993)** Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Reports* 12:139-143
- Chase SS (1963)** Analytic breeding of *Solanum tuberosum* L. *Can J. Genet. Cytol.* 5:359-363
- Chase SS (1969)** Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Bot. Rev.* 35:117-167

- Chen FQ, Hayes PM (1991a)** Effect of exogenous plant growth regulators on *in vitro* seed growth, embryo development, and haploid production in a cross between *H. vulgare* (L.) and *H. bolbosum* (L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26:179-184
- Chen FQ, Hayes PM (1991b)** Wide hybridization of *Hordeum vulgare* x *Zea mays*. *Genome* 34:603-605
- Chen Y, Kenaschuk EO, Procnier D (1998)** Plant regeneration from anther culture in Canadian cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica* 102:183-189
- Chu CC (1982)** Haploid in plant improvement. En: (Vasil IK, Scowcroft WR, Frey KJ, eds). *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*. Academic Press, New York p. 129-158
- Chu I (1995)** Economic analysis of automated micropropagation. En: (Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL, eds). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht p. 19-27
- Claxton JR Arnold DL, Clarkson JM, Blakesley D (1998)** The regeneration and screening of watercress somaclones for resistance to *Spongospora subterranea* f. sp. *nasturtii* and measurement of somaclonal variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52:155-164
- Coppens G, Duval MF (1995)** Bases genéticas para definir una estrategia de mejoramiento de la piña. *Rev. Fac. Agron., Maracay* 21:95-118
- Coumans M, Zhong D (1995)** Doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or artificial? Part2. *in vitro* isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41:203-209
- Cuny F, Roudot AC (1991)** Germination et croissance pollinique *in vitro* du pollen de melon (*Cucumis melo* L.) apres irradiations gamma. *Environmental and Experimental Botany* 31(3):277-283
- D'Halluin K, Keimer B (1986)** Production of haploid sugarbeets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. En: (Horn W, Jensen CJ, Odenbach W, Schieder O, eds). *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Walter de Gruyter, Berlin p. 307-309

- Dalldorf ER (1990)** Plant selection: Multiple tops in Smooth Cayenne pineapples. Farming in South Africa. Pineapples C-2
- Daquinta M, Benega R (1997)** Brief review of tissue culture of pineapple. Pineapple News 3(1):7-9
- Daquinta M, Cisneros A, Rodríguez Y, Pérez MC, Lunas I, Borroto C (1997)** Embriogénesis somática en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Acta Horticulturae 425:251-257
- Daquinta M (1998)** Propagación *in vitro* de la piña *Ananas comosus* (L.) Merr. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNICA 96 p
- De Wald MG, Moore GA, Sherman WB (1988)** Identification of pineapple cultivars by isozyme genotypes. J. Am.Soc.HortSci. 113:935-938
- Devaux P, Hou L, Ullrich SE, Huang Z, Kleinhofs A (1993)** Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Reports 13:32-36
- Doré C, Marie F (1993)** Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa* L.) after crossing with irradiated pollen. Plant Breeding 11:142-147
- Doré C, Bouldard L, Sauton A, Rode JC, Cuny F, Niemirowiecz-Szczytt K, Sari N, Dumas de Vaulx R (1995)** Interest of irradiated pollen for obtaining haploid vegetables. Acta Horticulturae 392:123-128
- Drew RA, Considine JA, McComb JA (1993)** Effect of fructose on growth of papaw shoot explant *in vitro*. Aust.J.Bot. 41:739-748
- Ekis H, Konzak CF (1991)** Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat. III. Common wheat crosses. Crop Sci. 31(6):1432-1436
- Escalona M (1999)** Propagación de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNICA 108 p
- Espinosa P (1997)** Nuevos elementos relacionados con la regeneración de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad Cayena lisa Serrana. Trabajo de Diploma. UNICA 40p.

