



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE  
DIFERENTES SISTEMAS DE REGENERACIÓN DE  
LA PIÑA (*ANANAS COMOSUS* (L.) MERR. HÍBRIDO  
MD2).

Tesis que presenta

ARGELYS KESSEL DOMINI

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR EN PLANTAS)

Mérida, Yucatán, México 2022

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*

**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Argelys Kessel Domini titulado: “Establecimiento y evaluación de diferentes sistemas de regeneración de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. Híbrido 'MD2')” fue realizado en el Laboratorio # 9 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular y en el laboratorio del Grupo de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología (GeMBIO), del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., siguiendo la línea de Regulación génica y Morfogénesis, bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Bussy y la Dra. Daisy Pérez Brito, dentro de la opción de Doctorado en Ciencias Biológicas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

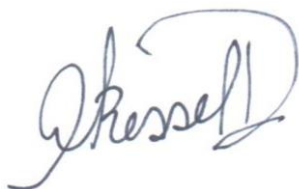
---

Dra. Cecilia Hernández  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 31 de octubre de 2022

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Argelys Kessel Domini

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CICY por darme la oportunidad de estudiar el doctorado en sus instalaciones, en especial al laboratorio No. 9 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, al laboratorio del Grupo de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología (GeMBIO) y al CONACYT por la beca otorgada con número 944539 durante la realización de esta investigación.

A la Dra. Nancy Santana Buzzy, por su ayuda en la elaboración de este trabajo de investigación y sus conocimientos aportados durante todo el doctorado. A la Dra. Daisy Pérez Brito, por sus conocimientos y contribución en la elaboración de esta tesis, además de sus valiosos consejos y apoyo incondicional brindado en cada momento durante estos cuatro años de doctorado. A mi comité tutorial: Dra. Lourdes Iglesias Andreu y Dr. Javier Mijangos por sus importantes observaciones y sugerencias, piezas claves durante el desarrollo del proyecto de tesis, siempre dispuestos a apoyar. Muchas gracias por su apoyo y por formar parte de mi comité de tesis.

A los técnicos M.C. Adriana Canto Flick, por la compra de los reactivos necesarios para el trabajo experimental, a la Dra. Susana A. Avilés Viñas, por su apoyo en el trabajo de laboratorio y al Dr. Adolfo Guzmán por su apoyo en la aclimatización y en el cuidado de las plantas en la última fase del trabajo experimental. Al M. C. Felipe Barredo Pool, por su esfuerzo y apoyo incondicional brindado para lograr el trabajo de histología, poniendo en riesgo su salud. A Alberto Cortés Velásquez, Yasmin Sánchez Rodríguez y Anuar Magaña Álvarez, que, con su carisma y sus buenos deseos de apoyar, hicieron muy agradable mi estancia en el laboratorio de GeMBio.

A todas las personas que de una forma u otra en algún momento de esta etapa de mi vida me brindaron su apoyo y sus conocimientos, a los profesores de las materias cursadas, a mis compañeras del laboratorio 9 de la Unidad de Bioquímica, Yaritza Rodríguez y Gema Pijeira. A Grecia Montalvo y Hernán Morffi por compartirme sus experiencias desde un inicio y por siempre estar en la mejor disposición de ayudar y brindar su amistad durante estos 4 años.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres y en especial a mi hijo:**

María Elena Domini Cuadra y Julio Kessel Fundora, por la educación y los valores brindado y por inculcarme ese ejemplo de superación y entrega. Gracias a ello, hoy puedo ver alcanzada una de mis metas. Va dedicada a ustedes porque siempre estuvieron apoyándome en los momentos más difíciles y porque admiro su fortaleza. Gracias por confiar en mí.

A mi hijo Kevin Julio Kessel Domini, quién ha sido mi mayor motivación y fomentó en mí el deseo de superación, el cuál será un ejemplo para él. Mil palabras no bastarían para agradecerle tu apoyo y comprensión.



---

## PRODUCTOS ASOCIADOS

Artículo científico publicado en Agriculture (MDPI):

Kessel-Domini, A., Pérez-Brito, D., Guzmán-Antonio, A., Barredo-Pool, F. A., Mijangos-Cortés, J. O., Iglesias-Andreu, L. G., Cortés-Velázquez, A., Canto-Flick, A., Avilés-Viñas, S.A., Rodríguez-Llanes, Y., and Santana-Buzzy, N. (2022). Indirect Somatic Embryogenesis: An Efficient and Genetically Reliable Clonal Propagation System for *Ananas comosus* L. Merr. Hybrid “MD2”. *Agriculture*, 12(5), 713.

---

<b>ÍNDICE</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Origen y distribución de la familia Bromeliaceae</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Taxonomía de la piña</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Origen y distribución de la piña</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Producción mundial de piña</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Producción de piña en México. Principales estados productores</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Valor nutricional e importancia económica del fruto de piña</b>	<b>6</b>
<b>1.7 Problemática comercial de la piña en México</b>	<b>7</b>
<b>1.8 Principales cultivares de piña</b>	<b>8</b>
<b>1.9 Propagación de la piña. Ventajas y desventajas</b>	<b>11</b>
<b>1.9.1 Propagación tradicional vegetativa</b>	<b>11</b>
<b>1.9.1.1 Ventajas de la propagación vegetativa</b>	<b>11</b>
<b>1.9.1.2 Desventajas de la propagación vegetativa</b>	<b>12</b>
<b>1.9.2 Propagación por cultivo de tejidos</b>	<b>12</b>
<b>1.9.2.1 Estrategias de regeneración vegetal que se usa en la micropropagación de la piña</b>	<b>14</b>
<b>1.9.2.2 Ventajas que le ofrece la micropropagación al cultivo de la piña</b>	<b>19</b>
<b>1.9.2.3 Desventajas de la micropropagación en el cultivo de la piña</b>	<b>20</b>
<b>1.10 Importancia de la aclimatización para las vitroplantas de piña</b>	<b>20</b>
<b>1.11 Cómo contribuyen los marcadores moleculares en la detección de la estabilidad genética</b>	<b>25</b>
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>



---

<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>30</b>
<b>Indirect somatic embryogenesis: an efficient and genetically reliable clonal propagation system for <i>Ananas comosus</i> L. Merr. hybrid 'MD2'.</b>	
<b>2.1 ABSTRACT</b>	<b>31</b>
<b>2.2 INTRODUCTION</b>	<b>32</b>
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>2.4 RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>2.5 DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>2.6 CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>56</b>
<b>3.1 DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>3.2 CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>3.3 PERSPECTIVAS</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>62</b>

---

## LISTADO DE ABREVIATURAS

2,4-D: ÁCIDO 2,4- DICLOROFENOXIACÉTICO

6-BAP: BENCILAMINOPURINA

AIA: ÁCIDO INDOL-3- ACÉTICO

AIB: ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO

ANA: ÁCIDO NAFTALENACÉTICO

ES: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

EZ: EMBRIOGÉNESIS ZIGÓTICA

FAO: ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y AGRICULTURA

RC: REGULADORES DEL CRECIMIENTO

SIAP: SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA

SAGARPA: SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN.

---

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrategia experimental (p. 28)

## FIGURAS DEL CAPITULO II

Figure 2.1. (A) Aseptic 'Md2' pineapple *in vitro* plants (4 – 6 weeks old) used as a source of explants to induce direct and / or indirect morphogenesis; (B) leaves isolated from the *in vitro* plants used as initial explant (p. 35)

Figure 2.2 Somatic embryos formed directly from 'MD2' hybrid pineapple explants in M3 treatment. (A, B) Direct formation of globular structures (GS) from leaf explants, (ED) advance stage of embryo development. (C) Asynchronous development of formed embryos; FLP: foliar leaf primordia (p. 41).

Figure 2.3. Indirect somatic embryogenesis (ISE) from young leaves of 'MD2' pineapple grown in the M7 treatment ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  of 2,4-D and  $2 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP). (A) Incipient callus formed at the base of the leaf, CF: callus formation; (B) primary callus of vitreous white color, semicompact consistency; (C) embryogenic callus of greenish white color, with embryogenic structures (SE) visible at various stages of development; (D) appearance of globular embryos; ED: advance stage of embryo development; (E) high embryogenic capacity of the induced callus, with embryos multiplying and developing asynchronously; FL: foliar primordia (p. 42).

Figure 2.4. Efficient regeneration of pineapple shoots in the M2 treatment. (A, B) Rapid and abundant proliferation of neoformations with a globular structure; (C, D) proliferation of multiple shoots from neoformations; (E, F) efficient shoot development (43).

Figure 2.5. Histological samples that show the intense meristematic activity that occurred in the regeneration with the M7 treatment. (A) Meristematic cells (MC) in active cell division (CDC), vacuolated, isodiametric cells, and prominent nucleus are observed, as well as the successive divisions of the cells to give rise to the formation of the somatic embryo; (B) Globular embryos advanced in their development without vascular connection (GSVC) with the maternal tissue and where the suspensor rupture is appreciated; (C, D) Formation of the first leaf primordia (FL) (45).

---

Figure 2.6. (A, B) Isolation of *in vitro* plantlets obtained in M3 and M7 media and developed and elongated in M4 medium. (C) Acclimatization in trays with substrate in a greenhouse. (D) Pineapple plants regenerated *in vitro* and ready to be transferred to the field after 20 weeks in polyethylene bags (46).

Figure 2.7. Banding profiles obtained. (A) AJ 805,060 SSR primer. (B) DT 338,091 SSR primer. (C) CO primer 730,888, DNA profiles show 100% monomorphic bands in individual plants from the M7 treatment (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); Lane 1: Hybrid 'MD2' donor material. Plants from M7 medium: Lanes 2, 3, 4, 5, and 6. (D) SSR CO 730,888 primer that showed 100% monomorphic bands in the analysis of regenerated plants in all treatments evaluated. 1: 'MD2' hybrid donor material; 2: sample of M1 regenerated plants (5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 3: sample of M2 regenerated plants (2 mg L<sup>-1</sup> ANA / 5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 4: sample of M3 regenerated plants (2 mg L<sup>-1</sup> ANA / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 5: sample of M4 regenerated plants (1 mg L<sup>-1</sup> ANA / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 6: sample of regenerated plants in treatment of M5 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D); 7: sample of regenerated plants in treatment of M6 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 8: sample of regenerated plants in treatment of M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 9: sample of regenerated plants in treatment of M8 (3 mg L<sup>-1</sup> P); 10: sample of regenerated plants of M9 (3 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); 11: sample of regenerated plants of M10 (5 mg L<sup>-1</sup> / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); NTC: nontemplate control (48).

Figure 2.8. ISSR primer (IS 19) showed the highest number of bands. 1: Hybrid 'MD2' donor material; 2: sample from regenerated plants in M1 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 3: sample from regenerated plants in M2 (2 mg L<sup>-1</sup> NAA / 5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 4: sample from regenerated plants in M3 (2 mg L<sup>-1</sup> NAA / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 5: sample from regenerated plants in M4 (1 mg L<sup>-1</sup> NAA / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 6: sample from regenerated plants in M5 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D); 7: sample from regenerated plants in M6 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 8: sample from regenerated plants in M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 9: sample from regenerated plants in M8 (3 mg L<sup>-1</sup> P); 10: sample from regenerated plants in M9 (3 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); 11: sample from regenerated plants in M10 (5 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); NTC: nontemplate control (49).

---

## **NDICE DE TABLAS**

Tabla 1.1 Países con mayor producción de piña (p. 6).

### **TABLAS DEL CAPITULO II**

Table 2.1. Combinations of different growth regulators that were used in the medium (MS) to induce morphogenesis in 'Md2' hybrid pineapple (36).

Table 2.2 Morphogenic response of leaf segments of 'Md2' hybrid pineapple seedlings grown in different treatments (40).

Table 2.3. SSR primers [19] used in this study, alignment temperature, and the number of monomorphic bands obtained with each primer (47).

Table 2.4. ISSR primers [20] used in this study, alignment temperature used in the PCR, and the number of monomorphic and polymorphic bands obtained with each primer, PIC value, and percentage of monomorphism (49).

Table 2.5. Levels of genetic stability detected by ISSR in the evaluated treatments (50).

