

Universidad “Máximo Gómez Báez” de Ciego de Ávila

Centro de Bioplasmas



**Variabilidad generada por organogénesis indirecta en piña
(*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) cultivar Española
roja pinareña y caracterización de los somaclones obtenidos.**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en
Ciencias Agrícolas**

Aspirante: M. Sc. Guillermo Armando Pérez García

**Ciego de Ávila, Cuba
2012**

Universidad “Máximo Gómez Báez” de Ciego de Ávila

Centro de Bioplantas



Variabilidad generada por organogénesis indirecta en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) cultivar Española roja pinareña y caracterización de los somaclones obtenidos.

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

Aspirante: M. Sc. Guillermo Armando Pérez García.

Tutores: Dr.C. José Carlos Lorenzo Feijoo.

Dr.C. Miriam Fátima Isidróon Pérez

Ciego de Ávila, Cuba

2012

Dedicado a: **mis hijos**
 mi esposa
 la memoria de mis padres
 mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a los doctores Miriam Fátima Isidró Pérez y José Carlos Lorenzo Feijoo por su valiosa ayuda en la conducción del trabajo, preparación del manuscrito y su apoyo incondicional durante el desarrollo del mismo. De igual modo a los miembros de los laboratorios de Células y Tejidos y Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas. Al Departamento de Producción Agropecuaria y todos los miembros de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Ciego de Ávila y especialmente al Dr. Lázaro E. Pulido Delgado por su ayuda y contribución directa en la conformación del documento.

A las doctoras María Margarita Hernández, Idalmis Bermúdez Caraballoso, María Esther González Vega y Lourdes García Rodríguez por la minuciosa revisión del trabajo y magníficas sugerencias.

A la Dra. María Caridad González Cepero y al Dr. Juan G. Castillo Hernández por sus valiosas observaciones y sugerencias.

Al Dr. Justo González Olmedo por haberme ayudado en los pasos iniciales del programa del doctorado, por su contribución en los aspectos generales y en particular en los Bioquímicos y Fisiológicos, así como por sus oportunos consejos.

A los doctores Marcos Daquinta Gradaille, Lourdes Yabor Cabrera y Marcos Martínez Montero, por sus valiosas observaciones que permitieron mejorar el manuscrito de la tesis en las diferentes etapas de su elaboración.

También quiero hacer extensivo mi agradecimiento al Dr. Ricardo Rodríguez Guzmán por sus consejos valiosos para mejorar la tesis en los aspectos de su especialidad, así como, a la M.Sc. Daymara Rodríguez Alonso y M.Sc. Ermis Yanes Paz por su apoyo en la valoración de la técnica molecular. Al Chino por la encuadernación del trabajo.

A la Revolución Cubana, Centro de Bioplasmas y a la Universidad de Ciego de Ávila.

SÍNTESIS

La investigación se realizó con el objetivo de evaluar la variabilidad generada por organogénesis indirecta en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña y caracterizar los somaclones obtenidos. Para ello se determinó la variabilidad en caracteres morfológicos y agronómicos en condiciones de campo hasta la tercera generación vegetativa, incluida en esta última la caracterización molecular, asimismo, en la cuarta generación se realizaron análisis anatómicos, fisiológicos y bioquímicos. Se obtuvieron dos somaclones estables, el P3R5 y Enana, lo que quedó confirmado mediante el análisis de AFLP, por lo que la variabilidad generada por este método representó un 0,52% de variación somaclonal. Al caracterizar el somaclón Enana se corroboró que presenta menor tasa fotosintética y mayor tasa de transpiración que el somaclón P3R5, por lo que mostró menor eficiencia en el uso del agua que este. Se constató que de los indicadores agronómicos, anato-morfológicos, fisiológicos y bioquímicos evaluados para detectar diferencias, el somaclón P3R5 difirió del donante en el 45,4% de estos, mientras que el somaclón Enana lo hizo en el 70,5%, ambos somaclones tuvieron respuestas variables respecto a los indicadores bioquímicos evaluados y mostraron los contenidos más altos de proteínas al compararse con el donante. El somaclón P3R5 se caracterizó por presentar de manera estable menor número de espinas en sus hojas, lo que facilita las atenciones fitotécnicas, unido a su adaptabilidad a las condiciones estudiadas y alcanzar rendimientos adecuados, mientras que el somaclón Enana posee valor genético.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
2.1 Generalidades del cultivo de la piña (<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> L. Merrill).	6
2.1.1 Origen y taxonomía	6
2.1.2 Importancia económica	6
2.1.3 Características botánicas	7
2.1.4 Características de los cultivares Española roja y Española roja pinareña.	8
2.1.5 Características fisiológicas y condiciones de cultivo.	9
2.2 Genética del cultivo.	10
2.3 Generalidades del cultivo <i>in vitro</i> de la piña (<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> L. Merrill).	12
2.4 Mejora genética por métodos tradicionales.	13
2.4.1 Selección.	13
2.4.2 Hibridación.	14
2.5 Mejora genética por métodos biotecnológicos.	16
2.5.1 Producción de haploides.	16
2.5.2 Ingeniería genética.	17
2.5.3 Selección <i>in vitro</i>	17
2.5.4 Mutagénesis <i>in vitro</i>	18
2.5.5 Variación somaclonal.	18
2.5.5.1 Factores que influyen en la variación somaclonal.	22
2.5.5.2 Técnicas utilizadas para la detección y cuantificación de la variación somaclonal.	25
2.5.5.3 Efectos del cultivo <i>in vitro</i> en la anatomía y procesos fisiológicos y bioquímicos de somaclones.	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	31
3.1 Evaluación de la variabilidad fenotípica y genética en plantas de piña (<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> L. Merrill), cultivar Española roja	32

	pinareña, obtenidas mediante organogénesis indirecta.	
	3.1.1 Evaluación de la primera generación vegetativa.	33
	3.1.2 Evaluación de la segunda generación vegetativa.	35
	3.1.3 Evaluación de la tercera generación vegetativa.	35
3.2	Caracterización anato-morfológica, fisiológica y bioquímica de los genotipos en estudio.	39
	3.2.1 Caracterización anato-morfológica.	39
	3.2.2 Caracterización fisiológica.	41
	3.2.3 Caracterización bioquímica.	41
	3.2.4 Resumen de la caracterización genotípica y fenotípica de los somaclones.	44
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	48
4.1	Evaluación de la variabilidad fenotípica y genética en plantas de piña (<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> L. Merrill), cultivar Española roja pinareña, obtenidas mediante organogénesis indirecta.	48
	4.1.1 Evaluación de la primera generación vegetativa.	48
	4.1.2 Evaluación de la segunda generación vegetativa.	54
	4.1.3 Evaluación de la tercera generación vegetativa.	57
4.2	Caracterización anato-morfológica, fisiológica y bioquímica de los genotipos en estudio.	70
	4.2.1 Caracterización anato-morfológica.	70
	4.2.2 Caracterización fisiológica.	75
	4.2.3 Caracterización bioquímica.	81
	4.2.4 Resumen de la caracterización genotípica y fenotípica de los somaclones.	92
V.	CONCLUSIONES.	98
VI.	RECOMENDACIONES.	99
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	100

I. INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) es la especie económicamente más importante dentro de la familia *Bromeliaceae*. Resulta de interés por su gran valor nutritivo, agradable sabor, posibilidades de industrialización, su belleza para la comercialización y por los altos precios que alcanza en el mercado como producto procesado o fresco. Es el tercer frutal tropical más importante después del banano y el mango. La producción mundial en el año 2010 alcanzó los 19,41 millones de toneladas, mientras en Cuba fue de 64 820 toneladas (FAOSTAT, 2012).

En Hawai, desde el año 1914 se inició el mayor programa en la mejora de la piña, que tenía entre sus objetivos, desarrollar resistencia a enfermedades en la variedad Cayena lisa. Mediante este programa se seleccionaron variedades, pero ninguna pudo reemplazarla porque después de varias generaciones las mismas revelaban nuevos problemas (Williams y Fleisch, 1993).

Posterior a esta etapa, a pesar de los esfuerzos invertidos los programas de mejoramiento genético de la piña no lograron crear variedades polivalentes de un nivel comparable al de la Cayena lisa. Una revisión de las bases genéticas útiles para el mejoramiento permite analizar las limitaciones de los métodos tradicionalmente usados, como la retrocruza entre los híbridos que someten de nuevo estas combinaciones a los riesgos de la recombinación (Coppens d'Eeckenbrugge y Duval, 1995). El mejoramiento varietal de la piña mediante hibridación es muy difícil y de muy poco progreso, comparado con otros cultivos (Botella y Fairbain, 2005).

Debido a que la búsqueda de variabilidad en piña mediante los métodos clásicos resultó muy laboriosa y larga (Cabot y Lacoevilhe, 1990; Mhatre, 2007), varios grupos de investigadores desarrollaron estudios básicos y aplicados en la última década para obtener nuevos cultivares de piña con mejor comportamiento agronómico, mediante la aplicación de la biotecnología como una herramienta eficaz para el logro de este objetivo (Sripaoraya *et al.* 2001, 2006; Espinosa *et al.* 2002; Botella y Fairbairn, 2005; Carlier *et al.* 2007; Yabor *et al.* 2009).

La proyección estratégica de frutales en Cuba concede papel preponderante a la piña y en la provincia de Ciego de Ávila se han dedicado recursos mediante un programa de recuperación abarcador (AIN, 2010).

En nuestro país el cultivar Española roja ocupa casi la totalidad de las áreas de cultivo, dada su rusticidad y aceptable comportamiento agronómico y el cultivar Española roja pinareña que surge de la selección en áreas de producción a partir del primero, por sus hojas irregularmente espinosas. Otros cultivares como la Piña blanca o la Cabezona, son prácticamente inexistentes en los campos cubanos. La Cayena lisa, cultivar que está mayoritariamente plantado en el mundo, no tiene el mejor comportamiento en el país (Isidró *et al.* 2003). El principal trabajo de selección en Cuba lo inició Ramírez (1981), el de hibridación Benega *et al.* (1998) y de prospección nacional Isidró *et al.* (2003).

La variación somaclonal es una herramienta muy útil en el mejoramiento de plantas, ya que la variación en las células somáticas de los tejidos se puede utilizar para obtener características novedosas en los cultivos (Cardoza y Stewart, 2004).

Este tipo de variación se utilizó para generar variabilidad en diferentes especies, tanto de propagación sexual como asexual entre las que se destacan: ajo (*Allium sativum* L.) (Al-Zahim *et al.* 1999); palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Tregear *et al.* 2002); geranio (*Pelargonium graveolens* L. Herit.) (Ravindra *et al.* 2004); banano (*Musa acuminata* Colla) (Bairu *et al.* 2006); caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido) (Orellana *et al.* 2006, 2010; Singh *et al.* 2008); arroz (*Oriza sativa* L.) (Gao *et al.* 2009); pasto St. Augustinegrass (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) (Li *et al.* 2010 a, b), en estos casos las características agronómicas generadas por la variación fueron heredables.

Estudios mediante marcadores moleculares determinaron la magnitud de la variación en las plantas generadas en diferentes especies del género *Solanum* (Aversano *et al.* 2009). No siempre la presencia de altos niveles de polimorfismo expresaron la aparición de variantes somaclonales.

Varios investigadores encontraron poco polimorfismo asociado con la regeneración *in vitro* en especies como: tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Smulders *et al.* 1995); palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Rival *et al.* 1998); papa (*Solanum tuberosum* L.) (Barandalla *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2007) al utilizar marcadores RAPD [Ácido dexosirribonucleico (ADN) polimórfico amplificado al azar], ISSR (Amplificación intermicrosatélites) y AFLP (Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados). Por el contrario, diferencias importantes se encontraron por Piccioni *et al.* (1997) en alfalfa (*Medicago sativa* L.) y Palombi *et al.* (2007), en pera (*Pyrus communis* L.), mediante marcador RAPD.

La variación somaclonal en piña se describió por Wakasa (1979, 1989), cuando utilizó tejido sincárpico en el cultivar Cayena lisa y encontró un alto porcentaje de plantas variadas en cuanto a espinosidad, color, forma y filotaxia de las hojas, sin ofrecerse detalles sobre la generación a la que pertenecían dichas plantas ni los porcentajes de reversión hacia la forma materna. Dewald *et al.* (1988), indicaron pequeña variación seguida de la multiplicación *in vitro* también en Cayena lisa. En el cultivar Española roja Liu *et al.* (1989) encontraron variantes de pocas espinas en las plantas surgidas de la primera generación *in vitro* que pasaron en su totalidad a la forma espinosa en la etapa de adaptación. Feuser *et al.* (2003), evaluaron la fidelidad genética de las plantas surgidas al comparar dos métodos de multiplicación y encontraron un 7% de polimorfismo revelado por isoenzimas y RADP, en las plantas obtenidas en la primera generación del cultivo *in vitro*.

Firoozabady y Moy (2004) y Firoozabady *et al.* (2006), indicaron variabilidad de 3% al utilizar un sistema de inmersión temporal, con gran reversión de las plantas a la forma de pocas espinas en el cultivar Champaka obtenidas mediante transformación y señalaron la necesidad de continuar los estudios en campo.

Sin embargo, estas investigaciones señalaron pocos cambios fenotípicos en las plantas descritas, pues sus objetivos fueron solo analizar las modificaciones en cuanto a la fidelidad genética en la

primera generación, sin dar continuidad en las generaciones siguientes. En ninguno de los trabajos precedentes se realizaron evaluaciones de otras características que pueden haberse modificado por las condiciones *in vitro*, a nivel anato-morfológico, fisiológico o bioquímico.

Al considerar lo expuesto y dada la importancia estratégica que se le concede a este frutal se plantea la necesidad de analizar la variabilidad de las plantas regeneradas y detectar la presencia de somaclones de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña que sean capaces de mostrar estabilidad de los cambios ocurridos a través de indicadores a niveles genéticos, morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares y que respondan a las exigencias del sector productivo.

De acuerdo con lo dicho anteriormente, se desarrolló una secuencia experimental a partir de la **hipótesis** siguiente:

La evaluación de la variabilidad en las plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) cultivar Española roja pinareña, generadas mediante organogénesis indirecta, permitirá definir la magnitud de los cambios presentados y caracterizar los somaclones obtenidos.

Para corroborar la hipótesis trazada se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL: Evaluar la variabilidad generada por organogénesis indirecta y caracterizar los somaclones obtenidos en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la variabilidad fenotípica y genética en plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña, obtenidas mediante organogénesis indirecta.
2. Caracterizar los somaclones obtenidos a partir de organogénesis indirecta en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña, mediante indicadores agronómicos, anato-morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

NOVEDAD CIENTÍFICA: Se confirma que las características morfoagronómicas y anatómicas hasta la cuarta generación vegetativa de los somaclones obtenidos en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) cultivar Española roja pinareña, son consecuencias de los cambios generados por la organogénesis indirecta a nivel genético, bioquímico y fisiológico.

VALOR PRÁCTICO: Se informa sobre la obtención de dos nuevos somaclones de piña derivados del cultivar Española roja pinareña mediante organogénesis indirecta, promisorios para diferentes fines, uno de ellos, el somaclón P3R5, destinado para su introducción en la producción comercial, al caracterizarse por presentar rusticidad similar al cultivar Española roja; mostrar de manera estable menor número de espinas en sus hojas que le confiere facilidades para la realización de atenciones fitotécnicas, unido a su adaptabilidad a las condiciones estudiadas y proporcionar rendimientos adecuados, el segundo, el somaclón Enana, destinado a programas de mejora por su valor genético.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades del cultivo de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill).

2.1.1 Origen y taxonomía.

Respecto al origen de las variedades cultivadas de la especie *Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill, Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (2009) realizaron un estudio de una colección de formas silvestres y cultivadas, las sometieron a análisis morfológicos y moleculares y obtuvieron resultados que confirman la hipótesis del origen en el norte del Río Amazonas de las variedades *comosus* y *erectifolius*, que son cultivadas en esta región.

La piña pertenece al orden *Bromeliales* y la familia *Bromeliaceae*, representada por 56 géneros y 2794 especies. La diversidad de formas silvestres y cultivadas en la parte Norte del río Amazonas (Orinoquia, Río Negro, Amapá), así como en Paraguay y sur de Brasil confirman la hipótesis de que este es su centro de origen (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003).

2.1.2 Importancia económica.

La piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) es cultivada fundamentalmente por su fruto que es consumido fresco o procesado. El fruto es una buena fuente de magnesio y contiene significativas cantidades de vitaminas B1 y C, su pulpa es utilizada como ingrediente en varios alimentos (Bartholomew *et al.* 2003). Contiene la bromelina que es una enzima proteolítica utilizada con propósitos medicinales y se señaló que tiene propiedades de detener el crecimiento de células malignas (Hale *et al.* 2005).

La producción mundial de piña en 2010 alcanzó los 19,41 millones de toneladas. Los mayores productores; Tailandia, Filipinas, China y Brasil destinaron su producción para el consumo interno y exportación (FAOSTAT, 2012).

2.1.3 Características botánicas.

Es una especie herbácea perenne, cuya inflorescencia terminal da lugar a un fruto múltiple (Coppens d'Eckenbruge y Leal, 2003). Después de la maduración del primer fruto, la planta desarrolla nuevos brotes a partir de yemas axilares que producen un nuevo eje de crecimiento capaz de producir otro fruto. Una planta da lugar a una secuencia de varios ciclos de producción. Las yemas del tallo dan lugar a los órganos de propagación, en su región basal surgen los brotes criollos, superiores a estos brotes claveles y cerca de la base del fruto, brotes basales. Las plantas adultas alcanzan de uno a dos metros de altura y uno a dos metros de ancho. Las principales estructuras morfológicas son distinguibles en el tallo, hojas, pedúnculo, fruto, corona, brotes y raíces. El tallo tiene una longitud de 25-50 cm y un ancho de 2-5 cm en la base y de 5-8 cm en el ápice. Las hojas son sésiles y envuelven al tallo, la filotaxia de estas en las variedades cultivadas es de 5/13, su número de 40 a 80, pueden alcanzar 1,6 m de largo y 7 cm de ancho, lo que depende del cultivar y las condiciones ecológicas. Las hojas D (Py *et al.* 1987) constituyen el grupo de hojas más largas en la planta, con el tiempo es común que se aplique el término de hoja D a una hoja simple, usualmente la más alta en la planta. Es la hoja estándar más fácil de identificar y representa con gran facilidad el índice de crecimiento y la situación nutricional de la planta (Malézieux *et al.* 2003). Es la hoja adulta más joven y la joven más adulta.

La densidad estomática puede alcanzar 80 estomas por mm^2 . La anatomía de los estomas de la piña hace que tenga una tasa de transpiración muy baja, sólo se ubican en el envés de las mismas. Los genotipos diploides presentan estomas que miden $24 \pm 0,6 \mu\text{m}$, mientras los tetraploides $31,02 \pm 0,13 \mu\text{m}$ y los triploides presentan valores intermedios entre diploides y tetraploides (Py *et al.* 1987). En la hipodermis se encuentran el parénquima acuífero y clorofílico, el acuífero funciona como un reservorio de agua, la cual es utilizada durante períodos de estrés. Las raíces pueden alcanzar entre 1-2 m lateralmente y una profundidad de 0,85 m. La inflorescencia posee desde 50 flores en especies silvestres a más de 200 en algunos cultivares. Están dispuestas en un eje central con filotaxia 8/21 en la mayoría de las piñas cultivadas. La floración se produce de forma natural, inducida por días cortos y

temperaturas bajas o artificial en plantaciones comerciales mediante la aplicación de etileno, acetileno o por productos que liberan estas hormonas (Bartholomew *et al.* 2003). El etileno está involucrado en el proceso de maduración del fruto, no obstante el fruto no es capaz de autocatalizarlo (Davey *et al.* 2007).

En *Ananas comosus*, la auto incompatibilidad se produce por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el tercio superior del estilo (Kerns, 1932; Majunder *et al.* 1964). Esto es controlado gametofíticamente por un locus simple con alelos múltiples (Brewbaker y Gorrez, 1967).

Todas las variedades botánicas de *Ananas comosus* poseen un sistema de auto incompatibilidad gametofítica. La reacción de autorechazo generalmente es más fuerte en las variedades cultivadas de *A. comosus*, lo que se debe probablemente al proceso de domesticación y selección para obtener frutos sin semillas (Coppens d'Eekenbrugge *et al.* 1993).

El fruto es un sincarpio formado por la fusión de los frutos individuales producidos por cada flor, el número de frutillos producidos por cada fruto determina el peso del mismo. El peso puede variar en dependencia de las variedades desde 0,7 hasta 10 kg, aunque el valor promedio está entre 1,5- 2 kg (Py *et al.* 1987). El momento de la cosecha lo determinan diferentes factores, fundamentalmente el momento de la plantación y su relación con las temperaturas existentes, el momento de la inducción floral, el tipo de propágulo utilizado y el estado nutricional de las plantas, por lo que el ciclo del cultivo puede durar desde 15 hasta 18 meses (Bartholomew *et al.* 2003; Davey *et al.* 2007).

2.1.4 Características de los cultivares Española roja y Española roja pinareña.

Española roja: El fruto es de tamaño medio (1,2-2 kg), anaranjado en la madurez y con forma de barril. La masa es firme, pálida, aromática y dulce, con moderado contenido de azúcares (alrededor de 12° Brix). La planta es de tamaño medio, con hojas de color verde oscuro, espinosas o semiespinosas, las espinas están distribuidas en ambos bordes. Las bracteadas florales tienen color rojo brillante. Es muy tolerante a las altas temperaturas, al estrés y a las enfermedades que atacan

a las variedades comerciales de piña (Py *et al.* 1987). El fruto con ojos rectangulares, planos, elevados hacia las esquinas, orientados en dos espirales, su número varía entre 77 y 92 (Leal, 1990).

Española roja pinareña: Posee frutos en forma de barril, hojas irregularmente espinosas, pero menos agresivas que en el tipo camagüeyana. Muy rústica. Surge de la selección en áreas de producción a partir del cultivar Española roja (Isidró *et al.* 2003).

Ambas han estado presentes en los campos de cultivo del país, casi como únicos cultivares.

2.1.5 Características fisiológicas y condiciones de cultivo.

Esta especie cumple el metabolismo del ácido crasulaciánico. Los estomas de las plantas que desarrollan este metabolismo permanecen cerrados durante el día y abren por la noche, controlado por las concentraciones internas de CO₂ (Salisbury y Ross, 1992). En la noche el CO₂ se asimila en el malato por la carboxilación de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa y durante el día, el CO₂ se procesa vía rubisco con los estomas cerrados (Londers *et al.* 2010).

Las plantas de piña fijan el CO₂ vía fosfoenol piruvato carboxilasa y rubisco, pero hay una separación temporal que ocurre entre los pasos de la carboxilación. Según señala Malézieux *et al.* (2003) la fijación nocturna del CO₂ ocurre vía fosfoenol piruvato carboxilasa y los ácidos sintetizados, fundamentalmente el málico son almacenados en las vacuolas y al siguiente día la descarboxilación del malato libera el CO₂, el cual es fijado vía rubisco. La fotosíntesis resultante de esa gran variación diaria en la concentración del malato, es propia de las plantas con metabolismo del ácido crasulaciánico a la que pertenece la piña.

La tasa fotosintética está relacionada con las temperaturas diurnas y nocturnas. Bartholomew y Malézieux (1994), plantearon una actividad óptima de la fotosíntesis con una relación entre temperatura diurna y nocturna de 30/20°C.

La piña se caracteriza por tener una alta eficiencia en el uso del agua, lo que según Malézieux *et al.* (2003) se debe a la descarboxilación del malato durante el día que produce un incremento en la concentración interna de CO₂, lo cual reduce la toma de CO₂ externo y la transpiración. Producto a la gran eficiencia señalaron que cuando las plantas de piña son sometidas a estrés de agua, la fijación de CO₂ se detiene, pero en un período prolongado las plantas continúan refijando el CO₂ respirado, por lo que pueden estar bajo estrés por períodos largos.

Las plagas constituyen la principal causa de pérdida de los rendimientos: chinche harinosa (*Dysmicoccus brevipes* Cock), gusano blanco (*Phyllophaga patruelis* Chev), nemátodos (*Meloidogyne* sp., *Pratylenchus brachiurus* Godfrey, *Rotylenchulus reniformes* Linford y Oliveira, y *Helicotylenchus* sp.), virus (*Closterovirus*), *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* y *Fusarium subglutinans*. Otro de los problemas que causa la pérdida del rendimiento, lo constituye un mal control de la vegetación indeseable. La piña es un cultivo que en su desarrollo vegetativo atraviesa períodos lentos de crecimiento hasta completar su madurez fisiológica (Peña *et al.* 1996). Esto hace que las plantas indeseables de rápido crecimiento puedan competir por alimento, luz y humedad con mucha mayor eficiencia. Por otra parte, las raíces son superficiales y poco desarrolladas, por lo que las malezas pueden utilizar rápidamente los nutrientes. Un enyerbamiento fuerte puede cubrir las plantas, reducir las posibilidades de la luz y por tanto su capacidad fotosintética, lo que retrasa su crecimiento y alarga su ciclo productivo. Además las plantas indeseables son reservorios de plagas y enfermedades como las chinches (*Dysmicoccus brevipes* Cock) y el gusano blanco (*Phyllophaga patruelis* Chev), lo que repercute desfavorablemente en las plantaciones (Isidró *et al.* 2003).

2.2 Genética del cultivo.

La piña posee cromosomas esféricos y pequeños, miden de 0,5 a 1,0 μm, su número es de 50 (n=25). *Pseudoananas saganarios* (Arruda) Camargo, tiene 100 cromosomas. Se conocen varios triploides,

entre ellos el cultivar Cabezona, además tetraploides como el caso del cultivar James Queen (Py *et al.* 1987).

El número de brotes basales y la formación de coronas están bajo control genético. Las condiciones climáticas tienen una marcada influencia dada por el estado de desarrollo de las plantas. Algunos cultivares están más sujetos a estas anomalías que otros, por lo que debe ser llevada a cabo una estricta selección para disminuir los efectos negativos (Dalldorf, 1990).

Kinjo (1993) partió de la definición de cinco tipos de espinosidad de las hojas de la piña, en las que había una epístasis dominante del gen (M) y otras series de genes, como se señala en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de espinosidad según Kinjo (1993).

Tipo de espinosidad	Epistáticos	Serie de genes	Ej. Variedades
1. Piping (Márgenes involutos)	M_	aabbcc	Maipure
2. Spineless (Lisas)	mm	A-B-C-	A. erectifolius
3. Few (Solo en los extremos)	mm	A-bbC- A-B-cc aaB-C	Cayenas
4. Sacallop (Espinosa irregular)	mm	A-bbcc aaB-cc aabbC-	E. roja
5. Spiny (Muy espinoso)	mm	aabbcc	Branco

La expresión de estos fenotipos fue estudiada desde la mitad del estado de crecimiento vegetativo en híbridos de piña producidos por cruces interespecíficos y se analizó la segregación del carácter espinoso en F₁. Los resultados mostraron que las plantas F₁ surgidas del cruce entre plantas de hojas lisas tipo *Piping* y *Spiny* segregaron en una proporción 1:1, lo que atribuyó a un par simple de alelos, en el que el fenotipo dominante fue *Maipure*. Los cruces de *Few* x *Spiny* mostraron ambos fenotipos de los padres, además de una forma irregular de las espinas (*Scallop*). En cruces entre Cayenas los fenotipos que aparecieron sugirieron que estas características están expresadas por pares triples de alelos. Concluyó que la segregación fenotípica observada probó que "*spineless*" fue heredada por tres alelos

dominantes en el locus con un cromosoma homólogo. Planteó el orden de la dominancia de la siguiente forma: **MAIPURE > SPINELESS >= FEW > SCALLOP > SPINY**.

En investigación de Coppens d'Eekenbrugge *et al.* (1993) señalaron que el tipo de hoja espinoso correspondió a un alelo o a una familia de alelos recesivos *s*. El tipo liso (con espinas en la base y en la punta de las hojas) de Cayena o medio espinoso de ciertos cultivares de Española roja correspondió a un alelo dominante S_2 sobre *S* y *s*. El tipo *piping* de los cultivares del llamado grupo *Mordilonus* (Perolera, Rondón, Primavera) correspondió a un alelo *P* dominante del gen *p* con efecto epistático sobre el gen *s*.

2.3 Generalidades del cultivo *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill).

La micropropagación de la piña mediante cultivo de tejidos ofrece una alternativa a los métodos convencionales de multiplicación de las plantas, no solamente por la producción masiva, sino, por la posibilidad de clonar plantas élites con características deseables y por la posibilidad de obtener plantas libres de virus a partir del cultivo de meristemos (Davey *et al.* 2007). Esta es una vía por la que no se produce variabilidad en el material, son en general muy estables y en particular el cultivo de meristemos es la técnica de mayor aplicación desde el punto de vista comercial.

Desde la década de 1960 se trabaja en la micropropagación de la piña y se realizaron protocolos para la regeneración y propagación de la piña *in vitro* (Daquinta y Benegas, 1997; Escalona *et al.* 1999; Firoozabady y Gutterson 2003; Sripaoraya *et al.* 2003; Rodríguez *et al.* 2004). También Benega *et al.* (2000) desarrollaron protocolos para el cultivo de anteras y óvulos de piña con el objetivo de su utilización en un programa de mejoramiento genético.

El primer informe sobre la vía de regeneración de plantas de piña mediante embriogénesis somática lo realizaron Daquinta *et al.* (1996), los que evaluaron diferentes concentraciones de 3,6 ácido dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba) como regulador del crecimiento para inducir la formación de callos embriogénicos a partir de hojas de los cultivares Española roja y Cayena lisa. Posteriormente

realizaron estudios de embriogénesis en piña Sripaoraya *et al.* (2003), Firoozabady y Moy (2004) y Firoozabady *et al.* (2006).

2.4 Mejora genética por métodos tradicionales.

La supremacía en la industria de un solo cultivar de piña, la Cayena lisa, es extremadamente peligroso por el efecto de las plagas. La obtención de nuevos cultivares resistentes, significa una correcta estrategia para resolver esta situación. Además, aunque el cultivar Cayena lisa es muy bueno para procesar, no tiene gran aceptación como fruto fresco. Estas constituyen las justificaciones principales de donde parten los programas de mejora de la piña en el mundo (Chan *et al.* 2003), los que en el caso de las técnicas tradicionales se basan en la selección y la hibridación.

2.4.1 Selección.

El principal y más antiguo programa de selección en piña para la resistencia a enfermedades como *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, nemátodos y otras características, se llevó a cabo en Hawai a partir de la Cayena lisa, se seleccionaron cultivares por ser mejores que este último en algunas características individuales, como mayor contenido de vitamina C, menor acidez, mayores rendimientos, mayor vigor de las plantas y mejores para el procesamiento industrial, pero después de varias evaluaciones mostraron deficiencias (Chan *et al.* 2003).

En trabajos realizados por Cabot (1988) se propusieron tres métodos para la creación de cultivares de piña a partir de una selección basada en la aparición de mutaciones somáticas espontáneas:

- Eliminación de las mutaciones desfavorables aparecidas en las plantaciones, (plantas espinosas, frutos *collar of slips*, deformaciones del fruto, quimeras).
- La práctica de una selección masal de las mejores plantas de la población, (vigor, relación peso del fruto/peso de la planta, producción de brotes precoces).

- La conducción de una selección clonal permite la creación de un cultivar homogéneo a partir de una población heterogénea resultante de la acumulación con el curso del tiempo de las mutaciones somáticas.

Por otra parte este mismo autor señaló cuatro métodos para la creación de cultivares a partir de una selección efectuada sobre una población con fuerte variabilidad inducida artificialmente en piña:

a) Creación de variabilidad por hibridación, b) Creación de variabilidad por cultivo *in vitro*, c) Variabilidad por mutagénesis, d) Inducción de poliploides.

Un método de selección fenotípica en piña se señaló por Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (1995), en el que se planteó la selección del fenotipo excepcional y su multiplicación por cultivo de tejidos. Este método tiene como ventaja la homogeneidad genética que se alcanza rápidamente.