Etienne H, Lartaud M, Michauxferriere N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull Arg.) using the temporary inmersión technique. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33(2):81-87

Falque M, Kodja AA, Sounigo O, Eskes AB, Charrier A (1992) Gamma-irradiation of cacao (*Theobroma cacao* L.) pollen: Effect of pollen grain viability, germination and mitosis and on fruit set. *Euphytica* 64:167-172

FAO (1998) Production yearbook. FAO, Rome

Faure O, Diemer F, Moja S, Jullien F (1998) Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52:209-212

Ferrie AMR, Palmer CE, Keller WA (1994a) Biotechnological applications of haploids. En: (Shorgool PD, Ngo TT, eds). *Biotechnological Applications of Plant Cultures*. CRC. Press, Boca Raton p. 77-110

Ferrie AMR, Palmer CE, Keller WA (1994b) Haploid embryogenesis. En: (Thorpe TA, ed). *In vitro* embryogenesis in plant. Kluwer Academic Publishers, Dordrech p. 309-344

Ferrie AMR, Keller WA (1995) Microspore culture for haploid plant production. En: (Gamborg OL, Phillips GC, eds). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental methods*. Springer-Verlag, Berlin p. 155-164

Ferrie AMR, Palmer CE, Keller WA (1995) Haploid embryogenesis. En: (Thorpe TA, ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrech p. 309-344

Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1990) Recurrent selection with haploid steps, a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theoretical and Applied Genetics* 80:564-568

Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1993) Andro and parthenogenesis. Principles and Prospects. En: (Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I, eds). *Plant Breeding*. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London

- Gautheret RJ (1985)** History of plant tissue and cell culture: a personal account. En: (Vasil IK, ed). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 2. Academic Press Inc., New York p. 1-59
- George EF (1993)** Plant growth regulators. En: (Butler & Tanner, eds). Vol. 1. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd., UK p. 420-479
- Ghaemi M, Sarrafi A, Alibert G (1994)** The effects of silver nitrate, Colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:355-359
- Giacometti DC (1978)** Melhoramento genética de abacaxi. 1º Encontro de abacaxicultura, Feira de Santana p. 25-37
- Gilmartin AJ, Brown GK (1986)** Cladistic test of hypotheses concerning evolution of xerophytes and mesophytes within *Tillandsia* subg. *Phytarrhiza* (*Bromeliaceae*). Amer. J. Bot. 73(3):387-397
- Gilmartin AJ, Brown GK, Varadarajan GS, Neighbours M (1989)** Status of *Glumeropitcairnia* within evolutionary history of *Bromeliaceae*. Systematic Botany 14(3):339-348
- González ME (1998)** Mejoramiento por hibridación de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Cuba. Tesis presentada en opción al gardo científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UAH 94 p.
- González R, Dominguez Q, Expósito LA, González JL, Martínez T, Hidalgo M (1997)** Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* en la adaptación de vitroplántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cv. 'Cayena lisa'. Acta Horticulturae 425:277-284
- Grant JE, Pandey KK, Willians EJ (1980)** Pollen nuclei after ionizing irradiation for egg transformation in *Nicotiana*. N.Z.J. Bot. 18:339-341
- Guha S, Maheshwari SC (1964)** *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204:497