---

## RESUMEN

El híbrido de piña (*Ananas comosus* L. Merr. 'MD2'), es el de mayor demanda en el mercado internacional, por sus características sobresalientes, como dulzor, color dorado uniforme, alto contenido en vitaminas A y C, y larga vida de anaquel. Como la piña es autoincompatible, su principal forma de propagación es vegetativa, con desventajas como tasa de crecimiento y multiplicación muy lentas, y alta incidencia de enfermedades, lo que hace inefectivo el mejoramiento tradicional. El objetivo de este estudio fue establecer diferentes sistemas de regeneración y evaluarlos histológica, morfológica y molecularmente, con el fin de encontrar un sistema con alta tasa de regeneración para 'MD2,' sin que varíen sus caracteres agronómicos destacados y que permita una alta tasa de supervivencia durante la aclimatización. Se probaron 10 tratamientos, con los reguladores del crecimiento, Ácido naftalenacético, 2,4 Diclorofenoaxiacético y Picloram, en ausencia o presencia de 6-Bencilaminopurina. Los datos se procesaron por el método de Kruskal Wallis y las pruebas (U Mann Whitney), usando el programa SPSS (v.17.0). Se hicieron cortes histológicos de las estructuras observadas en cada protocolo de regeneración. Para el análisis molecular se utilizaron Secuencias Simples Repetidas (SSR) e Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR). Se identificaron diferentes rutas de regeneración, mostrándose el alto potencial de regeneración de esta especie. El tratamiento M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D y 2 mg L<sup>-1</sup> BAP) fue el más eficaz. En éste ocurrió embriogénesis somática indirecta, y se indujo una división celular activa, que produjo, en promedio, 120 embriones somáticos. Se demostró que las plantas obtenidas conservaron la identidad genética del donante, lo que posibilita el uso de este protocolo para la propagación clonal de *A. comosus*. Así mismo, en la fase de aclimatización, se obtuvo el 98% de sobrevivencia y las plantas mostraron un adecuado desarrollo fisiológico. Por lo que, la presente investigación resultó de gran beneficio ya que se logró un eficiente sistema de regeneración a corto plazo, de plantas libres de enfermedades, con buen vigor, genéticamente homogéneas y con un alto nivel de supervivencia *ex vitro*.

---

## ABSTRACT

The hybrid pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. 'MD2'), is the most demanded in the international market due to its outstanding characteristics, such as sweetness, uniform golden color, high content of vitamins A and C, and long shelf life. As pineapple is self-incompatible, its main form of propagation is vegetative, with disadvantages such as very slow growth rate and multiplication, and a high incidence of diseases, which makes traditional breeding ineffective. The objective of this study was to establish different regeneration systems and evaluate them histologically, morphologically and molecularly, to find a system with a high regeneration rate for 'MD2,' without changing its outstanding agronomic characters and that allows a high survival rate during acclimatization. Ten treatments were tested, with the growth regulators Naphthaleneacetic Acid, 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid and Picloram, in the absence or presence of 6-Benzylaminopurine. The Kruskal-Wallis method and the tests (U Mann Whitney) of the SPSS program (v.17.0) were used in the statistical analyses. Histological sections of the structures observed in each regeneration protocol were made. Simple Sequence Repeats (SSR) and Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) were used for molecular analysis. Different regeneration routes were identified, showing the high regeneration potential of this species. The M7 treatment (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 mg L<sup>-1</sup> BAP) was the most efficient. In M7, indirect somatic embryogenesis occurred, and an active cell division was induced, which produced an average of 120 somatic embryos. It was shown that the plants obtained preserved the genetic identity of the donor, which makes it possible to use this protocol for the clonal propagation of *A. comosus*. Likewise, in the acclimatization phase, 98% survival was obtained, and the plants showed adequate physiological development. Therefore, the present investigation was of great benefit since an efficient short-term regeneration system was achieved, of disease-free plants, with good vigor, genetically homogeneous and with a high level of *ex vitro* survival.

### INTRODUCCION

La familia Bromeliaceae se encuentra en las zonas tropicales y templadas de América. Incluye 3,408 especies, agrupadas en 58 géneros (Neri *et al.*, 2021; Pérez-López *et al.*, 2020); de las cuales la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es la más importante, por ser una fruta tropical, cultivada para alimento, que tiene un significativo valor comercial debido a su agradable sabor y aroma, así como a su alto contenido en vitaminas y minerales, que la han convertido en uno de los frutos más demandado mundialmente (Hailing *et al.*, 2018; Jaji *et al.*, 2018). Actualmente, el híbrido 'MD2', conocido como 'Extra-Sweet', 'Golden-Sweet' o 'piña miel', desarrollado por la Empresa "Del Monte Fruit Fresh" de Hawái, (Mercado *et al.*, 2019; Bartholomew *et al.*, 2009), es considerado uno de los materiales de piña de mayor demanda en el mercado internacional (Aguilera *et al.*, 2022), pues cuando se compara con otros cultivares sobresale en cuanto a: su dulzor (valores de 13 a 18° Brix) (Russell, 2017), su color dorado uniforme, su alto contenido en vitaminas A y C y su larga vida de anaquel (mayor de 30 días) (Mercado *et al.*, 2019; Abdul *et al.*, 2018), por lo que reemplazó al cultivar 'Cayena Lisa,' al presentar mejores características para satisfacer la demanda de los países europeos y de Estados Unidos, en el consumo de piñas frescas y no enlatadas (Ahmadi *et al.*, 2015; Bartholomew *et al.*, 2009).

La principal problemática que presenta la especie es, que al ser autoincompatible (incapacidad para producir semillas por autopolinización aunque presente gametos viables) (Jiménez y Cruz, 2011), su principal forma de propagación es vegetativa (mediante propágulos, hijuelos, corona) (Guzmán, 1988), lo que trae consigo determinadas desventajas para la planta como: 1) una tasa de crecimiento y multiplicación muy lenta, ya que el intervalo entre siembra y fructificación puede ser de hasta dos años y se produce un número muy limitado de propágulos, 2) el mejoramiento tradicional es demorado y 3) una alta incidencia de plagas, puesto que cuando no existe un adecuado manejo fitosanitario de la planta madre, las enfermedades se transmiten en cada generación, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal idóneo para las plantaciones a gran escala (Blanco *et al.*, 2017; Guzmán, 1988); de ahí que se precisa disponer de otras metodologías, como el cultivo de tejidos vegetales, que se ha evidenciado como un método alternativo para acelerar la producción de plantas sanas y con alto valor genético para la siembra en el campo.

Por tales motivos, se ha hecho mucho énfasis en los factores exógenos que influyen en la



respuesta *in vitro* del explante, principalmente en el uso de diferentes reguladores del crecimiento a disímiles concentraciones. Sin embargo, son insuficientes los estudios que definen las estructuras que se originan, cuando las células somáticas de esta especie son sometidas a diversas concentraciones de auxinas y citoquininas. A su vez, es preciso conocer la variación que se origina con el uso del cultivo de tejidos, debido a que, si se quiere para programas de mejoramiento genético de esta planta, pudiera ser de gran provecho (Leite *et al.*, 2016), pero si el interés es la micropropagación y mantener bancos de germoplasma *in vitro*, es no recomendable (Krihsna *et al.*, 2016). Por lo que el objetivo de la presente investigación fue establecer diferentes sistemas de regeneración (morfogénesis directa e indirecta) y analizar dicho proceso mediante técnicas histológicas, morfológicas y moleculares, con el fin de obtener un sistema eficiente de regeneración *in vitro*, donde se logre una alta tasa de multiplicación del híbrido 'MD2,' sin que varíen sus caracteres agronómicos de relevancia, y a la vez con una alta tasa de supervivencia durante la aclimatización.

## CAPITULO I

### ANTECEDENTES.

#### 1.1 Origen y distribución de la familia Bromeliaceae.

La familia Bromeliaceae tiene una distribución geográfica básicamente neotropical. Está conformada por casi 3408 especies en 58 géneros (Neri *et al.*, 2021; Pérez *et al.*, 2020), divididos en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Bromelioideae y Tillandsioideae (Ramírez, 2004). La mayor diversidad de especies se encuentra en el bosque atlántico brasileño y se distribuyen desde Chile y Argentina, en América del Sur, el Caribe y Centroamérica, llegando a México y al sureste norteamericano. Sólo una especie, *Feliciania Pitcarnia* (A. Chevalier) Harms y Mildbraed se encuentra fuera del continente americano, la costa oeste de África (Mondragón *et al.*, 2011). La descripción de esta familia es atribuida al padre francés Charles Plumier que, al final del siglo XVII, se encontró con un conjunto de plantas diferentes y resolvió bautizarlas como bromelias, en homenaje al botánico sueco Olaf Bromel. En 1789, se estableció formalmente la reunión de estas plantas, con la designación de Bromelie. Actualmente, se considera la segunda familia más grande de monocotiledóneas epífitas, sólo superadas en número por la familia de las orquídeas (Ramírez, 2004).

Las bromeliáceas son notables por su diversidad ecológica, se dividen en especies terrestres y epífitas, adaptadas a disímiles ambientes. Se pueden encontrar desde el nivel del mar a altitudes superiores a 4000 m., por lo que disponen de una amplia variedad de *hábitats*, desde el desierto, zona caliente y seca, hasta las selvas tropicales y las regiones montañosas más frías. Muchas de estas especies ganaron popularidad entre paisajistas y jardineros, justamente debido a la belleza de sus flores y sus colores, durabilidad de las inflorescencias y la fácil adaptación a pequeños jardines (Mondragón *et al.*, 2011; Ramírez, 2004). Dentro de esta familia se encuentra la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), la más conocida de las bromelias, que es el único representante que se propaga extensivamente con fines alimenticios, y a su vez es considerado uno de los frutos tropicales más populares del mundo (Gangopadhyay y Mukherjee, 2015).

## 1.2 Taxonomía de la piña (Gangopadhyay y Mukherjee, 2015).

Reino: Planta

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Bromeliales

Familia: Bromeliaceae

Subfamilia: Bromelioideae

Género: *Ananas*

Especie: *Ananas comosus*

Nombre científico: *Ananas comosus* (L.) Merr.

## 1.3 Origen y distribución de la piña.

La piña es la especie más importante de la familia Bromeliaceae, originaria de un lugar no específico del Sur de América (Llanos, 2015; Espinosa, 2014). Los estudios de diversidad sugieren que se originó en el área entre Brasil, norte de Argentina y Paraguay en los bordes meridionales del Amazonas (es decir, la zona de nacimiento de la Cuenca del Río Plata), desde donde se difundió al curso superior del Amazonas, la zona de Venezuela y Guyanas (Gangopadhyay y Mukherjee, 2015). Antes del descubrimiento de América por Cristóbal Colón, el 4 de noviembre de 1493, el fruto ya era un componente estable del complejo vegetativo de los cultivos y en la dieta de los nativos americanos en las tierras bajas tropicales. Los exploradores europeos quedaron impresionados por esta deliciosa fruta y su abundancia en esta región, lo cual con frecuencia se menciona y describe en sus crónicas. En algunos casos, ellos mismos contribuyeron a la dispersión de la piña en el continente, de hecho, así como sucedió con diversas plantas introducidas por Colón, desde las Islas Canarias en su segundo viaje, que fueron distribuidas por los indígenas en toda América Tropical en menos de dos décadas. Por otro lado, si los indígenas dispersaron estos nuevos cultivos con tanta rapidez, muy probablemente habían hecho lo

mismo con la piña mucho antes de la llegada de Colón (Gangopadhyay y Mukherjee, 2015).

Otros indicios apuntan a la antigüedad de este cultivo, por lo tanto, los nombres “nanas” y “ananas” fueron ampliamente utilizados en toda América del Sur y el Caribe. Los primeros exploradores europeos observaron un alto grado de domesticación y selección expuesta en las frutas que encontraron. Los nativos americanos distinguían fácilmente los cultivares domesticados de los tipos silvestres y desarrollaron un profundo conocimiento de la agronomía de los cultivos, que incluía su ciclo de producción específicamente en los ya adaptados, (por ejemplo, 'Andina' 'Petrolera' y 'Manzana'), ellos encontraron variación en la producción y calidad de la fruta (Zhang *et al.*, 2014).

Este cultivo se expandió a invernaderos europeos durante los siglos XVIII y XIX y es cuando se introduce en 1919, el actual famoso cultivar 'Cayena Lisa' ('Smooth Cayenne'). 'Cayena Lisa' y 'Queen' fueron distribuidos desde Europa a todas las regiones tropicales y subtropicales y a la vez los españoles y portugueses dispersaron otros genotipos, como 'Singapore español', a África y Asia durante los grandes viajes de los siglos XVI y XVII (Cerrato, 2013). A mediados del siglo XIX, se desarrollaron rutas comerciales cortas en lugar de un entorno de producción óptimo y eran la Florida, las Bahamas, Cuba y Puerto Rico, los que le suministraban piña al mercado europeo y de América del Norte. Años más tarde, se inició el procesamiento comercial de la fruta en Hawái, quien ganó una sólida posición de liderazgo que se prolongó hasta el desarrollo de nuevos competidores, entre 1950 y principios de 1960, lo que dio lugar a la introducción de 'Cayena Lisa' a países tropicales (Garcidueñas, 2014).