En este trabajo observaron muy pocas variantes en más de 240 000 plantas producidas *in vitro* al analizar la variabilidad en clones existentes y casi todos volvieron al tipo normal después de unos meses, sólo los mutantes clorofílicos permanecieron estables. También plantearon que dada la variación de vigor observada en la fase de aclimatización es imposible identificar una mutación antes del primer ciclo vegetativo normal, es decir menos de tres años después de la producción de la vitroplanta y todavía quedaría por comprobar su transmisión en los ciclos vegetativos siguientes mediante la selección clonal clásica.

2.4.2 Hibridación.

Entre las metas de los programas de mejoramiento de piña se señalaron la resistencia a enfermedades como *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* y *Fusarium subglutinans*, la prevención de desórdenes como el pardeamiento interior y rasgos específicos como la floración natural temprana en cultivares élites (Carlier *et al.* 2007).

La hibridación constituye el principal método de mejora utilizado en la piña. En Puerto Rico de un cruce natural entre Cayena lisa y Española roja resultó la selección P.R 1-67 (Ramírez *et al.* 1972). Se realizó un programa de hibridación en Costa de Marfil entre Cayena y Perolera y se obtuvieron híbridos resistentes a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Loison-Cabot, 1987).

Estudios realizados en Filipinas por Villegas *et al.* (1995) quienes cruzaron Cayena lisa y Queen con el objetivo de obtener tipos Queen sin espinas, tuvieron éxito, pues lograron una selección con estas características.

En Malasia se desarrollaron programas de hibridación (Wee, 1974; Chan y Lee 1985). Chan y Lee (1996) obtuvieron híbridos, en particular el Josapine a partir del cruce entre Nanas Johor y Sarawak (variante de Cayena lisa). Trabajos realizados en Australia por Sanewski (1998), en un programa de mejoramiento en el que utilizó Cayena lisa, Queen e híbridos PRI, encontró que PRI 73-50, 53-116 y 59-656 y el híbrido filipino 24-80, produjeron varias progenies híbridas con atributos comerciales aceptables para el mercado de frutas frescas.

En Taiwán se desarrolló un programa de hibridación en el que cruzaron Cayena lisa con cultivares locales y posteriormente cruzaron Cayena lisa y Queen, que resultó en la obtención del híbrido Easy Peeler (Fitchet, 1989; Chan, 1997). Este programa continuó con la obtención de dos híbridos; Tainung 13 y Tainung 16 (Chang *et al.* 1997).

En busca de resistencia a la fusariosis en Brasil (Cabral *et al.* 1993; Cabral *et al.* 1997) señalaron que el principal programa de mejora incluyó a los cultivares Pérola y Cayena lisa. Con los mismos obtuvieron una alta proporción de progenies híbridas con características de resistencia. En el CIRAD (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo) de Francia, Coppens d'Eckenbrugge y Duval (2000) evaluaron al híbrido Scarlet para el mercado de frutas frescas.

El programa de hibridación en Cuba se inició en 1991, en el mismo se utilizó Cayena lisa Serrana, Perolera y Española Roja, a partir de estos trabajos fueron obtenidos los híbridos CBCE-116 y CBCE-74 (Benega *et al.* 1998).

La hibridación y selección clonal, que involucra principalmente cultivares élites, se utiliza en el mejoramiento genético de la piña desde hace un siglo. No obstante, la naturaleza heterocigótica de los cultivares de piña y la fuerte segregación y recombinación, limita el éxito de la mejora por hibridación (Carlier *et al.* 2007).

Dentro de los programas de mejora, Bartholomew *et al.* (2010) señalaron los 17 cultivares producidos en el mundo en los últimos años, en particular el híbrido MD-2 originado en el Instituto de Investigaciones de la Piña de Hawaii en 1970, a partir del cruce de 58-1184 y 59-443 e introducido en el mercado con este nombre en 1996. Destacaron también la introducción a la producción en 2009, de un híbrido de piña (Ajubá) a partir del programa de hibridación de Brasil, originado en la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, mediante cruce de Perolera y Cayena lisa, el que presentó hojas lisas como característica principal, adaptado para regiones templadas y preferiblemente para consumo fresco.

2.5 Mejora genética por métodos biotecnológicos.

2.5.1 Producción de haploides.

El trabajo más importante señalado en la bibliografía internacional es el de Benega *et al.* (2000) los que desarrollaron cuatro métodos para inducir plantas haploides de piña: cultivo de anteras y óvulos, partenogénesis *in situ* mediante polen irradiado y cruces intergenéricos. Obtuvieron plantas haploides a partir de los cruces intergenéricos de Cayena lisa Serrana como progenitor femenino y Curujey (*Tillandsia fasciculata* SW) como progenitor masculino, así como, mediante cultivo de anteras.

2.5.2 Ingeniería genética.

Son técnicas biotecnológicas que permiten transferir ADN foráneo de una especie donante a una especie vegetal receptora por medio de un plásmido bacteriano, virus o algún otro medio (ej. biolística, electroporación, microinyección). El proceso se conoce también como transformación (Poehlman y Allen, 2003). La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* Smith y Townsend, es el método que tiene mayor utilización (Clive, 2008).

Debido a que el mejoramiento clásico de la piña es extremadamente laborioso y consume mucho tiempo (Cabot y Lacoevilhe, 1990) se establecieron procedimientos eficaces para la transformación genética de la piña (Sripaoraya *et al.* 2001; Espinosa *et al.* 2002) y se informó de resultados exitosos en la transformación de la piña mediante *Agrobacterium* (Firoozabady *et al.* 2006) por lo que la ingeniería genética parece ser una estrategia prometedora en este cultivo (Carlier *et al.* 2007).

Los primeros ensayos en invernaderos y campo de clones de piña genéticamente transformados, mostraron la expresión reducida de la polifenol oxidasa (ppo) y de la 1- aminociclopropano-1-carboxilato sintetasa o expresión del gen que confiere resistencia a bialaphos (bar) (Rohrbach *et al.* 2000; Sripaoraya *et al.* 2001; Botella y Fairbairn, 2005; Sripaoraya *et al.* 2006; Trusov y Botella 2006; Yabor *et al.* 2009).

Los estudios realizados en plantas transgénicas de piña se dirigieron al control de la floración, la calidad del fruto, la resistencia a nemátodos, virus y al desorden fisiológico llamado corazón negro, que ocurre con temperatura y luminosidad bajas (Bartholomew *et al.* 2003; Sanewski, 2004; Ko *et al.* 2006; Wang *et al.* 2009).

2.5.3 Selección *in vitro*. Rodríguez *et al.* (2002) describieron un protocolo para la selección *in vitro* de genotipos resistentes a diferentes niveles de infestación del hongo *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, que causa la pudrición del corazón de las posturas de piña.

No obstante trabajos de selección *in vitro* a herbicidas y expresión reducida de enzimas en plantas transgénicas de piña se desarrollaron en los últimos años, como se señaló en el sub-acápite anterior (Rohrbach *et al.* 2000; Sripaoraya *et al.* 2001; Botella y Fairbairn, 2005; Sripaoraya *et al.* 2006; Trusov y Botella 2006; Yabor *et al.* 2009).

2.5.4 Mutagénesis *in vitro*.

En los últimos tiempos los trabajos señalados en piña en condiciones *in vitro* están relacionados con la utilización de mutágenos químicos; Mhatre y Rao (2002) señalaron que el número de brotes múltiples de piña *in vitro* disminuyó cuando aumentó el tiempo y la concentración de Etilmetano sulfonato (EMS); Yun y Ching (2010) encontraron mutantes clorofílicos, así como, alteraciones en la espinosidad de las hojas en plantas de piña regeneradas a partir de callos tratados con Dimetil sulfóxido(DMSO).

2.5.5 Variación somaclonal.

Mediante el cultivo de tejidos se puede regenerar plantas funcionales a partir de microsporas, sacos embrionarios, embriones inmaduros, fragmentos de tejidos, callos, células aisladas o protoplastos (Maluszynski *et al.* 2003).

Varios investigadores coinciden en señalar que la variación somaclonal ocurre *in vitro* en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como, en plantas regeneradas de los mismos y que es generalmente espontánea, con producción de cambios que pueden ser heredables o no (Larkin y Scowcroft 1981; Pierik, 1997; Sahijram *et al.* 2003; Anu *et al.* 2004; Mujib, 2004).

Cuando la variación somaclonal fue heredable se asoció con rearrreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez-Teyer *et al.* 2003; Noro *et al.* 2007), mientras que cuando la variación somaclonal fue epigenética, pudo ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable (Pierik, 1997; Kaeppler *et al.* 2000; Jain, 2001; Smulders, 2005), que pudo estar relacionado con alteraciones en los patrones de metilación del ADN (Kubis *et al.* 2003).

Estudios más recientes de la variación epigenética entre poblaciones, organismos individuales y en condiciones medioambientales diferentes, hacen pensar en su importancia para la adaptación de fenotipos adecuados y su transmisión heredable (Vaughn *et al.* 2007).

Hasta hoy pocos ejemplos de herencia epigenética transgeneracional se señalaron, el conocimiento acerca del posible mecanismo está en desarrollo y todavía hay muchas preguntas por responder, sin embargo la comprensión de la herencia epigenética transgeneracional podría ser la respuesta a varias incógnitas relativas a la adaptación (Hauser *et al.* 2011).

Existen procesos biológicos que pueden propiciar variación somaclonal heredable, que deben estar relacionados con mutaciones. Hay investigadores que le dieron mucho peso a que la variación somaclonal pudo estar asociada a cambios en el número de cromosomas (Brown *et al.* 1993) y a la poliploidía (Bhatia *et al.* 2005).

Es muy importante señalar que durante el cultivo *in vitro*, plantas como fresa (*Fragaria moschata*), cítricos (*Citrus sinensis* Osbeck.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y manzana (*Malus silvestres* L Mill) sufren de cambios hormonales y morfológicos temporales (como aparición o desaparición de espinas y ramificaciones, morfología de la hoja, etc.) lo que se debió al proceso de rejuvenecimiento, promovido en muchos casos por reguladores de crecimiento y no a causa de variación somaclonal (Mujib, 2004).

La variación somaclonal puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética y, en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables (Cassells y Curry, 2001; Araújo *et al.* 2004). Es muy útil en el mejoramiento de plantas, ya que la variación en las células somáticas de los tejidos puede ser utilizada para obtener características novedosas en los cultivos (Cardoza y Stewart, 2004).

El fenómeno de la variación somaclonal puede promover eventos positivos y negativos, según Sánchez-Chiang y Jiménez (2009), en programas de mejoramiento genético la variación somaclonal

puede ser un recurso importante que genera variabilidad. Sin embargo, durante la micropropagación y en bancos de germoplasma *in vitro*, este tipo de variación es indeseable.

Al analizar la variación somaclonal en el cultivar híbrido de banano 'FHIA 18' (*Musa AAAB*) mediante embriogénesis somática y organogénesis (Kosky *et al.* 2006) señalaron una variación total de 0,7% y de 0,3% respectivamente, mientras Orellana *et al.* (2010) informaron una variación total en todos los caracteres morfológicos en plantas propagadas por embriogénesis somática en el cultivar 'Cavendish enano' de 0,34% en el segundo ciclo de cultivo y recomendó este método para la propagación masiva de plantas de este cultivar.

Para comprobar la variación somaclonal producida por el cultivo *in vitro* es necesario realizar un conjunto de determinaciones fenotípicas y genotípicas que permitan su identificación como individuos con caracteres heredables. Esta variación puede pre existir en poblaciones naturales de plantas en colecciones de campo, en bancos de germoplasma o desarrollarse *de novo* como resultado de las condiciones de cultivo *in vitro* (Castillo *et al.* 2010). Esta tiene aplicación relevante, tanto en la propagación como en la transformación y en la clonación en plantas eucariotas (Prado *et al.* 2010).

Este procedimiento se utilizó para producir variabilidad en plantas de propagación vegetativa como el ajo (*Allium sativum* L.) (Al-Zahim *et al.* 1999). Cultivares con alto valor comercial se obtuvieron también por medio de esta técnica en arroz (*Oryza sativa* L.) (Araújo *et al.* 2004), chile dulce (*Capsicum annuum* L.) (Anu *et al.* 2004), palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Tregear *et al.* 2002), crisantemo (*Chrysanthemum indicum* Thunb.) (Martín *et al.* 2002), hierba de San Juan (*Hypericum perforatum* L.) (Halušková y Košuth, 2003), los que lograron en todos los casos variación somaclonal heredable.

Otras variantes somaclonales de interés se utilizaron comercialmente por sus características de resistencia a enfermedades, mejora en la apariencia de las plantas, flores y frutos, tamaño, sabor, fragancia y presencia de metabolitos útiles. Tal es el ejemplo de variantes somaclonales de fresa

Fragaria moschata Weston (*Fragaria x ananassa*), resistentes a antracnosis (Hammerschlag *et al.* 2006).

En cuanto a la resistencia a dos cepas causantes de la pudrición roja *Colletotrichum falcatum* Went, Singh *et al.* (2008) evaluaron 228 somaclones de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido), tres somaclones mostraron resistencia moderada a ambas cepas (Cf 03 y Cf 08) de *Colletotrichum falcatum* Went, mientras que la variedad donante fue susceptible.

Li *et al.* (2010 a) al realizar un estudio en plantas de pasto (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) *St. Augustinegrass* regeneradas a partir de cultivo *in vitro*, encontraron que una variante somaclonal mostró ser más tolerante a las heladas que su progenitor Raleigh. En investigación posterior Li *et al.* (2010b) identificaron 119 variantes morfológicas, 115 de ellas con hábito de crecimiento semienano, hojas más cortas, anchas y entrenudos cortos; 100 mostraron menor vigor y no sobrevivieron; 15 de ellas mostraron crecimiento adecuado y se investigaron en campo; 13 de ellas fueron semienanas y de hojas más largas. Los caracteres modificados fueron estables durante la propagación vegetativa.

Jain (2001) y Li *et al.* (2010a) relacionaron 22 cultivares de diferentes especies que se obtuvieron mediante variación somaclonal con caracteres mejorados que incluyeron el rendimiento, arquitectura de las plantas, color, resistencia a enfermedades y tolerancia a temperaturas altas o bajas y a la salinidad.

La variación somaclonal puede detectarse por cambios fenotípicos visibles (en el vigor, producción, calidad, pigmentación o resistencia a enfermedades) o por medio de marcadores bioquímicos y moleculares. La detección es posible al comparar las diferencias entre el fenotipo parental y el fenotipo donde ocurrió el cambio (Sahijram *et al.* 2003).

La selección de variantes somaclonales se puede iniciar desde la primera generación, aunque se corre riesgo de que no sea estable la variación. Ravindra *et al.* (2004) en investigación realizada en geranio (*Pelargonium graveolens* L. Herit.) encontraron mayor variación entre plantas regeneradas del cultivo *in vitro* en la primera generación vegetativa que sigue a la fase de cultivo *in vitro*, que

entre plantas parentales a partir de cortes del tallo, en cuanto al rendimiento, altura de la planta, tamaño de la hoja y contenido de aceites esenciales. En la segunda generación vegetativa que sigue a la fase de cultivo *in vitro*, el 100% de los somaclones seleccionados mantuvieron sus rasgos, por lo que se lo atribuyeron a causas genéticas.

En piña la variación somaclonal se señaló por Wakasa (1979, 1989), Dewald *et al.* (1988), Liu *et al.* (1989) y Feuser *et al.* (2003). La diferencia en la espinosidad de plantas de piña regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática en el cultivar Cayena lisa, informado por Firoozabady y Moy (2004), probablemente se deba a variación somaclonal. Estos estudios señalaron pocas características, como son el número de hojas por plantas, el número de espinas en las hojas y el color de éstas.

2.5.5.1. Factores que influyen en la variación somaclonal.

El método de cultivo *in vitro* y el estado físico del medio:

La variación somaclonal se puede generar en todos los métodos comúnmente empleados para el cultivo *in vitro* de plantas (cultivo de yemas, organogénesis y embriogénesis somática). Sin embargo, el patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la variación somaclonal. Por ejemplo, cuando un tejido altamente diferenciado pasó por una etapa de desdiferenciación con una alta tasa de división celular, se generó mayor variación somaclonal que cuando ocurrió un desarrollo directo hacia regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones (Sahijram *et al.* 2003; Cardone *et al.* 2004).

El estado físico del medio de cultivo (líquido o semi-sólido) también puede influir en la aparición de variantes somaclonales, ya que un mismo tejido se comporta de diferente manera frente a los factores físicos asociados (oxigenación, tensión superficial y daños mecánicos). Por ejemplo, una deficiencia en la oxigenación del callo causó la producción de etanol que puede actuar como mutágeno (Cardone *et al.* 2004). En otro ejemplo, se encontró que explantes de piña (*Ananas*

comosus cv. Amarelinho) cultivados en un sistema de inmersión temporal (medio líquido) presentaron tasas mayores de variación somaclonal que en medios de cultivos semisólidos (Feuser *et al.* 2003).

Edad del cultivo y número de subcultivos:

La proporción de variantes somaclonales aumentó en cultivos envejecidos y en plantas con varios subcultivos (Cardone *et al.* 2004). Lo anterior probablemente se debe a la acumulación de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y mutaciones (Pierik, 1997; Sahijram *et al.* 2003; Cardone *et al.* 2004). En ese sentido, Sahijram *et al.* (2003) mencionaron que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho subcultivos, en el caso de diferentes cultivares de banano.

Al realizar un estudio en crisantemo (*Chrysanthemum indicum* Thunb.), Miñano *et al.* (2009) encontraron una planta que mostró diferencias en el patrón de bandas en el séptimo subcultivo.

El medio de cultivo y sus componentes:

Un elemento de gran peso que se plantea como una causa de la variación es el efecto del medio de cultivo y su composición hormonal en la regeneración de plantas.

Se encontró que los reguladores del crecimiento, principalmente aquellos con naturaleza auxínica pueden promover la metilación del ADN, lo que provocó cambios epigenéticos (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Sahijram *et al.* 2003).

Joyce y Cassells (2002) señalaron que el cultivo *in vitro* produjo una alta metilación del ADN de la papa, fundamentalmente cuando se utilizaron hojas jóvenes, esta se determinó mediante un análisis de enzimas de restricción sensibles a la misma. Los criterios de Salisbury y Ross (1992) consolidan el punto de vista de que las auxinas y citoquininas cambian algunos productos génicos, como las proteínas, con la misma rapidez con que promueven el crecimiento.

Las dosis de reguladores del crecimiento que incluyen a las citoquininas, se han considerado las causantes de la variación somaclonal ocurrida al someter órganos o partes de estos al cultivo *in vitro*. Viegas (2008) evaluó la ocurrencia de la variación somaclonal en plantas de *Heliconia bihai*

L., micropropagadas a partir de ápices caulinares en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), con $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de bencil-amino-purina (BAP) que posteriormente fueron subcultivadas en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de esta misma citoquinina para la inducción de brotes axilares, seleccionaron 2000 plantas y la tasa de variación somaclonal obtenida fue de 61,4%, destacándose los tipos de porte bajo, clorofílicos y coloración del pseudotallo y pecíolo.

Otahola (2000) en maracuyá (*Pasiflora edulis* SIMS) encontró menor cantidad de variantes somaclonales con dosis de $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de benciladenina (BA) y con dosis bajas obtuvo mayor cantidad; mientras Ling *et al.* (2002) obtuvieron dos somaclones de arroz (*Oriza sativa* L.) a partir de plantas estériles que se convirtieron en fértiles cuando se cultivaron en suspensiones celulares que contenían $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido naftalenacético (ANA) y $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de kinetina (KIN), por su parte Rakoczy -Trojanowska (2002) seleccionó varios somaclones de cebada cuando aplicó altas dosis de 2-4-diclorofenoxiacético (2-4D) y Dicamba.

En el caso de la piña, Smith *et al.* (2003) señalaron que el procedimiento para la producción de plántulas donde se utiliza citoquininas suplementadas con auxinas, en particular el ANA y se obtienen tejidos desorganizados, el material obtenido está más propenso al incremento de cambios genéticos producidos por la variación somaclonal, los cuales pueden ser heredables

Existen informes que describen la aplicación de una citoquinina aromática, particularmente meta-topolin (N^6 -(meta-hidroxibenciladenina) (mT) en la micropropagación de plantas de piña; Teklehaymanot *et al.* (2010) indicaron que las plantas crecieron mejor en un medio de cultivo con mT que en una concentración equivalente de benciladenina. La piña mostró buenos resultados en su respuesta al meta-topolín, las plantas se desarrollaron con características morfológicas normales, sin ocurrencia de variación somaclonal y se observó que el mT fue superior en todo el sistema de cultivo *in vitro*.

Otros autores señalaron resultados favorables, sin la ocurrencia de variación somaclonal en la micropropagación de la piña MD2, con una tasa de multiplicación alta al utilizar medio de cultivo

semi-sólido o líquido Murashige y Skoog (1962), suplementado con 7,5 mg.L⁻¹ de BAP y 2,0 mg.L⁻¹ de ANA (Be y Debergh 2006; Danso *et al.* 2008).

Genotipo:

El efecto del genotipo se manifiesta en la regeneración de las plantas. En caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido), Pérez (1998) encontró diferencias de 1,3% a 12,5% de variación somaclonal en dependencia de los cultivares. Este autor indicó que la influencia del genotipo en la variabilidad somaclonal puede estar dada por dos causas; una es que sea más inestable y que tenga un mayor número de mutaciones en el tejido y la otra que los genotipos tengan variada respuesta a la variabilidad que se produce por el cultivo *in vitro*.

Explante:

Al tener en cuenta que no todos los explantes tienen igual frecuencia de regenerantes se debe asumir que también podrán tener diferentes frecuencias de variación, pero no se puede analizar de forma aislada, separado de los demás factores (Pérez, 1998).

Al analizar la variación en plantas regeneradas de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, a partir de organogénesis de explantes de raíces, Polanco y Ruiz (2002), encontraron tres somaclones que contenían el 40% de la variación observada en las mismas.

De acuerdo con Orellana *et al.* (2006) el cultivo de tejidos combinado con la mutagénesis *in vitro* son herramientas útiles para inducir variabilidad y reducir el tiempo en la selección de cultivares con adecuadas características productivas y resistentes a enfermedades, por lo que combinaron la técnica de inducción de callos y la mutagénesis para producir variabilidad en caña de azúcar (*Sacharum spp.* Híbrido) y obtuvieron dos mutantes resistentes a la roya (*Puccinia melanocephala* H y P Sydow.) con características similares al control.

2.5.5.2 Técnicas utilizadas para la detección y cuantificación de la variación somaclonal.

La variación somaclonal puede ser caracterizada por diversos tipos de marcadores: (a) morfológicos, tales como estudio del cariotipo (análisis citológico), tamaño, color de las flores, forma de la hoja, etc. (Mehta y Angra, 2000); (b) patrones isoenzimáticos, que se basan en la presencia

de isoformas de enzimas específicas, que tienen la misma actividad, pero con diferente estructura molecular (Seo *et al.* 2004); (c) los basados en proteínas de reserva de las semillas (Campa *et al.* 2004, Martín-Cuevas *et al.* 2004); y (d) aquellos basados en el ADN (Picca *et al.* 2004).

Se desarrollaron diferentes técnicas moleculares que se utilizaron en estudios de evolución genética, poblaciones, ecología, mapeo genético y clonación de genes (Picca *et al.* 2004). Estas técnicas moleculares fueron también una herramienta útil para detectar variación somaclonal de una manera más precisa y a nivel del ADN (Cassells y Curry, 2001; Martín *et al.* 2002; Polanco y Ruiz 2002; Mujib, 2004), así como, para determinar niveles y mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal (Aravanopoulos, 2003).

Estudios mediante marcadores moleculares determinaron la magnitud de la variación somaclonal en especies del género *Solanum* (Aversano *et al.* 2009). Falta de polimorfismo asociado con la regeneración *in vitro* se encontraron en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Smulders *et al.* 1995), abeto (*Abies alba* Mill.) (Fourré *et al.* 1997), palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Rival *et al.* 1998), begonia (*Begonia aceroides* Irmsch) (Bouman y De Klerk 2001), almendra (*Prunus amygdalus* Batsch) (Martins *et al.* 2004) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (Barandalla *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2007) al utilizar marcadores RAPD, ISSR y AFLP. Por el contrario, mayores diferencias se señalaron en alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Piccioni *et al.* 1997), en flor de gorro (*Codonopsis lanceolata* Wallr) (Guo *et al.* 2006a) y pera (*Pyrus communis* L.) (Palombi *et al.* 2007) con el empleo de marcadores RAPD e ISSR.

Se analizaron variantes fenotípicas de piña (*Ananas comusus* L. Merr.) sin espinas obtenidas *in vitro* mediante el método RAPD para amplificar el ADN polimórfico, en este sentido Soneji *et al.* (2002) estudiaron la fidelidad genética de regenerantes de piña obtenidos mediante cultivo *in vitro* para distinguir si procedían de fenotipos espinosos. En este caso de 59 cebadores arbitrarios utilizados, 29 produjeron bandas únicas del fenotipo liso y 30 del fenotipo espinoso y de 914 bandas determinadas, 55 fueron polimórficas para el fenotipo liso y 51 para el fenotipo espinoso, además se encontró variabilidad genética de los regenerantes mediante el coeficiente de similitud. También

en piña (*Ananas comusus* var. *comusus* L. Merrill), Feuser *et al.* (2003) encontraron 7,5% de variantes somaclonales mediante el método estacionario y 5% mediante el método de inmersión temporal.

Grupos de RFLPs (Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción) de origen nuclear y citoplasmático se utilizaron para separar grupos de clones en cada colección lo que proporcionó información de utilidad para la identificación taxonómica y el mejoramiento genético en caña de azúcar (*Saccharum* ssp.) (Cornide *et al.* 2000). Las bandas resultaron de gran utilidad, ya que contribuyen a la identificación inequívoca, con el monitoreo de los genes marcados (Cornide *et al.* 2002).

El análisis con técnicas moleculares explora al azar un número de loci en el genoma y los compara, pero una importante parte del genoma no es explorada. AFLP es una técnica muy eficiente pues genera un mayor número de bandas por combinación de cebadores que el generado por otras vías. La técnica de AFLP es relativamente fácil de aplicar, utiliza pequeñas cantidades de ADN y no requiere un conocimiento previo de las secuencias. Los marcadores AFLP se utilizaron ampliamente para el análisis de la variación somaclonal (Puente *et al.* 2008).

En este sentido AFLP es una técnica adecuada para estudiar la diversidad en piña (*Ananas comusus* var. *comusus* L. Merrill), lo que quedó demostrado en el trabajo de caracterización de dos colecciones de piña (*Ananas comusus* L. Merr.) (Paz *et al.* 2005).

Al utilizar marcadores AFLP para estudiar una colección de caña de azúcar (*Saccharum* ssp. Híbrido) encontraron dos marcadores y 48 fragmentos diferenciales que permitieron la identificación de 11 de los 15 genotipos analizados (Rodríguez *et al.* 2005).

En estudios de variantes somaclonales de nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott), Chen *et al.* (2006), observaron pequeñas diferencias genéticas y marcadas modificaciones en el fenotipo. Resultados similares se determinaron por Prado *et al.* (2007) en variantes somaclones de kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A. Chev).

2.5.5.3 Efectos del cultivo *in vitro* en la anatomía y procesos fisiológicos y bioquímicos de somaclones.

Muy pocas investigaciones se realizaron para evaluar el comportamiento anatómico y bioquímico en plantas obtenidas mediante cultivo de tejidos, estas no se desarrollaron a profundidad y solamente sobre algunos aspectos.

Existen investigaciones de somaclones de arroz (*Oriza sativa* L.) que se sometieron a diferentes fuentes de estrés. En este sentido Price *et al.* (2002) señalaron que la ganancia óptima de CO₂ se logró con la apertura de los estomas, mientras se minimizó la pérdida de agua. García-Sánchez *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la inundación y sequía en posturas de cítricos (*Citrus sinensis* Osbeck.). Qing-Ming *et al.* (2008) evaluaron la respuesta de plantines de pepino (*Cucumis sativus* L.) al estrés hídrico.

González y García, (1997), así como, Suárez y González (2004) señalaron la utilización de marcadores morfológicos y morfoagronómicos para la selección de genotipos de arroz (*Oriza sativa* L.) tolerantes a condiciones salinas. Encontraron tres radiomutantes de mejor comportamiento que la variedad donante en cuanto a los caracteres analizados para este tipo de estrés: porcentaje de germinación, longitud del sistema radical y masa seca de las raíces y hojas.

Barboza *et al.* (2006) estudiaron las características anatómicas de plantas micropropagadas y encontraron que aunque la estructura básica de la hoja de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) no cambió en condiciones *in vitro*, se expresó plasticidad del fenotipo durante este período a través de los cambios en el número de estomas, así como, en el espesor del parénquima clorofílico y acuífero.

El efecto de la inmersión temporal sobre aspectos fisiológicos se estudió por González-Olmedo *et al.* (2005), los que utilizaron un biorreactor para controlar los cambios fotomixotróficos a fotoautotróficos en plántulas de piña y demostraron que la luz es el factor que ejerce mayor influencia en la calidad de las plantas en estas condiciones.

Nievola *et al.* (2005) señalaron que las plantas de piña pueden realizar los ciclos metabólicos del ácido crasulaciánico y C3, en dependencia del régimen de temperatura utilizado durante el cultivo *in vitro*, ya que la misma modula la actividad enzimática y la expresión de genes mediante el ácido absísico y el ácido indol acético, estos resultados ponen de manifiesto el efecto de la temperatura en la determinación de la vía de la fijación del carbono de las plantas de piña desarrolladas *in vitro* y la participación del ácido absísico y ácido indol acético en el ciclo del ácido crasulaciánico.

En estudios desarrollados en somaclones de pastos (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) al compararlos con la variedad donante, estos tenían volúmenes de agua y crecimiento más altos que el donante, sin diferir en la evapotranspiración. Estos dos somaclones también mostraron la actividad de la superóxido dismutasa más alta después de un prolongado estrés de humedad (Lu *et al.* 2009).

El sistema de defensa antioxidante consta de varias enzimas, como la superóxido dismutasa que protege las plantas de los efectos del oxígeno reactivo, tales como los radicales superóxido (O^{2-}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los radicales hidroxilos que se produjeron en proporciones elevadas cuando se expusieron las plantas a condiciones de estrés (Mittler, 2002).

Estos sistemas incluyen sustancias de bajo peso molecular como el ácido ascórbico y enzimas que regeneran formas reducidas y de acuerdo con Raimbault *et al.* (2011) estas enzimas interactúan con especies reactivas de oxígeno como es el caso de las superóxido dismutasa.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical O^{2-} y el H_2O_2 es un evento común asociado con los procesos bioquímicos normales de la planta (Slesak *et al.* 2007). Estas especies pueden causar daños oxidativos a través de acciones como la peroxidación de lípidos con la destrucción de las membranas, inactivación de proteínas y mutación del ADN (Torres *et al.* 2006). Varias enzimas antioxidantes como las peroxidasas y la superóxido dismutasa participan durante el ataque de patógenos y son la primera línea de la defensa contra el estrés oxidativo (Shetty *et al.* 2007). La inducción o supresión de generación de ERO en las hojas se relaciona con la actividad de

enzimas antioxidantes que disminuyen niveles de H_2O_2 (directa u oxidación) y de $O^{\cdot -}$ (por dismutación) (El -Khallal, 2007).

En esta revisión se aprecia que la variación somaclonal se utilizó en especies de propagación sexual y asexual, con el objetivo de lograr somaclones con resistencia a enfermedades y estrés, mejor rendimiento, estructura de las plantas y frutos, así como, la presencia de metabolitos secundarios. La determinación de la magnitud de la variación somaclonal se realizó mediante diferentes técnicas moleculares. El desarrollo de la transformación genética de la piña se llevó a efecto en los últimos años.

Sin embargo, las investigaciones realizadas acerca del efecto del cultivo *in vitro* en la variación somaclonal en piña fueron pocas y se limitaron al análisis de algunos caracteres, fundamentalmente evaluación de la fidelidad genética en la fase *in vitro*; no se realizaron estudios de continuidad a lo largo de las diferentes generaciones que comprobaran la variabilidad o estabilidad en las mismas, sin realizarse estudios relacionados con aspectos fisiológicos y bioquímicos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Generalidades

El trabajo experimental se dividió en dos fases, la primera se desarrolló en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas, perteneciente a la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA) y la segunda en áreas productivas de la Estación Experimental "Dr. Juan Tomás Roig" de esta propia institución, situada a 21°47' de latitud Norte y 78°17' de longitud Este. El período experimental fue entre los años 2005 y 2009, sobre un suelo Ferralítico rojo compactado eútrico, sobre caliza dura (Hernández *et al.* 1999).

