

EFECTO DEL THIDIAZURON SOBRE LA FORMACIÓN DE EMBRIONES Y REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS EN CALLOS RECALCITRANTES DE ANTERAS EN PIÑA

R. Benega, Julia Martínez, M. Daquinta, Elizabeth Arias, M. Hidalgo, María C. González y Miriam Isidró

ABSTRACT. In order to try to obtain haploid plants, results about the effect of Thidiazuron upon embryo formation and plantlet regeneration on recalcitrant calluses achieved from anther culture of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) were presented. Calluses from different genotypes were cultured on Murashige and Skoog's medium containing several concentrations of plant growth regulators. There was a differential response among all tested genotypes and the kind of plant growth regulators employed upon androgenic embryo formation and plantlet regeneration. The best responses were obtained using 1.5 mg.L⁻¹ Thidiazuron on Red Spanish 'Pinareña', Smooth Cayenne c.v. 'Oriente' and 'Piña blanca' respectively. Calluses from Smooth Cayenne c.v. 'Serrana' and Smooth Cayenne cv 'Mexico' did not respond to these culture conditions.

Key words: anther culture, embryos, seedlings, pineapple, *Ananas comosus*, Thidiazuron

RESUMEN. Como paso previo a la obtención de plantas haploides, se presentan resultados sobre el efecto del Thidiazuron en la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes obtenidos a partir del cultivo de anteras en piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Callos de diferentes genotipos se cultivaron en medio de Murashige y Skoog con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. Existió una respuesta diferencial entre los genotipos y el tipo de regulador del crecimiento empleado en la formación de embriones androgénicos y la regeneración de las plántulas. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de 1.5 mg.L⁻¹ de Thidiazuron en Española roja Pinareña, Cayena lisa de Oriente y Piña blanca respectivamente. Cayena lisa Serrana y Cayena lisa de México no presentaron respuesta en las condiciones de cultivo ensayadas.

Palabras clave: cultivo de anteras, embriones, plántulas, piña, *Ananas comosus*, Thidiazuron

INTRODUCCIÓN

A partir de los primeros resultados sobre plantas haploides obtenidos mediante el cultivo de anteras en *Datura innoxia* (1), el desarrollo de esta técnica se extendió a 160 especies pertenecientes a alrededor de 25 familias (2).

Muchos de los avances obtenidos en la genética y el mejoramiento de esas especies se debieron en lo fundamental a las posibilidades de éstas de responder a los cultivos de haploides. Para el cultivo de la piña, especie que se propaga vegetativamente y con un alto grado de heterocigocis, esta posibilidad es aún limitada porque hasta el momento no existen resultados al respecto.

Los trabajos de mejoramiento en piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) se realizan mediante las técnicas de selección e hibridación (3). La selección clonal sólo ha permitido mantener las cualidades de los cultivares actuales y la hibridación aunque permite crear nuevas variedades, ambas sólo presentan un interés local (4). Por otra parte, la hibridación necesita mucho tiempo para la obtención de los genotipos mejorados (15 años) y requiere además una gran cantidad de recursos (5).

La obtención de plantas haploides en piña podría traer consigo un significativo avance en la genética y el mejoramiento de esta especie. Las líneas dobles haploides podrían ser incorporadas a los esquemas tradicionales de mejoramiento y así obtener variedades en corto tiempo. Además, los haploides y dobles haploides permitirían el acceso a genes recesivos en estado homocigótico, siempre que estos sean económicamente ventajosos, como el caso de la supresión de las espinas de los márgenes de las hojas (6). Por otra parte, las suspensiones embriogénicas pudieran ser iniciadas a partir de tejidos haploides, lo cual es una excelente fuente de material para el aislamiento de protoplastos y pudieran además ser utilizados en los experimentos de transformación de plantas.

R. Benega, Investigador (rbenega@unica.edu.cu), Julia Martínez y M. Hidalgo, Especialistas; M. Daquinta y Elizabeth Arias, Investigadores Agregados y Dra. Miriam Isidró, Investigadora Titular del Centro de Bioplantas, Laboratorio de Genética y Mejoramiento de Plantas, Universidad de Ciego de Avila (UNICA), CP 69450; Dra. María C. González, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Abreviaturas: BAP-6-Bencil-amino-purina, MS-Murashige y Skoog, TDZ-Thidiazuron [1-Phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-harnstoff]

Desde hace algunos años se realizan esfuerzos para la obtención de plantas haploides en piña a partir del cultivo de anteras (7), cultivo de óvulos (8) y partenogénesis *in situ* mediante la polinización con polen irradiado (9,10). En el cultivo de anteras, hasta el momento sólo se obtuvieron callos y la regeneración de plántulas a partir de estos es ineficiente con las variantes de reguladores del crecimiento de las plantas empleados.