#### **1.4 Producción mundial de piña.**

La demanda comercial de esta fruta tropical sigue en crecimiento gracias a los hábitos alimenticios de los consumidores americanos y europeos, que la consideran como una de las más finas del mundo. En el período 2003 – 2016, tuvo un crecimiento exponencial de un 29.06% y las exportaciones crecieron a un ritmo acelerado, pues pasaron de 20.8 mil a 86.3 mil toneladas, y a la vez se incrementó su demanda en 16 países, entre los que se incluye China y los miembros de la Unión Europea (SAGARPA, 2017). Actualmente tiene una producción mundial de 25,4 millones de toneladas métricas (FAO, 2019). El Cuadro

1.1 representa los 10 países con mayor producción a nivel mundial durante el 2020, según las estadísticas mundiales de piña.

**Cuadro 1.1 Países con mayor producción de piña a nivel mundial durante 2020** (Shahbandeh, 2022).

País	Producción (Ton)
Filipinas	2.702.55
Costa Rica	2.624.12
Brasil	2.455.69
Indonesia	2.447.24
China	2.220.26
India	1.799.00
Tailandia	1.532.51
Nigeria	1.508.2
México	1.208.25
Colombia	882.20

### 1.5 Producción de piña en México. Principales estados productores.

Los principales estados productores de piña en México son: Veracruz, con una participación del 64.9 por ciento del volumen nacional; Oaxaca, 12.8 por ciento; Tabasco, 6.2 por ciento; Quintana Roo, 4.6 por ciento, y Jalisco, 2.8 por ciento. Estas cinco entidades concentran el 92.3 por ciento del total de producción en el país, lo que equivale a 808 mil toneladas. El cultivo de este producto se realiza en 12 estados, sobre una superficie estimada de 41 mil hectáreas. La producción total tiene un valor comercial de alrededor de dos mil 899 millones de pesos y un consumo anual per cápita de 6.3 kilogramos (Infoagro, 2022).

### 1.6 Valor Nutricional e importancia económica del fruto de piña.

El fruto de piña es muy popular no sólo por su sabor y aroma, sino porque contiene un grupo de sustancias beneficiosas para el organismo humano. Está compuesto por un 81.2 a 86.2% de humedad y de un 13 a 19% de sólidos totales, de los cuales la sacarosa, la glucosa y la fructosa son los principales componentes (Elizondo y Campos, 2014). Los

carbohidratos representan hasta el 85% del total de sólidos, mientras que la fibra está en el rango 2-3%. De los ácidos orgánicos, el ácido cítrico es el más abundante. La pulpa tiene muy bajo contenido de cenizas y lípidos (0.1%), y del 25 al 30% de los compuestos nitrogenados son proteínas y minerales, como el calcio, el cloro, el potasio, el fósforo y el sodio (Morales *et al.*, 2001; Kumar, 2021). A su vez, es una rica fuente de manganeso, que ayuda a construir y mantener la fortaleza de los huesos. Un análisis fitoquímico de la cáscara de piña mostró que los alcaloides, flavonoides y saponinas, presentaron la mayor abundancia de propiedades fitoquímicas y los compuestos fenólicos, taninos y terpenoides estuvieron presentes moderadamente, al igual que los glucósidos y los esteroides en cantidades traza (Okoh *et al.*, 2019). Se considera que el ácido clorogénico y el ácido ferúlico, en el extracto acuoso de piña, tienen un papel importante como agentes reductores o antioxidantes (Hikal *et al.*, 2019). Los carotenoides son la fuente del color característico de la fruta, mientras que el sabor proviene de una mezcla muy compleja de sustancias, donde los compuestos alifáticos oxigenados tienen el papel principal (Difonzo *et al.*, 2019). Además, posee actividad proteolítica debido a la presencia de una proteasa llamada bromelina, de gran valor comercial y cuyo uso se encuentra en ascenso debido a; su aplicación en la industria farmacéutica (actividad antihelmíntica, antiinflamatoria y anticancerígena) (Hikal *et al.*, 2021), en la industria alimenticia para el ablandamiento de la carne, y por su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Wang *et al.*, 2014).

### **1.7 Problemática comercial de la piña en México.**

En los últimos años este cultivo en México adquirió una relevancia significativa por su dinámica económica y por ser una fuente importante de empleo, tanto en la producción y comercialización de la fruta fresca, como en el proceso de industrialización. Hasta el año 2016, este país no tenía una presencia destacada en el mercado internacional, sus exportaciones eran equivalente a 86 - 267 toneladas, lo que representaba el 7.65% del total de importaciones de Estados Unidos con respecto a este producto. Esto llevo a un análisis, que indico que era preciso optimizar las tecnologías para la producción y mejorar el manejo agronómico del cultivo. Debido a que las importaciones mundiales aumentaron un 38.01% en la última década, se generó un incremento en las exportaciones mexicanas, principalmente con destino a Estados Unidos, Corea del Sur y España (Infoagro, 2022), México se ubicó en la posición número seis de los diez principales exportadores de piña a

nivel mundial. Sin embargo, un problema latente en las producciones piñeras es la inadecuada calidad fitosanitaria, que limita impulsar la producción internacional y el acceso a nuevos mercados en los países miembros de la Unión Europea y Asia-Pacífico, lo cual contribuye un reto para los próximos 15 años (SIAP, 2018).

Actualmente, México ocupa el noveno lugar con una producción de 1 – 271 520, 75 toneladas (SIAP, 2021) y entre sus principales estados productores, figuran Veracruz, que contribuye con el 64.9% del volumen de producción nacional; Oaxaca, con el 12.8%, Tabasco, con el 6.2%, Quintana Roo, con el 4.6% y Jalisco, con el 2.8% (Infoagro, 2022). El 100% de los requerimientos nacionales de la fruta se satisfacen con la producción interna; pero para lograr diversificar aún más las exportaciones es preciso que los productores y comercializadores tengan conocimiento de los requisitos de sanidad vegetal (SAGARPA, 2017; Huchin, 2016). Debido a que no se cuenta con diversidad de material resistente a las plagas presentes en determinadas localidades, y por no existir, en ocasiones, un manejo fitosanitario adecuado en la propagación, las enfermedades se transmiten en cada generación, y esto impide cumplir con las normas de estandarización y calidad. Por lo que se hace imperante incursionar en metodologías que permitan la mejora genética de los cultivares existentes, para disponer de genotipos resistentes o tolerantes, de buena adaptación a diferentes localidades, con mejores cualidades morfoagronómicas que sus progenitores; en aras de posicionar al cultivo de alta calidad en mercados de mayor poder adquisitivo, así como destinar más cantidad a la agroindustria mexicana y poder desarrollar procesos de certificación de la fruta, optimizar el manejo postcosecha, impulsar las agroindustrias, fomentar la innovación productiva, así como inducir el desarrollo de capacidades técnicas y comerciales para la transformación de productos y subproductos.

## **1.8 Principales cultivares de piña existente en el mundo y en México.**

### **1.8.1 'Cayena Lisa'**

La fruta es de tamaño mediano, ovoide, de 1.5 a 2.5 kg. La pulpa es de color amarillo pálido, suave y jugoso, con una variación considerable en sólidos solubles de entre 13 - 19° Brix. A pesar del alto contenido de azúcar su acidez es a menudo considerada excesiva entre los consumidores tropicales, lo que contribuyó en gran parte a la imagen

de la piña como una fruta ácida. La planta es de tamaño mediano (80 a 100) cm, con 60 a 80 hojas verde oscuro con una franja roja que la distingue de otros cultivares, con pequeñas espinas en su base y en la punta. Es sensible a muchas plagas conocidas como el gorgojo de la fruta, ácaros, nematodos; la marchitez por cochinilla, putrefacción del núcleo de la fruta y pardeamiento interno; sin embargo, es considerada tolerante a *Phytophthora sp.* (Espinosa, 2014). Es el cultivar más reconocido mundialmente por su buena adaptación a ambientes disimiles y en México ocupa el 70% de la producción nacional (Uriza *et al.*, 2018).

### **1.8.2 'Singapore español'**

Es el segundo cultivar en importancia para la industria de productos en conserva. El color de la pulpa es amarillo dorado. La fruta es pequeña y pesa alrededor de 1 Kg, de forma cilíndrica y de color púrpura oscuro, volviéndose cobre a naranja al madurar. El azúcar es de 10 - 12° Brix y la acidez de 21%, por lo que su sabor se considera leve. La planta es de tamaño mediano 80 a 100 cm, con 35 a 70 hojas de color verde oscuro, de unos 150 cm de largo y 5 cm de ancho. La espinosidad de las hojas es muy variable, las brácteas del pedúnculo y la inflorescencia son de color rojo brillante. La planta es vigorosa y produce muchos brotes; puede presentar corona múltiple. Está adaptada para un alto pH del suelo, lo que pudiera estar relacionado con su tolerancia a *Phytophthora sp.*, y muestra clorosis severa cuando se expone a altas concentraciones de manganeso en el suelo (Espinosa, 2014).

### **1.8.3 'Queen'**

La planta es pequeña de 60 - 80 cm, con hojas plateadas cortas y muy espinosa, da un fruto pequeño 0.5 - 1 Kg, con una cáscara amarilla, con abundante "ojos" pequeños prominentes. La pulpa es de color amarillo dorado, crujiente y dulce con 14 - 18° Brix, con un sabor excelente y vida útil larga. Es un cultivar más tolerante a estrés y a las plagas y enfermedades que 'Cayena Lisa'. Por otra parte, es susceptible a *Phytophthora sp.*, y altamente susceptible a la refrigeración (Espinosa, 2014).

### **1.8.4 'Española Roja'**



El fruto es de tamaño mediano entre 1.2 - 2 kg, de color naranja y forma de barril. La pulpa es firme, pálida y dulce, con un contenido de azúcar moderado, de alrededor de 12° Brix, pero baja acidez. La planta es de tamaño mediano, con hojas de color verde oscuro espinosas. Las brácteas florales son de color rojo intenso brillante. Es vigorosa y tolerante a las altas temperaturas, la sequía, pardeamiento interno y *Phytophthora sp.*, pero no a nematodos (Espinosa, 2014).

#### **1.8.5 'Perola'**

El fruto es pequeño a mediano (0.9 - 1.6 kg), ovoide cuando es pequeña y cónica al madurar, es verde con un color amarillo iluminado en el centro de los "ojos" maduros. La pulpa es blanca, suave y jugosa con un exquisito aroma. Su contenido en sólidos solubles es de 13 -16° Brix y el de ácido ascórbico es alto. La planta es de tamaño mediano y vigorosa, con hojas verde oscuro, erguidas y espinosas. Es un cultivar muy resistente, mostrando resistencia a *Phytophthora sp.*, y nematodos (Espinosa, 2014).

#### **1.8.6 'Manzana'**

Difiere en los globulares regulares a la forma cilíndrica y "ojos" grandes planos de su fruto, que son de un atractivo color rojo brillante cuando se produce en tierras tropicales altas. Es susceptible al nematodo *Pratylenchus neglectus*, pero tolerante a *Meloidogyne incognita* (Espinosa, 2014).

#### **1.8.7 'Híbrido MD-2'**

El híbrido de piña 'MD2', conocido como 'Extra-Sweet', 'Golden-Sweet' o 'piña miel', es resultado del cruce entre los híbridos 'PRI 58 -1184' y '59 - 443', desarrollados por la Empresa "Del Monte Fruit Fresh" de Hawai, los cuales provienen de cruces entre el cultivar 'Cayena Lisa' y el híbrido 'Champaka F- 180' y 'Champaka F- 153' (Bartholomew *et al.*, 2009). Se desarrolló con el objetivo de buscar un material que superara a 'Cayena Lisa' en cuanto a su vida de anaquel y a la vez satisfacer la demanda de los países de la Unión Europea y Estados Unidos en el consumo de piñas frescas y no enlatadas (Mercado *et al.*, 2019; Russell, 2017; Ahmadi *et al.*, 2015; Bartholomew *et al.*, 2009). 'MD-2' da un fruto grande (1.3 a 2.5 Kg), con grandes "ojos" planos y un intenso color amarillo

anaranjado. La pulpa es amarillo claro, dulce, compacta y fibrosa. Tiene un alto contenido en azúcar (15 - 17° Brix) y ácido ascórbico, pero más bajo en acidez total que 'Cayena Lisa'. El núcleo es blando, comestible y más delgado. Las hojas son de color verde amarillo y en su mayoría con espinas. Es susceptible a la pudrición del núcleo y más sensible a *Phytophthora sp.*, y *Fusarium sp.* (Espinosa, 2014). Es el material de mayor demanda en el mercado internacional y aun cuando actualmente sólo el 30 % de la producción de México corresponde a 'MD2', la reconversión de 'Cayena Lisa' a este clon, ha sido sin duda el punto de partida para la renovación técnica y comercial de la actividad piñera mexicana (Uriza *et al.*, 2018).