El comportamiento de las variables meteorológicas según datos del Centro Meteorológico Provincial (Estación 346), fue el que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Comportamiento de las variables meteorológicas durante el desarrollo de la investigación.

Variable/Año	2005	2006	2007	2008	2009
Temperatura (°C)*	25,9	23,7	27,2	25,7	21,0
Pluviometría total (mm)	1275,2	1016,9	1377,9	1016,7	1000,2
Humedad relativa (%)*	81,8	89,8	66,5	89,7	75,8

* Promedios del año.

Material vegetal

Se utilizaron 50 yemas de coronas de frutos maduros de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) del cultivar Española roja pinareña, considerado a fines experimentales como donante que provenían de plantas desarrolladas en el Banco de Germoplasma del Centro de Bioplasmas y se sometieron a cultivo *in vitro* mediante el protocolo descrito por Daquinta y Benegas (1997). Se lavaron los explantes con detergente comercial y se enjuagaron con suficiente agua corriente tres veces. Posteriormente se introdujeron en agua con antioxidante (150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico). La desinfección se realizó dentro del flujo laminar, las coronas deshojadas se sumergieron en una solución de NaOCl 0,5% (m/v) durante 20 min, posteriormente se lavaron con agua desionizada estéril con el mismo antioxidante. A continuación se extrajeron las yemas de la corona en forma de cono, de aproximadamente 0,6-0,8 cm³ y se realizó una segunda desinfección con igual

concentración de NaOCl durante 10 min, las yemas se lavaron cuatro veces con agua desionizada estéril durante 5 min.

3.1 Evaluación de la variabilidad fenotípica y genética en plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña, obtenidas mediante organogénesis indirecta.

Se colocaron los explantes en recipientes convencionales para la micropropagación (300 mL), 25 mL de medio de cultivo líquido y se colocaron cinco explantes/frasco. El medio de cultivo incluyó las sales MS según Murashige y Skoog (1962), 100 mg.L⁻¹ mio-inositol; 0,1 mg.L⁻¹ tiamina HCL; 30 g.L⁻¹ sacarosa; 4,4 µmol.L⁻¹. BA y 5,3 µmol.L⁻¹ ANA. Las yemas se incubaron en una cámara de luz artificial de 25 a 30 µmol·m⁻²·s⁻¹ flujo de fotones fotosintéticos, fotoperíodo de 16 horas luz/8 oscuridad y temperatura de 25±1°C.

Luego de 42 d, los brotes obtenidos se transfirieron a medio de cultivo de multiplicación, que contenía iguales componentes que el medio de implantación, pero con 9,3 µmol.L⁻¹ BA y 1,6 µmol.L⁻¹ ANA. Se subcultivaron cada 42 d de intervalo por un período de 210 d.

De las plántulas obtenidas se tomaron aleatoriamente 300 hojas jóvenes de la región media de las mismas como explantes para la formación de callos (Daquinta *et al.*1996) y se colocaron tres hojas por placa petri que contenían un medio de cultivo con las sales de MS, 100 mg.L⁻¹ mio-inositol; 0,1 mg.L⁻¹ tiamina-HCL; 30 g.L⁻¹ sacarosa; 29 µmol.L⁻¹ ANA y 9,7 µmol.L⁻¹ KIN. Los callos proliferaron durante cuatro meses y se subcultivaron cada 30 d en una cámara de luz artificial de 25 a 30 µmol·m⁻²·s⁻¹ flujo de fotones fotosintéticos y temperatura de 25±1°C.

Se seleccionaron 500 callos con diámetro aproximado de 3 mm de forma aleatoria y se transfirieron a un medio de regeneración de plantas con las sales de Murashige y Skoog (1962), 100 mg.L⁻¹ mio-inositol; 0,1 mg.L⁻¹ tiamina-HCL; 30 g.L⁻¹ sacarosa; 0,9 µmol.L⁻¹ ácido indol-3-butírico (AIB); 1,1 µmol.L⁻¹ BA y 0,09 µmol.L⁻¹ ácido giberélico (GA₃), durante un período de cuatro meses en las mismas condiciones definidas para la formación de callos.

Todos los medios de cultivo se ajustaron a pH 5.7 antes de ser esterilizados en autoclave a 121°C y 1.2 kg.cm² de presión durante 15 min.

Las plantas obtenidas con cinco hojas como promedio se cultivaron *ex vitro* durante seis meses de acuerdo a la metodología propuesta por Yanes *et al.* (2000). Las plántulas se ubicaron en bolsas plásticas de 83 cm³ con una mezcla de zeolita y materia orgánica (1:1, v:v). El riego se realizó con microjet, el agua se aplicó por 25 s, cada 30 min en la primera etapa y posteriormente un riego diario. Las plantas se mantuvieron en casa de aclimatización, donde se determinó el flujo de densidad fotosintética a las 9am cada 15 d con el equipo CIRAS-2, el que se comportó en un rango de 456 a 460 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Se realizó el control fitosanitario y la fertilización según lo indicado por Isidrón (2002).

Después de la aclimatización, se transfirieron las plantas a condiciones de campo con un marco de plantación de 1,40 m x 0,40 m. Las actividades de preparación del suelo, labores agrícolas y la inducción de la floración con la mezcla de *Flordimex* (ácido-2-cloroetil-fosfónico) (200 mL), urea (30 kg) y CaCO₃ (600 g) a los 12 meses de efectuada la plantación se realizaron de acuerdo al Instructivo Técnico para el cultivo de la piña (MINAG, 1989). Las plantas se propagaron asexualmente por tres generaciones y se realizaron estudios que se detallarán a continuación.

3.1.1 Evaluación de la primera generación vegetativa.

Con el objetivo de evaluar la variabilidad causada por las condiciones del cultivo *in vitro* mediante organogénesis indirecta sobre diferentes características fenotípicas, tanto en las plantas como en los frutos de estas, se compararon a los 17 meses de la plantación en condiciones de campo 387 plantas procedentes del cultivo *in vitro*, al ser la cantidad de plantas que durante el período de aclimatización alcanzaron el tamaño y la masa similar al donante no cultivado *in vitro*. La comparación de estas se realizó con igual cantidad de plantas del donante no sometidas a cultivo *in vitro*.

Se establecieron dos poblaciones de plantas con los dos materiales, las plantas fueron distribuidas al azar en cada lote. En esta generación se seleccionaron plantas con características fenotípicas

diferentes al cultivar donante en la población de plantas procedentes del cultivo *in vitro*. Las evaluaciones realizadas a las plantas (Tabla 3) y a los frutos (Tabla 4) se detallan en cada una de ellas.

Tabla 3. Descripción de las variables evaluadas en las plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill).

Variabes	UM	Momento de la evaluación	Descripción
Altura de la planta	cm	Antes de la inducción floral	Con regla graduada de 1m. Según IBPGR 4.1.3
*Diámetro del pedúnculo	cm	En la cosecha	Con pie de rey de forma horizontal, en la zona media del mismo.
*Brotos basales/planta	U	Dos meses después de cosecha	Conteo visual
*Brotos claveles/planta	U	Dos meses después de cosecha	Conteo visual
*Brotos criollos/planta (Desarrollo inicial)	U	Dos meses después de cosecha	Conteo visual
*Estructura de la planta	escala	Antes de la inducción floral	Abierta. Ligeramente abierta. Compacta. Compacta a ligeramente abierta.
Color de las hojas	escala	Antes de la inducción floral	Según escala del IBPGR 4.1.8
Presencia de espinas en las hojas	escala	Antes de la inducción floral.	Según escala del IBPGR 4.1.16

*No recogido por IBPGR (1991).

Tabla 4. Descripción de las variables evaluadas en el fruto al momento de la cosecha de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill).

Variabes	UM	Descripción
Altura del fruto	cm	Con pie de rey, la distancia entre los extremos. IBPGR 4.3.5
Diámetro del fruto	cm	Se midió el diámetro medio con pie de rey. IBPGR 4.3.6
Masa del fruto con corona	kg	Con balanza técnica el día de la cosecha. IBPGR 4.3.5
*Número de ojos en el fruto	U	Conteo visual del número de ojos.
*Brotos de corona por fruto	U	Conteo visual de brotes de corona en 1ra generación.
Coronas por fruto	U	Conteo visual de coronas en 2da y 3era generación.
Forma de los ojos del fruto	escala	Según IBPGR 4.3.20
*Presencia de espinas en la corona del fruto	escala	Sin espinas, espinas solo en los extremos, espinas en ambos bordes.
Forma del fruto	escala	Según IBPGR 4.3.3
Color del fruto	escala	Según IBPGR 4.3.12
Vitamina C	mg/100 mL de jugo.	En 10 frutos según Norma Cubana 77-22-16 (1982)
Acidez total	%	En 10 frutos según Norma Cubana 77-22-7 (1982)

* No recogido por IBPGR (1991).

3.1.2 Evaluación de la segunda generación vegetativa.

Al disponer de solo 10 brotes basales procedentes de cada variante fenotípica (denominadas P3R5 y Enana) para ser comparadas con plantas del cultivar donante (nunca cultivada *in vitro*) y todas ellas con plantas del cultivar Española roja pinareña, provenientes del cultivo *in vitro* (según metodología descrita en acápite 3.1) se estableció un diseño experimental completamente aleatorizado, donde los cuatro grupos de materiales (10 plantas por grupo) se distribuyeron al azar y se identificó cada individuo acorde al grupo. Cada brote basal presentaba una masa media aproximada de 400 g, plantándose estos con un marco de 1,40 m x 0,40 m para su comparación.

Las plantas y frutos se evaluaron al culminar el ciclo plantación-cosecha (cuando el 90% de los frutos alcanzaron la madurez técnica). Las evaluaciones realizadas fueron las mismas y ya señaladas en la Tabla 3 (en las plantas) y Tabla 4 (en los frutos).

3.1.3 Evaluación de la tercera generación vegetativa.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad en los individuos obtenidos se realizó el tercer ciclo de reproducción asexual, mediante brotes surgidos en la anterior generación. Para ello se comparó el cultivar donante (Española roja pinareña, nunca cultivada *in vitro*) con las variantes fenotípicas. Las evaluaciones realizadas fueron las señaladas en la Tabla 3 (en las plantas) y Tabla 4 (en los frutos).

En esta generación se determinó el ciclo desde plantación hasta cosecha (en meses), cuando el 90% de los frutos presentaron la maduración técnica (MINAG, 1989).

El experimento se desarrolló en la Estación Experimental “Dr. Juan Tomás Roig” del Centro de Bioplantitas. El diseño que se utilizó fue un bloque al azar con cuatro réplicas (80 plantas/variante, por la existencia de mayor cantidad de material en las variantes fenotípicas) a partir de brotes basales de aproximadamente 400 g, desarrollados en la segunda generación vegetativa, con

marco de plantación de 1,40 m x 0,40 m. Las actividades fitotécnicas se realizaron según el Instructivo Técnico del Cultivo de la Piña (MINAG, 1989); en esta etapa se realizaron análisis moleculares mediante AFLP, de acuerdo a la metodología que se presenta:

Material vegetal: Para la caracterización mediante AFLP se colectaron 10 hojas "D" del cultivar donante (Española roja pinareña) y de las dos variantes fenotípicas obtenidas (P3R5 y Enana). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el aislamiento del ADN.

Aislamiento de ADN: Se realizó según lo descrito por Paz *et al.* (2005), donde se maceraron 250 mg de tejido fresco en nitrógeno líquido. Posteriormente se añadieron 650 µL de tampón de extracción: Tris-Cl (50 mmol.L⁻¹, pH 7,5), ácido etilendiaminotetracético (20 mmol.L⁻¹), NaCl (0,3 mmol.L⁻¹), sarcosil (2% m/v), dodecil sulfato de sodio (0,5% m/v) y urea 4,8 mol.L⁻¹ y seguidamente se añadió 650 µL de fenolcloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1, v:v:v). Se centrifugó durante 15 min a 12 000 rpm, a temperatura ambiente para separar las fases. El sobrenadante se colocó en un tubo y se descartó el *pellet*.

Se añadieron 0,8 volúmenes de isopropanol, se agitaron los tubos y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Luego se colocaron en la centrífuga por 10 min a 12 000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con etanol 70%. El ADN se secó al vacío y se disolvió en 50 µL de agua destilada con 10 µg m L⁻¹ de Rnasa A (SIGMA).

La calidad del ADN (integridad y pureza) se chequeó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. La concentración se estimó visualmente por comparación con una serie de estándares de concentraciones (de 100-1000 ng.µL⁻¹). Todas las muestras se llevaron a una concentración de 500 ng.µL⁻¹.

Desarrollo de AFLP: La técnica de AFLP se realizó según las descripciones de Vost *et al.* (1995). La digestión del ADN genómico, preamplificación con una base selectiva y la amplificación selectiva se realizaron de la siguiente forma:

Para la digestión del ADN genómico se preparó una mezcla (50 μL) que contenía 500 ng de ADN genómico (1 μL), Eco RI (0,2 U. μL^{-1}), Mse I (0,2U. μL^{-1}), tampón RL (1X) [Tris-HAc (pH 7.5) (10 mmol.L⁻¹), MgAc (10 mmol.L⁻¹), KAc (50 mmol.L⁻¹), y ditio-treitol (5 mmol.L⁻¹)]. Se incubó durante 4h a 37°C.

Para el ligamiento de adaptadores, a la mezcla de ADN digerido se le añadieron 10 μL de solución de ligado: adaptador Eco RI (0,5 pmol. μL^{-1}), adaptador Mse I (5 pmol. μL^{-1}): Adaptador Eco RI 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'; Adaptador Mse I 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 3'-TACTCAGGACTCAT-5'.

Se realizó la preamplificación con una base selectiva para lo que se tomaron 2 μL de la mezcla de ligado y se diluyeron en 38 μL de agua (dilución 1:20). Esta solución fue el sustrato de las reacciones de amplificación. Para ello se utilizaron cebadores que poseen una región complementaria a la región arbitraria del adaptador y otra al sitio de corte reconocido por la enzima, más un nucleótido arbitrario. Para la realización de este paso se prepararon dos mezclas por separado: la mezcla uno (25 μL) contuvo los cebadores Eco RI (3 ng. μL^{-1}) y Mse I (3 ng. μL^{-1}) y el *pool* de desoxirribonucleótidos (0,8 mmol.L⁻¹). La mezcla dos (20 μL) contenía Taq polimerasa (0,05U. μL^{-1}), y el tampón de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (1X). La mezcla final de PCR se preparó de la manera siguiente: 25 μL de la mezcla uno, más 20 μL de la mezcla dos y 5 μL de ADN diluido (1:20) de la ligación. La desnaturalización inicial fue seguida 20 ciclos de la siguiente forma: 94°C (30 s), 56°C (60 s) y 72°C (60 s). Al final se realizó una dilución de 1:20. Los cebadores utilizados para la preamplificación fueron EcoRI+A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') y Mse I+A (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3').

La amplificación selectiva se realizó de la siguiente forma. El cebador Eco RI se había marcado radiactivamente con anterioridad. Para ello se preparó la siguiente mezcla (10 μL): cebador Eco RI (12,5 ng. μL^{-1}), enzima T4 Kinasa (0,5 U. μL^{-1}), tampón de la kinasa (1X), más γ 32P-ATP (0,33 μCi).

Luego de incubar 1h a 37°C, la enzima se inactivó por calor (65°C por 10 min), para la amplificación se prepararon dos mezclas. Una primera mezcla (5 µL) con los cebadores Eco RI marcado (0.5 µL de la mezcla anterior) y Mse I (6 ng.µL⁻¹) y el *pool* de desoxirribonucleótidos (0,8 mmol.L⁻¹); la segunda mezcla (10 µL) contenía la Taq polimerasa (0,1 U.µL⁻¹) y el tampón de PCR (2X); para realizar el PCR se mezclaron 5 µL del ADN preamplificado diluido 1:20, 5 µL de la mezcla uno y 10 µL de la mezcla dos, por último se llevó a cabo la reacción de PCR mediante el siguiente programa: un ciclo a 94°C (30 s), 65°C (30 s) y 72°C (60 s), disminución de la temperatura de alineamiento desde 65°C hasta 56°C durante 13 ciclos (0,7°C como promedio por ciclo) y 23 ciclos a 94°C (30s), 56°C (30 s) y 72°C (60 s).

En este paso se utilizaron tres combinaciones de cebadores para esta amplificación. Ellas fueron EcoRI+ AAT con MseI+ AAG, AGT o ACC. Estas combinaciones resultaron las más polimórficas en un ensayo preliminar con otras electroforesis. Después de la PCR se añadió tampón de carga (ácido etilendiaminotetracético (10 mmol.L⁻¹, formamida (98%), bromofenol azul (0,06%) y xileno cianol (0,06%) y se preparó un gel de poliacrilamida 6% (19:1 acrilamida: bisacrilamida), urea (7,5 mol.L⁻¹), tampón TBE (1 X), se desnaturalizaron las muestras a 95°C por 5 min y se colocaron en hielo rápidamente para evitar la renaturalización.

Se cargaron en el gel al 5% de poliacrilamida y se realizó una corrida (pre-electroforesis) por 20-30 min hasta que la intensidad bajó a 35 mA. Se cargaron las muestras y se corrió por alrededor de 3h, luego se secó el gel y se expuso a un filme de rayos X (Kodak).

Los autorradiogramas se analizaron visualmente y se construyó una matriz dicotómica donde uno, representa la presencia de la banda y cero, su ausencia. La matriz dicotómica se importó al programa NTSYS-pc (Rohlf, 2000) para proceder al análisis; primeramente se construyó una matriz de similitud genética con el empleo del índice de *Simple Matching*: $S = (a+d) / (a+b+c+d)$, donde: a= número total de bandas que están presentes tanto en el genotipo A como en el B, b = número total de bandas que están presentes en el genotipo A pero no en el B, c= número total de

bandas que no están presentes en el genotipo A, pero sí en el B y d = número total de bandas que no están presentes ni en el genotipo A ni en el B. Este índice varía de 0-1.

A partir de esta matriz se construyó otra de distancia según la fórmula $\text{Distancia} = 1 - \text{similitud}$. Un valor de distancia cercano a cero indica gran similitud entre los genotipos y cercanos a uno, gran diferencia genética entre ellos. A partir de la matriz de distancia se construyó un dendograma mediante el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) con la utilización del coeficiente DICE.

La fiabilidad de los grupos obtenidos en el dendograma se evaluó mediante un análisis de remuestreo *bootstrap* con la utilización de 2000 réplicas en el programa TREECON 1,3b (Van de Peer y De Wachter, 1994).

3.2 Caracterización anato-morfológica, fisiológica y bioquímica de los genotipos en estudio.

De la totalidad de plantas desarrolladas en la tercera generación vegetativa se transfirieron 80 plantas de cada genotipo hacia el Banco de Germoplama de Piña del Centro de Bioplasmas, en un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas. A los seis meses se le realizó la caracterización anato-morfológica, fisiológica y bioquímica a los somaclones y al cultivar donante Española roja pinareña, nunca cultivada *in vitro*.

3.2.1 Caracterización anato-morfológica.

Conteo de cromosomas: Con el propósito de comprobar la estabilidad cromosómica de los somaclones obtenidos, se tomaron raíces que se pusieron en una solución saturada de 8-hidroxiquinolina, que contenía una gota de DMSO en 25 mL y saturada con aesculina. Para la fijación se utilizó la solución *Farmer* (etanol:acético, 3:1) durante 24 h. La hidrólisis se realizó con HCl 1N a 60°C durante 10 min, después de permanecer 2h en el reactivo de *Feulgen* fueron mantenidas en enzima pectinasa a 0,84% durante 3h y tratados con ácido acético al 45% por 15 min (Sharma y Sharma, 1991). Se tomaron los ápices de cinco raíces jóvenes (1 mm de ancho y 1 mm de largo) de 10 plantas, se colocaron en portaobjetos y se realizó el aplastado. Para la tinción

se utilizó aceto-orceína al 4%. La observación microscópica para el conteo del número de cromosomas se realizó con aumento de 1000X, 1250X y 1600X en un microscopio OPTON modelo Axioscop.

Anatómica: Se seleccionó la hoja "D" de 10 plantas del cultivar donante Española roja pinareña, P3R5 y Enana. Estas fueron procesadas en el Laboratorio de Botánica de la Universidad de Ciego de Ávila, se tomó la parte central de las hojas y se seccionaron en porciones de 1 cm², se sometieron a los procesos histológicos de microtecnia convencionales según Johansen, (1940).

La fijación de las muestras se realizó en una solución FAA (formaldehído-acetol-alcohol etílico) por un período de 48 h, posteriormente se lavaron en agua corriente durante igual período de tiempo para eliminar el exceso de fijador, a continuación se deshidrataron en series crecientes de alcohol etílico (30, 50, 70, 80 y 90%) y tres pases en alcohol etílico absoluto, durante 2h cada pase.

Después del proceso de deshidratación las muestras se aclararon en alcohol-benzol (50% v/v), luego se continuó la deshidratación en tres pases de benzol durante 1h y finalmente se sumergieron en una serie de tres pases de parafina con un período de imbibición de 1h por pase.

Seguidamente se incluyeron en bloques de parafina a los que se le realizaron cortes seriados con un espesor de 15 µm, en un micrótopo manual de deslizamiento vertical.

Los cortes se colocaron en una solución con tinción doble de safranina y hematoxilina según Kiernan (1999) y se montaron en una gota de jalea de glicerina; para la observación de las muestras mediante un microscopio Carl Zeiss, al cual se le acopló una cámara digital Canon Power Shot A620. Las micro fotografías se midieron con el programa Mechanical desktop 6 power pack con un patrón de escala micrométrica de forma computarizada, carácter 40x de objetivo y 4x de zoom.

Se determinó la longitud de los estomas y su número por mm², así como, el diámetro de los haces vasculares, tamaño del parénquima acuífero y parénquima clorofílico de las hojas de las 10 plantas, se realizaron seis mediciones por hoja para un total de 60 mediciones por genotipo.

3.2.2 Caracterización fisiológica.

Se determinó la tasa fotosintética, tasa de transpiración, concentración intercelular de CO₂ y eficiencia en el uso del agua mediante un analizador infrarrojo de gases portátil CIRAS-2 Photosynthesis Systems, (Europe, PP Systems, UK); se cubrió con la hoja "D" de la planta el área entera de la cubeta (PLC6, 2,5 cm²). La concentración de CO₂ y la humedad relativa del aire que entró en la cubeta fue de 375 μmol.mol⁻¹ y 80% respectivamente, con una temperatura ambiente de 25-27°C. Antes de obtener los datos experimentales, se midió la máxima intensidad de la luz a la cual la fotosíntesis fue estable, lo que se alcanzó a 600 μmol.m⁻².s⁻¹. Se realizaron seis mediciones en 10 plantas de cada genotipo.

A partir de los valores de la fotosíntesis neta y la transpiración total, se calculó la eficiencia del uso del agua como la relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración total (Cernusak *et al.* 2007).

Para determinar los niveles de pigmentos clorofílicos (a, b y total) las hojas se molieron finamente en nitrógeno líquido y las evaluaciones se hicieron según Porra (2002). La extracción se realizó con 5,0 mL de acetona (80%, v:v). Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm, 4°C durante 15 min. El sobrenadante se colectó y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec III a 647 nm y 664 nm. Se realizaron seis mediciones en 10 plantas de cada genotipo.

3.2.3 Caracterización bioquímica.

Para conocer los efectos bioquímicos secundarios de la variación somaclonal en plantas de ambos somaclones y la variedad donante (nunca cultivada *in vitro*) se determinaron algunos indicadores que están asociados a un amplio espectro de rutas metabólicas importantes, como la respuesta a la fotosíntesis. Se evaluaron los contenidos de malondialdehído, otros aldehídos (propanal, butanal, hexanal, heptanal y propanal-dimetilacetil), fenoles libres, fenoles ligados a la pared celular, fenoles totales y el contenido de proteínas en la hoja "D" de tres plantas por genotipo.

Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el análisis. Cada determinación bioquímica partió de tres muestras independientes que se agruparon (100 mg cada una). Estas fueron

finamente maceradas (0,1 g) en nitrógeno líquido, se mezclaron con 1,4 mL de agua destilada y se agitaron ligeramente.

Se determinó el nivel de malondialdehído y otros aldehídos según Heath y Packer (1968), en este caso se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (v/v; en ácido tricloroacético 20% v/v) y las muestras se cultivaron en un baño termostataado a 100°C durante 25 min. Luego de enfriarlas en hielo, se centrifugaron a 756 rpm por 10 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec III (A_{455} nm, A_{532} nm). La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del malondialdehído y a 455 nm para otros aldehídos. Los resultados se expresaron en μg de masa fresca. Los fenoles (unidos a la pared celular, libres y totales) se determinaron según Gurr *et al.* (1992); las muestras de hojas de 0,1 g se maceraron en nitrógeno líquido y luego se adicionó 0,5 mL de metanol, las muestras se agitaron en un *vortex* y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min. El precipitado se sometió a dos ciclos de extracción con metanol, con 250 mL cada uno hasta completar 1 mL de extracto, el sobrenadante se colectó y se consideró como la reacción para los fenoles solubles. El precipitado se incubó con 0,25 mL de NaOH (2 mol L^{-1}) durante 16 h a 70°C, se adicionó 0,25 mL de HCl (2 mol.L^{-1}) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se consideró como el reservorio de los fenoles ligados a las paredes celulares. Con el objetivo de cuantificar los niveles de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, 20 μL del sobrenadante se mezclaron con 980 μL de agua destilada. Se adicionaron 100 μL del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu y las muestras se incubaron durante 5 min. Se adicionó NaHCO_3 (600 μL , saturado con NaOH 0.1 mol.L^{-1}) y transcurridos 60 min, se determinó la absorbancia a 725 nm con espectrofotómetro UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec III.

El nivel de fenoles se expresó en mg de fenoles/g de masa fresca de la hoja, referido a una curva patrón de ácido clorogénico ($\epsilon=0,0044 \text{ 1}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}$).

Para las proteínas totales se siguió a Bradford (1976), las hojas (0,1 g) se maceraron en nitrógeno líquido, la extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0,01 mol.L⁻¹, pH 7,0), el extracto de hojas (0,1 mL) se mezcló con 1,0 mL de reactivo de Bradford, se evaluó la absorbancia a 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de masa fresca de la hoja "D", referido a una curva patrón de albúmina de suero bovino.

Se determinó la actividad de diferentes enzimas vinculadas a procesos metabólicos; en el caso de la enzima fenilalanina amonio liasa, por su influencia en la fenilalanina que puede dar lugar a fitoalexinas y lignina que le proporcionan a las plantas resistencia y sostén; la superóxido dismutasa, por su papel sobre las clorofilas y las membranas de los cloroplastos; la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa, por su participación directa en la fijación nocturna del CO₂ en la piña, planta con metabolismo del ácido crasulaciánico.

Se determinó la actividad enzimática y la actividad específica de la fenilalanina amonio liasa según Jorin y Dixon (1990). Para la extracción se empleó 0,25 g de hojas maceradas con polivinil-poli-pirrolidona (0,25 g) en nitrógeno líquido, posteriormente se adicionaron 2,0 mL del tampón de extracción Tris HCl (0,1 mol.L⁻¹) pH 7,5, que contenía para-metil-sulfóxido (1,0 mmol.L⁻¹) y β mercapto etanol (15 mmol.L⁻¹), en una relación 1:4 m/v. La mezcla de la reacción contenía 0,2 mL de extracto crudo, 0,8 mL de L-fenilalanina (7,5 mmol.L⁻¹) en tampón Tris-HCL 0,1 mol.L⁻¹, pH 8,5. Las muestras se incubaron a 4°C durante 2h, posteriormente se determinó la actividad mediante la lectura de la absorbancia a 290 nm. A partir de una curva de calibrado obtenida con diferentes concentraciones de ácido trans-cinámico en el tampón de ensayo, se obtuvo el coeficiente para el cálculo de la actividad ($\epsilon=3364,1$ 1/mol·L·cm). El tiempo de reacción fue de 5 min. La actividad específica se expresó en U/g de proteína donde una unidad corresponde a 1 μmol de sustrato transformado por minuto.

La superóxido dismutasa se realizó de acuerdo con McCord y Fridovich (1969), para la extracción se empleó el mismo procedimiento descrito para la fenilalanina amonio liasa; la suspensión se homogeneizó y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. La mezcla de reacción

para determinar la actividad enzimática superóxido dismutasa contenía 20 μL del extracto enzimático, 1 mL de tampón $\text{K}_3\text{PO}_4\text{-KOH}$ 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,6; 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ácido etilén-diamino-tetracético, 0,01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ citocromo C, 0,05 mmol/L xantina, 0,03 unidades xantina oxidasa (EC 1.2.3.22) (SIGMA). La mezcla xantina-xantina oxidasa se utilizó como fuente de radicales superóxido y para la cuantificación de los mismos se siguió el método del citocromo C (550 nm) ($\epsilon_{340}=21.1 \text{ 1/mmol}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}$). El tiempo de reacción fue de 5 min, la lectura de la absorbancia se realizó a 550 nm. La actividad específica se expresó en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína donde una unidad corresponde a un μmol de superóxido transformado por minuto.

La actividad enzimática y específica de la fosfoenol piruvato carboxilasa se realizó según Siegel y Stitt (1990) y Van Quy *et al.* (1991). La reacción catalizada por la fosfoenol piruvato carboxilasa se acopló con la reacción de la malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) (SIGMA), se ensayó a 25°C y se registró la utilización de nicotinamida-adenín-dinucleótido a 340 nm ($\epsilon_{340}=6,2 \text{ mmol}^{-1}\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB). La solución de ensayo presentó un volumen total de 1,0 mL, dividido en: 718 μL (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de HEPES-KOH, pH 7,6; 10 μL (1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de NaHCO_3 , 10 μL (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de nicotinamida-adenín-dinucleótido, 10 μL (1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de MgCl_2 , 1,0 μL (1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de ditio-treitol, 1,0 μL (1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido-etilén-diamino-tetracético, 5,0 unidades de malato deshidrogenasa y 20 μL (1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de glucosa-6P y 25 μL del extracto vegetal. Las reacciones se iniciaron con 5,0 μL de fosfoenol piruvato (1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

El tiempo de reacción para la enzima fue de 3 min y la actividad enzimática se expresó en U/mg de masa fresca y la actividad específica se expresó en U/mg de proteínas donde una unidad corresponde a un μmol de fosfoenol piruvato carboxilasa por minuto.

3.2.4 - Resumen de la caracterización genotípica y fenotípica de los somaclones.

Para el cálculo del coeficiente general de variación se realizó un uso no convencional del coeficiente de variación, aunque se empleó la misma fórmula reconocida [$\text{CV} = (\text{Desviación típica}/\text{Media}) * 100$]; se calculó a partir de las tres medias obtenidas en cada carácter de los genotipos en estudio, este

coeficiente será mayor a medida que las diferencias evaluadas entre los genotipos es también mayor; se establecieron clases: menor que 23%, entre 23 y 46%; mayores que 46%, para definir menor, intermedio y mayor efecto.

Se calculó la Distancia Euclídeana de cada variante somaclonal al cultivar donante. Antes de calcular las distancias Euclídeanas los datos se estandarizaron de forma tal que variaran entre cero y uno, de acuerdo con Kantardzic (2003).