- Gupta PK (1997)** Haploid in higher plants. En: (Rakesh R, ed). Cytogenetics. Rastogi publications, Educational Publishers, Shivaji, Road, Meerut, Delhi India p. 109-131
- Gursoz N, Abak K, Pitrat M, Rode JC, Dumas de Vaulx R (1991)** Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genetics Cooperative 14:109
- Hansen AL, Plever C, Pederson HC, Keimer B, Andersen SB (1994)** Efficient *in vitro* chromosome doubling during *Beta vulgaris* ovule. Plant Breeding 112:89-95
- Hernández AR (1954)** Relationship between chromosome number and stomata size in certain pineapple varieties. J. Agr. Univ. P.R. 38(4):199-204
- Hernández A, Pérez JM, Bosh D (1995)** Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Ciudad de la Habana:IS-MINAGRI 45p.
- Hu H (1992)** Germplasm enhancement by anther culture in *Triticeae*. Hereditas 116:151-154
- Huetteman CA, Preece JE (1993)** Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33:105-119
- IAEA (1995)** Mutagenic radiation. En: (Joint FAO/IAEA, eds). Vol. 19. Manual on Mutation Breeding. Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. Austria p. 7-43
- Jähne A, Lazzeri PA, Järggussen M, Lörz H (1991)** Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics 82:74-80
- Johansen DA (1940)** Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York p. 27-204
- Keller J (1990a)** Haploids from unpollinated ovaries of *Allium cepa* single plant screening haploid determination, and long term storage. En: (Nijkamp HJJ, Pla LHW, Vander IJ, Aatrijk JV, eds). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Publishers, Amsterdam p. 275-279
- Keller J (1990b)** Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction *via* gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica 47:241-247

- Kerns KR, Collins JL (1947)** Chimeras in pineapple. Colchicine induced tetraploids and diploid-tetraploids in the Cayenne variety. *J. Hered.* 32:322-330
- Khan SAKU, Rabhani MG (1999)** Effects of different media compositions and bud size on anther culture of papaya. 3rd International Plant Tissue Cult. Conf. 8-10 March, Bangladesh p. 18
- Kieffer M, Fuller MP, Chauvin JE, Schlessner A (1993)** Anther culture of Kale (*Brassica oleracea* L. covar. *acephala* (DC.) Alef.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:303-313
- Kihara M, Fukuda K, Funatsuki H, Kishinami I, Aida Y (1994)** Plant regeneration through anther culture of three wild species of *Hordeum* (*H. murinum*, *H. marinum* and *H. bulbosum*). *Plant Breeding* 112:244-247
- Kim MK, Sommer HE, Bongarten BC, Merkle SA (1997)** High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. *Plant Cell Reports* 16:536-540
- Kim MS, Schumann CM, Klopfenstein NB (1997)** Effects of thidiazuron and benzyladenina on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. *Plant Cell, Tissue and organ Culture* 48(45-52)
- Kimber G, Riley R (1963)** Haploid angiosperms. *Bot. Rev.* 29:480-531
- Kindiger B, Hamann L (1993)** Generation of haploids in maize: A modification of the indeterminate gametophyte (ig) system. *Crop Sci.* 33:342-344
- Kinjo K (1993)** Inheritance of leaf margin spine in pineapple. *Acta Horticulturae* 334:59-66
- Kinoshita T, Mori K (1991)** Somaclonal selection of physiological mutants through rice cell culture. *Cereal Research Communications* 19(1-2):131-146
- Kitto S (1997)** Commercial micropropagation. *HortScience* 32(6):1012-1014
- Kott L (1996)** Doubled haploid technology accelerates canola breeding. En: (Meerveld R, ed). *Agri-Food Research.* 19(2):17-18
- Koul AK, Dhar MK (1998)** Plant aneuploids: suggestions for their classification. *Euphytica* 104:95-106