## **1.9 Propagación de la piña. Ventajas y Desventajas.**

### **1.9.1 Propagación Tradicional (Vegetativa)**

La piña es una especie autoincompatible, por lo que no produce semillas, sin existir la polinización cruzada con otra planta, por lo que su propagación es vegetativa. Este tipo de propagación es uno de los métodos tradicionales, en el cual los retoños, hijos o vástagos emergen del tallo de la planta y son los que usualmente se usan para las nuevas plantaciones y son descritos como:

- Hijuelos de corona, conformados por las brácteas foliares del ápice de la inflorescencia y crecen simultáneamente con el desarrollo del fruto, entran en un estado de aparente inactividad a la maduración.
- Hijuelos de los pedúnculos, (bulbillos), se desarrollan en las axilas de las brácteas del pedúnculo.
- Hijuelos del tallo, que se encuentran en la zona de transición entre el tallo y el pedúnculo.
- Hijuelos con raíces, que se desarrollan en la base de la planta y son los de preferencia en la producción, porque producen frutos más rápidos (a partir de los 10 a 12 meses), que los antes mencionados.

#### **1.9.1.1 Ventajas de la propagación vegetativa.**

Con este tipo de propagación no hay incidencia de variación genética, no ocurre segregación de los híbridos.

#### **1.9.1.2 Desventajas de la propagación vegetativa.**

Este método de cultivo presenta limitaciones por sus bajas tasas de multiplicación, ya que se produce un número muy limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para el cultivo a gran escala (Guzmán, 1988). A su vez, el tiempo requerido para la fructificación puede ser de hasta dos años (Roostika y Mariska, 2003) y, en ocasiones, el material que se selecciona no es de óptima calidad, pues la contaminación por patógenos es transmitida de sus plantas madres, en cada ciclo de cultivo, e incluso en ocasiones se considera que con este método se elevan los costos de producción (Munive, 2015), lo que genera un desánimo por parte de los productores del sector piñero, porque transcurre mucho tiempo para ver el resultado de sus inversiones. Por ello, se requiere del empleo de métodos de propagación y multiplicación más eficientes que los métodos tradicionales (Blanco *et al.*, 2017).

### 1.9.2 Propagación por cultivo de tejidos

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un término amplio que abarca el cultivo de cualquier parte de la planta (células, tejidos u órganos) en un medio artificial, en condiciones asépticas, y en ambiente controlado (Rueda, 2019). Una de sus contribuciones más importantes es la demostración de la capacidad única de las células vegetales de regenerar una planta completa, vía organogénesis o embriogénesis, independientemente de la fuente del tejido utilizado (raíz, hoja, tallo, partes florales, endospermo) y de su nivel de ploidía (haploide, diploide, triploide), por lo que permite explotar la totipotencia celular de las plantas para un gran número de aplicaciones prácticas, y ofrece la posibilidad de mejorar cultivos, propagar plantas clonadas (micropropagación), eliminación de virus (cultivo de meristemos apicales), conservación de germoplasma, producción de fitoquímicos industriales, regeneración de plantas transgénicas y fusión celular (Rueda, 2019).

La propagación por cultivo de tejidos en este frutal es una técnica considerada de gran utilidad especialmente para la multiplicación rápida de nuevos cultivares producidos en programas de mejoramiento (Reinhardt *et al.*, 2018), debido a que contribuye a mejorar las deficiencias de la propagación vegetativa (Escalona, 1999; Cisneros *et al.*, 1996), porque acelera su multiplicación en menos tiempo y mantiene la calidad genética de la especie (Atawia *et al.*, 2016). Por ello, las técnicas de micropropagación para la obtención de plántulas a escala comercial, ha sido uno de los avances biotecnológicos con un impacto significativo en la agricultura en los últimos 30 años. Sin embargo, la aplicación de esta técnica depende de un número de factores que necesitan ser controlados, tales como el genotipo, el origen, tipo y edad fisiológica del explante, y el medio de cultivo, entre otros (Reinhardt *et al.*, 2018); por lo que, desde hace muchos años, ha sido motivo de muchas investigaciones el diseño de protocolos para lograr altas tasas de regeneración y multiplicación de plantas de piña.

Debido a que, en la micropropagación de la piña el genotipo tiene una fuerte influencia, se ha revelado la necesidad de diseñar protocolos específicos para cada cultivar, Silva *et al.*, (2016) evaluaron la viabilidad y el potencial de propagación de 66 genotipos de cuatro variedades botánicas: 44 genotipos de *A. comosus* var. *comoso*, ocho de *A. comosus* var. *bracteatus*, 4 de *A. comosus* var. *erectifolius* y 10 de *A. comosus* var. *ananasoides*, después de cuatro subcultivos, ellos observaron diferencias, no sólo entre variedades

botánicas, sino entre genotipos de la misma variedad botánica, lo que confirmó este efecto genotípico sobre la multiplicación *in vitro* de la piña. A su vez, el estado fitosanitario y las condiciones fisiológicas del material de partida son de crucial importancia para el éxito en el proceso de clonación e influyen fuertemente en la respuesta morfogénica y en el potencial de regeneración de los brotes (Silva *et al.*, 2016).

La combinación y las concentraciones de los reguladores del crecimiento (RC) que se empleen en el medio de cultivo también es fundamental para lograr una micropropagación exitosa, se debe considerar el momento en el que se añaden las auxinas y/o citoquininas, que es muy variable, según los diversos protocolos publicado sobre micropropagación de piña (Nelson *et al.*, 2015; Farahani, 2014; Usman *et al.*, 2013; AL-SAIF *et al.*, 2011). Se plantea que, la presencia de una citoquinina en equilibrio con una auxina es crítica para el inicio del proceso de división celular, por lo general debe ser una proporción de 3:1, para favorecer la elongación y el posterior enraizamiento de las plántulas. Hay autores que consideran, que ningún regulador de crecimiento debe ser añadido durante los primeros 45 días de cultivo, otros recomiendan la adición de citoquininas en la fase de multiplicación, y la mayoría de los investigadores recomiendan para este cultivo, la adición de 6-Bencilamino purina (BAP), en combinación con auxinas, como ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB), para obtener un alto porcentaje de multiplicación.

Para la fase de multiplicación de la piña, la concentración de BAP adecuada varía de 0,5 a 4,0 mg L<sup>-1</sup>, dependiendo del cultivar (Reinhardt *et al.*, 2018). A su vez, muchos autores hacen alusión a que el enraizamiento de plantas de piña *in vitro*, se logra en mayor frecuencia con la ausencia de los reguladores del crecimiento (Nelson *et al.*, 2015), otros opinan que, con la adición de bajas concentraciones de ANA (Usman *et al.*, 2013), y otros como (Farahani, 2014), observaron raíces cuando combinaron auxinas y citoquininas. En síntesis, la respuesta morfogénica de este cultivo va a estar relacionada con la especie o el cultivar que se utilice, por lo que se requiere, para lograr una mayor eficiencia en su micropropagación probar diferentes metodologías (Nelson *et al.*, 2015; Farahani, 2014; Usman *et al.*, 2013).

### **1.9.2.1 Estrategias de regeneración vegetal que se usan en la micropropagación de la piña.**

## Organogénesis

Se conoce como organogénesis al desarrollo de yemas o de meristemos radicales que puede ocurrir directa e indirectamente. En 1980, se introdujo el término organogénesis de Novo en cultivo de tejidos, el cual hace referencia a la diferenciación que ocurre en el explante (Villalobos y Thorpes, 1991), ya que se observó, que a partir del floema externo en segmentos de tallo de tabaco se desarrollaron meristemos primarios, por lo que la capacidad regenerativa de algunos tejidos puede pasar desapercibida, debido a que se asocian estos tejidos diferenciados dentro de un sistema organizado. La organogénesis indirecta puede ocurrir a partir de un callo, y para ello se deben producir cambios que lleven a la organización celular. Villalobos y Thorpes (1991), afirmaban que en la formación del callo se establecían regiones de mayor división celular con aspecto de meristemoide o regiones localizadas de células en división activa, capaces de responder a las señales de desarrollo. Estas se asemejaban a los meristemos porque tenían conexión vascular con el callo o tejido circundante (Roca, 1991).

Como se mencionó anteriormente, la organogénesis indirecta involucra la formación de una masa regenerativa intermedia llamada callo a partir de células madre no meristemáticas que se encuentran distribuidas a través del cuerpo de la planta en el tejido vascular (Ikeuchi *et al.*, 2013; Sugimoto *et al.*, 2011; 2010). Este callo a su vez produce raíces o brotes en respuesta a niveles apropiados de hormonas vegetales claves, como son las auxinas y citoquininas (Atta *et al.*, 2009; Gordon *et al.*, 2007). El paso inicial hacia la regeneración es la adquisición de la competencia. Se entiende por competencia la capacidad de las células para reconocer señales hormonales o de otra naturaleza que activan una ruta específica de diferenciación (Azcón y Talón, 2013), una vez que las células adquieren competencia, se define el destino celular del primordio en nuevos meristemos y órganos por medio del ensamble dinámico causado por una serie de interacciones moleculares (Kareem *et al.*, 2016).

Los avances en la biología del desarrollo vegetal plantean ciertas explicaciones en la comprensión de la organogénesis en plantas, se considera que en ambos caminos (directa e indirecta), ocurre reprogramación celular de manera inevitable y que durante la regeneración directa, las células sufren transdiferenciación (cambio del destino celular hacia otro sin pasar por un proceso de desdiferenciación), ya que las células radiculares

son reprogramadas hacia brote y viceversa (Kareem *et al.*, 2016). Atta *et al.*, (2009) en sus ensayos demostraron que no todos los tipos celulares poseen la misma capacidad de mantener su pluripotencia. Se sugiere que la iniciación directa ocurre cuando un explante contiene células que han retenido su capacidad de dividirse y de regenerar una raíz o un brote, rápidamente después de reingresar el ciclo celular (Gordon *et al.*, 2007). Cuando estas células predeterminadas no están presentes, los explantes deben desdiferenciarse a través de división celular antes de poder formar meristemas (Atta *et al.*, 2009).

La reprogramación directa de raíces a brotes y de brotes a raíces ocurre en la naturaleza, así como en el cultivo *in vitro*, y aunque las raíces y los brotes se generan a partir de regiones diferentes del embrión, se demuestra con ello, que las plantas aún tienen la capacidad de regenerar órganos en diferentes zonas. Se plantea que este fenómeno podría deberse sustancialmente al origen evolutivo común de las raíces y los brotes, y se puede considerar, que las raíces de las plantas modernas evolucionaron a partir de brotes de plantas primitivas (El-sherif, 2018; Kareem *et al.*, 2016). Por lo tanto, estas dos estructuras tanto raíces y brotes tienen más posibilidades de mantener el potencial de ser reprogramadas hacia otro destino celular. Este proceso puede lograrse en todas las especies de plantas, si se proveen las condiciones ambientales, se selecciona el explante y el medio de cultivo apropiados (George y Debergh, 2008), ya que la respuesta *in vitro* varía debido a múltiples factores, entre ellos: el contenido endógeno y la biodisponibilidad de RC, la edad fisiológica del explante, así como la especie en estudio.

Adicional a la organogénesis, la regeneración *in vitro* también se puede lograr por medio de embriogénesis somática (Pulianmackal *et al.*, 2014). Aunque ambos métodos permiten regenerar plántulas completas pueden distinguirse entre sí por lo siguiente: los embriones somáticos (ES) son formados mediante el tratamiento de células somáticas con altas concentraciones de auxinas sintéticas (Su *et al.*, 2011), e involucra la formación de estructuras bipolares que contienen los meristemas apicales y radicales; en la organogénesis se salta por completo la fase de desarrollo embrionario para producir estructuras monopolares de origen multicelular que poseen identidad celular de raíz o de brote (Roca, 1991). Además, en la embriogénesis somática, el embrión no mantiene ninguna conexión vascular con el tejido del explante mientras que, en la organogénesis si se presenta dicha conexión en los brotes o raíces formados.