En este trabajo se estudia el efecto de diferentes concentraciones de Thidiazuron sobre la formación de embriones androgénicos y la regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras, previo a la obtención de plantas haploides en piña.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El trabajo se realizó en el Centro de Bioplantitas con cinco genotipos de piña: Española roja Pinareña, Piña blanca, Cayena lisa de Oriente, Cayena lisa Serrana y Cayena lisa de México. Todas las plantas se desarrollaron en la Unidad de Ciencia y Técnica «Juan Tomás Roig» de la Universidad de Ciego de Ávila.

Cultivo *in vitro* de anteras. Se empleó la metodología recomendada para el cultivo aséptico de las anteras, así como el medio de cultivo para la formación de los callos (11).

Medios para el crecimiento de los callos, la inducción de embriones androgénicos y regeneración de plántulas. Callos con estructuras nodulares embriogénicas de 2-4 mm de diámetro se transfirieron a un medio de crecimiento (12) con Dicamba/BAP ($2:0.5 \text{ mg.L}^{-1}$) y arginina (5 mg.L^{-1}) en condiciones de oscuridad. A los 15 días de cultivo se subcultivaron 20 callos (63.4 a 65.4 mg de masa fresca, MF) en diferentes medios de cultivo para la regeneración de plántulas (12). El medio se enriqueció con BAP/Dicamba ($0.0:0.0$; $2.0:0.0$; $4.0:0.00$; $2.0:0.3$ y $4.0:0.3 \text{ mg.L}^{-1}$) y Thidiazuron (0.0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 , 2.5 y 3.0 mg.L^{-1}). Los cultivos se mantuvieron durante 45 días a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16 h con un flujo de fotones fotosintéticos de 15 a $18.75 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ suministrado por lámparas fluorescentes del tipo *cool white*.

A los 15 días de transferidos los callos a los medios de regeneración de plántulas, se analizó el número de embriones androgénicos sobre la superficie de los callos cultivados por miligramo de MF de callo. Para ello el embrión se tomó en estado globular y se tuvieron en cuenta los puntos meristemáticos de color verde que aparecieron en la superficie de los callos. La formación de plántulas por miligramo de MF de callos se analizó al término de los 45 días de cultivo.

Análisis estadístico. Los datos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple. Los datos en porcentajes se transformaron según la ecuación $x=2*\arcsen\sqrt{\%}$. Las comparaciones de media se realizaron mediante la prueba de los rangos múltiples de Duncan para $p<0.05$ con el auxilio del paquete *Complete Statistical System (CSS)*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existió un efecto marcado en la respuesta de los diferentes genotipos ensayados a la formación de callos androgénicos. Similares resultados fueron obtenidos, pero sólo Cayena lisa de Oriente, Española roja Pinareña, Piña blanca y Cayena lisa de México respondieron a la formación de los callos (7).

Efecto del Dicamba/BAP en el crecimiento de callos androgénicos. Al transferirse los callos androgénicos a los medios de crecimiento, se observó que éstos continuaban creciendo hasta los 15 días de cultivo. Estructuras blanquecinas o puntos de crecimiento meristemáticos se observaron sobre la superficie de estos a partir de los siete días.

El Dicamba es una potente auxina clorinada, a la cual se le encontró efectos positivos en la formación y el crecimiento de los callos en cultivos donde otros reguladores del crecimiento de las plantas no presentaron respuesta (13). En el cultivo de segmentos de hojas de vitroplántulas de piña, la adición al medio de Dicamba solo o combinado con BAP favoreció la formación y el crecimiento de los callos y se observaron además estructuras semiorganizadas sobre la superficie de estos (14, 15).

Efecto del Thidiazuron en la formación de embriones androgénicos y regeneración de plántulas. Algunos callos cultivados en los medios de regeneración que contenían BAP/Dicamba no continuaron su crecimiento e inmediatamente murieron. Otros callos continuaron su crecimiento hasta los 15 días y tomaron una coloración verde claro. Sin embargo, sólo se observó el fenómeno de la rizogénesis.