- Krishnaraj S, Sreeranga SR (1993)** *In vitro* salt tolerance screening in long-term anther culture of rice (*Oriza sativa* L.) variety IR50. J. Plant. Physiol. 42:754-758
- Kubaláková M, Dolezel J, Lebeda A (1996)** Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus cultures. Biologia Plantarum 38(3):475-480
- Kumlehn J, Nitzsche W (1995)** Plant regeneration from isolated ovules of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and different cytokinins supplemented to the ovule culture medium. Plant Science 111:107-116
- Lakshmi Sita G, Singh R, Iyer CPA (1974)** Plantlets through shoot-tip cultures in pineapple. Current Sciences 43(22):724-725
- Lakshmi Sita G, Sreenivas GL, Bhattacharya A (1998)** *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. Plant Tissue Culture and Biotechnology 4(3-4):189-195
- Leal F, Antoni MG (1978)** Sobre las especies del género *Ananas* y su distribución novedosa para Venezuela. Agronomía Tropical 28(4):313-320
- Leal F, Antoni MG (1981)** Especies del género *Ananas*: Origen y distribución geográfica. Rev. Fac. Agron., Maracay 29:5-12
- Leal F, Coppens G (1996)** Pineapple. En: (Janick J, Moore JN, eds). Vol. 1. Tree and Tropical Fruits. John Wiley Sons Inc., New York p. 515-556
- Lecuyer MP, Zhang YX, Tellier M, Lespinasse Y (1991)** *In vitro* pollen tube division of irradiated and non-irradiated apple pollen. Agronomie 11:483-489
- Lin HS, De Jeu MJ, Jacobsen E (1998)** Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: The effect of the position on the stem. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52:165-169
- Loeillet D (1997)** Panorama du marché mondial de l'ananas: L'importance de l'Europe. Acta Horticulturae 425:37-48
- Logue SJ, Giles LC, Sparrow DHB (1993)** Genotype and environment strongly influence barley anther culture response using Australian genotypes. Aust. J. Bot. 41(227-236)

Luckett DJ, Venkatanagappa S, Darvey NL, Smithard RA (1991) Anther culture of Australian wheat germplasm using modified C17 medium and membrane Rafts. Aust. J. Plant Physiol. 18:357-367

Luckett DJ, Darvey NL (1992) Utilization of microspore culture in wheat and barley improvement. Aust. J. Bot. 40:807-828

MacDonald MV, Ahmad I, Menten JOM, Ingram DS (1990) Haploid culture and *in vitro* mutagenesis (UV light, X-rays and gamma-rays) of rapid cycling *Brassica napus* for improved resistance to disease. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement 2:129-138

Mathews H, Rangan TS (1981) Growth and regeneration of plantlets in callus culture of pineapple. Scientia Horticulturae 14:227-234

McCormick S (1993) Male gametophyte development. The Plant Cell 5:1 265-1 275

Mercier H, Kerbauy GB (1997) Micropropagation of ornamental Bromeliads (*Bromeliaceae*). En: (Bajaj YPS, ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 40. High Tech. and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin p. 43-57

Mertens M, Werbrouck S, Samyn G, Botelho dos Santos Moreira da Silva H, Debergh P (1996) *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45:231-236

Metwally EI, Moustafa SA, El-Sawy BI, Shalaby TA (1998a) Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52:171-176

Metwally EI, Moustafa SA, El-Sawy BI, Haroun SA, Shalaby TA (1998b) Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52:117-121

Meynet J, Barrade R, Duclos A, Siadous R (1994) Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrida*, cv. 'Sonia') obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. Agronomie 2:169-175

- Michaux-Ferriere N, Grout H, Carron MP (1992)** Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*). *American Journal of Botany* 79(2):174-180
- Michaux-Ferriere N, Schwendiman J (1992)** Histology of somatic embryogenesis. En: (Dattée C, Dumas C, Gallais A, eds). *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Springer-Verlag, Berlin p. 247-259
- MINAG (1989)** Instructivo técnico para el cultivo de la piña. CIDA, Habana
- Morrison RA, Evans DA (1988)** Haploid plants from tissue culture: new plant varieties in a shortened time frame. *Biotechnology* 6:684-688
- Muhanna S, Sourré A, Albertini L (1991)** Effect of gamma rays on nuclear DNA and cellular RNA in *Meiocytes*, microspores and tapetum of *Nicotiana tabacum* L. var. *Xanthi Dulien*. *Cytologia* 56:107-115
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998)** Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:267-275
- Navarro-Alvarez W, Baenziger PS, Eskridge KM (1994)** Addition of Colchicine to wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. *Plant Breeding* 112:192-198
- Niemirowicz-Scytt K, Dumas de Vaulx R (1989)** Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genetics Cooperative* 12:24
- Noyer JL, Lanaud C, Coppens G, Duval MF (1997)** RFLP study on rDNA variability in *Ananas* genus. *Acta Horticulturae* 425:153-160
- Nyochembeng LM, Garton S (1998)** Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53:127-134
- O'Donoghue LS, Bennett MD (1994)** Durum wheat haploid production using maize wide-crossing. *Theor. Appl. Genet.* 89:559-566
- Ogawa T, Fukuoka H, Ohkawa Y (1994)** Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice. *Breeding Science* 44:75-77