## Embriogénesis somática

El proceso de embriogénesis somática (ES) de igual manera puede clasificarse en indirecta y directa. La primera tiene lugar cuando ocurre formación de embriones mediante una fase intermedia de formación de callos, mientras que, en la embriogénesis directa, el embrión da lugar a partir del explante, sin una previa formación de callo (George y Debergh, 2008). Este proceso demuestra la capacidad de desarrollo único de las plantas para activar el programa embriogénico en células somáticas que ya se han diferenciado. Como resultado de la transición embriogénica, se forman estructuras bipolares que se parecen a los embriones cigóticos, que se llaman embriones somáticos los cuáles pueden desarrollarse en plantas completas. Por lo que, desde la década de 1960, se han establecido numerosos protocolos que permiten la regeneración eficiente de especies de importancia agronómica mediante embriones somáticos que se inducen en condiciones de cultivo *in vitro* (Wójcik *et al.*, 2020), lo que la ha convertido en una valiosa herramienta biotecnológica. A su vez, es considerado un medio poderoso para estudiar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos, moleculares y genéticos involucrados en el proceso de diferenciación celular (Loyola *et al.*, 2008).

Aunque las condiciones de cultivo son diferentes para cada caso en particular, el tratamiento de los explantes con auxinas y sustancias similares parece ser necesariamente requerido para la inducción de ES. El 2,4-D, comparte similitud estructural con el ácido indol-3-acético (AIA), que implica la presencia de un grupo carboxilo y una estructura de anillo de arilo. Sin embargo, en contraste con la auxina natural, AIA, que se inactiva rápidamente mediante conjugación y degradación en las células vegetales, los efectos del 2,4-D en las plantas son duraderos, debido a su alto nivel de estabilidad en las células vegetales. Además, el transporte polar célula a célula de 2,4-D y AIA difiere en los portadores de auxina que están comprometidos, el AIA es transportado polarmente por ambos tipos de portadores de auxina, es decir, el eflujo PINFORMED (PIN) y P-GLYCOPROTEIN (PGP) y el influjo de proteínas AUXIN1 / LIKE-AUX1 (AUX / LAX), sin embargo, el transporte de 2,4-D por los portadores de salida de PIN es limitado, lo que resulta en una acumulación de 2,4-D en las células vegetales (Kuhn *et al.*, 2017). Del mismo modo, el 2,4-D tiene una afinidad de unión débil con el receptor AIA, la proteína de unión a la auxina 1 (ABP1), por lo que también el 2,4-D puede promover la unión de las proteínas AUXIN / INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux / IAA) a la



proteína F-box respuesta al inhibidor del transporte<sup>1</sup> (TIR1) de la vía de señalización de auxina, después de que los genes que responden a la auxina se activan por el motivo AuxRE (elemento responsable a la auxina) en los promotores (Tanx *et al.*, 2007).

Vale la pena señalar que los transcriptomas inducidos por 2,4-D y AIA tienden a solaparse solo hasta cierto punto, lo que refleja las diferencias entre el AIA y la auxina sintética en sus interacciones con la maquinaria de señalización. Además, de su actividad similar a la auxina, se cree que el 2,4-D afecta los procesos de desarrollo de la planta al inducir las respuestas al estrés. En consecuencia, el tratamiento con 2,4-D provoca una acumulación de ROS (especies reactivas de oxígeno) y las hormonas del estrés, etileno y ácido abscísico (ABA) en el tejido vegetal (Pazmino *et al.*, 2011). Se ha demostrado, que numerosos genes sensibles al estrés se expresan de manera diferente en transcriptomas de ES inducida por el 2,4-D (Sharma *et al.*, 2008), por lo que, su función como auxina y la función estresante están estrechamente relacionadas en la promoción del desarrollo embriogénico en las células vegetales. La observación de que los explantes embriogénicos de varias plantas contienen un mayor nivel de AIA que los explantes no embriogénicos, implica que existe una relación positiva entre el contenido de auxina y la capacidad del tejido para inducir ES (Li *et al.*, 2017).

A su vez, se reportó que, cultivos recalcitrantes a la ES, tenían un alto nivel de AIA, lo que sugiere que el contenido de auxina que permite la inducción de ES parece ser específico del genotipo y del tejido. Al parecer, no influye el nivel inicial de AIA en el tejido explante, sino más bien, el aumento dinámico del contenido de auxina endógena en respuesta a los factores de inducción de ES, es lo que podría proporcionar una señal indispensable para la transición embriogénica. La acumulación de auxina que acompaña al desarrollo embriogénico, que se induce tanto en las células vegetales generativas como en las somáticas, proporciona un apoyo adicional para una similitud en las señales moleculares y hormonales, que controlan el desarrollo embriogénico *in vivo* e *in vitro*. De ahí, que se ha manifestado en numerosas publicaciones el papel fundamental del 2,4-D como regulador sintético con actividad auxínica en plantas, y es considerado el inductor de ES más eficaz (Wójcik *et al.*, 2020), ya que provoca una serie de cambios morfológicos en las plantas, dependiendo de la concentración en la que sea empleado, estimula eficientemente la división celular, el crecimiento, e induce una rápida respuesta morfogénica a bajas concentraciones de (1–10 mg L<sup>-1</sup>).

Del mismo modo, se ha hecho mucho énfasis en la relación del 2,4D con determinados factores de transcripción (FT), la expresión de los genes LEC1 y LEC2, se localiza juntamente con las partes involucradas con la ES de los explantes tratados con 2,4-D y es importante destacar que LEC1 y LEC2 parecen tener una función promotora común de ES en las plantas, y se ha sugerido la sobreexpresión de estos FT como un método eficiente para mejorar la respuesta embriogénica en varias especies de cultivos, como yuca, col, tabaco y cacao (Brand *et al.*, 2019), esto implica que estas proteínas contribuyen a la regulación de varios procesos relacionados con auxina y se relacionan con el control de la biosíntesis de auxina. Se postuló también que la familia Aux / IAA estaba bajo el control de LEC1 (IAA5, IAA16 e IAA19) y LEC2 (IAA1, IAA17, IAA30 e IAA31) durante el desarrollo embrionario. El impacto de LEC2 en el transporte polar de auxina tampoco se puede descartar, porque se observó la regulación positiva de los facilitadores de flujo de auxina, PIN1 y PIN2, en las plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresaron LEC2. Para inducir ES, LEC1 y LEC2 están regulados positivamente por BBM, que es otro FT importante que controla la identidad y la totipotencia del embrión de la planta, y la actividad promotora de ES de BBM, requiere las proteínas LAFL / AGL15 (Horstman *et al.*, 2017).

El conocimiento sobre el papel de la auxina, en la red reguladora que controla la inducción de ES, todavía es fragmentario, ya que además de la transcripción de genes, la auxina regula una gran cantidad de otros procesos celulares, incluido el estado epigenético de la cromatina, la estabilidad de la proteína - interacciones proteína-proteína, y vías metabólicas (Wójcik *et al.*, 2020). Además, las interacciones de la auxina con otras vías hormonales, en particular las citoquininas, deben explorarse en las células que se someten a la inducción de ES, dado que solo un pequeño subconjunto de células explantes son capaces de realizar una transición embriogénica (Márquez *et al.*, 2018). El debate en curso sobre la red reguladora de ES, también se refiere al grado de similitud molecular del desarrollo embriogénico que se induce *in vitro* en el tejido somático con el proceso EZ. De acuerdo con la creencia común de una estrecha similitud de las vías reguladoras que controlan ambos tipos de embriogénesis en plantas, se descubrió que varios reguladores de EZ, incluidos los FT, LEC, PLT y WOX, desempeñan un papel decisivo en la reprogramación embriogénica de las células de plantas somáticas.

No obstante, a pesar de que la función intrínseca como auxina del 2,4D y su acción estresante es reconocida en muchas especies y está estrechamente relacionada en la promoción del desarrollo embriogénico en las células vegetales; en piña, autores como, (Kouadio *et al.*, (2017); Roostika *et al.*, (2015); Daquinta, (1997); Cisneros *et al.*, (1996)) recomiendan otros reguladores como Picloram y Dicamba, como auxinas sintéticas de gran potencial en la inducción de callos embriogénicos, e incluso observaron una mejor eficiencia de estos reguladores en el proceso embriogénico de esta especie, cuando lo combinaron con citoquininas como kinetina y BAP. Por lo que, para establecer una metodología eficiente de propagación por cultivo *in vitro* resulta primordial establecer diferentes vías de regeneración y proponer cuál es la más eficiente según las condiciones de estudio empleadas.

#### **1.9.2.2 Ventajas que le ofrece la micropropagación al cultivo de la piña.**

- La micropropagación permite a los productores operar durante todo el año con la producción programada en forma más ajustada a las ventas.
- Un explante (hoja, callo o brote) se multiplica y puede dar lugar a cientos de plántulas en menos de un año, ya que, una vez establecido el cultivo, se dispone de una fuente continua de brotes, que luego de enraizar, se convierten en plantas, sin importar la estación del año, por lo tanto, sin interrupción (Cuellar, 2015; Escalona, 1998).
- Se obtiene un producto de mayor calidad ya que su valor se incrementa como consecuencia de que se producen plantas libres de enfermedades y con mejor fenotipo, lo que se traduce en frutos más grandes y mayores rendimientos de los que se obtiene por la propagación vegetativa (Souza, 2017; Gangopadhyay y Mukherjee, 2015).

#### **1.9.2.3. Desventajas de la micropropagación en el cultivo de la piña.**

Una de las principales desventajas que restringen la eficiencia de la micropropagación, es la fase de aclimatización de las plántulas en invernadero

para después ser transferidas al campo (Rodríguez *et al.*, 2016), debido a que se hace muy difícil por la baja supervivencia y el lento crecimiento de las plantas que requieren de 6 a 8 meses para que alcancen de 20 a 30 cm (Hurtado *et al.*, 2015), por lo que en ocasiones se encarecen los costos producción. Es por ello por lo que esta etapa resulta fundamental para que el sistema de obtención de plantas a través de la micropropagación sea realmente eficiente.

### **1.10 Importancia de la aclimatación para las vitroplantas de piña.**

El éxito de las plántulas producidas *in vitro*, depende de la transferencia exitosa y el establecimiento de las plantas a las condiciones *ex vitro*. Muchos autores han manifestado que puede ocurrir una gran pérdida o daño de las plantas debido a que son transferidas a nuevas condiciones: como baja humedad, alto nivel de irradiación, déficit hídrico por mala conductividad hidráulica de las raíces y mala conexión de la raíz con el tallo. Por lo tanto, las plantas provenientes de condiciones *in vitro*, necesariamente deben ser aclimatadas con una reducción gradual de la temperatura, de la humedad del aire, el flujo de aire y el nivel de irradiación, para lograr el establecimiento exitoso en el suelo y posteriormente en el campo; y en esta última fase, es donde se aprecia el verdadero éxito de la propagación *in vitro*. Lograr altos porcentajes de aclimatación y establecimiento en campo de plántulas de piña es realmente un reto, debido a que, por su naturaleza de crecimiento lento, requieren aclimatarse cuidadosamente y de un largo periodo, hasta que alcanzan un tamaño adecuado, y se le suman, los costos por mano de obra, sustratos, transporte y otras instalaciones (Mengesha *et al.*, 2013).

En varios estudios se ha confirmado, que el período de crecimiento durante esta fase, se puede reducir con la aplicación de ácido húmico y con el uso de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Baldotto *et al.*, 2010), y a la vez otros autores reafirman que el sustrato en el que las plántulas se establecen cuando son aclimatadas, sigue siendo un desafío para una aclimatación exitosa (Mengesha *et al.*, 2013). A su vez, las bajas tasas de supervivencia se asociaron con el medio de crecimiento en el que son sometidos los explantes en condiciones *in vitro*, que contiene alto contenido de sacarosa (Zhang *et al.* 2009) y baja densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), que no favorecen el desarrollo de un aparato fotosintético funcional en los explantes (Goncalves *et al.*, 2017). Además, presentan brotes reducidos con baja cantidad de cera cuticular y epicuticular,

estomas no funcionales, hojas delgadas y pequeñas con número reducido de tricomas y un sistema radicular poco desarrollado (Goncalves *et al.*, 2017), y tales características anatómicas provocan que disminuya la capacidad de las vitroplantas para equilibrar la transpiración y la absorción del agua por las raíces y por lo tanto, sufren de estrés por la sequía del aire e incluso cuando se proporcionan cantidades excesivas de agua a través del riego, en ocasiones provoca mortalidad (Desjardins *et al.*, 2009).