Las fórmulas utilizadas para la determinación de las distancias, al considerar el genotipo según la expresión del análisis AFLP y del fenotipo según la expresión de todos los caracteres cuantitativos, fueron las que aparecen en la figura 1.

$$\begin{aligned}
 &\text{Distancia Euclídeana de cada variante somaclonal con respecto al donante Española Roja Pinareña (Genotipo)} = \sqrt{\sum_{\text{Banda 1}}^{\text{Banda 127}} \left(\text{Valor de la banda en el variante somaclonal} - \text{Valor de la banda en el donante} \right)^2} \\
 &\text{Según el análisis por AFLP, cuando la banda estaba presente, el valor era igual a uno. Cuando la banda estaba ausente, el valor era igual a cero.} \\
 \\
 &\text{Distancia Euclídeana de cada variante somaclonal con respecto al donante Española Roja Pinareña (Fenotipo)} = \sqrt{\sum_{\text{Carácter 1}}^{\text{Carácter 37}} \left(\text{Valor del carácter en el variante somaclonal} - \text{Valor del carácter en el donante} \right)^2} \\
 &\text{Se incluyeron en el cálculo todos los caracteres fenotípicos que se evaluaron cuantitativamente (total: 37 caracteres).}
 \end{aligned}$$

Figura 1. Fórmulas empleadas para determinar las distancias Euclídeanas de cada somaclón con respecto al donante Española roja pinareña, en cuanto al genotipo y al fenotipo.

📊 Procesamiento estadístico de los datos.

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versión 8.0 para Windows (Copyright SPSS Inc., 1998-2002). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Se desarrolló la prueba t Student para el análisis de la

primera generación vegetativa (Epígrafe 3.1.1) y ANOVA de un factor y Prueba HSD de Tukey en los siguientes análisis (Epígrafe 3.1.2), (Epígrafe 3.1.3, en cuanto a características agromorfológicas de las plantas y frutos), (Epígrafe 3.2.1, características anatómicas), (Epígrafes 3.2.2 y 3.2.3) .La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0.05.

Para el análisis estadístico de la acidez total los datos se transformaron según $y' = 2 \arcsen (y/100)^{0.5}$.

En la figura 2 se muestra la metodología para la determinación de la variabilidad y la caracterización de los somaclones de piña obtenidos mediante organogénesis indirecta.

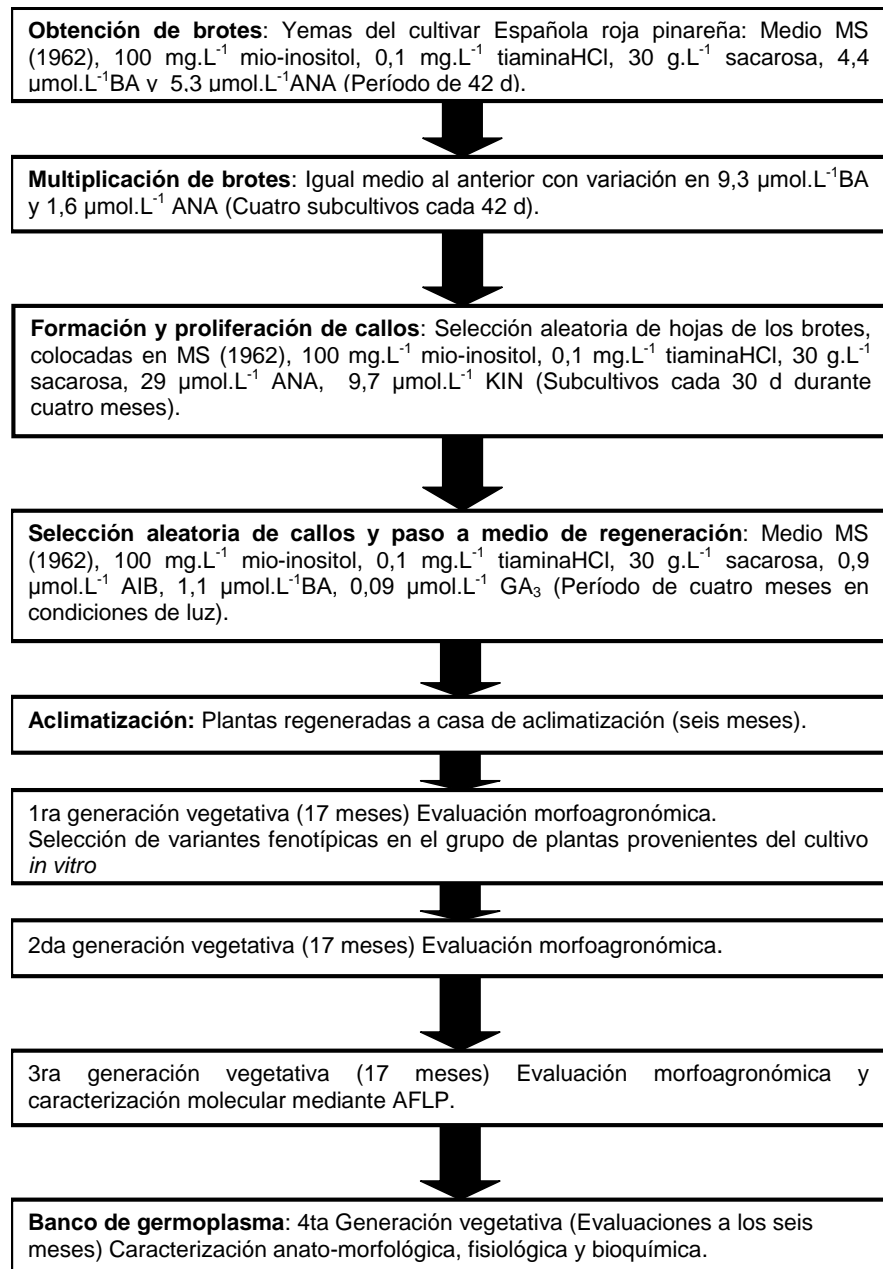


Figura 2 . Metodología utilizada para la determinación de la variabilidad mediante organogénesis indirecta en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña en la presente investigación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Evaluación de la variabilidad fenotípica y genética en plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), cultivar Española roja pinareña, obtenidas mediante organogénesis indirecta.

4.1.1 Evaluación de la primera generación vegetativa.

Las características fenotípicas cuantitativas en la primera generación, al evaluar las dos poblaciones (donante nunca cultivada *in vitro* y plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro*), no mostraron diferencias significativas en varias de las características evaluadas (el promedio de las dos poblaciones se señala entre paréntesis): diámetro del pedúnculo (2,59 cm), número de brotes claveles (cero), número de brotes criollos (uno), número de ojos (80), altura del fruto (15,0 cm), diámetro del fruto (16,0 cm), contenido de vitamina C (18 mg/100 mL de jugo) y acidez total (0,31%).

Tabla 5. Características fenotípicas cuantitativas de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) en la primera generación vegetativa.

Carácter valorado.	Española roja pinareña (Donante)*	Española roja pinareña (<i>in vitro</i>)**
	Media± ES	Media± ES
Altura de la planta (cm).	67,90 ± 0,08 b	69,90 ± 0,20 a
Número de brotes basales.	4,99 ± 0,42 a	4,01 ± 0,41 b
Masa del fruto con corona (kg).	1,57 ± 0,08 b	1,60 ± 0,10 a
Número de brotes de corona por fruto.	0,99 ± 0,08 b	3,00 ± 0,08 a

Prueba t de Student. Medias con letras desiguales difieren para $p < 0,05$. *(387 individuos que nunca se habían cultivado *in vitro*),**(387 individuos que fueron obtenidos mediante cultivo *in vitro*)

La población de plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro* mostró diferencias estadísticas y con medias mayores respecto al donante (nunca cultivada *in vitro*), en cuanto a la altura de las plantas, masa del fruto con corona y el número de brotes de corona por fruto, mientras que en las macropropagadas solamente fueron superiores en cuanto al número de brotes basales (Tabla 5).

La media de la masa del fruto con corona fue de 1,57 kg para las plantas que no fueron cultivadas *in vitro* y de 1,60 kg para las cultivadas *in vitro*, ambos constituyen rendimientos por planta adecuados para este cultivar, dado que estos valores están en el rango de 1,5 a 2,0 kg señalado por Py *et al.* (1987). Resulta de interés el incremento señalado en las plantas de la población *in*

vitro, tanto en la altura de las plantas como en la masa del fruto con corona, pues estos indicadores influyen en el rendimiento del cultivo y en particular el segundo indicador lo determina. En cuanto al número de brotes de corona por fruto fue superior en las plantas cultivadas *in vitro*, lo que constituye la manifestación de características de juvenilidad producidas por estas condiciones. Sobre este aspecto se ha encontrado que los reguladores del crecimiento, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, lo que causa variación, que puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable (Pierik, 1997; Kaepler *et al.* 2000; Jain, 2001; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Kubis *et al.* 2003; Sahijram *et al.* 2003; Smulders, 2005).

Mujib, (2004) señaló que estos son cambios morfológicos temporales promovidos, como se dijo anteriormente por reguladores del crecimiento y no como causa de variación somaclonal. No obstante, el comportamiento de la variación epigenética y su transmisión heredable se ha valorado por Vaughn *et al.* (2007) quienes señalaron que se producen variaciones en enzimas que median en las modificaciones del ADN o de proteínas asociadas que controlan la transcripción de los genes y Hauser *et al.* (2011) al evaluar la herencia epigenética transgeneracional señalaron que si se mantenían las condiciones ambientales adversas permanecen las manifestaciones fisiológicas inducidas por estas condiciones. El comportamiento de los brotes de corona en esta investigación se debió a cambios morfológicos temporales.

Sin embargo, se confirmó la obtención de verdaderos cambios heredables por Ling *et al.* (2002), a partir de somaclones estériles de arroz (*Oriza saliva* L.), que se convirtieron en fértiles al ser cultivados en suspensiones celulares que contenían ANA y kinetina, también Rakoczy - Trojanowska (2002) indicó que altas dosis de 2,4-D y Dicamba, permitieron la selección de varios somaclones de cebada (*Hordeum vulgare* L.).

Salisbury y Ross (1992) señalaron el papel de las auxinas y citoquininas, las cuales promueven el crecimiento, pero de esta misma forma pueden producir cambios en productos génicos, como las proteínas, lo que está en correspondencia con los resultados de la presente investigación en piña, ya que se utilizaron para el proceso de obtención de las plantas en condiciones *in vitro*; ANA en las fases de brotación de yemas y multiplicación de los brotes, KIN y ANA en la formación y proliferación de los callos, así como, el AIB, BA y GA₃ en la regeneración de las plantas.

La variación observada, puede pre-existir en las poblaciones naturales de plantas en colecciones de campo, en bancos de germoplasma o desarrollarse *de novo* como resultado de las condiciones de cultivo *in vitro* (Castillo *et al.* 2010). Acorde con esta consideración, otros factores pueden haber incidido en las variaciones encontradas, como es el material de partida, el tipo de explante, vinculado al proceso de callogénesis y el desarrollo de las divisiones mitóticas sucesivas, que implican ciclos celulares donde en la fase S (síntesis), es replicada la información genética del núcleo (Chiriqui, 2008), lo que ocurre en gran medida en tejidos desorganizados mediante organogénesis indirecta.

Es importante significar que se observó una disminución en cuanto al número de brotes basales en las plantas producidas mediante cultivo *in vitro*, lo que constituye un elemento negativo debido a que este es el principal material de propagación del cultivar, aunque Py *et al.* (1987) indicaron que la cantidad promedio de brotes basales en Española roja es de cuatro a cinco por planta. Ambos caracteres, número de brotes basales y formación de brotes de corona están bajo control genético y las condiciones climáticas tienen también una gran influencia, por lo que la selección en estos caracteres debe ser muy estricta (Dalldorf, 1990) y darle seguimiento en las generaciones siguientes.

Al evaluar las características fenotípicas cualitativas (Tabla 6), en la población de plantas del cultivar donante todas las plantas manifestaron las características típicas del mismo, mientras que en las obtenidas mediante cultivo *in vitro* se encontraron alteraciones en el fenotipo en dos plantas; una con espinas más pequeñas y en ambos márgenes de la hoja, tanto en la planta como en la corona, color verde muy claro de sus hojas y la planta de estructura compacta; la otra con espinas solo en los extremos de las hojas de la planta y corona, con una estructura compacta a ligeramente abierta y el fruto en forma de bloque cilíndrico.

Tabla 6. Características fenotípicas cualitativas de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) en la primera generación vegetativa.

Carácter valorado.	Española roja pinareña (donante)*		Española roja pinareña**	
	387 plantas	385 plantas	Dos plantas variadas	
Presencia de espinas en las hojas	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes.	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes.	1. Con espinas pequeñas. 2. Con espinas solo en los extremos.	
Color de las hojas	Verde con tono rojo	Verde con tono rojo.	1. Planta verde muy claro.	
Estructura de la planta	Ligeramente abierta	Ligeramente abierta	1. Planta compacta. 2. Planta compacta a ligeramente abierta.	
Forma de los ojos del fruto.	Rectangulares	Rectangulares	(1 y 2)Rectangulares	
Color del fruto	Naranja-rojizo	Naranja-rojizo	(1 y 2)Naranja-rojizo	
Forma del fruto.	Barril	Barril	2. Planta con fruto en forma de bloque cilíndrico.	
Presencia de espinas en la corona.	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	1. Planta con espinas pequeñas. 2. Planta con espinas solo en los extremos.	

* Nunca propagadas *in vitro*. ** Obtenidas mediante cultivo *in vitro*.

Es conocido que una de las desventajas de la propagación de plantas *in vitro* es el incremento de plantas con variaciones genéticas, en particular el método de organogénesis indirecta puede provocar que las plantas regeneradas difieran genéticamente unas de otras y con respecto a la planta original (Debergh, 2008).

La herencia del carácter espinosidad en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) fue evaluada a profundidad por Kinjo (1993) quien definió cinco tipos de espinosidad, entre estos *Scallop*, que se caracterizó por tener espinas de forma irregular y en menor cantidad que el tipo *Spiny* después de realizar cruces interespecíficos de cultivares de pocas espinas y espinosos. No obstante Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (1995) señalaron que el tipo de hoja espinoso corresponde a un alelo o a una familia de alelos recesivos "s" y que el tipo medio espinoso de ciertos cultivares de Española corresponde a un alelo "S₂", dominante sobre "S" y "s", respectivamente, por lo que aunque difícil, es posible encontrar estas variantes de menos espinas a partir de una variedad espinosa mediante las técnicas de cultivo *in vitro*, pero se requiere dar continuidad al menos hasta la tercera generación para comprobar la estabilidad del carácter y valorar la posible reversión o no a la forma anterior, criterio que se siguió en el presente estudio.

Con el cultivo de callos varía el potencial de la morfogénesis de las plantas obtenidas, por esta razón los callos originados de explantes de una misma planta se comportan de forma diferente. De un mismo explante pueden ser aisladas líneas de callos con diferente apariencia, digamos textura y color, así como, diferente capacidad de morfogénesis; las diferencias encontradas pueden ser el reflejo del potencial epigenético de las células o ser causadas por la variabilidad genética de las células cultivadas. En cualquiera de los casos se tiene que alcanzar el estado adulto de las plantas para confirmar la estabilidad del material obtenido, ya sea con fines de la micropropagación, así como, para determinar variantes somaclonales que puedan ser útiles, lo que se tuvo cuenta en este trabajo.

De acuerdo con estas consideraciones se hizo necesario continuar el análisis de los materiales en estudio en las siguientes generaciones para confirmar la estabilidad de los mismos y demostrar que los cambios producidos son heredables o no, pues fundamentalmente la variación somaclonal es heredable según Sánchez-Teyer *et al.* (2003) y Noro *et al.* (2007) cuando están involucrados rearrreglos cromosomales, deleciones y otras mutaciones.

No obstante los criterios señalados anteriormente, en plantas de propagación vegetativa se ha informado por otros autores de la presencia de variantes somaclonales en la primera generación. Así Ravindra *et al.* (2004), en investigación realizada en geranio (*Pelargonium graveolens* L. Herit.), encontraron mayor variación respecto al donante en cuanto al rendimiento, altura de la planta, tamaño de la hoja y contenido de aceites esenciales en la primera generación que sigue a la fase de cultivo *in vitro*. Otros investigadores informan de variantes somaclonales en pastos (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) en la primera generación vegetativa (Li *et al.* 2010 a).

Como aspectos concluyentes del análisis de la primera generación vegetativa, se destaca que a partir de las alteraciones en las características del fenotipo, tanto cuantitativas como cualitativas, se encontraron dos variantes somaclonales en esta generación (nombradas P3R5 y Enana) que representó 0,52% (dos variantes somaclonales / 387 plantas procedentes del cultivo *in vitro*), las que entre las fundamentales características manifestaron espinas solo en los extremos de las hojas (P3R5) y el segundo de morfología compacta (Enana), con hojas más pequeñas y en sentido general todos sus órganos con menor tamaño, en particular el fruto con masa mucho menor, así como hojas de coloración más clara.

El porcentaje de aparición de somaclones en piña resultó bajo al compararlo con resultados de Polanco y Ruiz (2002), Viegas (2008) y Bairu *et al.* (2006), lo que puede estar relacionado con el tipo de explante, la técnica utilizada, el medio de cultivo, el genotipo y otros factores, pero el hecho de encontrar un somaclón de menos espinosidad es importante, si se tiene en cuenta la complejidad de este carácter. La valoración de la primera generación vegetativa indicó variabilidad en las plantas que fueron cultivadas *in vitro*.

Las características mostradas por estos dos somaclones en el momento de su selección fueron las siguientes:

P3R5: Planta de buen vigor y desarrollo compacto. Fruto en forma de bloque cilíndrico que midió 15 cm de alto por 15 cm de ancho, rojo en la madurez, masa con la corona de 1,5 kg formado por 82 ojos prominentes y rectangulares. Diámetro del corazón de 2,5 cm. Hojas de color verde con tonalidades rojizas, pocas espinas hasta el final del ciclo. Desarrolló 10 brotes basales y tres criollos.

Enana: Planta de porte reducido, hojas cortas de color verde claro, de 15 a 20 cm de largo, por 8-10 cm de ancho, muchas espinas de consistencia suave. Fruto pequeño en forma de bloque de 9,0 cm de alto por 9,3 cm de ancho. Produjo 10 brotes basales y dos criollos.

4.1.2.- Evaluación de la segunda generación vegetativa.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la evaluación de la segunda generación vegetativa, donde se aprecia que el somaclón P3R5 alcanzó los mayores valores, con diferencias significativas en la mayoría de los caracteres evaluados, excepto en la formación de claveles, en la que resultó inferior al somaclón Enana y respecto a la acidez del fruto donde fue inferior al donante y al somaclón Enana. En P3R5 se destacó su mayor masa del fruto con corona (1,73 kg), con un pedúnculo más grueso (2,77 cm), un incremento considerable de brotes basales (siete) y de criollos (dos). En cambio el somaclón Enana, mostró valores inferiores en cuanto al tamaño de la planta (32,2 cm), diámetro del pedúnculo (1,62 cm) y los demás caracteres del fruto, sin embargo su producción de brotes vegetativos es alta y fue el único material que produjo claveles.

El material obtenido por cultivo *in vitro* reveló menos indicadores con variación estadística respecto al cultivar donante nunca cultivada *in vitro*, dos características fueron inferiores en el primero: altura de la planta y la acidez total del fruto. En esta generación se apreció estabilidad en el número de coronas (una) en todos los materiales estudiados.

La segunda generación, que siguió a la fase de cultivo *in vitro*, la constituyeron plantas que se originaron a partir de órganos vegetativos del material original obtenido *in vitro*. Los cambios aparecidos en esta generación coinciden con lo informado por Ravindra *et al.* (2004) quienes encontraron que la totalidad de los somaclones de geranio (*Pelargonium graveolens* L. Herit.) seleccionados, mantuvieron los rasgos determinados en la primera generación, por lo que indican que estos cambios fueron debidos a causas genéticas y los definen como verdaderos somaclones.

Tabla 7. Evaluación de los caracteres fenotípicos cuantitativos en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) en la segunda generación vegetativa.

Carácter valorado.	Española roja pinareña (donante)*	Española roja pinareña**	P3R5	Enana
Altura de la planta (cm)	72,00±0,27 b	71,00±0,23 c	73,30±0,28 a	32,20±0,27 d
Diámetro pedúnculo (cm)	2,66±0,02 b	2,60±0,09 b	2,77±0,01 a	1,62±0,02 d
Número de brotes claveles	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	2,00±0,25 a
Número de brotes basales	4,00±0,14 c	4,00±0,04 c	7,00±0,24 a	6,00±0,00 b
Masa fruto con corona (kg)	1,68±0,06 a	1,66±0,00 a	1,73±0,02 a	0,69±0,05 b
Número de ojos del fruto.	81,50±0,02 a	80,00±0,01 a	81,80±0,02 a	50,20±0,01 b
Altura del fruto (cm)	15,20±0,02 b	15,00±0,25 b	15,68±0,20 a	9,34±0,41 c
Diámetro del fruto (cm).	16,32±0,01 a	16,00±0,01 a	16,30±0,01 a	9,35±0,47 b
Vitamina C del fruto (mg/100 mL de jugo)	18,00±0,02 b	18,00±0,02 b	18,60±0,24 a	17,80±0,00 c
Acidez total del fruto (%)	0,33±0,010 a	0,30±0,00 c	0,30±0,00 c	0,32±0,00 b

ANOVA de un factor. Medias con letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$, según prueba HSD de Tukey. Los valores representan la media \pm ES (n=10).

*Nunca cultivadas *in vitro*, **Obtenidas mediante cultivo *in vitro*.

Existen especies en las que se utilizó el fenómeno de la variación somaclonal para generar variabilidad, con alto rendimiento de somaclones obtenidos, los que en su gran mayoría fueron seleccionados en la segunda generación, comprobándose que estos cambios fueron heredables posteriormente, por lo que constituyen verdaderos cultivares o somaclones, tanto en plantas de propagación vegetativa como sexual (Al-Zahim *et al.* 1999; Tregear *et al.* 2002; Martín *et al.* 2002; Halušková y Košuth 2003; Araújo *et al.* 2004; Anu *et al.* 2004; Hammerschlag *et al.* 2006; Singh *et al.* 2008; Gao *et al.* 2009; Li *et al.* 2010 a,b).

Los aspectos cualitativos que caracterizaron esta segunda generación se exponen en la tabla 8, en la que se destacó la disminución de la espinosidad en P3R5, tanto en la planta como en la corona, una estructura de la planta de compacta a ligeramente abierta y el fruto en forma de bloque cilíndrico. En Enana la gran espinosidad se mantiene, tanto en sus hojas como en la corona, las hojas poseen un color verde muy claro y la planta posee una estructura compacta, con un fruto en la madurez de color amarillo-verdoso.

Tabla 8. Características fenotípicas cualitativas de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) en la segunda generación vegetativa.

Carácter valorado.	Española roja pinareña (donante)*	Española roja pinareña **	P3R5	Enana
Presencia de espinas en las hojas	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	Solo en los extremos	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes, pequeñas
Color de las hojas	Verde con tono rojo	Verde con tono rojo	Verde claro con tono rojo	Verde muy claro
Estructura de la planta.	Ligeramente abierto	Ligeramente abierto	Compacta a ligeramente abierta.	Compacta
Forma de los ojos del fruto.	Rectangulares	Rectangulares	Rectangulares	Rectangulares
Color del fruto	Naranja-rojizo	Naranja-rojizo	Naranja-rojizo	Amarillo-verdoso
Forma del fruto.	Barril	Barril	Bloque cilíndrico	Barril
Presencia de espinas en la corona.	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	Solo en los extremos	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes, pequeñas

*Nunca cultivadas *in vitro*. ** Obtenidas mediante cultivo *in vitro*. (n=10).

En la segunda generación vegetativa se manifestaron diferencias entre el donante y los somaclones en cuanto a presencia de espinas en las hojas de las plantas y de la corona, color de las hojas, estructura de las plantas, color y forma del fruto, las que se encontraron en la primera generación. En Enana se destacan además los cambios en las características cuantitativas (Tabla 7) tanto de las plantas como de los frutos, que la distinguen totalmente de los demás individuos analizados, mientras que entre el cultivar donante (nunca cultivado *in vitro*) y plantas del cultivar donante obtenidas

mediante cultivo *in vitro* fueron menores los cambios fenotípicos, tanto cualitativos como cuantitativos.

Se consolidaron los dos somaclones descritos, al mostrar las características semejantes a la primera generación, sin ocurrir cambios reversibles hacia la forma materna en los caracteres evaluados.

4.1.3.- Evaluación de la tercera generación vegetativa.

En la figura 3A se muestra el análisis de la altura de las plantas, donde se observa que la variedad donante (72 cm) y P3R5 (73,3 cm) poseen los mayores valores, los que están en correspondencia con las características del cultivar Española roja pinareña.

El somaclón Enana con solamente 32,2 cm de altura de las plantas, resultó un individuo muy pequeño, que se diferencia notablemente de los demás. Sin embargo, en cuanto al período desde plantación hasta cosecha (ciclo) todos necesitaron entre 16 y 17 meses para alcanzar la maduración del fruto (Figura 3B), Enana mostró el menor ciclo. Este comportamiento del somaclón Enana en cuanto al ciclo está en correspondencia con lo planteado por Bartholomew *et al.* (2003) y Davey *et al.* (2007) los que señalaron que el mismo puede oscilar desde 15 hasta 18 meses en función del genotipo.

Los resultados del diámetro del pedúnculo indicaron que el somaclón P3R5 y el cultivar donante, poseen pedúnculos más gruesos, capaces de soportar frutos de mayor masa, los valores alcanzados para este indicador no se diferencian estadísticamente entre los dos primeros, si respecto al somaclón Enana (Figura 3C).

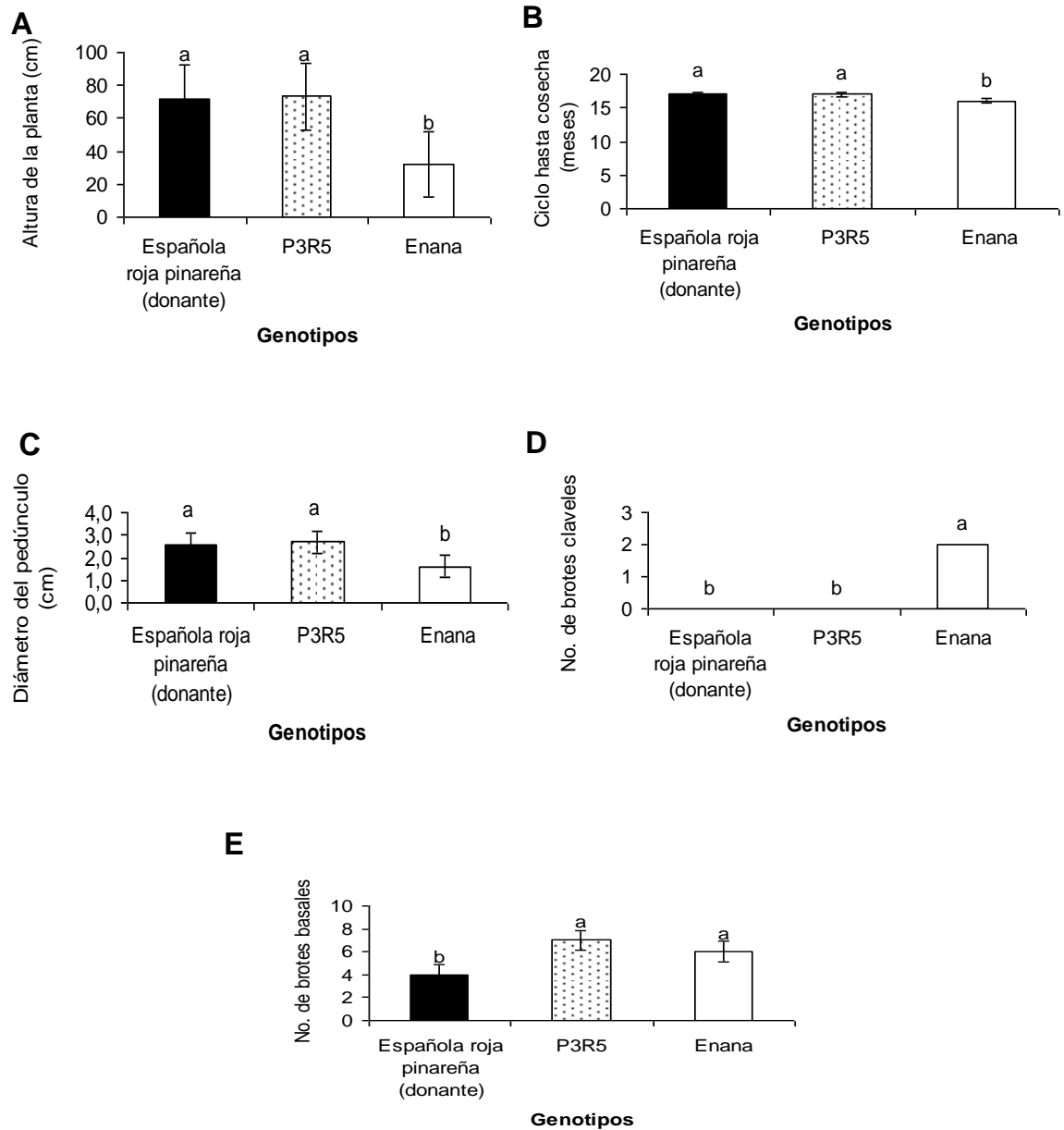


Figura 3. Altura de las plantas (A), ciclo hasta cosecha (B), diámetro del pedúnculo del fruto (C), número de brotes claveles (D), número de brotes basales (E) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la tercera generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Cada valor representa la media \pm ES (n=10).

El desarrollo de los brotes vegetativos mostró diferencias en su comportamiento. Los claveles solamente se formaron en el somaclón Enana (Figura 3D), los brotes basales mostraron valores significativos y mayores en los somaclones P3R5 y Enana respecto al cultivar donante (Figura 3E) lo que los hace superiores al donante por ser la principal forma de multiplicación de este cultivar. En cuanto a la formación de brotes criollos no hubo diferencias estadísticas, los somaclones produjeron dos de estos brotes, mientras el cultivar donante uno.

Las características relacionadas con el fruto se valoran a continuación. Respecto a la masa del fruto con corona (Figura 4A) el cultivar donante y P3R5 no mostraron diferencias, sí respecto a Enana, la que expresó el menor valor. Este mismo comportamiento se observó en cuanto al número de ojos (Figura 4B), la altura (Figura 4C) y diámetro del fruto (Figura 4D).

El tamaño del fruto fue inferior en el somaclón Enana, el que mostró también la menor altura de la planta como se analizó anteriormente, por lo que se evidencia la relación existente entre la masa foliar y el desarrollo del fruto. El número de coronas por fruto se mantuvo estable desde la segunda generación con la aparición de una corona, que es el indicador comercial adecuado (MINAG, 1989).

Respecto a la calidad del fruto, la vitamina C y acidez total, no mostraron diferencias respecto al donante, solo ligeramente superior el contenido de vitamina C en el somaclón P3R5, el que presentó 18 mg/100mL de jugo. Estos índices son favorables, los valores hasta 18 mg/100mL de jugo resultan adecuados según lo informado por Py *et al.* (1987). Por su participación en la calidad comercial del fruto, el porcentaje de acidez es un indicador de mucha importancia, pues junto con los sólidos solubles definen el momento de la cosecha, ya que valores entre 0,30-0,33% de acidez total constituyen indicadores adecuados para su comercialización (MINAG, 1989). Este somaclón mostró 0,30% de acidez total.