- Ogawa T, Fukuoka H, Ohkawa Y (1995)** Plant regeneration through direct culture of isolated pollen grains in rice. *Breeding Science* 45:301-307
- Ohkawa Y, Suenaga K, Ogawa T (1992).** Production of haploid wheat plants through pollination of Shorgum pollen. *Japan. J. Breed.* 42(4):891-894
- Omar Faruque M, Farzana T, Seraj ZI, Sarker RH, Khatun AA (1998)** Variations in green plant regeneration response from anthers of indica rice and their hybrids with japonica c.v. Taipei 309. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:191-195
- Oost EH, Den Nijs APM (1979)** Storage and irradiation of *Cucumis* pollen and their influence on pollen vitality. *Inc. Newsl.*, 11:63-67
- Orshinsky BR, Sadasivaiah RS (1994)** Effects of media on embryoid induction and plant regeneration from cultures anthers of soft white spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 102: 99-107
- Osolnik B, Bohanec B, Selaska S (1993)** Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) anthers dissection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:241-246
- Pérez G, Isidró M, Arias E, Pérez S, González J, Nieves N (1997)** Caracterización fenotípica, bioquímica y citogenética en plantas de piña obtenidas por variación somaclonal y mutagénesis. *Acta Horticulturae* 425:221-242
- Piccirilli M, Arcioni S (1991)** Haploid plants regenerated *via* anther culture in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Kock). *Plant Cell Reports* 10:273-276
- Pinho NM, Zambolim L, María J, Ventura JA (1997)** Protoplast isolation of *Ananas comosus* (L.) Merr. cv. 'Perolera'. *Acta Horticulturae* 425:259-266
- Pius J, George L, Eapen S, Rao PS (1993)** Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:91-96
- Py C, Gaillard JP (1971)** La formation et la croissance des rejets d'*Ananas*. *Fruits* 26(3):211-222

- Py C, Lacoeyuilhe JJ, Teisson C (1987)** The pineapple, cultivation and use. (Maisonneuve GP, Larose eds), Paris 568 p
- Raghavan V (1986)** Pollen developmental biology in cultured anthers. En: (Vasil IK, ed). Vol. 3. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. p. 275-304
- Ramírez AL, Santana N (1986)** Obtención de brotes múltiples en yemas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en la variedad Española roja. Cultivos Tropicales 9(2):32-35
- Rangan RS, Mathews H (1980)** Growth and multiple plantlet formation in lateral bud, leaf explant and callus cultures of pineapple. En Plant Cell Cultures. Results and Perspectives. Elsevier. Biomedical Press, Holland 410 p.
- Rangan TS (1984)** Pineapple. En: (Evans DA, Sharp WR, Yamada Y eds). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 3. Crop Species. Collier Macmillan, London p. 373-382
- Rao AN, Wee YC (1979)** Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. New Phytol. 83:485-497
- Raviv A, Avenido RA, Tisalona LF, Damasco OP, mendoza EMT, Pinkas Y, Zilkah S (1998)** Callus and somatic embryogenesis of *Persea* species. Plant Tissue Culture and Biotechnology 4(1-3):196-206
- Reynolds TL, Kitto SL (1992)** Identification of embryoid-abundant genes that are temporally expresses during pollen embryogenesis in wheat anther cultures. Plant Physiol. 100:1744-1750
- Roberts-Oehlschlager SL, Dunwell JM, Faulks R (1990)** Changes in sugar content of barley anthers during culture on different carbohydrates. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22:77-85
- Rode JC, Dumas de Vaulx R (1987)** Obtention de plantes haploides de carotte (*Daucus carota* L.) issues de parthénogenese induite *in situ* par du pollen irradié et culture *in vitro* des graines immatures. C. R. Acad. Sci. 305:225-229
- Rodríguez Y, Daquinta M, Cisneros A, Mosqueda M, Lorenzo JC, Escalona M (1996)** Histología de la embriogénesis somática en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Biotam 7(2-3):45-48