El Dicamba favoreció el crecimiento y la formación de estructuras embriogénicas en los callos obtenidos por el cultivo *in vitro* de anteras, pero no resultó efectivo en los trabajos de regeneración de las plántulas. Sin embargo, los callos cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de TDZ como regulador del crecimiento mostraron una coloración verde claro y a partir de los 15 días comenzaron a desarrollar los primeros esbozos foliares.

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

Cayena lisa de Oriente resultó el segundo cultivar de mejor comportamiento con 1.5296 embriones. mg^{-1} de MF de callos, los cuales se observaron a dosis de 1.5 mg.L^{-1} de TDZ. Sin embargo, estos resultados no difirieron de

los obtenidos con la dosis de 2.0 mg.L⁻¹ (1.3668). Por su parte, en el cultivar Piña blanca no se encontraron diferencias significativas en la formación de los embriones en dosis comprendidas desde 0.5 hasta 1.5 mg.L⁻¹ de TDZ (0.7351, 0.7460 y 0.7690). Similar comportamiento se observó en el cultivar Cayena lisa de México, donde no se observaron diferencias significativas en los valores de formación de callos a dosis comprendidas desde 0.5 a 2.0 mg.L⁻¹ de TDZ. Estos valores no resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en el cultivar Piña blanca en las condiciones de cultivo ensayadas.

Tabla I. Efecto del TDZ en la formación de embriones, plántulas y eficiencia en la regeneración de callos provenientes del cultivo *in vitro* de anteras

| Genotipos | TDZ (mg.L ⁻¹) | Formación/mg de MF de callos | | Eficiencia (%) (plántulas/ embriones) |
|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------|--|
| | | embriones | plántulas | |
| Española roja Pinareña | 0.0 | 0.4104 c | 0.0000 h | 0.0000 c |
| | 0.5 | 1.4680 b | 0.0024 gh | 0.0163 c |
| | 1.0 | 1.8173 a | 0.00100 f | 0.0550 c |
| | 1.5 | 2.0187 a | 0.00713 a | 0.3532 a |
| | 2.0 | 1.9178 a | 0.00249 c | 0.1298 bc |
| | 2.5 | 2.0220 a | 0.00359 b | 0.1775 b |
| Piña blanca | 3.0 | 1.9129 a | 0.00248 c | 0.1296 bc |
| | 0.0 | 0.1183 de | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 0.5 | 0.7351 c | 0.00062 g | 0.0843 c |
| | 1.0 | 0.7460 c | 0.00094 f | 0.1260 bc |
| | 1.5 | 0.7690 c | 0.00216 d | 0.2808 ab |
| | 2.0 | 0.1476 de | 0.00007 gh | 0.0474 d |
| Cayena lisa de Oriente | 2.5 | 0.0000 e | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 3.0 | 0.0000 e | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 0.0 | 0.2564 de | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 0.5 | 0.8624 c | 0.00025 gh | 0.0289 c |
| | 1.0 | 1.1881 bc | 0.00174 e | 0.1465 bc |
| | 1.5 | 1.5296 b | 0.00359 b | 0.2347 b |
| Cayena lisa de México | 2.0 | 1.3668 b | 0.00147 e | 0.1076 bc |
| | 2.5 | 0.6835 cd | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 3.0 | 0.5985 cd | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 0.0 | 0.1504 de | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 0.5 | 0.6656 cd | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 1.0 | 0.7187 cd | 0.00000 h | 0.0000 c |
| ES A | 1.5 | 0.5748 cd | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 2.0 | 0.5425 cd | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 2.5 | 0.0000 e | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | 3.0 | 0.0000 e | 0.00000 h | 0.0000 c |
| | CV (%) | - | 0.2381 ^a | 0.0028 ^a |
| | - | 6.2590 | 4.6183 | 3.5816 |

Medias con igual denominación no difieren estadísticamente para p<0.05

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

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

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

Los bajos valores de formación de plántulas obtenidos con el uso continuado del TDZ en los medios de cultivo pudieron deberse a que las citoquininas comúnmente estimulan la proliferación de los brotes e inhiben su elongación. Por esta razón, la inhibición en la formación de los brotes por el TDZ puede estar relacionada con su alta actividad como citoquinina y no debiera considerarse como un efecto fitotóxico.