Como ya es bien conocido, la planta de piña hace uso de un tipo especial de fotosíntesis, llamado metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (Prigget y Gutiérrez *et al.*, 2014), pero se ha demostrado constitutiva fuerte (desarrolla el metabolismo ácido de las crasuláceas), pero se ha demostrado que las plantas micropropagadas no son CAM (Aragón *et al.*, 2013), o sea que los mecanismos defensivos y adaptativos no están preparados como en las plantas cultivadas en su hábitat natural; tienen una morfología y fisiología plástica que puede cambiar según las condiciones de crecimiento, de C3 a CAM. Se ha evidenciado en muchos casos, que la temperatura determina que realicen la fotosíntesis como si fueran plantas C3 (Nievola *et al.*, 2005) y este comportamiento también es modulado por la disponibilidad de agua (Freschi *et al.*, 2010). Además, se informó que el metabolismo CAM en las plántulas de piña estuvo condicionado por una combinación de baja humedad relativa y altas temperaturas e intensidad de luz, durante las 4 primeras semanas de crecimiento *ex vitro* (Aragón *et al.*, 2013; Aragón *et al.*, 2012).

No se conoce mucho sobre las transiciones del metabolismo C3 a CAM en estas plantas, pero se sabe que la fijación nocturna de CO<sub>2</sub> la inicia la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) (E.C. 4.1.1.3 I), de forma independiente de la luz, mientras que la asimilación diurna depende de la luz y se fija mediante la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) (EC 4.1.1.39). El funcionamiento CAM en estas plantas está intrínsecamente relacionado con la expresión de genes que codifican PEPC (Aragón *et al.*, 2013). Además, la actividad de PEPC está controlada por un proceso de fosforilación-desfosforilación por fosfoenolpiruvato carboxilasa-quinasa (PPCK) en el que la enzima fosforilada abunda durante el período nocturno y es menos susceptible a la inhibición por malato y responde mejor al activador alostérico glucosa-6-fosfato (Glc-6-P). Las Plantas CAM inmediatamente después del amanecer pueden aumentar la absorción de CO<sub>2</sub>, ya que ambas enzimas carboxilantes (Rubisco y PEPC) están activas (Wild *et al.*, 2010), por lo que no sufren estrés por sequía ya que pueden asimilar fotosintéticamente el CO<sub>2</sub>

atmosférico directamente a través del metabolismo C3, mientras que las plantas estresadas por la sequía, en su mayoría, cierran sus estomas durante el día para absorber CO<sub>2</sub> durante la noche (CAM), cuando se reduce la demanda de agua atmosférica, por lo que disminuye la pérdida de agua (Antony *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que la asimilación de CO<sub>2</sub> a través del metabolismo C3 es más eficiente energéticamente que CAM (Ceusters *et al.*, 2019), mantener las plantas con riego puede facilitar el proceso de aclimatación. De hecho, se ha informado que las plantas de piña trabajando como C3 presenta un sistema de raíz más desarrollado, mientras mantienen en gran medida el agua dentro de los tejidos debido al alto nivel de cera cuticular (Aragón *et al.*, 2012). De ahí que, dada la importancia económica de este frutal, es imperativo identificar posibles alternativas que pueden utilizarse para lograr una aclimatación exitosa.

### **1.11 Cómo contribuyen los Marcadores Moleculares en la detección de la estabilidad genética.**

La tecnología de marcadores moleculares ofrece una nueva alternativa para que los recursos genéticos puedan evaluarse y caracterizarse al nivel de su ADN (Lanaud y Lebot, 1995). Actualmente se reconoce que los marcadores de ADN basados en la PCR son una herramienta poderosa para los análisis genéticos, así como para los programas de mejoramiento por su simplicidad y facilidad de manejo y han sido de gran utilidad tanto en estudios de diversidad, como de estabilidad genética en el cultivo de plantas *in vitro* (Patzak, 2003; Sahijram *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2001). La PCR está basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento de ADN comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados cebadores. Este proceso es realizado por una enzima termoestable ADN polimerasa termoestable (Picca *et al.*, 2004). Las variaciones genéticas pueden ser detectadas por varias técnicas moleculares como: ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), Repeticiones de Secuencias Simples o Microsatélites (SSR) e Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR).

Es importante considerar que la utilización de las herramientas descritas con anterioridad permite detectar cambios genéticos aún en etapas tempranas de cultivo. Sin embargo, hay que tener en cuenta también que, dependiendo de la técnica utilizada y las enzimas de restricción o cebadores seleccionados, el análisis por medio de técnicas moleculares

puede no evidenciar ciertas variantes fenotípicas, por el solo hecho de que no se está estudiando la región del genoma donde ocurrieron las modificaciones. A su vez, hay que considerar que la variación somaclonal contempla, además de los cambios genéticos, también aquellos cambios de naturaleza epigenética, que producen alteraciones en el fenotipo. La mayoría de estas técnicas no permiten discriminar estas variantes. Por otro lado, puede haber variantes somaclonales, producto de cambios en la secuencia de ADN de regiones no codificantes, que se identifiquen por medio de marcadores moleculares, pero que no tengan ningún efecto sobre el fenotipo. Desde el punto de vista de una operación comercial enfocada en la micropropagación de plantas, este tipo de cambios no constituye un problema para su actividad. Si bien la utilización de técnicas moleculares ha demostrado ser útil para la detección de variación somaclonal.

Hasta la fecha, se han desarrollado varios tipos de marcadores de ADN incluido el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), simple secuencia repetida o microsatélites (SSR), e Inter secuencia simple repetida (ISSR) (Nashima *et al.*, 2020). Entre los tipos de marcadores de ADN mencionados anteriormente, los marcadores SSR tienen varias ventajas clave, debido a sus altos niveles de polimorfismo, alelos múltiples y codominancia. Los SSR se han aplicado ampliamente en estudios de población genética, reproducción molecular y pruebas de paternidad. Por ello, se han desarrollado numerosos SSR, 18 marcadores EST-SSR Wöhrmann y Weising (2011), 18 marcadores SSR desarrollados por Shoda *et al.* (2012), 32 marcadores SSR desarrollados por Carlier *et al.* (2012), 18 marcadores SSR desarrollados por Feng *et al.* (2013), y dos marcadores SSR desarrollados por Urasaki *et al.* (2015), fueron utilizados para construir mapas de ligamiento genético en piña (Sousa *et al.*, 2013), los cuales se componen de 157 a 741 marcadores de ADN, con 32% a 86% de cobertura del mapa (Leitao, 2018).

A su vez, ISSR es un método sencillo y rápido que reúne los mejores beneficios de AFLP, SSR y la universalidad de RAPD, y supera sus limitaciones como: la baja reproducibilidad de RAPD, el alto costo de AFLP y la necesidad de conocer las secuencias flanqueantes para desarrollar cebadores específicos de especies para el polimorfismo, como en los SSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1993). Además, los ISSR son altamente polimórficos, implican el uso de secuencias

microsatélites como cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa para generar marcadores multilocus (Pradeep *et al.*, 2002) y son muy útil en estudios sobre diversidad genética, filogenia, etiquetado de genes, mapeo del genoma y biología evolutiva

ISSR, implica la amplificación del segmento de ADN a una distancia amplificable entre dos regiones idénticas de microsatélites orientado en dirección opuesta. La técnica utiliza microsatélites, generalmente de 16 a 25 pares de base (pb), como cebadores, el microsatélite utilizado se repite ya que los cebadores pueden ser dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos o pentanucleótidos y estos no pueden estar anclado (Gupta *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1993) o generalmente están anclado al extremo 3' o 5' y terminan con 1 a 4 bases degeneradas extendidas en las secuencias flanqueantes (Zietkiewicz *et al.*, 1994). La alta reproducibilidad de los ISSR es debido al uso de cebadores más largos (16 - 25 pb), en comparación con los cebadores RAPD (10 pb), lo que permite una alta temperatura de fusión (45 - 60 °C) y conduce a una mayor rigurosidad de la técnica (Pradeep *et al.*, 2002).

### **1.11.1 Cómo contribuyen los marcadores moleculares en la detección de la homogeneidad genética en piña.**

Con respecto al uso de los marcadores moleculares, los RAPD resultaron de gran utilidad (Roostika *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2008) en el estudio donde se tuvieron en cuenta diferentes métodos de regeneración (organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática) y dos etapas (período largo y corto plazo), ya que comprobaron que puede aplicarse para la detección temprana de la variación somaclonal en este cultivo, detectándose un 95.9% de polimorfismo. Además, demostraron que los largos períodos de siembra fueron los principales contribuyentes de tal variación, aunque el método de propagación vía indirecta y el uso de reguladores del crecimiento como el Picloram en el medio de cultivo pudo haber contribuido a la variabilidad (Roostika *et al.*, 2015). A su vez los AFLP se utilizaron para estimar la variabilidad entre dos somaclones y sus donantes, donde se pudieron observar diferentes patrones de bandas que difirieron genéticamente, además en este estudio también se consideraron marcadores morfológicos (Pérez *et al.*, 2012). En otra investigación se emplearon 17 cebadores ISSR, para determinar la



estabilidad genética del banco de germoplasma conservado *ex situ*, las plantas se seleccionaron para la evaluación en el quinto subcultivo, y se observó que se mantuvo la fidelidad genética, ya que, en la mayoría de los perfiles electroforéticos, sólo se detectó un 7% de polimorfismo, cuando se compararon las accesiones plantadas *in situ* (Leite *et al.*, 2016).

En los estudios anteriormente citados, se demostró de forma general, que los cultivos *in vitro* a largo plazo abren un alto riesgo de variación somaclonal para la micropropagación de la piña, por lo que recomiendan emplear períodos de cultivo corto. Conjuntamente, se manifiesta que el método de regeneración y el fitorregulador también pueden inducir variación genética *in vitro*. Se hizo alusión al Picloram como inductor de la variación, hay que valorar que este regulador es de origen auxínico, y de uso común a bajas concentraciones, para dar lugar a la formación de callos en la embriogénesis somática y requiere de mayor tiempo que otros fitorreguladores para dar lugar a este proceso, por lo que la probabilidad de cambios genéticos aumenta (Noormi *et al.*, 2012; Firoozabady y Moy, 2004). Del mismo modo hay que tener en cuenta que el callo es una estructura indiferenciada, en activa división celular, que favorece a la variabilidad (Roostika *et al.*, 2015), lo cual pudo ser motivo para que en los estudios dónde se empleó esta metodología se manifestara variación somaclonal.

Teniendo en cuenta que las herramientas más valiosas para el análisis de plantas *in vitro*, son las basadas en el ADN, y que para la evaluación de la variabilidad genética y la fidelidad, se recomienda enfáticamente utilizar diferentes tipos de marcadores moleculares, en nuestro trabajo de investigación se emplearon los marcadores SSR e ISSR, que son de alta reproducibilidad y confiabilidad, para evaluar la homogeneidad genética de las plantas de piña, regeneradas mediante diferentes vías de micropropagación, y a su vez determinar qué protocolo se puede utilizar para la propagación *in vitro* de la especie, con menor riesgo de variabilidad genética y a la vez, comprobar si ambos marcadores son eficientes para determinar la estabilidad genética en el cultivo de tejidos.

## **JUSTIFICACIÓN.**

El híbrido de piña 'MD2', es el de mayor demanda en el mercado nacional e internacional. Su principal vía de propagación es la tradicional (siembra de propágulos), la cual presenta una baja tasa de multiplicación y facilita una mayor incidencia de plagas y enfermedades, esto hace necesario desarrollar alternativas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, que permitan propagar esta planta de manera eficiente. Por lo que, para profundizar en el estudio de la morfogénesis en este valioso frutal y aportar información básica, es necesario establecer diferentes vías de regeneración *in vitro* y evaluarlas mediante técnicas histológicas, morfológicas y moleculares.

## **Preguntas de Investigación.**

¿Qué vía de regeneración *in vitro* resultará más eficiente para aumentar la tasa de multiplicación del híbrido de piña 'MD2' y aportar plantas genéticamente estables?

¿Qué ocurre en las células somáticas de la piña al ser sometidas a diferentes tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento en su proceso de morfogénesis?

### **HIPÓTESIS.**

La inducción de la embriogénesis somática (indirecta) en el híbrido de piña 'MD2', permitirá obtener un gran número de plantas genéticamente estables, lo que contribuirá a aumentar la tasa de multiplicación de este frutal. A la vez el estudio histológico de las estructuras originadas con diferentes concentraciones de auxina y citoquinina permitirá distinguir cómo ocurre la totipotencia en las células de piña.

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar mediante técnicas histológicas y marcadores morfológicos las estructuras morfogénicas que se originan en los diferentes sistemas de regeneración *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr. híbrido 'MD2') y evidenciar la homogeneidad genética de las plantas obtenidas con marcadores moleculares.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1- Establecer y evaluar diferentes sistemas de regeneración *in vitro* en el híbrido de piña 'MD2', a partir de explantes foliares.
- 2- Caracterizar las estructuras morfogénicas obtenidas en las diferentes vías de regeneración establecidas, mediante un estudio histológico.