- Rohilla SS, Khanna VK (1993)** Effect of gamma-radiation of pollen tube growth and seed set in barley-rye crosses. *Cereal Research Communication* 21(2-3):207-211
- Rohrbach KG (1997)** Pineapple research and development in a world market. *Acta Horticulturae* 425:123-134
- Rybczynski JJ, Simonson RL, Baenziger PS (1991)** Evidence for microspore embryogenesis in wheat anther culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.* p. 168-174
- Sarwar M, Skirvin RM (1997)** Effect of thidiazuron and 6-benzylamino-purine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'Melntosh' apple (*Malus X domestica* Borkh.) *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 68:95-100
- Sarwar M, Skirvin RM (1997)** Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'Melntosh'apple (*Malus x domestica* Borkh.) *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 68:95-100
- Sauton A, Dumas de Vaulx R (1987)** Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par pollen irradié. *Agronomie* 7:141-148
- Schoofs H (1997)** The origin of embryogenic cells in *Musa*. Proefschrift voorgedragen tot het behalen van de graad van Doctor in de Toegepaste Biologische Wetenschappen. Katholieke Universiteit Leuven 255p.
- Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N (1990)** Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux* 45(10):409-418
- Schwenkel HG, Winkelmann T (1998)** Plant regeneration *via* somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4(1):28-34
- Singsit C, Ozias-Akins P (1992)** Rapid estimation of ploidy levels in *in vitro* regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids. *Euphytica* 64:183-188

- Sinha RK, Majumdar K, Sinhas P (1999)** *In vitro* differentiation and plant regeneration of *Albizia chinensis* (Orb.) Merr. 3rd International Plant Tissue Cult. Conf. 8-10 March, Bangladesh p. 4
- Smith LB (1971)** Flora de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría. Instituto Botánico, Caracas 12:1-361
- Smith LB, Downs RJ (1979)** *Bromeliaceae (Bromelioideae)*. Flora Neotropica Monographs. 14(3):1493-2142
- Snider KT, Veilleux RE (1994)** Factors affecting variability in anthers culture and in conversion of androgenic embryos of *Solanum phureja*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:345-354
- Sudhakar Johnson T, Badari Narayan S, Narayana DBA (1997)** Rapid *in vitro* propagation of *Saussurea lappa*, an endangered medicinal plant, through multiple shoot cultures. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 33:128-130
- Suenaga K (1994)** Doubled haploid system using the intergeneric crosses between wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). Bull. Natl. Inst. Agrobiol. 9:83-139
- Suenaga K, Nakajima K (1989)** Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). Plant Cell Reports 8:263-266
- Sunderland N (1977)** Observations on anther culture of ornamental plants. En: (Gautheret RJ, ed). La Culture des Tissus et des Cellules des Végétaux. Travaux dédiés à la memoire de Georges Morel. Masson Publishers. Paris p. 34-46
- Sunderland N, Roberts M, Evans LJ (1979)** Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. 1. Independent division of the generative and vegetative cells. J. Exp. Bot. 30:1133-1144
- Szarejko I, Maluszynsky M, Polok K, Kilian A (1990)** Doubled haploids in the mutation breeding of selected crops. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement 2:355-378
- Teisson C, Alvard D (1995)** A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Inmersión. En: (Terzi M, Cella R, Falavigna A, eds). Current

Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht p. 105-109

Thomas SC (1987) CURVEFIT, programa informático para el ajuste de curvas. Versión 2.1