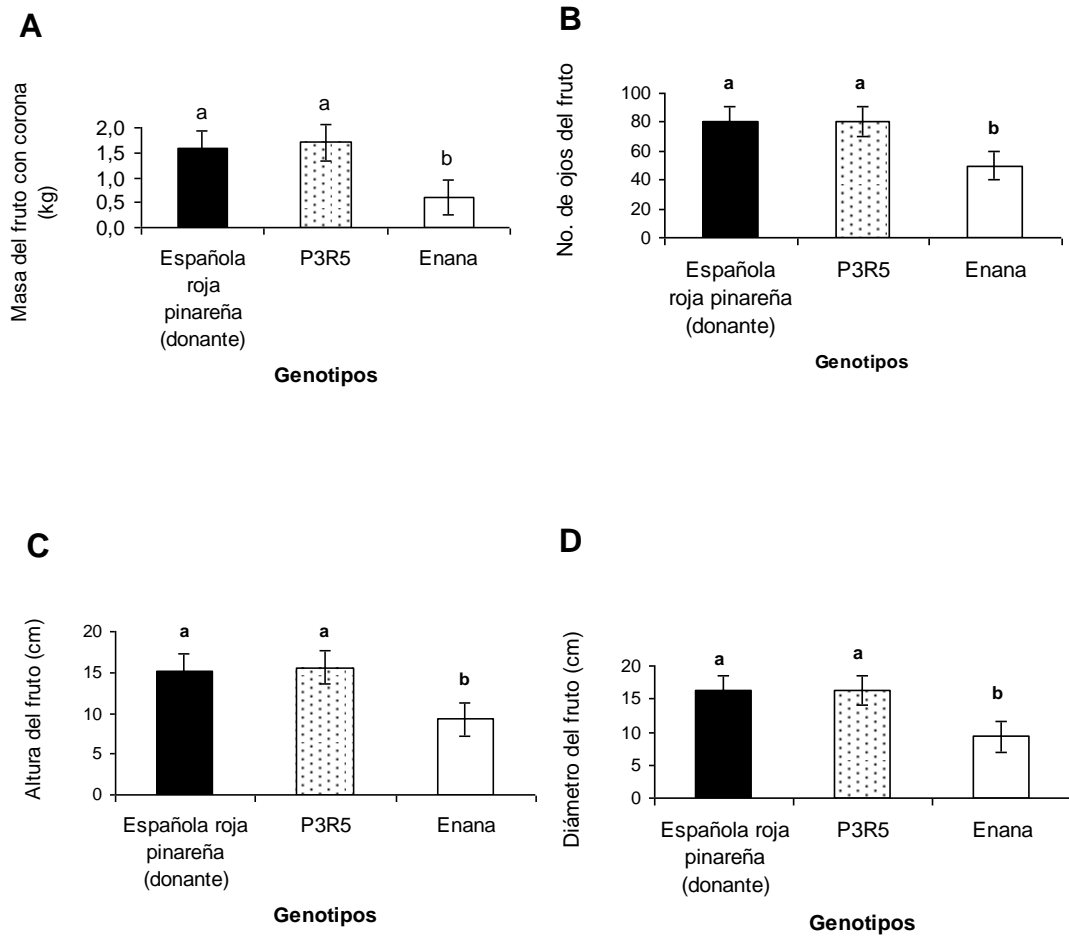


Figura 4. Masa del fruto con corona (A), número de ojos del fruto (B), altura del fruto (C) y diámetro del fruto (D) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la tercera generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Cada valor representa la media \pm ES (n=10).

La variación somaclonal en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) mediante análisis de pocas características, fue descrito por Wakasa (1979, 1989), quien en sus estudios mostró la obtención de 100% de variantes a partir de tejido sincárpico, la mayoría albinas, en el cultivar Cayena lisa; Dewald *et al.* (1988) hicieron un estudio puramente isoenzimático para identificar cultivares de piña Cayena, sin señalar las características de las plantas; Liu *et al.* (1989) evaluaron la espinosidad, desde el punto de vista de la reversión de plantas sin espinas a espinosas y encontraron total reversión y Feuser *et al.* (2003) hicieron un análisis molecular e isoenzimático de plántulas de piña que surgieron de cultivo *in vitro*, donde solo refieren una planta variada, pero las características de las variantes no se exponen. En estudios en *Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley), una piña ornamental, Santos *et al.* (2008) señalaron que el porcentaje de variación se estimó entre 21 y 42% al analizar plantas surgidas del cultivo *in vitro* mediante RAPD; pero no se refieren a las características de estas plantas y las evaluaciones se realizaron solo en la primera generación vegetativa. Como se puede apreciar en los trabajos anteriores, estos se limitaron fundamentalmente a las características moleculares e isoenzimáticas, sin valorar otras características fenotípicas de las variantes somaclonales encontradas.

Smith *et al.* (2003) en su trabajo referido a la propagación de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), atribuyen al uso de citoquininas suplementadas con auxinas, en particular al ANA, donde obtuvieron tejidos desorganizados, una mayor propensión al incremento de cambios genéticos producidos por la variación somaclonal, por lo que los resultados del presente trabajo están en correspondencia con lo planteado por estos investigadores.

Algunos resultados indicaron la presencia de altas tasas de variación somaclonal como los obtenidos por Polanco y Ruiz (2002) en *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, al encontrar tres somaclones, lo que significó el 40% de la variación. Esto supera en gran medida la tasa de variación encontrada en el presente estudio en piña.

Resultados significativos sobre el efecto de los reguladores del crecimiento en la aparición de altas tasas de variación somaclonal se obtuvieron en investigación de Viegas (2008) al analizar

este efecto en plantas de *Heliconia bihai* L., micropropagadas con dosis de 2,5 mg.L⁻¹ y 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, cuando obtuvo una tasa de variación somaclonal de 61,4%, en los que se destacan los tipos porte bajo, clorofílicos y coloración del pseudotallo y el pecíolo y un resultado más relevante es el de Bairu *et al.* (2006) los que al evaluar el efecto de reguladores del crecimiento, combinado con el efecto de la tasa de multiplicación en banano *Cavendish* (*Musa acuminata* Colla), encontraron mayor cantidad de variantes somaclonales, al obtener hasta el 72% en los tratamientos con altas tasas de multiplicación promovidas por varios reguladores.

Al profundizar en la frecuencia alcanzada en cuanto a variantes somaclones, se destaca por Li *et al.* (2010 a y b) en estudios en plantas de pasto (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) regeneradas a partir de cultivo *in vitro*, la determinación de un 0,015% de variantes morfológicas con características modificadas tales como: hábito de crecimiento semienano, hojas más cortas, anchas y entrenudos cortos, además de señalar una variante somaclonal más tolerante a las heladas que su progenitor, lo que fue corroborado en estudios de campo e indicaron además que los caracteres variados fueron estables durante las siguientes generaciones. La frecuencia de somaclones obtenidos en piña en el presente estudio se corresponde con la variación total señalada por Kosky *et al.* (2006) en banano 'FHIA 18' y Orellana *et al.* (2010) en banano 'Cavendish enano', aunque en estas investigaciones se utilizó la embriogénesis somática.

En esta tercera generación las características morfológicas cuantitativas del somaclón Enana se diferenciaron del donante en los indicadores: altura de la planta, diámetro del pedúnculo, número de claveles, brotes basales, masa del fruto con corona, número de ojos, altura y diámetro del fruto. El somaclón P3R5 en cuanto al número de brotes basales.

En esta generación vegetativa con respecto a las características cualitativas, los caracteres de juvenilidad no se manifestaron. Distingue al somaclón P3R5 del cultivar donante, la poca presencia de espinas en las hojas de la planta y corona, se ubican las mismas solo en los extremos de estas y el fruto en forma de bloque cilíndrico. En el caso de Enana se mantuvo la

gran cantidad de espinas, pequeñas y continuas en las hojas de la planta y la corona, el color de las hojas verde claro y un porte de la planta compacto (Tabla 9).

Tabla 9. Características fenotípicas cualitativas de los somaclones y del cultivar donante (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) en la tercera generación vegetativa.

Carácter valorado.	Española roja pinareña (Donante)	Somaclones	
		P3R5	Enana
Presencia de espinas en las hojas	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes	Espinas solo en los extremos	A lo largo de la hoja, en ambos márgenes y pequeñas
Color de las hojas	Verde con tono rojo	Verde claro con zonas rojizas	Verde claro
Porte de la planta	Ligeramente abierto	Ligeramente abierto	Compacto
Forma de los ojos del fruto	Rectangulares	Rectangulares	Rectangulares
Color del fruto	Anaranjado-rojizo	Anaranjado-rojizo	Amarillo-verdoso
Forma del fruto	Barril	Bloque cilíndrico	Barril
Presencia de espinas en la corona del fruto	Espinas en ambos bordes, continuas	Espinas solo en los extremos	Espinas en ambos bordes continuas y pequeñas

La figura 5 ilustra las características de los somaclones P3R5, Enana y el cultivar donante en cuanto a los principales caracteres morfológicos evaluados en la tercera generación vegetativa, fundamentalmente los relacionados con la estructura de las plantas, la forma y espinosidad de las hojas y el fruto.

Se aprecia el porte de la planta Enana, con un crecimiento compacto, las hojas espinosas del cultivar donante, la menor espinosidad en P3R5 y la gran espinosidad en Enana, con hojas más pequeñas y por último el fruto en forma de barril de la Enana, al igual que el donante y el fruto de P3R5 en forma de bloque cilíndrico.

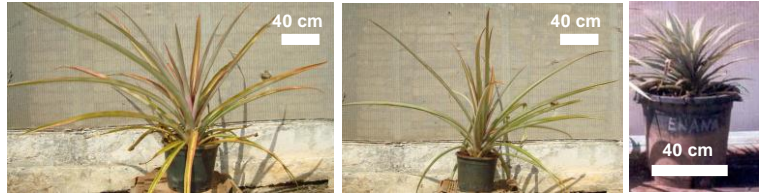
La caracterización morfológica en esta tercera generación vegetativa indicó que, comparado con el cultivar donante (Española roja pinareña), el somaclón P3R5 mostró diferencias en el número de brotes basales, en la presencia de espinas en las hojas y en la corona del fruto, así como en

la forma del fruto. El somaclón Enana fue diferente del cultivar donante en la altura de la planta, el diámetro del pedúnculo, el número de brotes claveles y brotes basales, la masa del fruto con corona, el número de ojos del fruto, altura y diámetro del fruto, color de las hojas, forma de la planta y color del fruto. Estas características de los dos somaclones están determinadas por la constitución genética de los mismos.

Según Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (1995) en piña (*Ananas comusus* var. *comusus* L. Merrill) es imposible identificar una mutación basada en los caracteres cuantitativos antes del primer ciclo vegetativo normal, es decir menos de tres años, después de la producción de la vitroplanta y todavía quedaría por comprobar su transmisión en los ciclos vegetativos siguientes. De manera que en la presente investigación, ya en esta tercera generación referida a tres ciclos del cultivo en campo, son casi cinco años de desarrollo de las plantas y además el período de cultivo *in vitro* y aclimatización que alcanzaron los dos años como se muestra en la figura 2, implica suficiente período de desarrollo de los somaclones, lo que permitió establecer que esta caracterización morfológica y agronómica consolida las consideraciones relativas a la estabilidad de los somaclones seleccionados en la primera generación vegetativa. Los resultados en esta generación mostraron la consolidación de los somaclones P3R5 y Enana.

La metodología utilizada (Figura 2), posibilitó determinar el efecto de la variación somaclonal con características variadas estables en un período de tiempo relativamente corto, si se tiene en cuenta que se analizó tal efecto en condiciones de campo y que el ciclo reproductivo de esta especie es de 15 a 18 meses. Esto está en correspondencia con Carlier *et al.* (2007) quienes señalaron en estudios en piña que los métodos biotecnológicos acortan el período de obtención de individuos variados.

Plantas a los 6 meses de crecimiento en condiciones controladas.

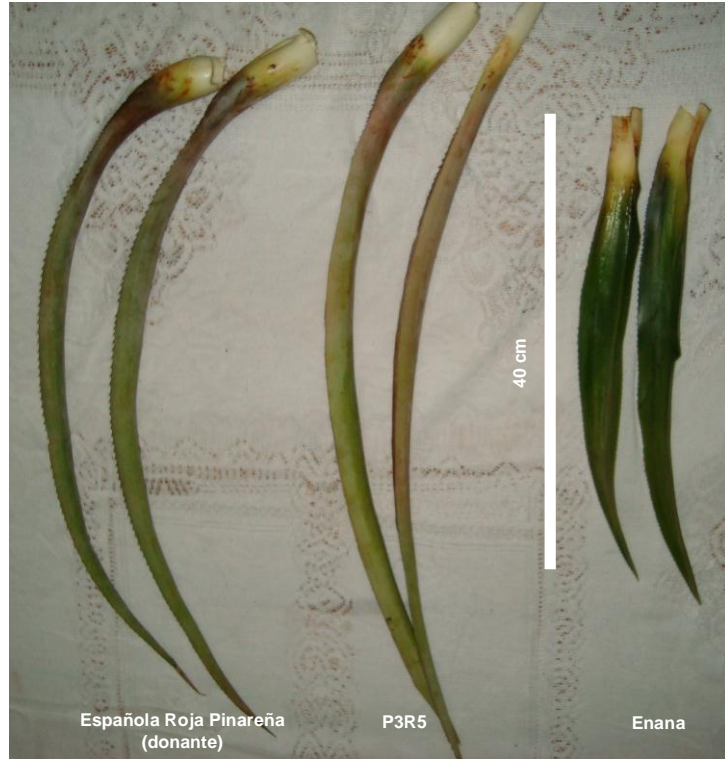


Española Roja Pinareña (donante)

P3R5

Enana

Hojas D de plantas con 6 meses de crecimiento en campo.

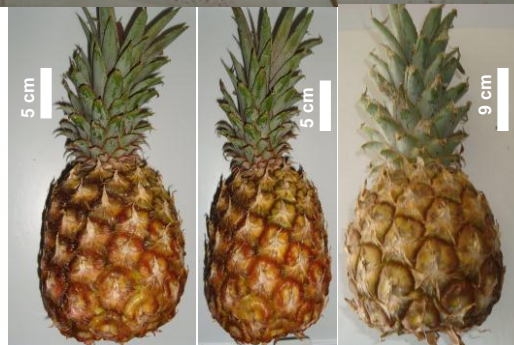


Española Roja Pinareña (donante)

P3R5

Enana

Frutos recién cosechados de plantas crecidas en campo.



Española roja pinareña (donante)

P3R5

Enana

Figura 5. Materiales de piña Española roja pinareña (donante) y de los somaclones P3R5 y Enana en la tercera generación vegetativa.

No apareció más variación en su descendencia vegetativa respecto a la primera, lo que comprobó la estabilización del material vegetal en estudio en cuanto a las características morfológicas.

Evaluación molecular mediante AFLP en la tercera generación vegetativa.

Las tres combinaciones de cebadores empleadas para la amplificación selectiva rindieron entre 39 y 47 bandas legibles. Se obtuvieron 127 bandas AFLP producto de la amplificación con las tres combinaciones de cebadores. El 6,2% de los marcadores AFLP mostraron polimorfismo en el somaclón P3R5 y de 7% en el somaclón Enana respecto al cultivar donante. En la tabla 10 se expresan los niveles de polimorfismo por combinación de cebadores y para los genotipos analizados.

Tabla 10. Polimorfismo detectado por AFLP en los somaclones de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) respecto al cultivar donante (Española roja pinareña).

Combinación de cebadores	P3R5			Enana		
	Número de bandas	Número de bandas polimórficas	% de polimorfismo.	Número de bandas	Número de bandas polimórficas.	% de polimorfismo
EcoRI -AAT/ Mse I -AAG	41	2	4,8	41	1	2,4
EcoRI-AAT/ Mse I -ACC	39	3	7,7	39	3	7,7
EcoRI-AAT/ Mse I -AGT	47	3	6,4	47	5	10,6
Total	127	8	6,2	127	9	7,0

La figura 6 muestra los patrones de bandas obtenidos para los tres genotipos producto de la amplificación con la combinación de cebadores Eco RI + AAT y MseI + AAG (las flechas en los somaclones indican bandas polimórficas). El empleo de las tres combinaciones de cebadores permitió diferenciar los genotipos en estudio y su ubicación de acuerdo a la distancia genética entre ellos (Figura 7).

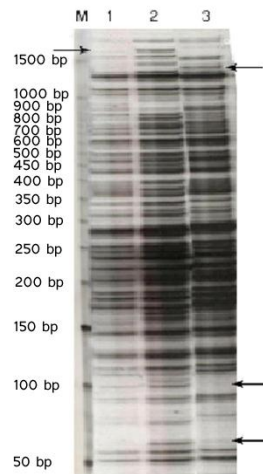


Figura 6. Patrones de bandas obtenidos producto de la amplificación del ADN de los genotipos con los cebadores Eco RI + AAT y MseI + AAG en la técnica de AFLP. 1(Española roja pinareña), 2(P3R5), 3(Enana). M: representa el marcador de masa molecular.

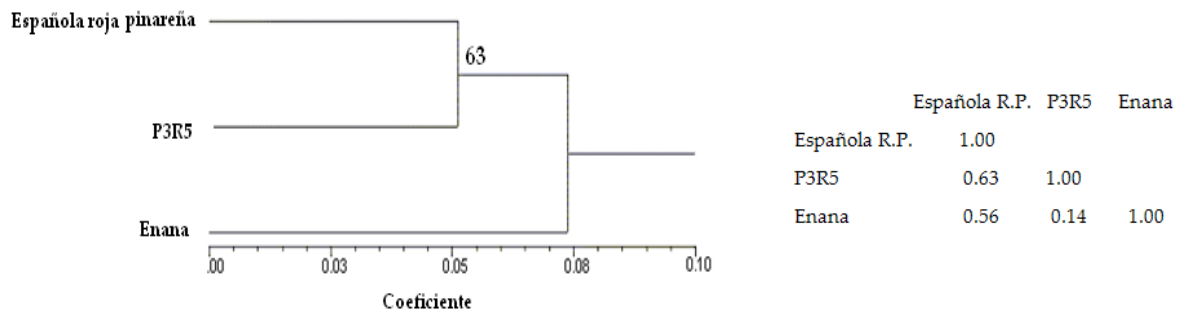


Figura 7. Dendrograma de los genotipos basado en un análisis de agrupamiento UPGMA en NTSYS-pc que muestra la distancia genética entre los genotipos, mediante la matriz de similitud generada con el coeficiente DICE. Se representa el valor *bootstrap* superior al 50%.

Los somaclones Enana y P3R5 se diferenciaron genéticamente entre sí y respecto al progenitor Española roja pinareña, se obtuvieron distancias genéticas de 0,05 entre Española roja pinareña y P3R5 y de 0,08 entre estas dos y Enana como se aprecia en la figura 7.

Paz *et al.* (2005) al evaluar accesiones del germoplasma de piña por AFLP, lograron explorar al azar un número de 144 loci en el genoma y los compararon, pero una importante parte del genoma no fue explorado. En el presente trabajo de 6,2 a 7% de las 127 bandas AFLP generadas de la amplificación con tres cebadores, indicaron la variación de los somaclones respecto al genotipo donante. No obstante, aunque la existencia de distancia genética entre ambos somaclones y entre los somaclones y su progenitor no fue muy grande, la diferencia en algunas bandas permite afirmar que son diferentes.

La técnica de AFLP es muy eficiente pues genera un mayor número de bandas por combinación de cebadores que el generado por otras vías, es relativamente fácil de aplicar, utiliza pequeñas cantidades de ADN y no requiere un conocimiento previo de las secuencias. Por ser tan versátiles estos marcadores se han utilizado ampliamente para el análisis de la variación somaclonal (Puente *et al.* 2008). Los resultados obtenidos se corresponden con Paz *et al.* (2005) en su trabajo al comparar dos colecciones de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L Merrill) cuando obtuvieron 44,6 bandas por cebador y en la presente investigación 42 bandas, mientras distan mucho de lo obtenido por Duval *et al.* (2001) con marcadores RFLP y Tapia *et al.* (2005) en este mismo cultivo, quien diferenció un promedio de 5,9 bandas por combinación con el empleo de marcadores ISSR y 6,83 con RAPD.

Soneji *et al.* (2002) en sus estudios sobre la fidelidad genética de regenerantes de piña obtenidos mediante cultivo *in vitro* con el objetivo de determinar si procedían de fenotipos espinosos mediante RAPD, encontraron bandas que respondían al fenotipo liso y otras al fenotipo espinoso, determinaron un porcentaje de polimorfismo de 6% para el fenotipo liso y encontraron variabilidad

genética de los regenerantes mediante el coeficiente de similitud. Feuser *et al.* (2003) compararon técnicas isoenzimáticas y RAPD para determinar fidelidad genética en piña en dos sistemas de micropropagación, estacionario e inmersión temporal, lo que reveló que las isoenzimas y el RAPD de forma independiente no detectaron diferencias entre los dos sistemas, sin embargo en la combinación de los datos de ambas técnicas, el RAPD mostró mayor variación que las isoenzimas, con un 7% de polimorfismo. Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo con un porcentaje entre 6,2 y 7%, aunque con la técnica de AFLP.

Los resultados obtenidos en esta investigación mediante AFLP, coinciden con los de Rodríguez (2010) cuando utilizó técnicas de microsatélite (SSR) y RAPD y encontró diferencias del somaclón P3R5 con los demás genotipos pertenecientes al grupo horticultural Española.

Los resultados obtenidos con estas técnicas también superan a los obtenidos con marcadores isoenzimáticos descritos en los trabajos de Dewald *et al.* (1992) donde de 32 sistemas isoenzimáticos ensayados, solo lograron buena resolución en ocho y solo dos revelaron polimorfismo, lo que constituye una muestra de que las técnicas isoenzimáticas en piña (*Ananas comusus* var. *comosus* L. Merr.) tienen limitadas posibilidades para detectar un mayor polimorfismo, no obstante, Arias *et al.* (1996) en ocho variedades de piña mediante muestras de raíces, encontraron ocho sistemas isoenzimáticos con buena resolución y cuatro de ellos (peroxidadasas, malato-deshidrogenasas, esterases y diaforasas) mostraron variación entre los genotipos estudiados, lo que posibilita su empleo como marcadores de proteínas en piña.

Los resultados obtenidos mediante AFLP mostraron diferencias entre los genotipos estudiados, con niveles bajos de polimorfismo, lo que se corresponde con el criterio de Aversano *et al.* (2009) quienes señalaron que los marcadores moleculares han permitido determinar el efecto de la variación somaclonal en diferentes especies, en algunos casos para detectar poco polimorfismo, tal como señalaron Smulders *et al.* (1995); Fourré *et al.* (1997); Rival *et al.* (1998); Bouman y De

Klerk (2001); Martins *et al.* (2004); Barandalla *et al.* (2006); Chen *et al.* (2006); Prado *et al.* (2007) y Sharma *et al.* (2007), y contrariamente a lo planteado por Piccioni *et al.* (1997); Guo *et al.* (2006b); Palombi *et al.* (2007) y Tyagi *et al.* (2007) en especies en las que encontraron altos niveles de polimorfismo.

El conjunto de resultados analizados mediante la técnica AFLP, empleada para los estudios a nivel del genoma, permitieron definir en el presente trabajo a los somaclones Enana y P3R5 como verdaderos mutantes.

4.2 Caracterización anato-morfológica, fisiológica y bioquímica de los genotipos en estudio.

4.2.1 Caracterización anato-morfológica.

Conteo de cromosomas.

No existieron diferencias en cuanto al número de cromosomas en los individuos analizados, todos resultaron $2n=50$.

El número de cromosomas más común en la sub-familia *Bromelioideae* y en las variedades y cultivares de *Ananas comosus* es $2n=50$, aunque se encuentran triploides en *Ananas comosus* var. *comosus* como el cultivar *Cabezona* y tetraploides en var. *Ananassoides* (Dujardin, 1991; Cotias de Oliveira, 2000). Arumuganathan y Earle (1991) estimaron el tamaño del genoma haploide de *Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill en 526 Mpb y el de *Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) en 444 Mpb.

El fenómeno de la variación somaclonal según criterios de Brown *et al.* (1993) está relacionado a cambios en el número de cromosomas y a la poliploidía de acuerdo con (Bhatia *et al.* 2005), aunque en el presente estudio no es esta la causa. Esta variación heredable podría estar asociada con rearrreglos cromosomales, deleciones o mutaciones puntuales (Sánchez-Teyer *et al.* 2003; Noro *et al.* 2007).

Anatómica.

En cuanto a las características de los estomas se puede apreciar que el número de estos por milímetro cuadrado en el somaclón Enana fue más bajo que en P3R5 y la Española roja pinareña, quienes poseen los valores más altos, con diferencias estadísticas respecto al primer somaclón. Sin embargo, en cuanto a la longitud de los estomas ambos somaclones no difieren del cultivar donante, aunque entre estos si se observan diferencias, con un incremento en Enana (Figuras 8A y 8B).

Los valores determinados se corresponden con los señalados por Py *et al.* (1987) y Coppens d'Eeckenbrugge y Leal (2003). El somaclón P3R5 presentó mayor cantidad de estomas, pero más pequeños, mientras el somaclón Enana presentó menor cantidad de estomas, pero más grandes al compararse con P3R5.

La anatomía de los estomas de la piña (*Ananas comusus* var. *comusus* L. Merrill) hace que tenga una tasa de transpiración muy baja, se encuentran en la epidermis por lo que comunican el interior de los órganos vegetales con el medio externo. Estos se localizan en el envés de las hojas y se ubican en una posición más abajo de las demás células epidérmicas para disminuir las pérdidas de gases, principalmente CO₂ y vapor de agua. Es una planta que cumple el ciclo del ácido crasulaciánico (CAM) (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003), lo que conjuntamente con los tejidos de almacenamiento de agua y la disposición de los estomas, contribuye a la economía de la misma.

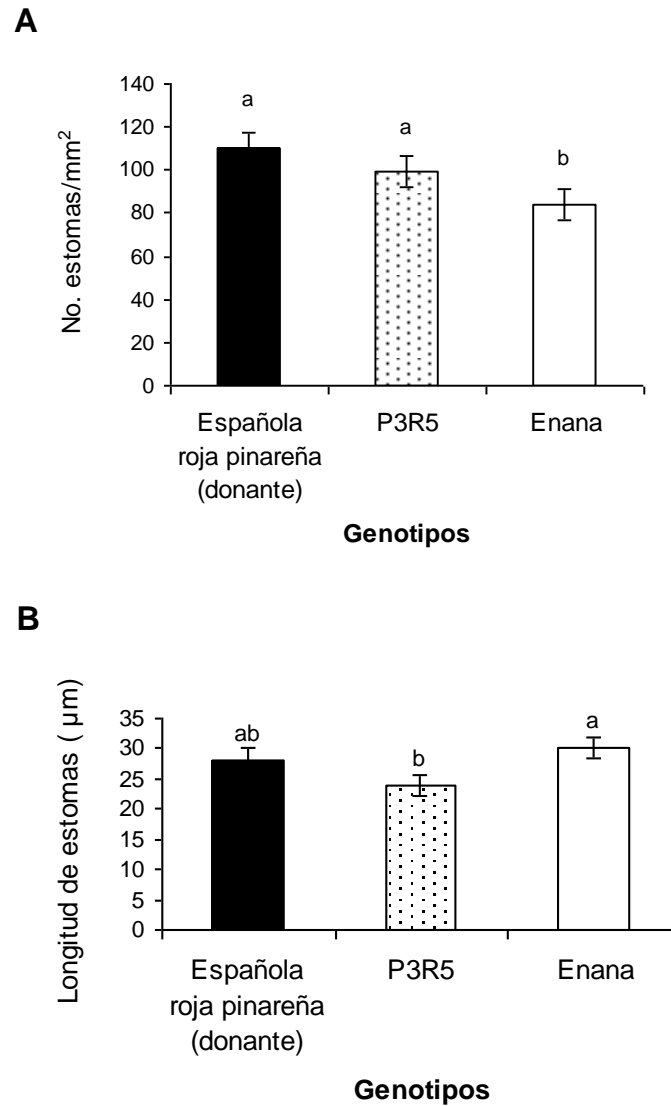


Figura 8. Número de estomas (A) y longitud de los estomas (B) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Cada valor representa la media \pm ES (n=60).

En las figuras 9A, 9B y 9C se muestran los resultados del análisis de los tejidos en las hojas. Respecto al diámetro de los vasos conductores y al espesor del parénquima acuífero, el cultivar Española roja pinareña (donante) y el somaclón P3R5 mostraron los mayores valores, sin diferencias estadísticas entre ellos y si respecto al somaclón Enana. Sin embargo, los resultados relativos al espesor del parénquima clorofílico mostraron el mayor valor en Española roja pinareña con diferencias significativas en relación con los dos somaclones.

Al comparar el somaclón Enana con el cultivar donante, alcanzó el 35% del espesor del parénquima clorofílico (19,9 μm / 57,6 μm) y el 37% del parénquima acuífero (43,8 μm / 119,1 μm). En el caso de P3R5, alcanzó el 58% (33,6 μm / 57,6 μm) del espesor del parénquima clorofílico y 72% (86,4 μm / 119,1 μm) del espesor del parénquima acuífero.

Los tejidos parenquimáticos están constituidos por células diferenciadas que realizan funciones asimiladoras o de reserva. El parénquima clorofílico posee un alto contenido de cloroplastos, en este se lleva a cabo la fotosíntesis, fundamentalmente en hojas y tallos, mientras que el parénquima acuífero se desarrolla en la piña (*Ananas comusus* var. *comusus* L. Merrill) con el objetivo fundamental de almacenar agua. Los resultados demuestran que el somaclón P3R5 mostró características para ser más eficiente en el uso del agua y en el proceso fotosintético, con respecto al somaclón Enana, lo cual debe estar relacionado con las características genéticas propias de estos genotipos, sin embargo, el donante con los valores más altos en los tejidos también mostró mayor cantidad de estomas y gran tamaño de estos, lo que lo hace menos eficiente en el uso del agua.

Barboza *et al.* (2006) analizaron las características anatómicas de plantas de piña (*Ananas comusus* var. *comusus* L. Merrill) micropropagadas, señalaron que no se alteró la estructura básica de la hoja, pero si se expresó plasticidad del fenotipo durante este período a través de cambios en el número de estomas, así como, en el espesor del parénquima clorofílico y acuífero. Es muy probable que esos cambios hayan sido transitorios, pues no se aclara a que generación vegetativa correspondían dichas plantas. En el presente trabajo de investigación los resultados corresponden a la cuarta generación vegetativa en condiciones de campo, por lo que la expresión del fenotipo se considera estable.

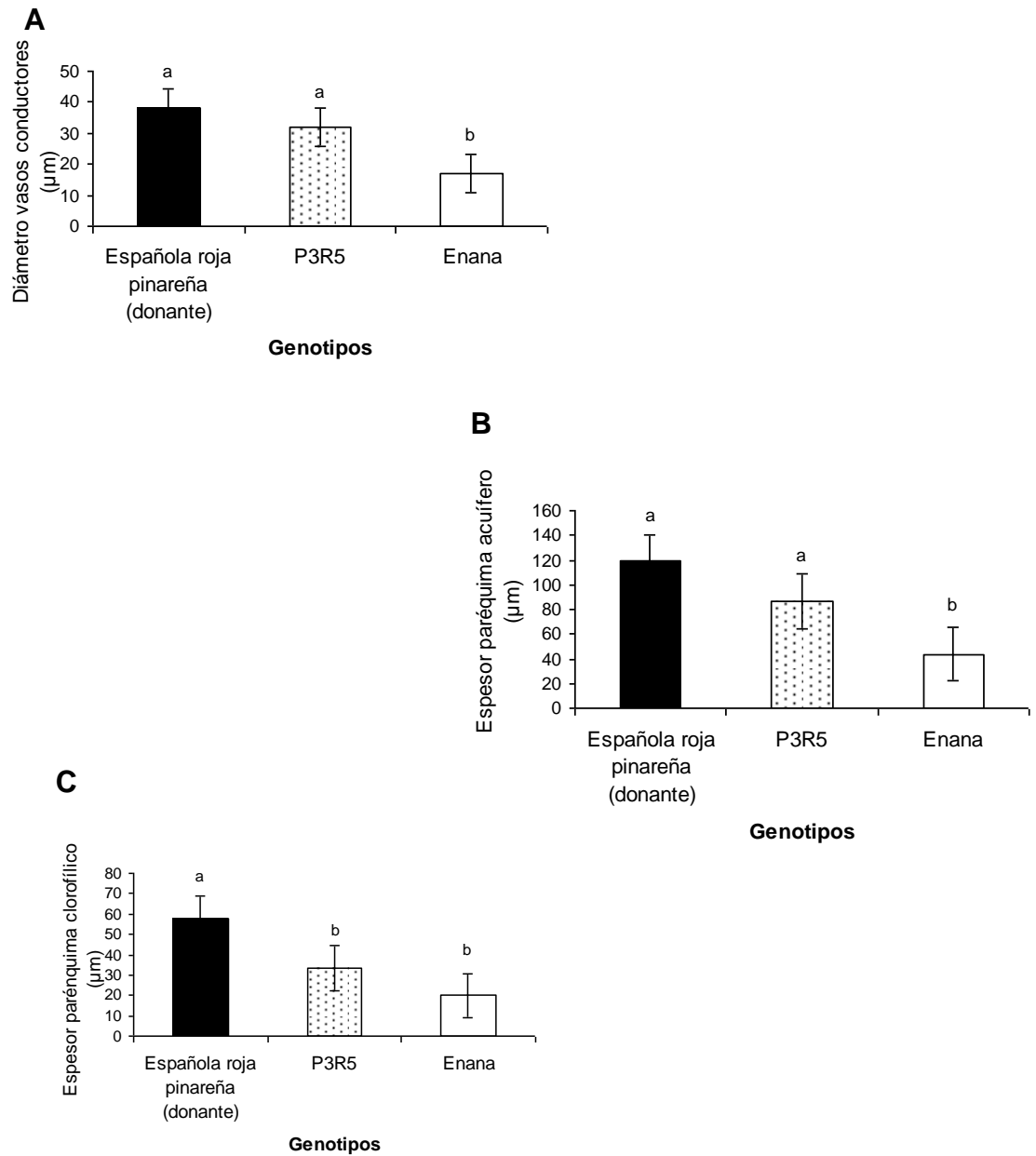


Figura 9. Diámetro de los vasos conductores (A) , espesor del parénquima acuífero (B) y espesor del parénquima clorofílico (C) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merril), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Cada valor representa la media \pm ES (n=60).