- 3- Analizar la homogeneidad genética de las plantas obtenidas en las diferentes vías de regeneración establecidas, con marcadores moleculares (SSR e ISSR).

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

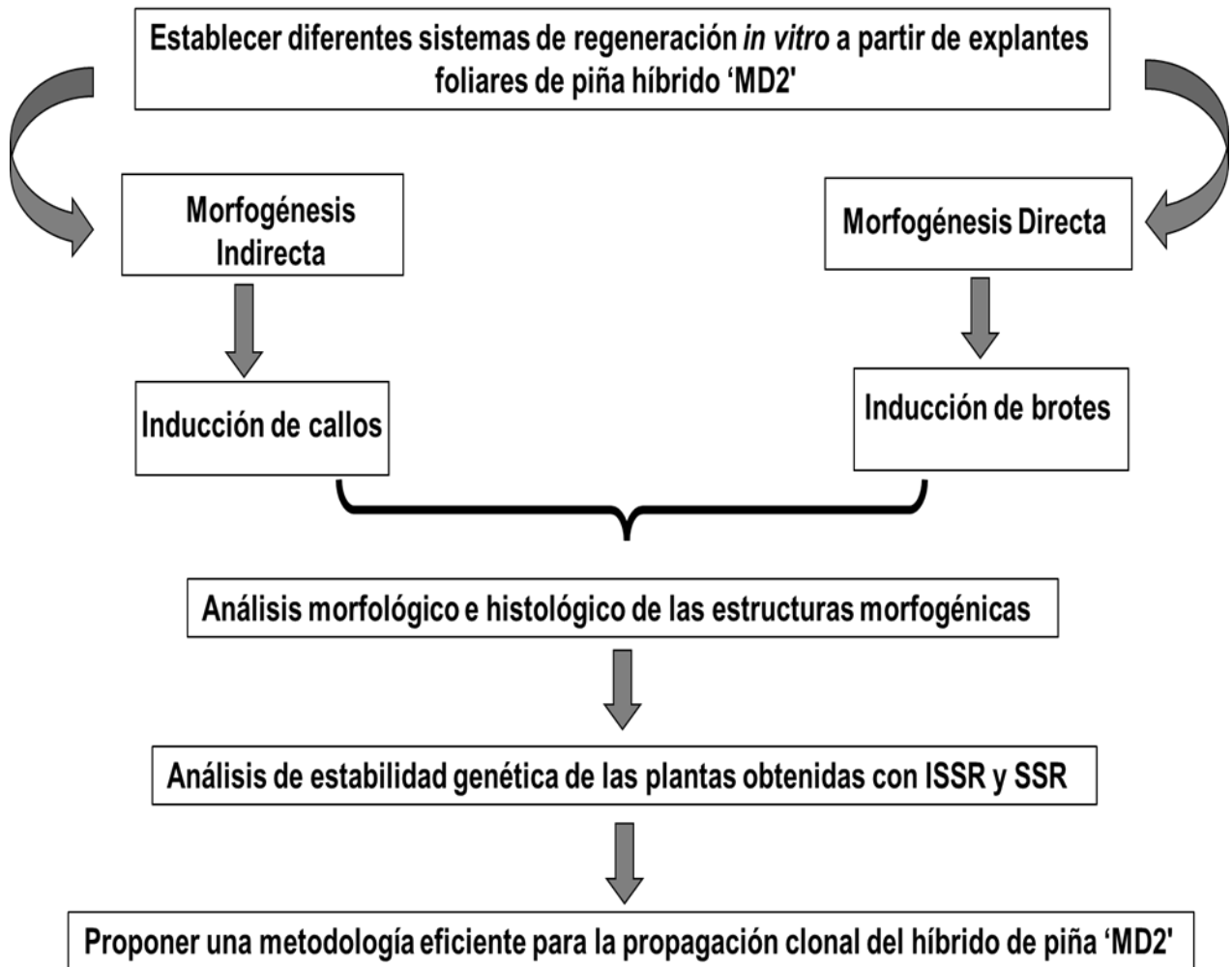


Figura 1.1. Estrategia experimental.

## CAPITULO II

### **Indirect Somatic Embryogenesis: An Efficient and Genetically Reliable Clonal Propagation System for *Ananas comosus* L. Merr. Hybrid 'MD2'.**

Argelys Kessel-Domini<sup>1</sup>, Daisy Pérez-Brito<sup>2</sup>, Adolfo Guzmán-Antonio<sup>1</sup>, Felipe A. Barredo-Pool<sup>3</sup>, Javier O. Mijangos-Cortés<sup>4</sup>, Lourdes Georgina Iglesias-Andreu<sup>5</sup>, Alberto Cortés-Velázquez<sup>5</sup>, Adriana Canto-Flick<sup>1</sup>, Susana A. Avilés-Viñas<sup>1</sup>, Yaritza Rodríguez-Llanes<sup>1</sup> and Nancy Santana-Buzzy<sup>1\*</sup>.

1

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97205, México

2

GeMBio, Grupo de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97205, México

3

Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97205, México

4

Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97205, México

5

Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Campus para la Cultura, Universidad Veracruzana, las Artes y el Deporte. Av. de las Culturas Veracruzanos No. 101. Colonia Emiliano Zapata, Xalapa-Enríquez 91090, México

\*

Author to whom correspondence should be addressed.

Este capítulo ha sido publicado en la revista Agriculture:

Academic Editors: Muhammad Sultan, Redmond R. Shamshiri, Md Shamim Ahamed and Muhammad Farooq

Agriculture 2022, 12(5), 713; <https://doi.org/10.3390/agriculture12050713>

Received: 29 March 2022 / Revised: 11 May 2022 / Accepted: 12 May 2022 /

Published: 18 May 2022

(This article belongs to the Special Issue Advances in Agricultural Engineering Technologies and Application)

## 2.1 Abstract

The objective of this study was to establish an efficient direct or indirect regeneration system for pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) plants, with a high rate of multiplication and that would preserve the genetic identity of the donor genotype (Hybrid 'MD2') in the regenerated plants. Ten treatments, with different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and Picloram (P), in the absence or presence of 6-Benzylaminopurine (BAP), were used for *in vitro* morphogenesis induction, as well as histological and molecular techniques, in order to characterize the morphogenic responses induced. Significant differences between treatments tested, to induce callus and buds, were assessed by the Kruskal Wallis method and the Mann–Whitney U-tests. Different pineapple regeneration routes were identified, showing the high regeneration potential of this species. The medium containing 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 mg L<sup>-1</sup> BAP, where indirect somatic embryogenesis occurred, was selected as the most efficient treatment, with an average of 120 somatic embryos per explant, differing significantly from the rest of the treatments. It was also demonstrated that the pineapple plants regenerated *in vitro* preserved the genetic identity of the donor genotype, which represents a high degree of confidence for the application of indirect somatic embryogenesis for *A. comosus* clonal propagation.

Keywords: *Ananas comosus*; somatic embryogenesis; micropropagation; organogenesis; SSR markers; ISSR markers; pineapple.

## 2.2. Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) is a monocotyledonous plant native to tropical America, specifically South America, belonging to the Bromeliaceae family, and is one of the most important tropical species in the international market, due to the great acceptance of its fruit by consumers (Jaji *et al.*, 2018) The fruit is recognized as one of the finest in tropical regions, and is considered the queen of all fruits, because it is highly appreciated for its high nutritional value. It is rich in carbohydrates and saturated fats, free of cholesterol, low in sodium, and has high contents of vitamins A, C, and minerals. It is also a highly digestible food because it contains the enzyme bromelain (Abdul *et al.*, 2018). It is currently the second tropical crop in terms of production volume, only surpassed by the banana (*Musa acuminata*). It is produced in many tropical regions of the world and is exported mainly to the United States of America and the European Union (Hikal *et al.*, 2021; Blanco *et al.*, 2107). Seventy percent of its commercial production is consumed fresh, and the rest is intended for canning in syrup, so the hybrid 'MD2', known as 'Extra Sweet', 'Golden Sweet', or Honey pineapple", is the most demanded in the international market, since when compared with other cultivars, it stands out for: its sweetness (values from 13 to 18° Brix), its uniform golden color, and especially for its long shelf life (more than 30 days) (Mercado *et al.*, 2019; Abdul *et al.*, 2018; Russel *et al.*, 2017).

This plant is described as a perennial herb that grows between one and one and a half meters high. Prior to fruiting, this plant generates around two hundred flowers, which, when fertilized, combine to form a polyfruit, which is known as a pineapple. Each plant generates between seventy and eighty leaves, which are like pods or sheets arranged in a spiral, usually in layers. Some cultivars have thorns on the edges of their leaves. Its flowers have foliar scales that have the property of retaining water. The embryo of the plant has only one leaf, or cotyledon, and is a self-incompatible species (Jaji *et al.*, 2018), so its main form of propagation is vegetative, based on three types of tillers: crowns, cocks, and spikes (Blanco *et al.*; Nouri *et al.*, 2107). The crowns, located in the upper part of the fruit, have a slow but uniform development, with a low percentage of natural flowering, and their cycle can



be considered late. The propagules, or tillers, that grow and develop from buds located on the peduncle, and the base of the fruit are known as roosters and the number and vigor per plant vary, with the most occurring during the first harvest and being of intermediate vigor. Nails are considered scions, and grow and develop from axillary buds, located throughout the stem, and their cycle is considered the earliest, because they are more vigorous and are the most used tillers for the establishment of plantations (Garcidueñas *et al.*, 2013).

All these species characteristics imply a very low growth and multiplication rate through vegetative propagation, since the interval between planting and fruiting can be up to two years, and only two to three uniform propagules are produced per plant, which in turn drastically limits the availability of suitable planting material to establish large areas of the crop (Guzmán, 1988). On the other hand, the incidence of pests and diseases is higher, and this condition is aggravated by the low genetic variability present in their populations, since traditional genetic improvement is delayed and inefficient (Garcidueñas *et al.*, 2013). Given this problem, it is necessary to use biotechnological tools that allow the rapid and massive production of uniform plants with high phytosanitary quality, in a rapid and massive way, thus producing larger fruits with higher agricultural yields. Technologies based on plant tissue culture provide us with very valuable tools for the massive and uniform propagation of this crop in very short cycles of time and at any time of the year (Souza *et al.*, 2017; Shamin *et al.*, 2016). However, it should be noted that the conditions required for tissue culture can result in genomic changes in plants, resulting from *in vitro* culture (Dhurve *et al.* 2021., Ling *et al.*, 2019; Nouri *et al.*, 2017)

Tissue culture conditions, such as the use of growth regulators, successive transfers of explants, certain temperatures, and culture medium pH, sometimes lead to alterations at the cellular level, which result in genomic changes in plants from *in vitro* culture (Dhurve *et al.*, 20121; Nouri *et al.*, 2017) which are not favorable in micropropagation. Authors such as Akdemir *et al.* (2016) found that when high concentrations of cytokinins are used in long-term pineapple cultivation, somaclonal variations occur, which can be detected by molecular markers. In another study, differences in morphological and physiological characters between regenerants and mother plants were observed, when Naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-Benzylaminopurine (BAP) were used for plant regeneration (Nouri *et al.*, 2017).

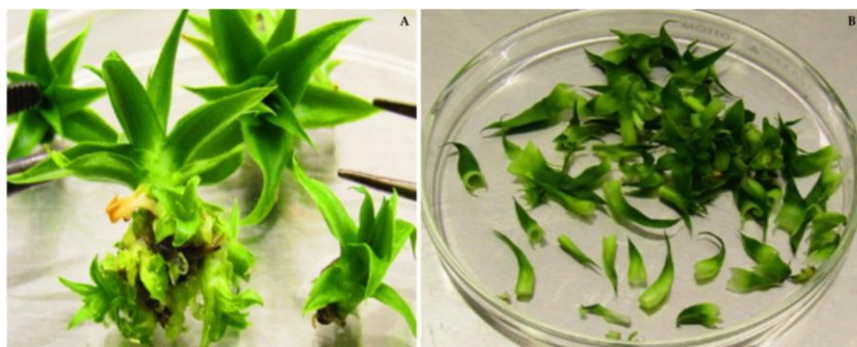
Years later, in another study using these same regulators, DNA methylation increase was found in the dedifferentiation process (callus formation) and differentiation (seedling regeneration), and it was concluded that these changes lead to somaclonal variation in pineapple (Ling *et al.*, 2019).