El TDZ es una fenilurea con alta actividad como citoquinina. Este regulador del crecimiento de las plantas se ha utilizado para la regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de anteras en especies recalcitrantes (16) y en la micropropagación de un gran número de cultivos (17, 18, 19, 20, 21). Recientemente, el TDZ brindó buenos resultados en la micropropagación de *Cryptantus sinuosos*, una *Bromelia* endémica del Brasil (22).

REFERENCIAS

1. Guha, S. y Maheshwari, S. C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 1966, vol. 212, p. 97-98.
2. Ferrie, A. M. R., Palmer, C. E. y Keller, W. A. Biotechnological applications of haploids. En (Shorgool PD y Ngo TT, eds). *Biotechnological Applications of Plant Cultures*. CRC. Press, Boca Raton, 1994, p. 77-110.
3. Williams, D. D. F. y Fleisch, H. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae*, 1993, no. 334, p. 67-76.
4. Coppens, G. y Duval, M. F. Bases genéticas para definir una estrategia de mejoramiento de la piña. *Rev. Fac. Agron., Maracay*, 1995, vol. 21, p. 95-118.
5. Cabot, C. Practice of pineapple breeding. *Acta Horticulturae*, 1987, vol. 196, p. 25-36.

6. Subramanian, N., Iyer, C. P. A. y Singh, R. Surmounting self-incompatibility in pineapple (*Ananas comosus* L.) with pollen irradiation. *Indian Journal of Horticulture*, 1981, vol. 38, no. 3-4, p. 162-164.
7. Benega, R., et al. Effect of genotypes and hormone relations on pineapple callus formation. *Bioteconología Aplicada*, 1995, vol. 13, no. 2, p. 146.
8. Benega, R., et al. Plant regeneration from pineapple ovules (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae*, 1997, vol. 425, p. 247-250.
9. Benega, R., et al. Effect of gamma irradiations on pineapple pollen germination and tube growth. *Fruits*, 1996, vol. 51, no. 6, p. 425-428.
10. Benega, R., et al. Irradiaciones gamma de polen en piña y fecundación con polen irradiado. *Nucleus*, 1998, vol. 24, p. 12-14.
11. Benega, R., et al. Inducción de callos en anteras de piña. *Cultivos Tropicales*, 1996, vol. 17, no. 1, p. 72-74.
12. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
13. Zhou, H., Srinivasan, C. y Sticklen, M. B. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrotis palustris* Huds). *Plant Cell Reports*, 1991, vol. 10, p. 453-456.
14. Daquinta, M. y Benega, R. Brief review of tissue culture of pineapple. *Pineapple News*, 1997, vol. 3, no. 1, p. 7-9.
15. Daquinta, M., et al. Embriogénesis somática en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae*, 1997, vol. 425, p. 251-257.
16. Chen, Y., Kenaschuck, E. O. y Procnier, D. Plant regeneration from anther culture in Canadian cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica*, 1998, vol. 102, p. 183-257.
17. Martens, M., et al. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, vol. 45, p. 231-236.
18. Sarwar, M. y Skirvin, R. M. Effect of Thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'Melntosh' apple (*Malus X domestica* Borkh) *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 1997, vol. 68, p. 95-100.
19. Faure, O., et al. Mannitol and Thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 52, p. 209-212.
20. Lakshmi Sita, G., Sreenivas, G. L. y Bhattacharya, A. Agrobacterium mediated transformation of Sandal wood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1998, vol. 4, no. 3-4, p. 189-195.
21. Raviv, A., et al. Callus and somatic embryogenesis of *Persea* species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1998, vol. 4, no. 1-3, p. 196-206.
22. Carneiro, L. A., et al. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, endemic stoloniferous *Bromeliaceae* species from Rio de Janeiro, Brazil. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1998, vol. 4, no. 3-4, p. 152-158.

Recibido: 30 de noviembre de 1998

Aceptado: 24 de marzo del 2000

CURSO DE VERANO 2000

B I O T E C N O L O G Í A

Coordinador: Dra. C. María Margarita Hernández Espinosa
Fecha: 9 al 13 de agosto
Duración: 30 horas
Matrícula: 200 USD



Para más información diríjase a:

Dr. C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700

Tel: (53)(64) 6-3867, 6-3773

Fax: (53)(64) 6-3867

e-mail: posgrado@ inca.edu.cu