4.2.2 Caracterización fisiológica.

En la figura 10A se muestran los resultados de la tasa fotosintética. Las plantas del somaclón P3R5 manifestaron valores significativamente superiores respecto al cultivar donante y al somaclón Enana, el que mostró el valor más bajo.

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas captan energía solar y forman energía metabólicamente utilizable en forma de trifosfato de adenosina (ATP) y potencial de reducción mediante la Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato (NADPH), que utilizan como fuente de energía para formar los carbohidratos y otros compuestos orgánicos a partir de CO_2 y H_2O , cuando simultáneamente liberan O_2 a la atmósfera. La fotosíntesis depende de varios factores como son la intensidad y calidad de luz, la concentración de CO_2 , el desarrollo del parénquima clorofílico, los pigmentos fotosintéticos (clorofilas) y la presencia de agua (Salisbury y Ross, 1992). De esta manera se hizo necesario valorar los demás criterios relacionados con el proceso fotosintético, entre ellos la transpiración como medida del uso del agua y la concentración intercelular de CO_2 .

Con relación a la concentración intercelular de CO_2 el somaclón P3R5 también mostró el mayor valor con diferencias estadísticas respecto a los otros dos genotipos (Figura 10B).

Al analizar la tasa de transpiración (Figura 10C), el somaclón P3R5 presentó el valor más bajo, mientras que Enana no difirió del donante, lo cual pone de manifiesto la mayor eficiencia del primer somaclón en el uso del agua (Figura 10D). Al valorar este indicador, este resultado presupone además, un comportamiento estomático más eficiente de este somaclón, pues tuvo mayor densidad estomática que Enana (Figura 8A), pero la longitud de los estomas fue menor (Figura 8B), para reducir marcadamente la pérdida de agua por transpiración (Figura 10C) por un presumible cierre estomático y capacidad para almacenar agua como se demostró en la interpretación de las observaciones del parénquima acuífero (Figura 9B).

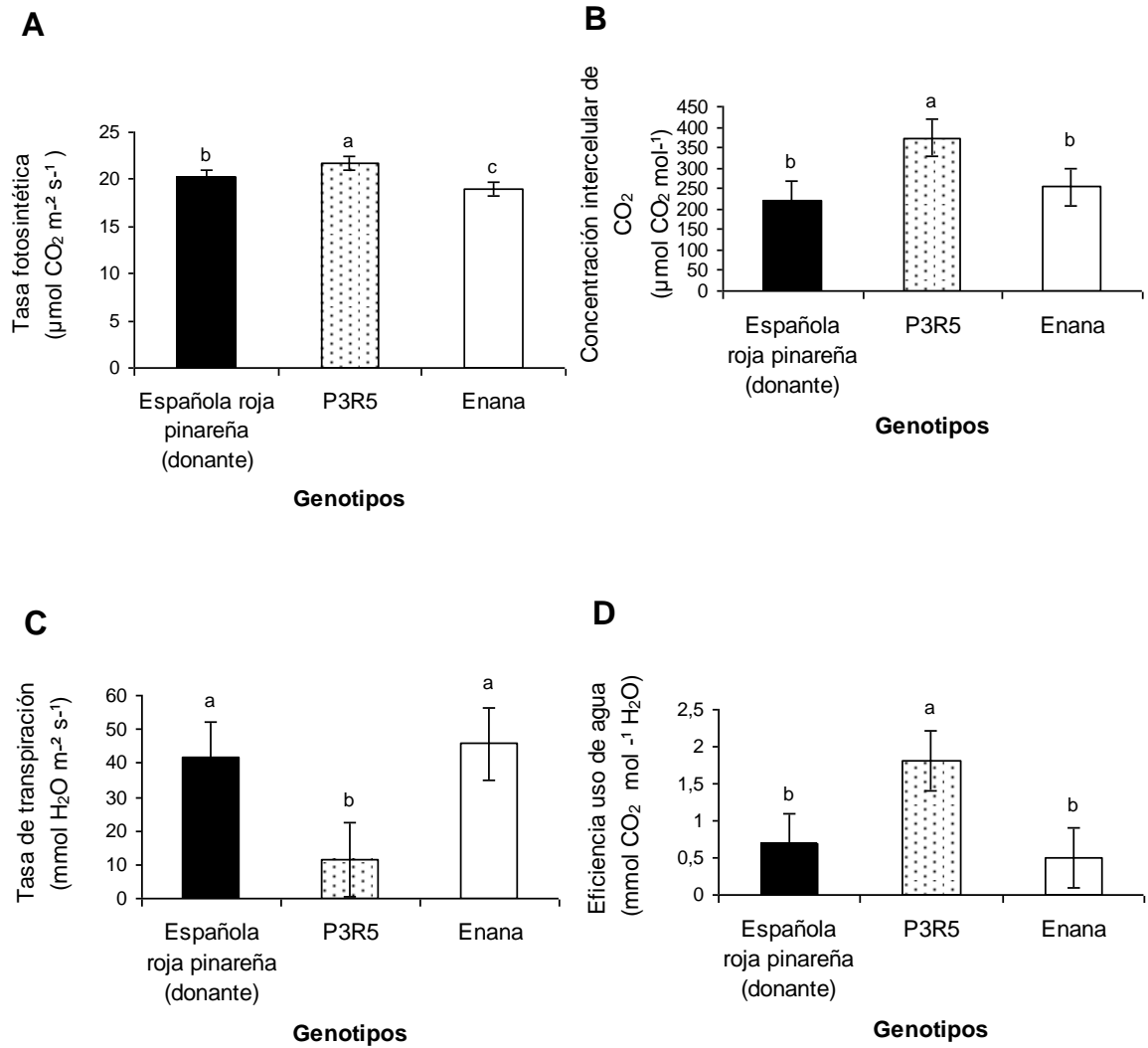


Figura 10. Tasa fotosintética (A), concentración intercelular de CO_2 (B), tasa de transpiración (C) y eficiencia del uso del agua (D) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merril), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Cada valor representa la media \pm ES (n=60).

Es muy reconocido que el tamaño o el número de los estomas influye en la transpiración, la toma del CO₂ y el uso eficiente de agua (Bergmann y Sack, 2007; Casson y Hetherington, 2010; Kim *et al.* 2010). El uso más eficiente del agua se correlaciona con una baja transpiración y alta asimilación de CO₂, lo que permite mejorar este indicador de eficiencia mediante la regulación de la transpiración (Yoo *et al.* 2009). Como se aprecia en el análisis conjunto de los indicadores transpiración y uso del agua, el somaclón P3R5 resultó tener modificaciones fisiológicas que favorecen la eficiencia en el uso del agua mediante la regulación de la transpiración.

Resultan interesantes los bajos valores mostrados por el somaclón P3R5 en la tasa de transpiración donde solo alcanzó 28% de la tasa del cultivar donante (11,5 mmol H₂O m⁻².s⁻¹ / 41,6 mmol H₂O m⁻².s⁻¹). La eficiencia en el uso del agua de la planta describe la tasa de producción de fotosíntesis neta en relación con la tasa en que transpira el agua a la atmósfera, es el resultado del compromiso entre la maximización de la fotosíntesis y la minimización de la transpiración. La eficiencia en el uso del agua es una medida de rendimiento que ha sido de interés para los agrónomos y ecologistas, pues comprueba la respuesta adaptativa de las plantas a diferentes condiciones de desarrollo (Bacon, 2004). La alta eficiencia del uso del agua del somaclón P3R5 con mayor captación de CO₂ y con menor pérdida de agua lo señala como un somaclón de gran capacidad para controlar la transpiración total, lo que resulta de mucha importancia ya que es más eficiente y permitirá un ahorro de agua.

Desde el punto de vista fisiológico el fenómeno de la fotosíntesis está íntimamente relacionado con los procesos de asimilación de CO₂, transpiración y eficiencia en el uso del agua. A menor transpiración y mayor tasa fotosintética se eleva la eficiencia en el uso del agua. En estudios que compararon la variedad donante con variantes somaclonales de pastos (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) no se encontraron diferencias en la evapotranspiración, sin embargo, los dos somaclones tenían volúmenes de agua y crecimiento más altos que el donante (Lu *et al.* 2009).

El somaclón P3R5 expresó mayor tasa fotosintética que el donante, lo que está en correspondencia con lo planteado por Molina-Montenegro *et al.* (2005) cuando evaluaron dos somaclones de especies altoandinas y los compararon con sus donantes. Los primeros manifestaron tasas de fotosíntesis superiores. También López-Herrera *et al.* (2007) señalaron cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con tasas fotosintéticas superiores respecto al genotipo donante.

Se realizaron estudios de indicadores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en somaclones que se sometieron a estrés, por ejemplo Price *et al.* (2002) señalaron que la ganancia óptima de CO₂ se logró con la apertura de los estomas, mientras se minimizó la pérdida de agua en somaclones de arroz (*Oriza sativa* L.). García-Sánchez *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la inundación y sequía en posturas de cítricos (*Citrus sinensis* Osbeck.) y Qing-Ming *et al.* (2008) evaluaron la respuesta de plantines de pepino (*Cucumis sativus* L.) al estrés hídrico.

El comportamiento de los contenidos de clorofila (Figuras 11A, 11B y 11C) mostró que tanto en la concentración de clorofila a como la b, así como la a+b, el somaclón P3R5 posee los mayores valores, con diferencias significativas respecto a los demás genotipos. En el somaclón Enana se cuantificaron los más bajos contenidos de estos pigmentos, sin diferir respecto al donante.

En estudios desarrollados en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) por Yabor *et al.* (2006) señalaron que el aumento de las clorofilas en las plantas micropropagadas con respecto a las macropropagadas puede deberse al efecto de la revigorización que adquieren las plantas salidas de un sistema de micropropagación. Preece y Sutter (1991) y Rodríguez *et al.* (2003) señalaron que estas plantas tienen mayor capacidad fisiológica en menos tiempo y tasa de crecimiento durante la aclimatización, todo esto contribuye a que tengan menores desórdenes en la organización de las granas de los cloroplastos.

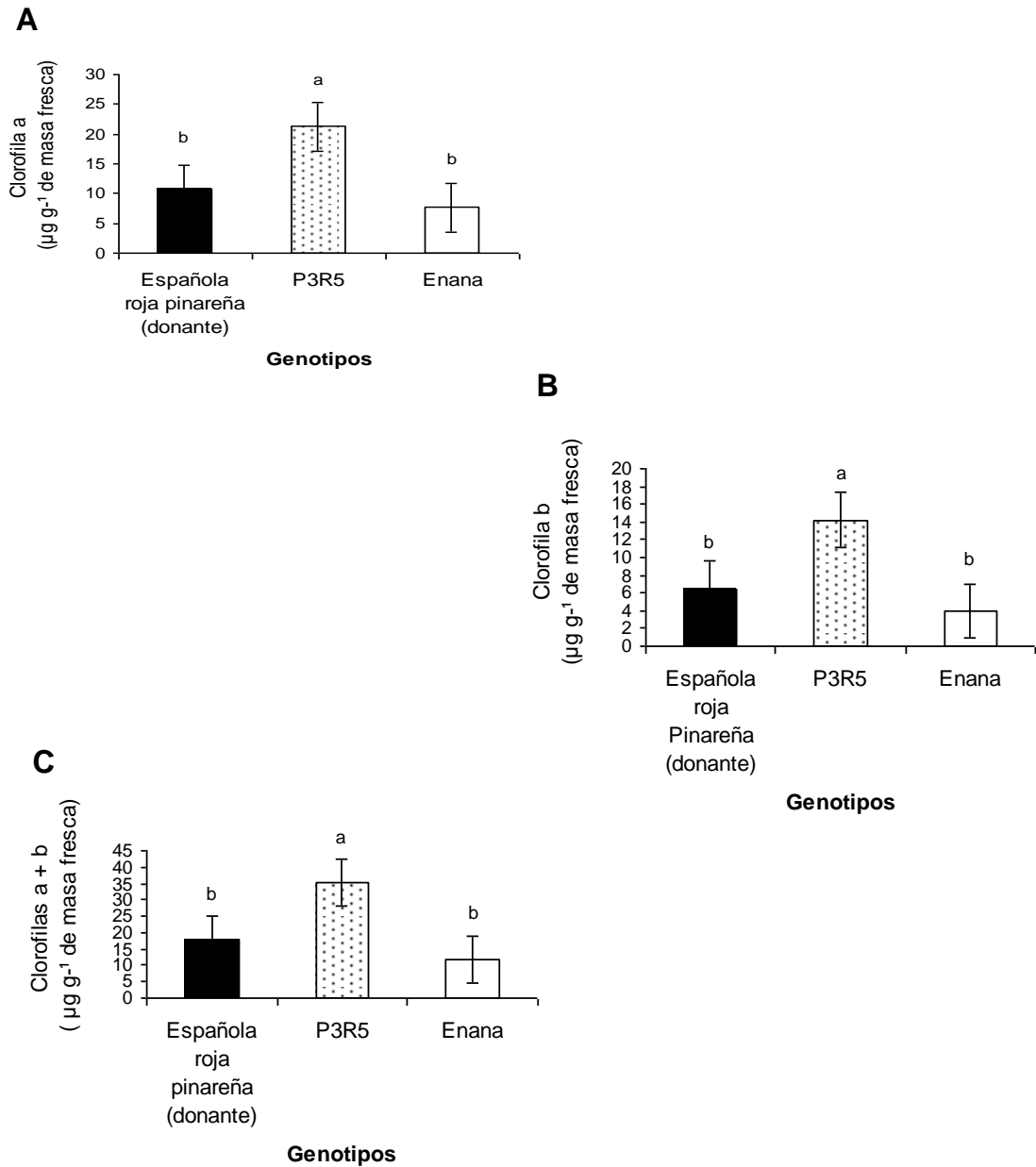


Figura 11. Clorofila a (A), clorofila b (B) y clorofila a + b (C) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Los valores representan las medias \pm ES (n=60).

Al concluir el análisis de los indicadores anatómicos y fisiológicos estudiados, el somaclón P3R5 mostró varios de estos que conjugados, determinan que se beneficie el proceso fotosintético. Posee mayor tasa fotosintética, mayor eficiencia en el uso del agua, mayor concentración intercelular de CO₂ y mayor contenido de pigmentos clorofílicos, lo que se relaciona con la mayor tasa de fotosíntesis, aunque los valores de los parénquimas sean intermedios y más bajos que en el cultivar donante. Su nivel alto de CO₂ intercelular contribuye al cierre de los estomas, lo que disminuye el proceso de transpiración, aún cuando su densidad estomática y longitud de los mismos sea menor que el donante, pues aunque no se estudió el fenómeno de apertura y cierre de los estomas es de suponer que tiene un eficiente sistema que evita la pérdida de agua por transpiración y a la vez una correcta fijación del CO₂ atmosférico por la fotosíntesis.

El somaclón Enana por el contrario reveló niveles bajos de fotosíntesis, concentración intercelular de CO₂ y eficiencia en el uso del agua, lo que sumado con sus niveles bajos de clorofilas y de desarrollo de sus parénquimas y su alta transpiración, lo convirtieron en un individuo poco eficiente en los procesos fisiológicos estudiados.

La comparación de ambos somaclones demostró que P3R5 tuvo mejor capacidad fotosintética, porque la mayor concentración interna de CO₂ (Figura 10B) está más relacionada con la actividad metabólica de las carboxilaciones. De este modo, del aumento de la concentración interna de CO₂ se deduce que ese CO₂ subestomático, llegó a las células del tejido estudiado para ser fijado en la fase carboxilativa, como también demostró De Oliveira Silveira (2010) en plantas de café.

El somaclón Enana mostró otro comportamiento, ya que la concentración intercelular de CO₂ fue superior a la variedad donante, pero la fotosíntesis fue inferior, posiblemente por los cambios estructurales ya analizados o a la reducción en la regeneración de la 1,5 difosfato ribulosa, según consideraciones de Liao y Lin (2001) en la interpretación de la adaptación de plantas estresadas.

4.2.3 Caracterización bioquímica.

Los resultados de los niveles de malondialdehído se expresan en la figura 12A, donde se observó variación significativa entre el somaclón Enana y el cultivar donante; este somaclón presentó el mayor valor, sin diferencias respecto a P3R5.

Los valores determinados de malondialdehído (metabolito de respuesta al estrés de las plantas (Dumet y Benson, 2000) no son excesivos y están dentro del rango óptimo (Tsun-Thai *et al.* 2005). Los valores mostrados por Enana fueron superiores a P3R5 y muy superiores al cultivar donante, entre estos dos últimos genotipos no existieron diferencias significativas.

Al considerar el malondialdehído un producto final de la peroxidación lipídica que puede ser mutagénico (Marnett, 1999), los niveles más altos en los somaclones y fundamentalmente en Enana, pueden haber afectado los niveles de producción de ácidos nucleicos y por tanto producir alteraciones en el ADN. En estudios realizados durante la etapa de aclimatización de la piña (*Ananas comusus* L. Merr.), los niveles de malondialdehído y otros aldehídos disminuyeron en las plantas transformadas genéticamente (Yabor *et al.* 2006; Yabor *et al.* 2008).

Los análisis relacionados con otros aldehídos mostraron a P3R5 con la menor media y con diferencias estadísticas, tanto con Enana como con el cultivar donante (Figura 12B).

El resultado de otros aldehídos no fue el esperado en P3R5, este somaclón mostró mayor valor de malondialdehído sin diferenciarse de Enana y de acuerdo con Moller (2001) este metabolito es promotor de la formación de otros aldehídos, sin embargo, Enana sí mostró el comportamiento señalado. El donante, contrariamente con un nivel más bajo de malondialdehído, alcanzó un valor más alto de otros aldehídos sin diferir del somaclón Enana.

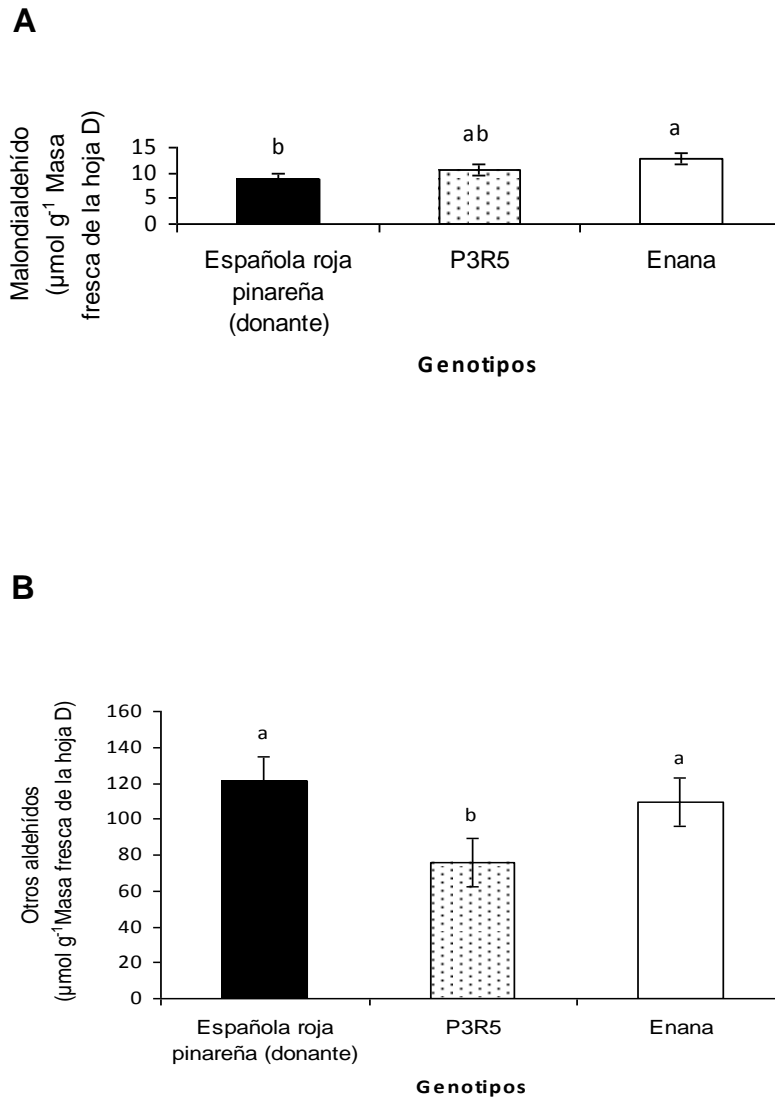


Figura 12. Malondialdehído (A) y otros aldehídos (B) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey $p \leq 0,05$). Los valores representan las medias \pm ES (n=9).

Respecto al comportamiento de los fenoles, en la figura 13A se muestran los resultados de los fenoles ligados a la pared celular, donde los mayores valores se encontraron en P3R5 sin diferir del cultivar donante, sin embargo, Enana tuvo los menores valores con diferencias estadísticas respecto a los primeros.

La figura 13B indica el nivel de fenoles libres, P3R5 mostró el menor valor, sin diferenciarse del somaclón Enana, mientras el cultivar donante tuvo el mayor nivel de estos. Los fenoles totales fueron superiores en P3R5 y el cultivar donante, ambos difirieron estadísticamente del somaclón Enana (Figura 13C).

Faivre-Rampant et al. (2000) en sus estudios en tabaco señalaron haber obtenido mutantes que contenían altos niveles de auxinas protectoras denominadas ácido clorogénico (que es un dihidroxifenol), así como de fenoles totales. Estos autores señalaron que existen muchas cumarinas (fenoles) que tienen efectos no bien conocidos en varios procesos bioquímicos y fisiológicos, con un comportamiento inestable, pues en ocasiones bajos niveles se comportan como estimuladores y altos niveles como inhibitorios, así como, que tienen ambos efectos; estimulantes o inhibitorios en la síntesis de proteínas, respiración y fotofosforilación y disminuyen el metabolismo de los carbohidratos.

Los mayores niveles de fenoles totales y ligados a la pared celular en el somaclón P3R5 y en el cultivar donante, pueden propiciar en los mismos mayor protección y tolerancia, comparado con el somaclón Enana si estos fueran sometidos y evaluados en condiciones de estrés.

Urubcová *et al.* (2000), señalaron la disminución del nivel de fenoles, principalmente derivados del ácido cinámico, después de aplicar un inhibidor de la fenilalanina amonio liasa, lo que deja clara la interrelación de los fenoles con esta enzima, también Taiz y Zeiger (2006) indicaron que un incremento de la actividad de esta enzima en las plantas, estimula la síntesis de compuestos fenólicos.

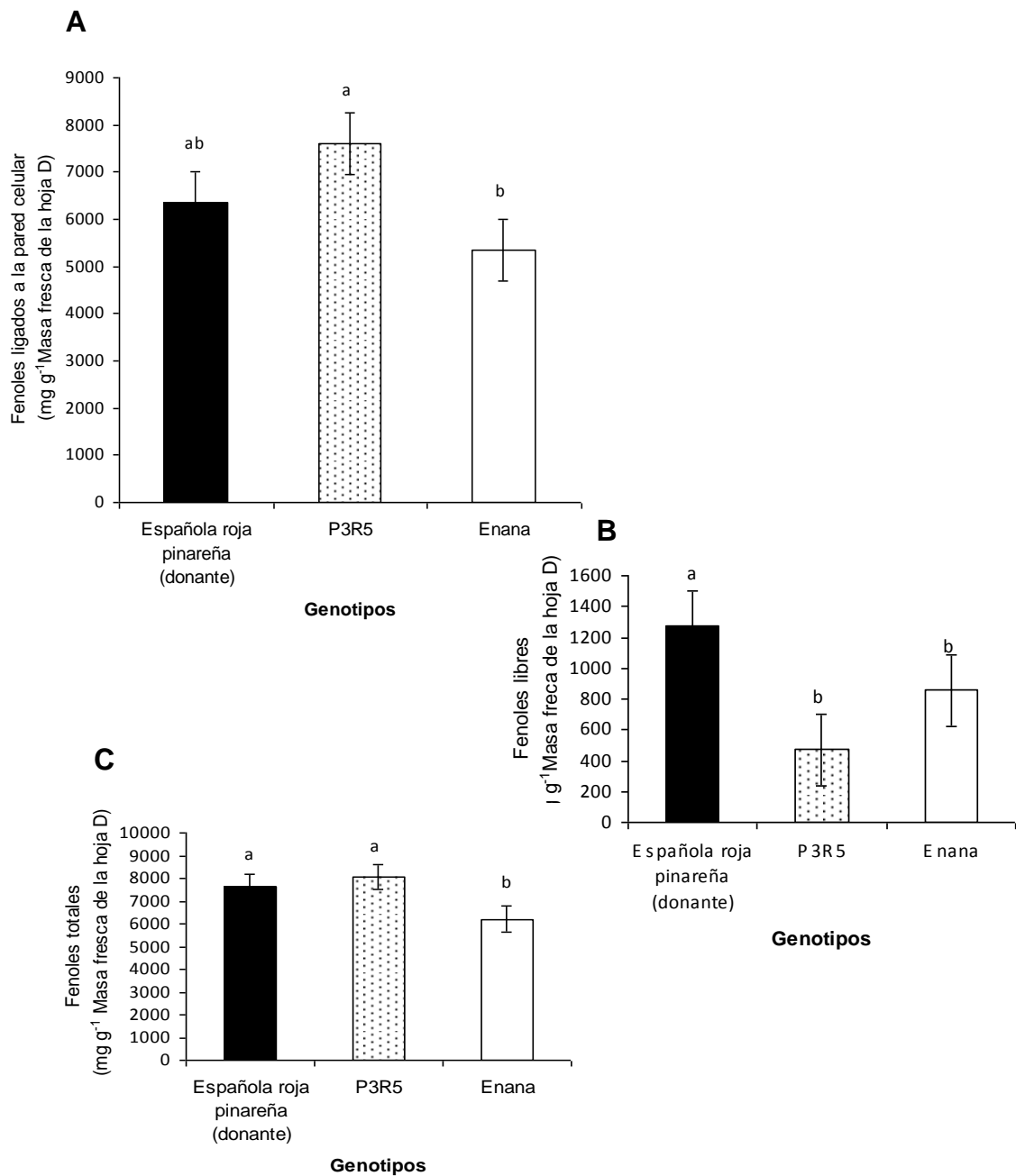


Figura 13. Fenoles ligados a la pared celular (A), fenoles libres (B) y fenoles totales (C) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Los valores representan las medias \pm ES (n=9).

El nivel de fenoles libres en P3R5 solo representó el 37% respecto al donante ($472,58 \text{ mg.g}^{-1}$ masa fresca de la hoja / $1273,44 \text{ mg.g}^{-1}$ masa fresca de la hoja).

Según Salisbury y Ross (1992) los compuestos fenólicos; antocianina, lignina, tirosina, triptófano, auxinas y fenilalanina son generados en la glucólisis a partir del fosfoenolpirúvico. Muchos compuestos fenólicos surgen de la ruta del ácido shiquímico y de sus reacciones. Hay cuatro que se derivan de la fenilalanina y la tirosina: cinámico, p-cumárico, cafeico y telúrico, estos son importantes, no porque abunden de forma libre, sino, porque se transforman en varios derivados combinados con proteínas, estos derivados incluyen fitoalexinas, lignina y diversos flavonoides como las antocianinas. La formación de derivados mediante la conversión de la fenilalanina en ácido cinámico es una reacción muy importante. Esta reacción es catalizada por la fenilalanina amonio liasa, además, la formación de lignina explica que a mayor nivel de fenoles ligados a la pared celular se proporciona mayor resistencia y rigidez de las hojas y partes de la planta, que aporta además de sostén, resistencia contra el ataque de patógenos e insectos. Estos fundamentos sustentan el hecho de que P3R5 y la variedad donante, que mostraron los mayores niveles de fenoles ligados a la pared celular y fenoles totales pueden ser más tolerantes a condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico.

El contenido de proteínas fue superior en los somaclones respecto al cultivar donante (Figura 14A). Las diferencias en la concentración de proteínas totales pudieran estar dadas por las transformaciones que ocurrieron en los genes, algunos de los cuales pudieran estar involucrados en este proceso y que propiciaron un metabolismo más eficiente para la síntesis de las mismas en los somaclones y estas tuvieron un marcado efecto en el fenotipo, al ser las proteínas las biomoléculas encargadas de realizar la información contenida en los genes.

Al comparar los somaclones y el cultivar donante en cuanto a la actividad de la fenilalanina amonio liasa (Figura 14B), así como en su actividad específica (Figura 14C), se encontraron diferencias estadísticas entre los genotipos, con mayor actividad en el somaclón Enana. El somaclón P3R5 y el donante no difirieron y mostraron los valores más bajos.

Sin embargo, el cultivar donante mostró el 46% de la actividad de la fenilalanina amonio liasa comparado con Enana (0,29 U.g⁻¹ masa fresca de la hoja / 0,62 U.g⁻¹ masa fresca de la hoja) y su actividad específica 0,0071 U.mg⁻¹ de proteínas / 0,0157 U.mg⁻¹ de proteínas). En el somaclón P3R5 la tendencia es la misma, solo que las diferencias entre este y el cultivar donante son menores.

El somaclón Enana mostró mayor actividad de esta enzima comparado con el cultivar donante, lo que está en correspondencia con los resultados de Fernández *et al.* (2003) quienes encontraron mayor actividad de la enzima en somaclones y mutantes de arroz resistentes y señalaron que se pueden haber afectado los genes involucrados en la expresión de la misma.

En el caso del somaclón Enana, con una alta actividad de la fenilalanina amonio liasa y que además posee niveles bajos de clorofilas a, b, así como totales, se corresponde con los criterios de Yabor *et al.* (2009) que señalaron que esta enzima puede disminuir el contenido de clorofilas.

El comportamiento de la actividad de la superóxido dismutasa (Figura 15A) y su actividad específica (Figura 15B) demostró que son superiores en el somaclón P3R5 y el cultivar donante, sin diferir entre sí. El menor valor lo mostró el somaclón Enana.

Decrecimientos significativos se obtuvieron en el somaclón Enana respecto al cultivar donante en cuanto a la actividad de la superóxido dismutasa (0,33 U.mg⁻¹ masa fresca de la hoja / 0,85 U.mg⁻¹ masa fresca de la hoja) y en su actividad específica (8,27 U.mg⁻¹ de proteína / 21,16 U.mg⁻¹ de proteína), mientras que el somaclón P3R5 incrementó sus valores respecto al cultivar donante (0,9 U.mg⁻¹ masa fresca de la hoja / 0,85 U.mg⁻¹ masa fresca de la hoja) en cuanto a la actividad y (23,7 U.mg⁻¹ masa fresca de la hoja / 21,16 U.mg⁻¹ masa fresca de la hoja) en la actividad específica. En el somaclón P3R5 se destaca el incremento experimentado.

