INDUCCIÓN DE CALLOS EN ANTERAS DE PIÑA

R. Benega, Miriam Isidrón, A. Cisneros, Elizabeth Arias, M. Daquinta, Laura Companioni y Julia Martínez

ABSTRACT. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) haploid plant production could bring a significant advance to genetics and breeding in this species. Results about pineapple anther callus formation are given for the first time. The influence of two sucrose concentrations and six Dicamba (3,6 dichloro-metoxy-benzoic acid)/BAP (6 Benzyl-aminopurine) combinations and two culture conditions on four pineapple genotypes is studied in this paper. Compact and globular calluses were successfully formed mainly at the place of anther remotion. There was a notable response to anther culture in every genotype tested. The highest frequencies of callus formation were recorded in Oriente Smooth Cayenne and Red Spanish cultivars in cultural media containing 9 % sucrose in the dark and a Dicamba/BAP ratio of 2.0:0.4 and 2.5:0.5 mg.L^{-1} respectively. "Serrana" Smooth Cayenne and "Piña blanca" were considered recalcitrant cultivars under the culture conditions assayed.

Key words: *Ananas comosus*, pineapple, anther culture, calluses

RESUMEN. La producción de plantas haploides en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), podría traer consigo un significativo avance en la genética y el mejoramiento de la especie. En este trabajo por primera vez se brindan resultados sobre la formación de callos en anteras de piña. Se estudió la influencia de dos concentraciones de sacarosa, y seis combinaciones de Dicamba (ácido 3,6 dicloro-metoxi-benzoico)/BAP (6 Bencil-amino-purina), así como dos condiciones de cultivo en cuatro genotipos de piña. Se logró la formación de callos compactos y globulares desde el sitio donde se separó el conectivo de la antera fundamentalmente. Existió una marcada respuesta al cultivo de anteras en los genotipos estudiados. Las mayores frecuencias de formación de callos se obtuvieron en los cultivares Cayena lisa de Oriente y Española roja, en los medios de cultivo que contenían 9 % de sacarosa en condiciones de oscuridad y una relación Dicamba/BAP de 2.0:0.4 y 2.5:0.5 mg.L^{-1} respectivamente. Cayena lisa Serrana y Piña blanca resultaron recalcitrantes en las condiciones de cultivo ensayadas.

Palabras clave: *Ananas comosus*, piña, cultivo de anteras, callos

INTRODUCCIÓN

Por siglos, la única técnica para la introducción de variación genética en los cultivos fue la hibridación sexual. La inducción de mutaciones (rayos X o productos químicos), el rescate de embriones, cultivo de anteras y óvulos, seguido de la producción de plantas completamente homocigóticas, han revolucionado el proceso e incrementado el rango de variación genética en el presente siglo (Raybould y Gray, 1993).

El cultivo de anteras es el principal método para la producción de haploides (Chu, 1982). Este interés en las plantas haploides, parte de su considerable potencial para cruzamientos y el poder ser utilizados para facilitar la detección de mutaciones y la recuperación de recombinantes raros (Bajaj, 1983).

Los porcentajes de obtención de haploides con estas técnicas son, en algunos cultivos económicamente importantes, poco eficientes; es por ello, que se le presta especial interés a factores como el genotipo, las condiciones físicas de desarrollo de la planta donante, el estado de desarrollo del polen, la composición del medio y las condiciones de cultivo (Chu, 1982).

R. Benega y M. Daquinta, Investigadores Agregados; Dra. Miriam Isidrón, Profesor Titular; Elizabeth Arias, Investigador; A. Cisneros, Reserva Científica; Laura Companioni y Julia Martínez, Especialistas del Centro de Bioplantas, Instituto Superior Agrícola, Carretera Ciego-Morón km 9, Ciego de Avila, Cuba.

En la piña, especie propagada vegetativamente y con un alto grado de heterocigosis (Cabot, 1987), la inducción de haploides podría traer un significativo avance en la genética y el mejoramiento de esta especie. No existen hasta ahora resultados exitosos sobre androgénesis, ginogénesis u otros métodos relacionados con esta técnica en piña.

En este trabajo se estudia la influencia de diferentes niveles de hormonas, sacarosa y dos condiciones de cultivo sobre la formación de callos en anteras de cuatro genotipos de piña.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Centro de Bioplantas con cuatro cultivares de piña: Española roja, Piña blanca, Cayena lisa de Oriente y Cayena lisa Serrana. Las plantas se desarrollaron en la Unidad de Ciencia y Técnica "Juan Tomás Roig", del Instituto Superior Agrícola de Ciego de Avila.

Cultivo de anteras. Las inflorescencias se colectaron en estado inmaduro. Las mismas se sumergieron durante cinco segundos en etanol (70 %) y 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Cada flor se cortó individualmente desde la base de la inflorescencia y se

introdujo en un frasco con agua destilada estéril; se eliminaron los cépalos y pétalos y se extrajeron las anteras conteniendo microsporas en estado uninucleado. El estado de desarrollo de las microsporas se determinó microscópicamente por tinción con aceto carmín. Alrededor de 50 anteras fueron sembradas en placas Petri de 60 x 15 mm.