Trottier M-C, Collin J, Comeau A (1993) Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35:59-67

Tulecke WR (1953) A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science* 117:559-620

Tulsieram LK, Glaubitz JC, Kiss G, Carlson JE (1991) Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. *Biotechnology* 10:686-690

Ushiyama T, Shimizu T, Kuwabara T (1991) High frequency of haploid production of wheat through intergeneric cross with teosinte. *Japan. J. Breed.* 41:353-357

Vasil IK (1980) Androgenetic haploids. En: (Vasil IK, ed). *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. Academic Press, New York p. 195-223

Visessuwan R, Kawai T, Mii M (1997) Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina*. *Breeding Science* 47:217-222

Wakasa K (1989) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). En: (Bajaj YPS, ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 5. Tree II*. Spriger-Verlag, Berlin. Heidelberg p. 14-29

Waugh R, Baird E, Powell W (1992) The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. *Plant Cell Reports* 11:466-469

Wee YC, Rao AM (1979) *Ananas* pollen germination. *Grana* 18:33-39

Wijesekera KB, Iqbal MCM, Sathyapala SK (1999) Microsporogenesis and anther culture in tea (*Camellia sinensis* L.). 3rd International Plant Tissue Cult. Conf. 8-10 March, Bangladesh p. 18

Wilens RW, Mandel RM, Pharis RP, Holbrook LA, Moloney MM (1990) Effects of abscisic acid and high osmoticum on storage protein gene expression in microspore embryos of *Brassica napus*. *Plant Physiology* 94:875-881

- Williams DDF, Fleisch H (1993)** Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae* 334:67-76
- Williams DJ, Al-Juboory H, Skirvin RM (1998)** Adventitious shoot regeneration from ovaries of hosta 'Golden scepter'. *In vitro Cell.Dev.Biol.Plant* 34:289-292
- Wolyn DJ, Feng X (1993)** Genotype, temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. *HortSci.* 28(3):216-217
- Yang HY, Zhou DT, Cai H, Yang Y, Wu Y, Chen XM (1986)** *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Helianthus annuus*. En: (Hu H, Yang HY, eds). Haploids of Higher Plants *In Vitro*. China Acad. Publ., Bejin p. 182-191
- Yao K, Chen CH, McMullen R (1991)** Regeneration of albino shoots in cultures anthers of intermediate wheat grass (*Agropyron intermedium* (Host) Beauv.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 26:189-193
- Yoshida S, Watanabe K, Fujino M (1998)** Non-random gametoclonal variation in rice regenerants from callus subculture for a prolonged period under high osmotic stress. *Euphytica* 104:87-94
- Yves H (1998)** Origin of microspore-derived dihaploid and polyhaploid *in vitro* plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4(3-4):127-135
- Zee FT, Munekata M (1992)** *In vitro* storage of pineapple (*Ananas spp.*) germplasm. *HortScience* 27:57-68
- Zhang YX, Lespinasse Y, Chevreau E (1990)** Induction of haploidy in fruit trees. *Acta Horticulturae* 280:293-305
- Zhang YX, Lespinasse Y (1991)** Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetics plants in apple. *Euphytica* 54:101-109
- Zhang YX, Lespinasse Y (1992)** Haploidy. En: (Hammerschlag FA, Litz RE, eds). *Biotechnology of Perennial Fruit Crop*. CAB International, Walling ford, UK p. 57-75
- Zhou C, Yang HY, Tian HQ, Liu ZL, Yan H (1986)** *In vitro* culture of unpollinated ovaries in *Oriza sativa*. En: (Hu H, Yang HY, eds). Haploids of Higher Plants *In Vitro*. China Acad. Publ., Bejin p. 165-181

Zhu ZC, Wu HS, An QK, Liu ZY (1981) Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum*. cultured *in vitro*. Acta Genet. Sin. 8:386-389

Zornig RK (1996) Micropropagation of Bromeliads. Bromélia 3(3):3-8