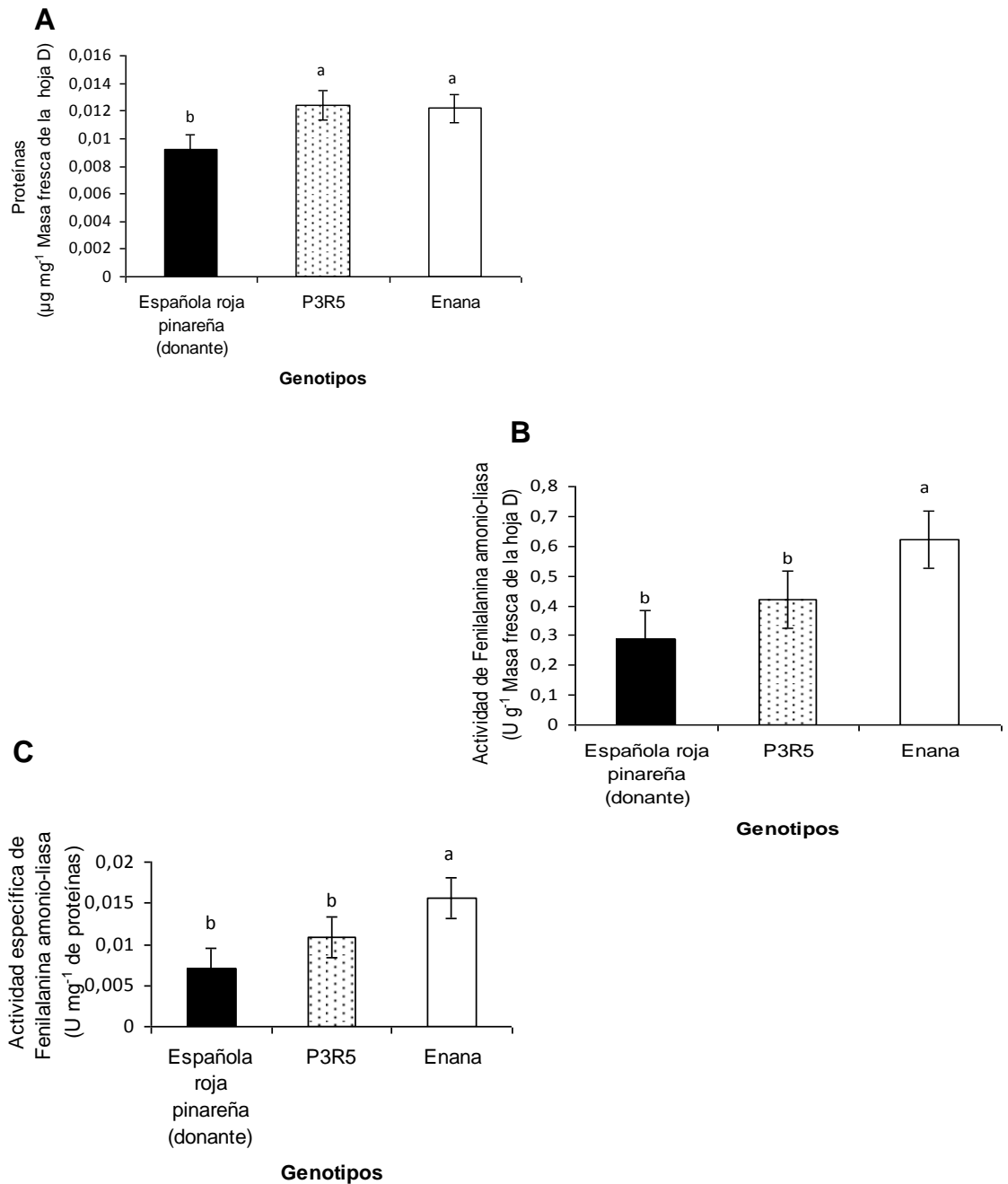
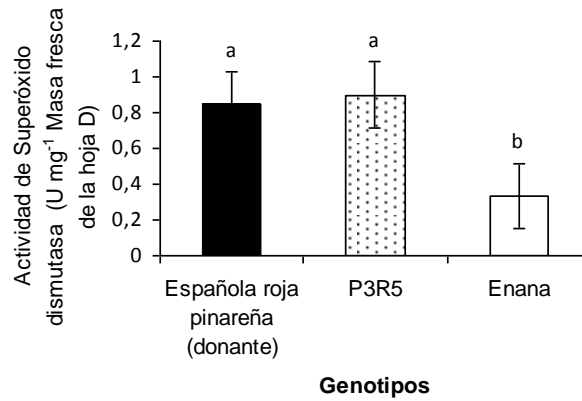


Figura 14. Proteínas (A), actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (B) y actividad específica de la enzima fenilalanina amonio liasa (C) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Los valores representan las medias \pm ES (n=9).

A



B

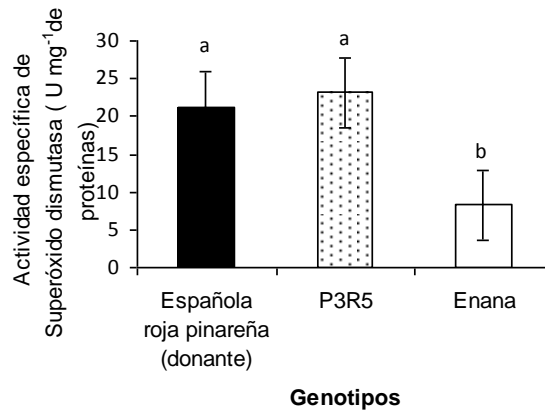


Figura 15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (A) y actividad específica de la enzima superóxido dismutasa (B) de los tres genotipos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill), en la cuarta generación. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, prueba HSD Tukey $p \leq 0,05$). Los valores expresan las medias \pm ES (n=9).

No obstante hay algunos aspectos que necesitarían ser esclarecidos posteriormente, pues el somaclón Enana que también mostró mayor contenido de proteínas, tuvo a diferencia de P3R5 y el donante, menor actividad de superóxido dismutasa y de su actividad específica. En ambos somaclones la actividad enzimática debió ser superior si se tiene en cuenta que los incrementos pueden propiciar el desarrollo del contenido de proteínas, pues la superóxido dismutasa es capaz de disminuir las concentraciones del anión superóxido, que tiene la propiedad de ocasionar daños oxidativos a las proteínas; aunque en última instancia la actividad de la enzima mostrada es suficiente para evitar los daños anteriormente explicados, aún cuando es menor que en P3R5.

Existen varias enzimas que intervienen en el sistema de defensa antioxidante, entre ellas se encuentra la superóxido dismutasa que protege a las plantas de los efectos del oxígeno reactivo, tales como los radicales superóxido, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilos que se producen en proporciones elevadas cuando se exponen las plantas a condiciones de estrés (Mittler, 2002). En las plantas, las especies reactivas de oxígeno son continuamente producidas por procesos del metabolismo aeróbico, por ejemplo las reacciones de fotosíntesis y respiración. La acumulación celular de estas, que son altamente reactivas es citotóxica. Las cascadas de oxidación-reducción (redox) de las cadenas fotosintética y respiratoria, de transporte de electrones, no solo proveen la energía para el metabolismo, sino también generan las señales redox y ambas participan en la regulación de todos los aspectos de la biología de las plantas, desde la expresión de genes y su traducción hasta la química de las enzimas (Kim *et al.* 2009).

Según los criterios de Raimbault *et al.* (2011) estos sistemas de defensa incluyen otras sustancias antioxidantes de bajo peso molecular (ácido ascórbico, glutatión y tocoferoles), aparte de enzimas que regeneran formas reducidas de los antioxidantes. El efecto principal de la superóxido dismutasa es su interacción con especies reactivas de oxígeno.

En investigación de Edna *et al.* (2008) se señaló que la superóxido dismutasa tiene como primer blanco las clorofilas, cuyos niveles aumentaron como mecanismo de defensa para proteger y estabilizar las membranas de los cloroplastos, lo cual mantuvo la actividad metabólica y

fisiológica. Los resultados del presente trabajo consolidan este criterio en el caso del somaclón P3R5, en el que se encontró mayor actividad de la enzima que correspondió con los niveles más elevados de clorofilas a y b, así como totales y en el somaclón Enana que contrariamente los niveles más bajos de clorofilas, coincidieron con la más baja actividad de la superóxido dismutasa. Alta actividad de superóxido dismutasa se encontró en somaclones de arroz (Guo *et al.* 2006b) y pastos (Zhang *et al.* 2006; DaCosta y Huang 2007), no obstante la respuesta respecto a esta enzima no siempre es igual, pues somaclones de pastos (*Stenotaphrum secundatum* Walt. Kuntze) mostraron la actividad de superóxido dismutasa más baja, comparados con la variedad donante después de un prolongado estrés de humedad (Lu *et al.* 2009), lo que se atribuyó precisamente al período extremo de estrés hídrico.

La actividad significativamente más baja de superóxido dismutasa en el somaclón Enana, indicó una menor capacidad de este para eliminar los radicales superóxido, por lo que tendrá menor protección contra el daño oxidativo. Sin embargo, P3R5 y el cultivar donante que no difirieron significativamente y mostraron la mayor actividad, tendrán mayor capacidad para eliminar estos radicales y por tanto ser más tolerantes a este daño. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mckersie *et al.* (1996, 1999) en plantas transgénicas de alfalfa (*Medicago sativa* L) con alta actividad de superóxido dismutasa, menos afectadas por déficit hídrico y bajas temperaturas, así como, en cultivares de banano (*Musa acuminata* Colla) tolerantes a condiciones de estrés (Tsun-Thai *et al.* 2005).

La actividad de la fosfoenol piruvato carboxilasa y su actividad específica no mostraron diferencias entre los somaclones y el cultivar donante. El comportamiento similar respecto a la fosfoenol piruvato carboxilasa indicó que los somaclones y el cultivar donante pueden desarrollar de forma adecuada los procesos en los que está involucrada esta importante enzima, si se tiene en cuenta que la misma interviene en la asimilación del CO₂ en el malato por la carboxilación de la misma durante la noche.

Las plantas de piña tienen un sistema altamente eficiente respecto al proceso fotosintético en el que la fosfoenol piruvato carboxilasa juega un importante papel. Según los criterios de Londers *et al.*

(2010) la asimilación del CO_2 en la noche ocurre mediante su integración con el malato por la carboxilación de esta y durante el día el CO_2 se procesa vía rubisco con los estomas cerrados, este es un mecanismo que poseen las plantas que cumplen el metabolismo del ácido crasulaciánico y que de acuerdo con Salisbury y Ross, (1992) los estomas de estas plantas permanecen cerrados durante el día y abren por la noche, controlado por las concentraciones internas de CO_2 . Este mecanismo hace a las plantas de piña eficientes en el uso del agua y en sentido general en el proceso fotosintético, aprovechan de manera efectiva este fenómeno para evitar la pérdida de agua. El somaclón P3R5 resultó altamente eficiente en el uso del agua, comparado con los otros dos genotipos.

Los cambios registrados en las figuras 10A y 10D, relacionados previamente con las carboxilaciones no se manifestaron en estos resultados de la fosfoenol piruvato carboxilasa, porque estos se realizaron en el horario diurno, podrían variar en análisis de muestreos nocturnos.

También sucede que muchas plantas CAM son inducibles, en las que el tiempo y la severidad del estrés incrementan la actividad de la fosfoenol piruvato carboxilasa. En contraste en las plantas CAM, la edad de la planta, en especial de la hoja donde se evalúa es el factor del que depende la actividad de esta enzima (Amagasa, 1982). Casi siempre las plantas CAM son plantas C3 facultativas, cambian a fotosíntesis tipo C3 después de abundante agua con luz diurna o noches calurosas (Salisbury y Ross, 1992).

La enzima se relaciona además con otras funciones fisiológicas, entre ellas reacciones anapleróticas en el Ciclo de Krebs, cuando existe mucha demanda de precursores carbonados para biosíntesis aminoacídica (Huppe y Turpin, 1994), como presuponen los incrementos en los contenidos proteicos registrados en los somaclones evaluados. También existen resultados que demuestran su contribución al control del balance C/N (Zhang *et al.* 1995) y a los procesos reproductivos (González *et al.* 1998), sin embargo en plantas CAM es esencial en el metabolismo fotosintético como ocurrió en las plantas de piña en este estudio.

4.2.4 Resumen de la caracterización genotípica y fenotípica de los somaclones.

Modificaciones fenotípicas en los somaclones.

La tabla 11 resume los cambios en el fenotipo de los somaclones P3R5 y Enana con respecto al cultivar donante. Se analizaron 44 indicadores basados en una amplia gama de rasgos morfológicos, anatómicos, fisiológicos y agrícolas. Los datos mostraron las características donde la variación somaclonal ocurrió en la piña cultivar Española roja pinareña en las condiciones de la presente investigación. P3R5 difirió del cultivar donante en 20 características (20/44; 45,4%), mientras Enana lo hizo en 31 (31/44; 70,4%).

El análisis señaló características que disminuyeron o aumentaron su expresión, así como otras modificaciones comparadas con el cultivar donante. La variación en estos indicadores fue diferente en cada somaclón.

Entre las características que disminuyeron y que son comunes a ambos somaclones se encuentran el número de estomas por mm² y el espesor de los vasos conductores y parénquimas. Mientras aumentaron en ambos somaclones el número de brotes basales, número de brotes criollos, concentración intercelular de CO₂, contenido de proteínas y la actividad específica de la fenilalanina amonio liasa.

Las modificaciones en el fenotipo se señalaron por Jain (2001) y Li *et al.* (2010a), los que relacionaron 22 cultivares de diferentes especies que fueron obtenidos mediante variación somaclonal, con caracteres mejorados que incluyeron el rendimiento, arquitectura de las plantas, color, así como, tolerancia a enfermedades, a la salinidad, a las altas y bajas temperaturas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Resumen de las modificaciones fenotípicas de los somaclones P3R5 y Enana.

Somaclones	Indicadores fenotípicos			
	No modificado respecto al cultivar donante	Disminuyó respecto al cultivar donante	Aumentó respecto al cultivar donante	Otras modificaciones respecto al cultivar donante
P3R5 *(20/44; 45,4%)	24 indicadores: Altura de la planta; Diámetro del pedúnculo; Número de claveles; Masa del fruto con corona; Número de ojos del fruto; Altura del fruto; Diámetro del fruto; Número de coronas; Vitamina C; Acidez del fruto; Ciclo; Color de las hojas; Estructura de las plantas; Forma de los ojos; Color del fruto; Forma del fruto; Diámetro de los estomas; Tasa fotosintética; Malondialdehído; Fenoles ligados a la pared; Fenoles totales; Actividad de superóxido dismutasa; Actividad específica de superóxido dismutasa; Actividad de la Fosfoenol piruvato carboxilasa; Actividad específica de la Fosfoenol piruvato carboxilasa.	9 indicadores: Presencia de espinas en las hojas; Presencia de espinas en la corona; Número de estomas/mm ² ; Diámetro de los haces vasculares; Espesor del parénquima acuífero; Espesor del parénquima clorofílico; Tasa de transpiración; Otros aldehídos; Fenoles libres.	11 indicadores: Número de brotes basales; Número de brotes criollos; Tasa fotosintética; Eficiencia en el uso del agua; Concentración intercelular de CO ₂ ; Clorofilas a+b; Clorofila a; Clorofila b; proteínas; Actividad de Fenilalanina amonio-liasa; Actividad específica de Fenilalanina amonio-liasa.	
Enana *(31/44; 70,4%)	13 indicadores: Número de coronas; Vitamina C; Acidez del fruto; Presencia de espinas en las hojas; Forma de los ojos del fruto; Presencia de espinas en la corona del fruto; Diámetro de los estomas; Tasa de transpiración; Otros aldehídos; Fenoles ligados a la pared; Fenoles libres; Actividad de Fosfoenol piruvato carboxilasa; Actividad específica de Fosfoenol piruvato carboxilasa.	19 indicadores: Altura de la planta; Diámetro del pedúnculo; Masa del fruto con corona; Número de ojos en el fruto; Altura del fruto; Diámetro del fruto; Ciclo; Número de estomas/mm ² ; Diámetro de los haces vasculares; Espesor del parénquima acuífero; Espesor del parénquima clorofílico; Eficiencia en el uso del agua; Tasa fotosintética; Clorofilas a+b; Clorofila a; Clorofila b; Fenoles totales; Actividad de Superóxido dismutasa; Actividad específica de Superóxido dismutasa.	8 indicadores: Número de brotes claveles; Número de brotes basales; Número de brotes criollos; Concentración intercelular de CO ₂ ; Malondialdehído; Proteínas; Actividad de Fenilalanina amonio-liasa; Actividad específica de Fenilalanina amonio-liasa.	4 indicadores: Hojas de color verde claro y zonas rojizas; Estructura de la planta de ligeramente abierta a compacta; Frutos de color anaranjado rojizo a amarillo verdoso; Frutos con forma de barril a bloque cilíndrico.

*Porcentaje de modificaciones respecto al donante.

 **Coefficiente general de variación para cada indicador fenotípico.**

Los coeficientes generales de variación (Tabla 12) indicaron que el número de brotes claveles fue notablemente diferente (173,21%) respecto a los demás indicadores. La clasificación de los coeficientes totales de variación de los otros indicadores del fenotipo se realizó en tres categorías: menos de 23%, entre 23 y 46% y más de 46%. Los indicadores que mostraron los mayores valores del coeficiente de variación general fueron los más influenciados por el cultivo *in vitro*, ya que este coeficiente involucró a todos los valores promedios observados de cada uno de los individuos en estudio.

Se determinó que la eficiencia en el uso del agua, la concentración de clorofila a, b y total, la tasa de transpiración, el espesor del parénquima clorofílico, la masa de la fruta con corona, el contenido de fenoles libres y la actividad específica de la superóxido dismutasa fueron también muy diferentes, con valores superiores a 46%.

Trece indicadores manifestaron valores entre 23 y 46%, entre ellos los relacionados con las características de las plantas; altura, número de criollos, número de brotes basales y diámetro del pedúnculo. Los relacionados con el fruto: diámetro, altura y número de ojos del fruto y los relacionados con la anatomía: parénquima acuífero y vasos conductores, así como con la concentración intercelular de CO₂, actividad enzimática de la superóxido dismutasa, la actividad de la fenilalanina amonio liasa y el uso del agua.

Sin embargo, el nivel de otros aldehídos, nivel de malondialdehído, nivel de fenoles ligados a la pared celular, contenido de proteínas, actividad de la fosfoenol piruvato carboxilasa, la actividad específica de la fosfoenol piruvato carboxilasa, nivel de fenoles totales, número de estomas por mm², diámetro de los estomas, tasa fotosintética, ciclo de la planta y el contenido de vitamina C del fruto mostraron variabilidad baja, lo que demostró que estos últimos indicadores fueron menos influenciados por el cultivo *in vitro*.

Tabla 12. Resumen de los efectos de la variación somaclonal en el fenotipo de P3R5 y Enana.

Carácter fenotípico	Coefficiente de variación general (%)
Número de brotes claveles	173.21
Eficiencia en el uso del agua	70.00
Clorofila b	64.57
Clorofila a + b	57.06
Tasa de transpiración	56.70
Clorofila a	53.99
Espesor del parénquima clorofílico	51.53
Masa fruto con corona	46.79
Fenoles libres	46.15
Superóxido dismutasa. Act.Esp.	46.10
Espesor del parénquima acuífero	45.44
Superóxido dismutasa. Act.Enz.	45.36
Altura de la planta	38.30
Fenilalanina amonio liasa. Act.Esp.	38.15
Fenilalanina amonio liasa. Act.Enz.	37.16
Diámetro vasos conductores	36.94
Número de brotes criollos	34.64
Diámetro del fruto	28.94
Concentración intercelular de CO ₂	28.16
Número de brotes basales	26.96
Diámetro del pedúnculo	26.45
Altura del fruto	26.39
Número de ojos del fruto	25.33
Otros aldehídos	22.83
Malondialdehído	18.45
Fenoles ligados a pared	17.59
Proteínas	15.85
Fosfoenol piruvato carboxilasa.Act.Enz	14.93
Fosfoenol piruvato carboxilasa.Act.Esp	14.11
Fenoles totales	13.47
Estomas/ mm ²	13.41
Diámetro de estomas	11.38
Tasa fotosintética	6.66
Ciclo de la planta	3.46
Vitamina C	2.30
Número de coronas del fruto	0.00
Acidez total del fruto	0.00

 **Distancias euclidianas de los somaclones respecto a la variedad donante.**

La figura 16 muestra las distancias euclidianas de cada somaclón respecto al cultivar donante, al considerar el genotipo (AFLP) y las evaluaciones del fenotipo, lo que permite revelar a la totalidad

de los indicadores fenotípicos en estudio y su relación con las características genéticas, se aporta de esta forma la interacción de ambos factores.

Con respecto a la información del genotipo, P3R5 se separó del cultivar donante Española roja pinareña por 2,83 unidades de distancia euclídeana y Enana por 3,00 unidades. Sin embargo, los indicadores del fenotipo revelaron diferencias más altas: 3,74 en P3R5 y 4,71 en Enana. Los cambios en el fenotipo se produjeron con la manifestación de diferencias genéticas menores, lo que según Paz *et al.* (2005) se debe a que las técnicas moleculares exploran solo una parte del genoma. Es muy probable que en la parte no explorada del genoma haya otras diferencias entre los somaclones y sea en un locus de importancia agronómica. Los resultados de la presente investigación coinciden con los obtenidos por Chen *et al.* (2006) y Prado *et al.* (2007).

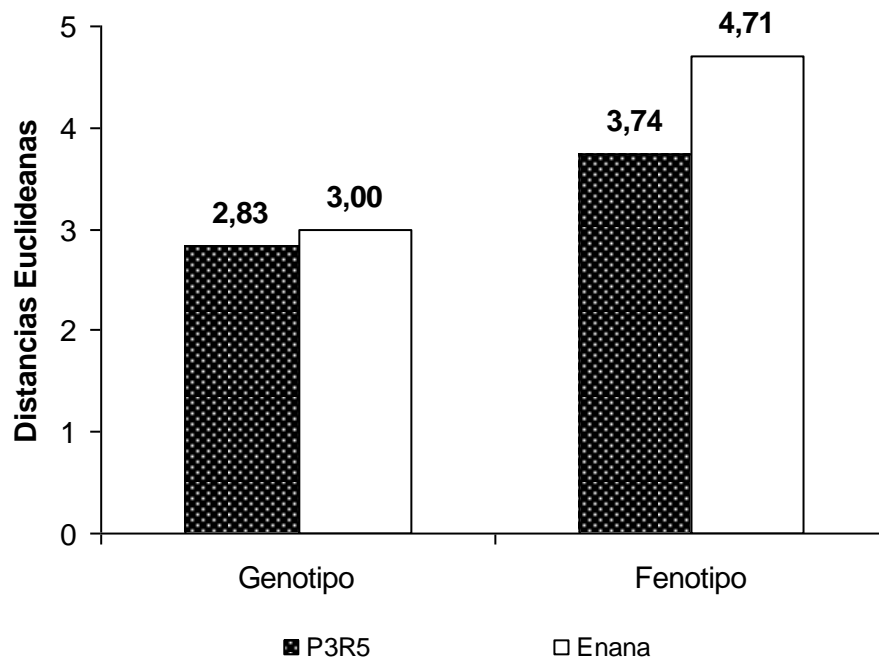


Figura 16. Distancias Euclídeanas de cada somaclón con respecto al donante Española roja pinareña, en cuanto al genotipo y al fenotipo.

La variación somaclonal en piña ocurrió con una frecuencia de 0,52%, tal como se señaló en el análisis de la primera generación del presente trabajo. Se demostró posteriormente, tanto por su caracterización molecular, como fisiológica y bioquímica que pequeños cambios en el genotipo,

demostrado mediante análisis moleculares de tipo AFLP pueden producir cambios notables en el fenotipo.

No es posible decir cuáles genes se involucraron en los cambios morfológicos y fisiológicos que se observaron en este estudio pues no constituyó objetivo del trabajo, no obstante las evaluaciones realizadas, que resumen una gran cantidad de datos de las características fenotípicas y la caracterización mediante AFLP, apoyaron las diferencias a nivel del genoma. Los genes que pueden ser marcados mediante AFLP requerirán la hibridación sexual entre los dos mutantes, pero debido a que está bien documentada la auto-incompatibilidad de la piña, que se produce por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el tercio superior del estilo (Kerns, 1932; Majunder *et al.* 1964) y está controlada gametofíticamente por un locus simple con alelos múltiples (Brewbaker y Gorrez, 1967), no se puede esperar que los mutantes produzcan semillas después de la polinización en un programa de hibridación. Hay una reacción de autorrechazo muy grande, la que es variable en intensidad y generalmente mayor en las variedades cultivadas, lo que probablemente es el resultado del proceso de domesticación y la selección de frutos sin semillas (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.* 1993).

La presente investigación doctoral demostró que las plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) cultivar Española roja pinareña obtenidas mediante organogénesis indirecta a partir de callos en las condiciones estudiadas manifestaron variación comprobada genética y fenotípicamente, así como, permitió la identificación de dos somaclones que manifestaron diferencias en cuanto a su comportamiento genético, morfológico, anatómico, fisiológico y bioquímico hasta la cuarta generación vegetativa. De esta manera el esquema de trabajo desarrollado en la presente investigación permitió evaluar la variabilidad producida mediante organogénesis indirecta en piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) cultivar Española roja pinareña y caracterizar a los somaclones obtenidos.

V. CONCLUSIONES.

1. A partir del cultivar donante Española roja pinareña, mediante organogénesis indirecta se obtuvieron dos somaclones estables, el P3R5 y Enana, confirmándose mediante el análisis de AFLP, por lo que la variabilidad generada por este método representó un 0,52% de variación somaclonal.
2. Al caracterizar el somaclón Enana se corroboró que presenta menor tasa fotosintética y mayor tasa de transpiración al compararlo con el somaclón P3R5, motivo por el cual el uso del agua fue menos eficiente en el primero de estos.
3. Los somaclones tuvieron respuestas variables respecto a los indicadores bioquímicos evaluados en plantas de seis meses de la cuarta generación vegetativa; el somaclón Enana mostró el más bajo nivel de fenoles totales, el más alto nivel de malondialdehído y la mayor actividad de fenilalanina amonio liasa y superóxido dismutasa; el somaclón P3R5 el nivel más bajo de otros aldehídos y de malondialdehído tan alto como Enana, ambos somaclones mostraron los contenidos más altos de proteínas al compararse con el donante.
4. Se constató que de los indicadores agronómicos, anato-morfológicos, fisiológicos y bioquímicos evaluados para detectar diferencias, el somaclón P3R5 difirió del donante en el 45,4% de estos, mientras que el somaclón Enana lo hizo en el 70,5%.
5. De acuerdo a los indicadores anato-morfológicos y agronómicos evaluados, el somaclón P3R5 se caracterizó por presentar rusticidad similar al cultivar Española roja; mostrar de manera estable menor número de espinas en sus hojas, lo que le confiere facilidades para la realización de atenciones fitotécnicas, unido a su adaptabilidad a las condiciones estudiadas y alcanzar rendimientos adecuados, mientras que el somaclón Enana posee valor genético.

VI. RECOMENDACIONES.

1. Aplicar el esquema de trabajo desarrollado en esta investigación como una alternativa más en el programa de mejoramiento de la piña.
2. Multiplicar y extender a áreas comparativas, en otras condiciones el somaclón P3R5, dado su bajo contenido de espinas en las hojas y su posible uso como variedad comercial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AIN (2010) Agencia de Información Nacional. Invasor Digital. Fruticultores de Ciego de Ávila sobrecumplen planes. (Visitado 27 de Enero 2010) Disponible en: WWW.INVASOR.CU.
2. Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18: 473–477.
3. Amagasa T (1982) Change in properties of phosphoenol pyruvate carboxylase in Kalamchoe daigremontana with leaf age. *Plant Cell Physiol.* 23:1471-1474.
4. Anu A, Babu KN, Peter KV (2004) Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 261–267.
5. Araújo LG, Prabhu AS, Arraes-Pereira PA (2004) RAPD marker linked to a gene conferring resistance to race IB-9 of *Pyricularia grisea* in somaclones of the rice cultivar Araguaia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 151–158.
6. Aravanopoulos FA (2003) Molecular identification of micropropagated plants. *Acta Horticulturae* 616: 25–47.
7. Arias E, Nieves N, Benega R, Quintas O, Isidró M, González J (1996) Estudios bioquímicos y genéticos de ocho cultivares de piña. *Cultivos Tropicales* 17:66-71.
8. Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.
9. Aversano R, Savarese S, De Nova JM, Frusciante L, Punzo M, Carputo D (2009) Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids. *Euphytica* 165: 353–361.
10. Bacon MA (2004) Water use efficiency in plant biology. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp 31-45.
11. Bairu MW, Fennell CW, Van Staden J (2006) The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish* banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci. Hortic.* 109: 347-351.
12. Barandalla L, Ritter E, Ruiz J I (2006) Oryzalin treatment of potato diploids yields tetraploid and chimeric plants from which euploids could be derived by callus induction. *Potato Res.* 10:143–154.
13. Barboza SB, Graciano-Ribeiro D, Teixeira JB, Portes TA, Souza LA (2006) Leaf anatomy of micropropagated pineapple plants. *Pesq. Agropec. Brasileira* 41:185–194.
14. Bartholomew DP, Malézieux E (1994) Pineapple. In: Schaffer, B and Anderson, P (eds)

- Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 243-291.
15. Bartholomew DP, Paul R, Rohrbach K (2003) The pineapple: Botany, production and use. Wallingford:CABI Publishing; 301.
 16. Bartholomew DP, Coppens d'Eeckenbrugge G, Chen CC (2010) Pineapple. In: Clark, J.R. and Finn, C.E. (eds.): Register of new fruit and nut cultivars, HortScience 45: 740-742.
 17. Be LV, Debergh PC (2006) Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). South. Afri. J Bot. 72: 191-194.
 18. Benega R, Cisneros A, Hidalgo M, Martínez J, Arias E, Arzola M, Carvajal C, Isidrón M (1998) Hybridization in pineapple results and strategies to save time for obtaining and releasing new hybrid varieties for growers. In : Abstracts of the Third Int. Pineapple Symp. Thailand. p.16.
 19. Benega R, Martínez J, Arias E, Daquinta M, Hidalgo M, Yabor L, Isidrón M (2000) Pineapple review of some methods to obtain pineapple haploid plants. Pineapple News 7: 7-9.
 20. Bergmann DC, Sack FD (2007) Stomatal development. Annu. Rev. Plant Biol. 58:163-181.
 21. Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, Krauss S (2005) Genetic analysis of cotyledon-derived regenerants of tomato using AFLP markers. Curr Sci 88: 280–284.
 22. Botella JR, Fairbairn DJ (2005) Present and future potential of pineapple biotechnology. Acta Horticulturae 666: 23–28.
 23. Bouman H, De Klerk GJ (2001) Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. Theor. Appl. Genet. 102:111–117.
 24. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.
 25. Brewbaker JL, Gorrez DD (1967) Genetics of self-incompatibility in the monocot genera, *Ananas* (pineapple) and *Gasteria*. American Journal of Botany 54: 611-616.
 26. Brown PTH, Lange FD, Kranz E, Lorz H (1993) Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. Mol. Gen : Genet. 237:311–317.
 27. Cabot CL (1988) Amelioration génétique de l'ananas: exemple de création variétale, analyse des ressources génétiques disponibles. Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur en Sciences. Francia. pp 100.
 28. Cabot C, Lacoevilhe JC (1990) A genetic hybridization programme for improving pineapple

- quality. *Acta Horticulturae* 275: 395-400.
29. Cabral JRS, de Matos AP, Da Cunha GAP (1993) Selection of pineapple cultivars resistant to fusariose. *Acta Horticulturae* 334: 53-58.
 30. Cabral JRS, de Matos AP, Coppens d'Eeckenbrugge G (1997) Segregation for resistant to fusariose leaf colour and leaf margin type from the EMBRAPA pineapple hybridization programme. *Acta Horticulturae*. 425:153-200.
 31. Campa A, Pérez E, Giráldez R, Ferreira JJ (2004) Utilización de las proteínas de semilla como marcadores genéticos para la caracterización de la colección de judías del Serida. *En Congreso de Mejora Genética de Plantas* (21 – 24 Septiembre, 2004, España). León, España. Universidad de León. *Actas de Horticultura* 41: 313–316.
 32. Cardone S, Olmos S, Echenique V (2004) Variación somaclonal. In Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (eds). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA, Argentina. p. 81-96.
 33. Cardoza V, Stewart NC (2004) Brassica biotechnology: Progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 542-551.
 34. Carlier JD, Coppens d'Eeckenbrugge G, Leitão JM (2007) Pineapple. In: Kole, C. (Ed.) *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol. 4. Fruits and Nuts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 331-342.
 35. Cassells CA, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145–157.
 36. Casson SA, Hetherington (2010) Environmental regulation of stomatal development. *Curr. Opin. Plant Biol* 13:90-95.
 37. Castillo NF, Bassil NV, Wada S, Reed BM (2010) Genetic stability of criopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 46:246-256.
 38. Cernusak LA, Aranda J, Marshall JD, Winter K (2007) Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytologist*. 173: 294 –305.
 39. Chan YK, Lee CK (1985) The Hybrid 1 pineapple: a new canning variety developed at MARDI. *Teknologi Buah-buahan* 1:24-30.
 40. Chan YK, Lee HK (1996) Josapine: a new pineapple hybrid developed at MARDI. In Osman, M., Clyde, MM and Zamrod, Z. (eds). *The Second National Congress on genetics*. Malaysia, pp 217-220.
 41. Chan YK (1997) Performance and stability of pineapple hybrids in G x E trial in Malaysia. *Acta Horticulturae* 425:201-211.