Medio de inducción de callos. El medio utilizado para la inducción de callos fue Murashige y Skoog (1962), con suplemento de 3 y 9 % de sacarosa, y seis combinaciones de Dicamba/BAP (control 0.5:0.1, 1.0:0.2, 1.5:0.3, 2.0:0.4 y 2.5:0.5 mg.L^{-1}) para cada concentración de sacarosa. Los cultivos se incubaron a 24 + 2 °C en condiciones de iluminación (fotoperíodo de 16/8 horas luz) y oscuridad respectivamente.

La evaluación del número de anteras que formaron callos se realizó entre las ocho y nueve semanas de cultivo.

Todos los datos fueron procesados estadísticamente mediante el utilitario estadístico CSS -**Complete Statistical System**-.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los cuatro genotipos probados, solo Cayena lisa de Oriente y Española roja respondieron favorablemente a los medios y condiciones de cultivo ensayados; Piña blanca y Cayena lisa Serrana resultaron recalcitrantes en la formación de callos. En condiciones de iluminación prácticamente no se formaron callos, por lo que los datos que se analizan en el trabajo corresponden a los callos obtenidos en condiciones de oscuridad para Cayena lisa de Oriente y Española roja.

Tanto el genotipo (Kieffer *et al.*, 1993) como las condiciones de cultivo (Hidaka, 1984 y Hou *et al.*, 1993), presentan una marcada influencia en la inducción y formación de callos.

Efecto de dos concentraciones de sacarosa sobre la formación de callos en anteras de piña. A partir de un mes de cultivadas las anteras de piña, se observó la formación progresiva de callos blanquecinos o blanco-amarillentos. Se obtuvieron diferencias en el tamaño y la calidad de ellos en dependencia de la concentración de sacarosa empleada en el medio.

En los medios que contenían 3 % de sacarosa se observó la presencia de microcallos en la zona donde se separó el tejido del conectivo de la antera. Estos microcallos murieron a partir de los cuatro o cinco días de formados. Cayena lisa de Oriente no presentó respuesta a esta concentración de sacarosa.

Callos de tipo compacto, globulares y de mayor tamaño se observaron con la utilización de 9 % de sacarosa. Estos continuaron su crecimiento y parecieron brotar desde dentro de la antera, por el sitio donde se eliminó el conectivo de la misma. Cayena lisa de Oriente presentó mejor respuesta que la Española roja (Tabla I).

Osolnik, Bohanec y Jelaska (1993) indican que las paredes de las anteras juegan un rol importante en el desarrollo del embrión, y que existió una tendencia a aumentar el número de embrioides cerca de los cortes realizados a las puntas de las anteras cultivadas de col.

Tabla I. Efecto de dos concentraciones de sacarosa sobre la formación de callos en anteras de piña

Genotipo	Sacarosa	Callos/anteras	Porcentaje
Cayena lisa de Oriente	3	0/600	0.00
	9	21/600	3.50 a
Española roja	3	6/600	1.00 c
	9	20/750	2.66 b
ES A			0.0020

Wakasa, Koga y Kudo (1978) obtuvieron formación de microcallos con el empleo de sacarosa al 3 % en el filamento de las anteras cultivadas de Cayena lisa. Estos callos murieron o se necrosaron. La sacarosa es comúnmente usada como fuente de carbón para el cultivo *in vitro* en naranjas, dependiendo la respuesta de formación de embrioides, según Hidaka (1984), de la concentración de esta. Resultados diversos en cuanto a las concentraciones de sacarosa para la inducción de callos de anteras se han obtenido en diferentes cultivares: 9 % en espárragos (Wolyn y Feng, 1993); 3 % en cebada (Hou *et al.*, 1993); 2 % en naranja cultivar Trovita (Hidaka, 1984) y 9 % en trigo (Yao, Chen y Mc Mullen, 1991).

Efecto de diferentes concentraciones hormonales sobre la formación de callos en anteras de piña. Los reguladores del crecimiento en el medio de inducción tuvieron un efecto significativo en la eficiencia de producción de callos, cuando el medio de Murashige y Skoog tenía suplemento del 9 % de sacarosa (Tabla II). Los mayores porcentajes de formación de callos (12 %), se obtienen cuando se utiliza una combinación Dicamba/BAP de 2.0:0.4 mg.L^{-1} en Cayena lisa de Oriente y en Española roja un 6.5 % con la utilización de 2.5:0.5 mg.L^{-1} muy poca o ninguna formación de callos se logró en los medios sin suplemento (control), o con bajas concentraciones hormonales.