42. Chan YK, Coppens DG, Sanewski GM (2003) The pineapple : Botany, Production and uses Cap. 3. Breeding and variety improving. D. P. Bartholomew, R.E. Paull and K.G. Rohrbach (eds). CAB International. pp: 33-55.
43. Chang CC, Chang CC, Chen YW (1997) Pineapple breeding. Competitiveness of fruit industry. In Chang-LinRen (ed). Special proceeding of a Symposium on enhancing. Publication No. 38 pp :107-112.
44. Chen J, Henny RJ, Devanand PS, Chao CT (2006) AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. Plant Cell Rep. 24: 743–749.
45. Chriqui D. (2008) Chap. 2. Developmental biology. In: Plant Propagation by Tissue Culture Vol 1. The Background. 3rd Edition. Edwin F George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (eds.) Springer. pp 283-333.
46. Clive J. (2008) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. Ithaca.
47. Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval MF, Van Miegroet F (1993) Fertility and self-incompatibility in the Genus *Ananas*. Acta Horticulturae 334:45-51.
48. Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval MF (1995) Bases genéticas para definir una estrategia de mejoramiento de la piña. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 21:95-118.
49. Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval MF (2000) Pineapple breeding at CIRAD. II. Evaluation of 'Scarlet', a new hybrid for the fresh fruit market, as compared to Smooth Cayenne. Acta Horticulturae 529:155-163.
50. Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F (2003) Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: Bartholomew, D.P., Paul, R.E. and Rohrbach, K.G. (eds.): The Pineapple: Botany, Production and Uses. CAB International, Wallingford (Great Britain), pp.13-32.
51. Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval MF (2009) The domestication of pineapple: context and hypotheses. Pineapple News 16: 15-27.
52. Cornide MT, Coto O, Calvo D, Canales E, De Prada F, Pérez G (2000) Molecular markers for the identification and assisted management of genetic resources for sugarcane breeding. Plant Varieties and Seeds 13: 113-123.
53. Cornide MT, Sánchez JE, Calvo D (2002) Identificación de genotipos y progenitores. En: Marcadores Moleculares: Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Cornide MT (Ed) Félix Varela, Habana pp 212-220.
54. Cotias de Oliveira AL, Assis JG, Bellintani MC, Andrade JC, Guedes ML (2000) Chromosome numbers in *Bromeliaceae*. Genet. Mol. Biol. 23:173-177.
55. DaCosta B, Huang B (2007) Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for bentgrass species in response to drought stress. J Am Soc Hortic Sci 132:319–326.

56. Dalldorf DB (1990) Botanical classification of the pineapple. Pineapples A.2. South Africa. p25.
57. Danso KE, Ayeh KO, Oduro V, Amiteye S, Amoatey HM (2008) Effect of 6-Benzylaminopurine and Naphthalene acetic acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials. World. Applied. Sci. J. 3(4): 614-619.
58. Daquinta MA, Cisneros A, Rodríguez Y, Escalona M, Pérez M, Luna I, Borroto CG (1996) Embriogénesis somática en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Acta Horticulturae 425:243–246.
59. Daquinta M, Benega R (1997) Brief review of tissue culture of pineapple. Pineapple News 3: 7–9.
60. Davey M, Sripaoraya S, Anthony P, Lowe K, Power J (2007) Biotechnology in agriculture and forestry. In: Pua, E. C., Davey, M. R. (eds.) Transgenic Crops. Berlin: Springer Verlag; pp 97-127.
61. Debergh PC (2008) Chap. 2. Micropropagation: Uses and Methods. Plant Propagation by Tissue Culture. Vol 1. The Background. 3rd Edition. Edwin F George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (eds.) Springer. pp 29-64.
62. De Oliveira Silveira HR (2010) Excesso de água em mudas de café (*Coffea arábica* L.): efeitos fisiológicos, bioquímicos e anatómicos. Tesis Maestría UFLA- Lavras-MG: 66p.
63. Dewald MG, Moore GA, Sherman WB, Evans MH (1988) Production of pineapple plants *in vitro*. Plant Cell Rep. 7: 535-537.
64. Dewald MG, Moore GA, Sherman WB (1992) Isozymes in *Ananas* (Pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:491-496.
65. Dujardin M (1991) Cytogénétique de l'ananas. Fruits 46 : 376-379.
66. Dumet D, Benson EE (2000) The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: Engelmann, F., Takagi, H., eds. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application. Rome, Tsukuba: JIRCAS, IPGRI: 43-56.
67. Duval MF, Noyer JL, Perrier X, Coppens d'Eeckenbrugge G, Hannon P (2001) Molecular diversity assessed by RFLP markers. Theor. Appl. Gen. 102:83-90.
68. Edna, A.; Tahar, T.; Mikae, I.; Courbot, S.; Mugford, J.; Andrew, C.; Borland, A. (2008) Cloning, localization and expression analysis of vacuolar sugar transporters in the CAM plant *Ananas comosus* (pineapple). J. Exp. Bot. 43:1-14.
69. El-Khallal SM (2007) Induction and Modulation of Resistance in Tomato Plants Against *Fusarium* Wilt Disease by Bioagent Fungi (Arbuscular *Mycorrhiza*) And/or Hormonal Elicitors (Jasmonic Acid & Salicylic Acid): 2-Changes in the Antioxidant Enzymes,

- Phenolic Compounds and Pathogen Related- Proteins. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 1(4): 717-732.
70. Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep 18:743–748.
 71. Espinosa P, Lorenzo JC, Iglesias A, Yabor L, Menéndez E, Borroto J, Hernández L, Arencibia AD (2002) Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. Plant Cell Rep 21:136–140.
 72. Faivre-Rampant O, Kevers C, Gaspar T (2000) IAA-oxidase activity and auxin protectors in non rooting, rac mutant shoots of tobacco *in vitro* . Plant Sci 153: 73-80.
 73. FAOSTAT (2012) FAO Statistics Division. Disponible en URL: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Visitado 20 de Marzo de 2012).
 74. Feuser S, Kelen M, Daquinta M, Onodari R (2003) Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD_s. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 72: 221-227.
 75. Fernández A, Peteira B, González MC, Yanes LY (2003) Actividad peroxidasa, polifenoloxidasa, fenilalanina amonio liasa y glucanasa en somaclones y mutantes de arroz. Protección Vegetal 18(3):183-188.
 76. Fitchet M (1989) Observations on pineapple improvement in Taiwan, Republic of China. Subtropica 10:10-12.
 77. Firoozabady E, Gutterson N (2003) Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. Plant Cell Rep. 21:844–850.
 78. Firoozabady E, Moy Y (2004) Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant 40:67–74.
 79. Firoozabady E, Heckert M, Gutterson N (2006) Transformation and regeneration of pineapple. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 84:1–16.
 80. Fourré JL, Berger P, Niquet L, André P (1997) Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. Theor Appl Genet 94:159–169.
 81. Gao DY, Vallejo VA, He B, Gai YC, Sun LH (2009) Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 98:187-196.
 82. García-Sánchez F, Syvertsen JP, Gimeno V, Botía P, Pérez-Pérez JG (2007)

- Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiol. Plant.* 130:532–542.
83. González MC, García A (1997) Detección de posibles marcadores morfológicos para la selección temprana de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad. *Cultivos Tropicales* 18:47–50.
 84. González MC, Osuna L, Echeverría C, Vidal J, Cejudo FJ (1998) Expresión and localization of phosphoenol piruvate carboxilase in developing and germination wheat grains. *Plant Physiol.* 116:1249-1258.
 85. González-Olmedo JL, Fundora Z, Molina LA, Abdulnour J, Desjardins Y, Escalona M (2005) New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:87–90.
 86. Guo WL, Gong L, Ding ZF, Li YD, Li FX, Zhao SP, Liu B (2006a) Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. as revealed by ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Rep* 25:896–906.
 87. Guo Z, Ou W, Lu S, Zhong Q (2006b) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiol Biochem* 44:828–836.
 88. Gurr SI, McPherson J, Bowles DJ (1992) Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: Wilkinson D. L. (ed) *Molecular Plant Pathology*. Oxford, pp 51–56.
 89. Hale LP, Greer PK, Trinh CT, Gottfried MR (2005) Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10 deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clinical Immunology* 116:135-142.
 90. Halušková J, Košuth J. (2003) RAPD analysis of somaclonal and natural DNA variation in *Hypericum perforatum* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botánica* 45: 101–104.
 91. Hammerschlag F, Garcés S, Koch-Dean M, Ray S, Lewers K, Maas J, Smith BJ (2006) *In vitro* response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletotrichum acutatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 255–261.
 92. Hauser MT, Aufsatz W, Jonak C, Luschnig C (2011) Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. doi:10.1016/j.bbagr.2011.03.007.
 93. Heath RL, Packer J (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125: 189–198.
 94. Hernández JA, Ascanio GO, Morales MD (1999). Nueva versión de clasificación genética de los suelos. MINAG. Cuba. Universidad de Biología Agropecuaria. Veracruz. México: 14 pp.

95. Huppe HC, Turpin DH (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algae cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 45:577-607.
96. IBPGR. International Bureau Plant Genetic Resources. (1991) Descriptors for pineapple. CAB International. pp 87.
97. Isidró M (2002). Algunas consideraciones técnicas acerca del establecimiento y atenciones al cultivo de la piña. Libro electrónico: Ed. Ciego de Ávila, Centro de Bioplantitas 41 pp.
98. Isidró M, Rosales Y, Pifferrer A, Cisneros A, Benega R, Carvajal C (2003) Caracterización del germoplasma de piña colectado en Cuba mediante prospección nacional: localización, diversidad genética y situación actual. *Cult. Trop.* 24:65-71.
99. Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166.
100. Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company. New York and London. p 523.
101. Jorin J, Dixon RA (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). II. Purification, characterization, and induction of phenylalanine ammonia-lyase isoforms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 92: 447–455.
102. Joyce SM, Cassells AC (2002) Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 125-137.
103. Kaepler SM, Kaepler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179–188.
104. Kantardzic M (2003) *Data mining: concepts, models, methods, and algorithms*, vol 1. Wiley, New Jersey.
105. Kerns KR (1932) Concerning the growth of pollen tubes in pistils of Cayenne flowers. *Pineapple Quarterly* 1:133-137.
106. Kiernan JA (1999) *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Butterworth Heinemann. Oxford. London.120pp.
107. Kim HS, Yoon SK, Hahn HK (2009) Reactive Oxygen Species: Regulation of Plant Growth and Development. *Advances in Botanical Research.* 52: 26-41.
108. Kim TH, Bohmer HH, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network advances in understanding abscisic acid, CO₂ and Ca²⁺ signalling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:561-591.
109. Kinjo K (1993) Inheritance of leaf margin spine in pineapple. *Acta Horticulturae.* 334:59-66.
110. Ko HH, Campbell PR, Jobin-Décor MP, Eccleston KL, Graham MW, Smith MK (2006) The introduction of transgenes to control blackheart in pineapple (*Ananas comosus* L.) cv.

- Smooth Cayenne by microprojectile bombardment. *Euphytica* 150: 387–395.
111. Kosky RG, Barranco LA, Chong-Pérez B, Daniels D, Reyes M, De Fera M (2006) Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar FHIA-18 plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. *Euphytica* 150: 63-68.
 112. Kubis SE, Castilho AM, Vershinin AV, Heslop-Harrison JS (2003) Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 52: 69–79.
 113. Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
 114. Leal F (1990) Complementos a la clave para la identificación de las variedades comerciales de piña *Ananas comosus* (L) Merrill. *Rev. Fac. Agron (Maracay)* 16:1-12.
 115. Li R, Bruneau AH, Qu R (2010 a) Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in St. Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. *Plant Breeding* 129:96-99.
 116. Li R, Qu R, Bruneau AH, Livingston DP (2010 b) Selection for freezing tolerance in St. Augustinegrass through somaclonal variation and germplasm evaluation. *Plant Breeding* 129: 417-421.
 117. Liao CT, Lin CH (2001) Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proceedings of National Science Council* 25:148-157.
 118. Ling DH, Liang CH, Ma AR, Chen MF (2002) Fertile revertants from somaclones of male sterile plants derived from somatic cell culture of *indica* rice. *Rice Genetics Newsletter* 5:20-26.
 119. Liu JL, Rosa-Márquez E, Lizard E (1989) Smooth leaf (spineless) Red Spanish pineapple (*Ananas comosus*) propagated in vitro. *J. Ag. Univ. P. R.* 73: 301-311.
 120. Loison-Cabot C (1987) Practice of pineapple breeding. *Acta Horticulturae* 196:25-36.
 121. Londers E, Ceusters J, Godts C, Van De Poel B, De Proft MP (2010) Pre and Postharvest Metabolism of Leaves on the Pineapple Fruit Crown. *Pineapple News* 17: 4-8.
 122. López-Herrera, M, Peña VC, Aguirre RJ, Trejo LC, López AL (2007) Intercambio gaseoso y parámetros fotosintéticos en dos tipos de hojas de frijol silvestre y domesticado. *Revista UDO Agrícola* 7:49-57.
 123. Lu S, Chen C, Wang Z, Guo Z, Li H (2009) Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant Cell Rep* 28:517–526.
 124. Maluszynski M, Kasha K, Szarejko I (2003) Published doubled haploid protocols in plant

- species. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp 309-335.
125. Malézieux E, Cote F, Bartholomew D (2003) . Crop Environment, plant growth and physiology. In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E. and Rohrbach, K.G. (eds.): The Pineapple: Botany, Production and Uses. CAB International, Wallingford (Great Britain), pp. 69-107.
 126. Majumder SK, Kerns KR, Brewbaker, Johansmessen GA (1964) Assessing self-incompatibility by a pollen fluorescence technique. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 84:217-223.
 127. Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation research 8;424: 83-95.
 128. Martín C, Uberhuaga E, Pérez C (2002) Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. Euphytica 127: 247–253.
 129. Martín-Cuevas A, Martín LM, Álvarez JB (2004) Las proteínas de reserva como marcadores moleculares en el castaño (*Castanea sativa* Miller). In Congreso de Mejora Genética de Plantas (21 – 24 Septiembre, 2004, España). León, España. Universidad de León. Actas de Horticultura 41: 245–248.
 130. Martins M, Sarmiento D, Oliveira MM (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep 23:492–496.
 131. McCord J, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. J Inorg Biochem 244: 6049–6055.
 132. McKersie BD, Bowley SR, Harjato E, Leprice O (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiology 111:1177-1181.
 133. McKersie BD, Bowley SR, Jones KS (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiology 119:839-848.
 134. Mhatre M, Rao PS (2002) Influence of physical and chemical mutagens on pineapple shoot cultures. Pineapple News 9:10-11.
 135. Mhatre M (2007) Micropropagation of pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. In: Jain S.M. and Haggman H. (eds.), Protocol for micropropagation of Woody Trees and Fruits. pp 499-508.
 136. Miñano H, González-Benito ME, Martín C (2009) Characterization and analysis of

- somaclonal variation in *Chrysanthemum* cultivars using RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 122:238-243.
137. Mehta YR, Angra D (2000) Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 23: 617-622.
 138. MINAG. Ministerio de Agricultura. (1989) Instructivo Técnico para el cultivo de la piña. Ciudad de la Habana. CIDA
 139. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
 140. Molina-Montenegro MA, Badano E, Hinostroza P, Cavieris LA (2005) Intercambio gaseoso en dos especies alto andinas de Chile central: efecto de la asociación a plantas en cojín. *Ecología Austral* 15: 7-15.
 141. Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Plant Mol. Biol.* . 52:561-591.
 142. Mujib A (2004) *In vitro* variability in tissue culture: a fresh look. In Mujib, A; Myeong-je, C; Predieri, S; Banerjee, S. eds. *In vitro* application in crop improvement. Enfield, EUA, Science Publishers. pp 261-271.
 143. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and Bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:52-53.
 144. Nievola CC, Kraus JE, Freschi I, Souza BM, Mercier H (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:832–837.
 145. Norma Técnica Cubana 77-22-16. 1982. Oficina Nacional de Normalización.
 146. Norma Técnica Cubana 77-22-7. 1982. Oficina Nacional de Normalización.
 147. Noro Y, Takano-Shimizu T, Syono S, Kishima Y, Sano Y (2007) Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the *EPSPs-ORPS20* region. *Theor. Appl. Gen.* 114: 705–711.
 148. Otaola V (2000) Regeneración de plantas de Parchita (*Pasiflora edulis* F. Flavicarpa) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *BIOAGRO.* 12(3):71-74.
 149. Orellana P, Valdés BA, García L, Veitía N, Bermúdez-Carabaloso I, Padrón Y, Torres D (2006) Obtención y selección de mutantes resistentes a la roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* H y P Sydow.) mediante el cultivo *in vitro* y tratamiento con radiaciones Gamma (⁶⁰Co) de callos de la variedad de caña de azúcar (*Sacharum* spp. *Híbrido*) SP 70-1284. *Biotechnología Vegetal* 6(3):182.
 150. Orellana P, Kosky RG, García-Agula L, Chong-Pérez B, León M, Reyes M, Sarría Z, Triana

- R, Pérez B, Rodríguez M (2010) Respuesta en campo de plantas de 'Cavendish enano' (*Musa AAA*) obtenidas mediante embriogénesis somática. *Biología Vegetal* 10 (4): 245 – 250.
151. Palombi MA, Lombardo B, Caboni E (2007) In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyrastrer* Burgsd) clones tolerant to Fe- chlorosis and somaclonal variation análisis by RAPD markers. *Plant Cell Rep* 26:489–496.
 152. Paz EY, Gil K, Rebolledo L, Rebolledo A, Uriza D, Martínez O, Isidró M, Simpson J (2005) AFLP Characterization of the Mexican Pineapple Germplasm Collection. *J Am Soc Hort Sci*, 130:575–579.
 153. Peña H, Díaz JA, Martínez T (1996) *Fruticultura Tropical*. Bogotá: Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior (ICFES).
 154. Pérez PJ (1998) Variación somaclonal. En: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Pérez Ponce JN (Ed) pp: 105-121.
 155. Picca A, Helguera M, Salomón N, Carrera A (2004) Marcadores moleculares. In Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. (eds.) *Biología y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina, Ediciones INTA. pp 61-68.
 156. Piccioni E, Barcaccia G, Falcinelli M, Standardi A (1997) Estimating somaclonal variation in axillary branching propagation and indirect somatic embryogenesis by RAPD fingerprinting. *Int J Plant Sci* 158:556–562.
 157. Pierik RLM (1997) *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Kluwer Academia Publishers.364 p.
 158. Poehlman J, Allen D (2003) Mejoramiento genético de cultivos autógamos; Mutaciones; Aplicación de la biología molecular al fitomejoramiento. *Mejoramiento Genético de las Cosechas*. Editorial Limusa, S.A.; Noriega Editores, Ciudad México, México, pp 171-192, 119-128, 145-152.
 159. Polanco C, Ruiz ML (2002) AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science* 162: 817–824.
 160. Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth. Res.* 73: 149–156.
 161. Prado MJ, González MV, Romo S, Herrera MT (2007) Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88:1–10.

- 162.** Prado MJ, Rodríguez E, Rey L, González MV, Santos C, Rey M (2010) Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers Plant Cell Tiss. Org. Cult.103:49–59.
- 163.** Preece J, Sutter G (1991) Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P., Zimmerman, R., (eds.) Micropropagation Technology and Applications. The Netherland: Kluwer Academic Publishers; pp 71-73.
- 164.** Price A, Cairns J, Horton P, Jones HG, Griffiths H (2002) Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. J. Exp. Bot. 53: 989–1004.
- 165.** Puente R, González AI, Ruiz ML, Polanco C (2008) Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 44: 419-426.
- 166.** Py C, Lacoevilhe JJ, Teisson C (1987) The pineapple: Cultivation and Uses. Editions GP. Maisonneuve & Larose, Paris, France: 568 pp.
- 167.** Qing-Ming L, Bin-Bin L, Yang W, Zhi-Rong Z (2008) Interactive effects of drought stresses and elevated CO₂ concentration on photochemistry efficiency of cucumber seedlings. J Integ Plant Biol 50:1307–1317.
- 168.** Raimbault AK, Marie-Alphonsine PA, Horry JP, Haugrin MF, Romuald K, Soler A (2011) Polyphenol Oxidase and Peroxidase Expression in Four Pineapple Varieties (*Ananas comosus* L.) after a Chilling Injury. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 342–348.
- 169.** Rakoczy-Trojanowska M (2002) The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 1111–1120.
- 170.** Ramírez OD, Gandía H, Vélez FH (1972) P.R.1-67, a new pineapple selection. Fruit varieties and Horticultural Digest 26:13-15.
- 171.** Ramírez, A. L. (1981) Repetibilidad de algunos caracteres en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* L. Merr). Cultivos Tropicales. 3(1):13-15.
- 172.** Ravindra NS, Kulkarni RN, Gayathri MC, Ramesh S (2004) Somaclonal variation for some morphological traits, herb yield, essential oil content and essential oil composition in an Indian cultivar of rose-scented geranium. Plant Breeding 123: 84-86.
- 173.** Rival A, Bertrand L, Beale T, Combes MC, Touslot P, Leshermes P (1998) Suitability of RAPD analysis for detection of somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Breeding 117: 73–76.

174. Rodríguez Y, Mosqueda M, Companioni B, Arbola M, Borrás O, Pérez MC, Lorenzo JC, Santos R (2002) Bioassay for *in vitro* differentiation of pineapple cultivar resistance levels to Heart rot disease. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38:613-616.
175. Rodríguez R, Cid M, Pina D, Gonzalez-Olmedo J, Desjardins Y (2003) Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 39: 657-66.
176. Rodríguez M, Coto O, Hernández I, Delgado M y Cornide MT (2005) Caracterización molecular de un grupo de variedades de caña de azúcar del programa de mejoramiento cubano. *Cultivos Tropicales* 26: 25-30.
177. Rodríguez D, Isidró M, Moya M, Valera E, Cruz, Roque A (2004) Influencia del Pectimorf en la multiplicación "*in vitro*" de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.). En: XIV Congreso Científico Nacional de Ciencias Agrícolas. (14: 2004, nov 9-12, La Habana) Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2004. ISBN 959-7023-27-X.
178. Rodríguez D (2010) Caracterización de piña tropical (*Ananas comosus* L. Merrill) y especies afines. Tesis de Maestría. Univesrsitat de Lleida. Saragosa. España. pp155.
179. Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software: Setauket, NY.
180. Rohrbach KG, Christopher D, Hu J, Paull R, Sipes B, Nagai C, Moore P, McPherson M, Atkinson H, Levesley A, Oda C, Fleisch H, McLean M (2000) Management of a multiple goal pineapple genetic engineering program. *Acta Horticulturae* 529:111–113
181. Sahijram L, Soneyi JR, Bollamma KT (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cell Dev Biol. – Plant* 39: 551–556.
182. Salisbury FB, Ross CW (1992) *Plant Physiology*. Fourth Edition. Wadsworth Publishing Company, California, USA. pp383.
183. Sánchez-Chiang, N, Jiménez, VM (2009) Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):135-151.
184. Sánchez-Teyer LF, Quiróz-Figueroa F, Loyola-Vargas V, Infante D (2003) Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23: 107–115.
185. Sanewski GM (1998). The Australian pineapple fresh market breeding program. In. *Abstrats of third international pineapple symposium*. Thayland, p.51.
186. Sanewski G (2004) A method for screening pineapple genotypes for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *Pineapple News*. 11:16-17.
187. Santos MDM, Buso GCS, Torres AC (2008) Evaluation of genetic variability in

- micropropagated propagules of ornamental pineapple (*Ananas comosus* var *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal) using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 7:1097-1105.
- 188.** Seo BB, Do GS, Devi J (2004) Chromosomal and molecular analysis of somaclonal variation in certain *Allium* species *In*: Mujib A, Myeong-je C, Predieri S, Banerjee S. (Eds.). *In vitro* application in crop improvement. Enfield, EUA, Science Publisher, pp 79-102.
- 189.** Shetty NP, Mehrabi R, Lutken H, Haldrup A, Kema GH, Collenge DP, Jorgenson HJ (2007) Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist*. 174(3): 637-637.
- 190.** Sharma AK, Sharma A (1991) *Chromosome Techniques. Theory and Practice*. Third edition. University Park Press Baltimore and Butterworths London. UK. 176pp.
- 191.** Sharma SK, Bryan GJ, WinWeld MO, Millam S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226:1449–1458.
- 192.** Siegel G, Stitt M (1990) Partial purification of two forms of spinach leaf sucrosephosphate synthase which differ in their kinetic properties. *Plant Sci* 66: 205–210.
- 193.** Singh G, Sandhu SK, Meeta M, Sinhg K, Gill R, Gosal SS (2008). *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. *Euphytica* 160:35–47.
- 194.** Smith M, Ko HL, Hamill SD, Sanewski GM, Graham MW (2003) *Biotechnology*. In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E. and Rohrbach, K.G. (eds.): *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford (Great Britain), pp. 57-68.
- 195.** Smulders MJ, Rus-Kortekaas W, Gilissen LJW (1995) Natural variation in patterns of polysomaty among individual tomato plants and their regenerated progeny. *Plant Sci* 106:129–139.
- 196.** Smulders MJ. (2005) Are there adequate methods for assessing somaclonal variation in tissue culture propagated plants? *In*: Libiaková, G; Gaidosová, A. (eds.) *Final conference / Cost 843 and Cost 851* (June 28 – July 3, 2005, Slovakia), pp 201-203.
- 197.** Slesak I, Libik M, Karpinska B, Miszalski Z (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses. *Acta. Biochem. Polon.* 54: 39-50.
- 198.** Soneji JR, Rao PS, Mhatre M (2002) Suitability of RAPD for analyzing spined and

- spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) Plant Molecular Biology Reporter 20:307.
199. Sripaoraya S, Marchant R, Power JB, Davey MR (2001) Herbicide-tolerant transgenic pineapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment. Ann. Bot. 88: 597–603.
 200. Sripaoraya S, Marchant R, Power JB, Davey MR (2003) Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39:450–454.
 201. Sripaoraya S, Keawsompong S, Insupa P, Davey MR, Power JB, Srinives P (2006) Evaluation of transgene stability, gene expression and herbicide tolerance of genetically modified pineapple under field conditions. Acta Horticulturae 702:37–40.
 202. Suárez L, González MC (2004) Evaluación de estadios tempranos de un grupo de mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones salinas, utilizando marcadores morfoagronómicos. Cultivos Tropicales, 25: 27–31.
 203. Tapia CE, Andrade HG, Gutiérrez EMA (2005). Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas sp.*) mediante RAPD e ISSR. Fitotecnia Mexicana 28:187-194.
 204. Taiz L, Zeiger E (2006) Plant Physiology. Cuarta Edición: pp 705.
 205. Teklehaymanot T, Wannakraioj S, Pipattanawong N (2010) Meta-topolin for Pineapple shoot multiplication under three *in vitro* systems. Amer-Eurasian J. Agric & Environ. Sci. 7:157-162.
 206. Torres MA, Jonathan DJ, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogen. Plant physiol., 141: 373-378.
 207. Tregear JW, Morcillo F, Richaud F, Berger A, Singh R, Cheah SC, Hartmann C, Rival A, Duval Y (2002) Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. Journal of Experimental Botany 53: 1381–1396.
 208. Trusov Y, Botella JR (2006) Delayed flowering in pineapples (*Ananas comosus* (L.) Merr.) caused by co-suppression of the ACACS2 gene. Acta Horticulturae 702:29–36.
 209. Tsun-Thai Ch, NorAini M, Fadzillah M, Kusnan M, Mohmad M (2005) Efecto del estrés oxidativo sobre los cultivares Berangan y Mas. InfoMusa 14:32-36.
 210. Tyagi RK, Agrawal A, Mahalakshmi C, Hussain Z (2007) Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43:51-58.
 211. Urubcová M, Cvikrova M, Eder J, Zon J, Machackova I (2000) Effect of inhibition of phenyl-

- propanoid biosynthesis on peroxidase and IAA-oxidase activities and auxin content in alfalfa suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 949-956.
- 212.** Van de Peer Y, De Watchter R (1994) TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comp. Appl. Biosci.* 10:569-570.
- 213.** Van Quy L, Lamaze T, Champigny M L (1991) Effect of light and NO_3^- on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Evidence for covalent modulation of the C3 enzyme. *Physiol Plant* 97: 1476–1482.
- 214.** Vaughn MW, Tanurdzić M, Lippman Z, Jiang H, Carrasquillo R, Rabinowicz PD, Dedhia N, McCombie WR, Agier N, Bulski A, Colot V, Doerge RW, Martienssen RA (2007) Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*, *PLOS Biol.* 5: p174.
- 215.** Viegas RP (2008) Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I plantlet (*Heliconiaceae*). *Scientia Agricola* 65:69-71.
- 216.** Villegas VM, Pementel RB, Siar SV, Barile ER (1995) Preliminary evaluation of promising pineapple hybrids. In Abstracts of Second Symposium International Ananas. CIRAD-ISMS. Martinique: p16.
- 217.** Vost P, Hgogers R, Bleeker R, Van de Lee T, Homes M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- 218.** Wang L, Uruu G, Xiong L, He X, Nagai C, Cheah T, Hu S, Nan G, Sipes S, Atkinson J, Moore H, Rohrbach G, Paull R (2009) Production of transgenic pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 45:113-121.
- 219.** Wakasa K (1979) Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. *Japan. J. Breed* 29:13-22.
- 220.** Wakasa K (1989) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry.*, Vol. 5 Trees II. Y. P. S. Bajaj (ed). Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. Pp13-29.
- 221.** We YC (1974) The Masmerah pineapple: a new cultivar for the Malaysian pineapple industry. *World Crops* March/April:67-76.
- 222.** Williams DDF, Fleisch H (1993) Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae* 334:67-76.
- 223.** Yabor L, Arzola A, Aragón C, Hernández M, Arencibia A, Lorenzo JC (2006) Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 86:63–67.

- 224.** Yabor L, Arzola A, Aragón C, Hernández M, Arencibia A, Lorenzo JC (2008) Biochemical side effects of the herbicide FINALE on bar gene-containing transgenic pineapple plantlets. *Euphytica*. DOI 10.1007/s10681-008-9743-0.
- 225.** Yabor L, Valle B, Carvajal C, Aragón C, Hernández M, González J, Daquinta M, Arencibia A, Lorenzo JC (2009) Characterization of a field-grown transgenic pineapple clone containing the genes chitinase, AP24, and bar. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. DOI 10.1007/s11627-009-9245-3.
- 226.** Yanes PE, Olmedo GJ, Rodríguez R (2000) A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Pineapple News* 7: 6-7.
- 227.** Yoo CY, Pence HE, Hasegawa PM, Mickelbart (2009) Regulation of transpiration to improve crop water use. *Crit. Rev. Plant Sci*. 28:410-431.
- 228.** Yun HC, Ching CC (2010) RAPD marker assisted selection of EMS induced pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) mutants. *Pineapple News* 17:24-26.
- 229.** Zhang XQ, Bin L, Chollet R (1995) In vivo regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenol piruvate carboxilase. *Plant Physiol*. 108:1561-1568.
- 230.** Zhang X, Ervin EH, LaBranche AJ (2006) Metabolic defense responses of seeded bermudagrass during acclimation to freezing stress. *Crop Sci* 46:2598–2605.