Tabla II. Influencia de las concentraciones hormonales en medio con 9 % de sacarosa sobre la formación de callos en anteras de piña

Genotipo	Dicamba/BAP (mg.L^{-1})	Callos/anteras	Porcentaje
Cayena lisa de Oriente	Control	0/100	0.0
	0.5:0.1	1/100	1.0 d
	1.0:0.2	8/100	8.0 b
	1.5:0.3	0/100	0.0
	2.0:0.4	12/100	12.0 a
	2.5:0.5	0/100	0.0
Española roja	Control	0/100	0.0
	0.5:0.1	0/100	0.0
	1.0:0.2	0/100	0.0
	1.5:0.3	1/100	1.5 d
	2.0:0.4	7/200	3.5 c
	2.5:0.5	13/200	6.5 bc
ES A			0.0310

Wakasa, Koga y Kudo (1978) no encontraron respuesta de formación de embrioides en anteras cultivadas de piña, cuando probaron diferentes combinaciones de ANA y BAP con agua de coco o sin ella.

Las mejores respuestas en anteras de trigo se obtuvieron con la utilización de la Kinetina sola, mientras que la combinación ANA + Kinetina produjo más callos embriogénicos que la combinación 2,4 D + Kinetina (Zonzak y Zhou, 1991).

Wakasa, Koga y Kudo (1978) no encontraron respuesta de formación de embrioides en anteras cultivadas de piña, cuando probaron diferentes combinaciones de ANA y BAP con agua de coco o sin ella.

Las mejores respuestas en anteras de trigo se obtuvieron con la utilización de la Kinetina sola, mientras que la combinación ANA + Kinetina produjo más callos embriogénicos que la combinación 2,4 D + Kinetina (Konzak y Zhou, 1991).

Embriones somáticos directos fueron iniciados de anteras y pistilos no polinizados de *Dactylis glomerata*, cuando el medio tenía suplemento de 6.6 $mg.L^{-1}$ de Dicamba (Songstad y Conger, 1986).

En sentido general, las condiciones de oscuridad y el suplemento del medio basal Murashige y Skoog (1962), con 9 % de sacarosa y una relación hormonal Dicamba/BAP de 2.0:0.4 y 2.5:0.5 $mg.L^{-1}$, favorecieron la formación de callos a partir de las anteras cultivadas de Cayena lisa de Oriente y Española roja respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

Bajaj, Y. P. S. **In Vitro** Production of Haploids. /Y. P. S. Bajaj.-**En**: Handbook of Plant Cell Culture.- New York : Mac Millan, 1983.- p. 228-287.

Cabot, C. Practice of Pineapple Breeding. **Acta Horticulturae** 196:25-36, 1987.

Chu, C. C. Haploids in Plant Improvement. /C. C. Chu.- **En**: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics.- New York : Academic Press, 1982.- p. 129-157.

Hidaka, T. Induction of Plantlets from Anthers of **Trovita orange** (**Citrus sinensis** (L.) Osbeck). **J. Japan Soc. Hort. Sci.** (Tokio)53(1):1-15, 1984.

Hou, L. /**et al.**/. Improvement of Anther Culture Methods for Doubled Haploid Production in Barley Breeding. **Plant Cell Reports** (Nueva York)12:334-338, 1993.

Keiffer, M. /**et al.**/. Anther Culture of Kale (**Brassica oleracea** (L.) convar, acephala (DC) Alef.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 33:303-313, 1993.

Konzack, D. F. y H. Zhou. Anther Culture Methods for Doubled Haploid Production in Wheat. **Cereal Research Communications** 19(1-2):147-164, 1991.

Murashige, Y. y F. Skoog. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum** (Copenhagen)15:473-497, 1962.

Osolnik, B., B. Bohanec y S. Jelaska. Stimulation of Androgenesis in White Cabbage (**Brassica oleraceae** var. capitata) Anthers by Low Temperature and Anther Dissection. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 32:241-246, 1993.

Raybould, A. F. y A. J. Gray. Genetically Modified Crops and Hybridization with Wild Relatives: a VK Perspective. **Journal of Applied Ecology** (Nueva York)30:199-219, 1993.

Songstad, D. D. y B. V. Conger. Direct Embryogenesis from Cultured Anthers and Pistils of **Dactylis glomerata** L. **Am. J. Bot.** (Ottawa)73(7):989-992, 1986.

Wakasa, K., Koga y M. Kudo. Differentiation from **In Vitro** Culture of **Ananas comosus. Jpn. J. Breed.** 28:113-121, 1978.

Wolyn, D. J. y X. Feng. Genotype, Temperature and Sampling Date Affect Embryogenesis in Asparagus Anther Culture. **Hort. Sci.** (Alexandria)28(3):216-217, 1993.

Yao, K., C. Chen y M. Mc Mullen. Regeneration of Albino Shoots in Cultured Anthers of Intermediate Wheatgrass (**Agropyron intermedium** (Host) Beauv). **Plant cell, Tissue and Organ Culture** 26:189-193, 1991.

Recibido: 31 de octubre de 1995
Aceptado: 17 de noviembre de 1995