Therefore, the establishment of a tissue culture technology in this valuable fruit plant requires reproducible protocols for each of the process stages, and for this, it is necessary to define the structures that originate in the different morphogenic routes; as well as to analyze if the change that originated in the genetic program of these cells leads to somaclonal variation, since a fundamental requirement in the commercial industry when working with elite genotypes is to maintain their relevant agronomic characteristics (Shamin *et al.*, 2016). For this reason, the present research hypothesizes that with the application of somatic embryogenesis, many genetically stable plants are obtained, and the multiplication rate of this fruit species is increased in a short period of time. Therefore, the objective of this work is to present the advances achieved in the search for a highly efficient and genetically reliable mass propagation technology, in which vigorous 'MD2' pineapple *in vitro* plants with a high survival rate are generated.

## 2.3. Materials and Methods

### 2.3.1. Explant Selection

For the induction of pineapple morphogenic structures, the leaf base from young (4–6 weeks old) *in vitro* plants of the ‘MD2’ hybrid undergoing *in vitro* vegetative growth (Figure 2.1) was used as plant material. Leaves explants were placed horizontally with their adaxial surface on the culture medium.



**Figure 2.1. (A) Aseptic ‘MD2’ pineapple *in vitro* plants (4 – 6 weeks old) used as a source of explants to induce direct and/or indirect morphogenesis; (B) leaves isolated from the *in vitro* plants used as initial explant.**

Four treatments were established and tested to induce morphogenesis, in which different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) were used in Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) medium, supplemented with sucrose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), Myoinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), and Thiamine ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). The explants remained under conditions of 16 h of light and 8 h of darkness, and a temperature of  $27\text{--}30 \text{ }^\circ\text{C}$ . The shoots obtained were subcultured on the same medium every 45 days until shoots were obtained. For callus regeneration, six treatments were established and evaluated. Where an MS medium was used, which was supplemented with sucrose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), Myoinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), Thiamine ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), and different concentrations of regulators: 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and Picloram (P), in the absence or presence of BAP (Table 2.1). In this case, the explants were incubated in total darkness at  $25\text{--}28 \text{ }^\circ\text{C}$  and subsequently, the calluses obtained were subcultured in the same medium (MS) every 45 days. From the second subculture (90 days), they were transferred to conditions of a photoperiod of 16 h of

light and 8 h of darkness, and a temperature of 27–30 °C, to induce the formation of morphogenic structures (embryos or shoots) in an MS medium without auxin, which contained BAP at different concentrations (0.5, 1, and 2 mg L<sup>-1</sup>), in which they remained 145 days, with refreshing passes every 45 days. The shoots obtained were transferred to a rooting medium [MS + (NAA 1 mg L<sup>-1</sup> /1 mg L<sup>-1</sup> BAP)] until reaching seedlings of 6 to 8 cm in height.

**Table 2.1. Combinations of different growth regulators that were used in the medium (MS) to induce morphogenesis in 'MD2' hybrid pineapple.**

Treatments	NAA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	2,4D (mg L <sup>-1</sup> )	P (mg L <sup>-1</sup> )
M1		5		
M2	2	5		
M3	2	2		
M4	1	1		
M5			1	
M6		1	1	
M7		2	2	
M8				3
M9		0.05		3
M10		0.05		5

In all treatments, the media were solidified with Gelrite (3000 mg L<sup>-1</sup>), and 40 mL of it were distributed in magentas and sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 min. Five explants were planted per magenta, and a completely randomized experimental design was used, with three replications, for which a total of 45 explants were planted per treatment, and when more than 50% of the explants presented morphogenic structures, the following features were evaluated: the number of explants with morphogenic structures, the type of morphogenic response (calluses, shoots, and direct and indirect

somatic embryos), number of embryos per treatment, number of shoots per treatment, and number of plants obtained.

### **2. 3. 2. Histological Analysis of Morphogenic Structures That Originated in *In Vitro* Regeneration**

For histological processing, samples of the different morphogenic structures formed in the different treatments were taken. The methodology used was that described by Piven *et al.* (2001), though slightly modified. Biological samples were taken in small portions of approximately 0.5–1.0 cm<sup>2</sup>, containing callus mass, embryos, and shoots. Three samples per treatment, taken at random, were fixed for 96 h in a FAA solution containing formaldehyde (4%), glacial acetic acid (95%), ethanol (95%), and distilled water, in a ratio of 2:1:10:7, respectively. After fixation, the tissues were washed three times (30 min each) with distilled water to remove fixative residues. Subsequently, the washed samples were subjected to dehydration treatments in different concentrations of ethanol (C<sup>2</sup>H<sup>6</sup>O), in a gradual and ascending manner (30%, 50%, and 70%) (Ruzin *et al.*, 1999). The samples were then left to stand in the last ethanol concentration (70%) for 24 h, and the dehydration process was continued with 85%, 96%, and absolute or anhydrous ethanol. Two alcohol changes were made for each concentration, with an immersion time of one hour for each change. The tissues were then embedded in JB-4 plastic resin according to the manufacturer's instructions (Embedding Solution Poly-sciences, Los Angeles, CA, USA). The embedded tissues were immersed in solution A + catalyst (Benzoyl Peroxyde Plasticized, Polysciences, Warrington, PA, USA) and maintained for one week at room temperature (20 to 25 °C). At the end of resin infiltration, casts were made, including the tissues for transverse and tangential sectioning on an HM 325 rotary microtome (Microm, CA, USA) with a thickness of 2–4 µm. Histological sections were serially performed and spread in distilled water and collected on a 26 mm x 76 mm slide. To visualize the cellular organization, the histological sections were stained with Toluidine Blue and Paz stain, and observations were made on an Axioplan Zeiss microscope, equipped with AxioCam ICc 5 (Jena, Germany).

### **2.3.3. Acclimatization of Plants *In Vitro***

Seedlings with a height of 6–8 cm were extracted from the culture containers, washed with abundant running water, and placed in plastic trays for transfer to the greenhouse, where they were established in trays containing a mixture of red soil + coconut fiber +

perlite (1:1:1) as substrate, following the methodology described by Guzmán-Antonio et al. (data in process of publication). After 45 days, the seedlings were transplanted into black plastic bags (22 cm × 26 cm), where they remained for about 16–20 weeks, for subsequent transfer to the field.

#### **2.3.4. Analysis of the Genetic Stability of the Plants Obtained from *In Vitro* Regeneration**

Genomic DNA extraction. For DNA extraction, leaf samples were taken from 10 plants from the different treatments. Total genomic DNA was extracted according to the method reported by Tapia *et al.* (2005) The quality and integrity of the DNA was determined by electrophoresis in a 0.8% (w/v) agarose gel, and the concentration and purity of the genomic DNA was determined by reading absorbance at 260 and 280 nm in a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Madrid, Spain), according to the methodology described above. Once the DNA was obtained, we proceeded to the analysis to determine the genetic stability with the SSR and ISSR markers.

Amplification by SSR. To determine the appropriate alignment temperature, each SSR primer was tested at 50 °C, 55 °C, and 60 °C. Amplifications were developed in a final volume of 25 µL for a reaction, containing 40 ng of template genomic DNA, 0.3 µM of each SSR primer, 0.15 mM of dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.5 mM of magnesium chloride (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1× buffer, and 1.2 U of Taq polymerase (recombinant) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Twenty SSR primers reported by Wang *et al.* (2017) were evaluated. For each amplification reaction, three samples from each treatment with three replicates per primer were analyzed.

PCR reactions were performed on a Thermal cycler 2720 (Applied Biosystems, CA, USA). The amplification program began with a 2.30 min cycle at 94 °C, followed by 35 cycles at 94 °C at 45 s. The alignment temperatures were 55 °C, 60 °C (45 s), and 72 °C (1 min), with an 8-min final extension cycle at 72 °C. PCR products were separated on 2% agarose gels in a 0.1× TBE buffer (0.04 M Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl); 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA); 0.04 M boric acid; pH 8) at 100 v (constant voltage). Staining was performed with ethidium bromide and gels were visualized in a U.V. light transilluminator. (BIO-RAD Gel Doc Ez Imager, Hercules, CA, USA). By comparing the size of the amplified fragments to a 1 Kb plus DNA molecular

weight marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the size of the amplified fragments was determined.

Amplification by ISSR. Amplifications were made in a final volume of 25  $\mu$ L for a reaction containing 20 ng of template genomic DNA, 1  $\mu$ M ISSR primer, 0.25 mM dNTP mix (Invitrogen), 2.5 mM magnesium chloride (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1 $\times$  buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1.0 U Taq polymerase (recombinant). Five ISSR primers (IS01, IS13, IS14, IS17, and IS19), reported by Weiguo *et al.* (2005), were evaluated. In each amplification reaction, 10 samples per previously described treatment were analyzed, and three repetitions of the amplifications per primer were performed. PCR reactions were run on a thermal cycler 2720 (Applied Biosystems, California, USA), using the following amplification program: an initial cycle at 94  $^{\circ}$ C for 2 min, followed by 45 cycles at 94  $^{\circ}$ C (45 s), where the alignment temperature was 54  $^{\circ}$ C (45 s) and 72  $^{\circ}$ C (1 min and 30 s), and a final extension cycle at 72  $^{\circ}$ C for 7 min. PCR products were analyzed on 2% agarose gels in a 0.1X TBE buffer (0.04 M Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl); 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA); 0.04 M boric acid; pH 8) at 100 v (constant voltage). The bands were visualized by ethidium bromide staining on a U.V. light transilluminator. (BIO-RAD, Gel Doc Ez Imager, Hercules, CA, USA). The size of the amplified fragments was determined by comparison with a 1 Kb plus DNA molecular weight marker (Invitrogen). The Polymorphic Information Content was calculated by the methodology cited by Anderson *et al.* (1992).

### **2.3.5. Statistical Analysis**

The SPSS program (V.17.0) was used to analyze the data. The Kruskal–Wallis method was used, and the quantitative variables that influenced the variation observed among the different treatments established were identified. Paired t-tests (post hoc to Mann–Whitney U) were performed to test for differences between treatments. For the molecular analysis, the percentage of monomorphism obtained by each SSR and ISSR primer was determined, considering the total number of monomorphic bands generated for each of them, over the sum of the total number of bands detected with all the primers, times 100, and this value was considered to determine the genetic stability of each treatment.

## 2.4. Results

### 2.4.1. Evaluation of the Treatments Established for *In Vitro* Regeneration of the Pineapple Hybrid 'MD2'.

#### Direct Somatic Embryogenesis (DSE)

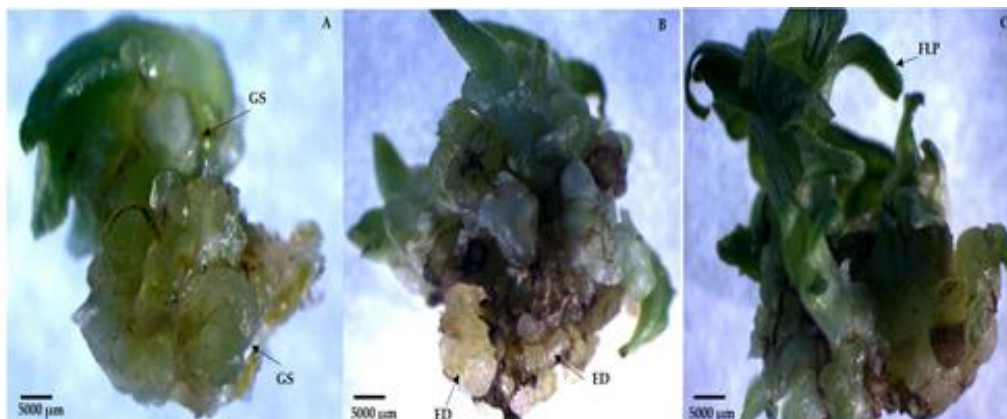
Results obtained in the treatments established for the *in vitro* regeneration of the 'MD2' hybrid showed that depending on the balance of BAP/NAA to which the explants were exposed, the morphogenic response varied (Table 2.2). Direct Somatic Embryogenesis occurred in some of the explants in the treatment M3 used since the formation of abundant globular structures directly from the explant was observed (Figure 2.2 A, B). Unlike the rest of the treatments that contained these two growth regulators, the structures formed evolved rapidly at advanced stages of their development, which is shown in Figure 2.2 B, C, as well as their conversion to plants, so M3 was identified as an adequate medium for the direct induction and proliferation of 'MD2' pineapple embryos from leaf segments. In the rest of the treatments, in which BAP and NAA were used, no embryogenic structures formation was observed, but there was formation of leaf primordia directly from the explant and multiple budding.

**Table 2.2 Morphogenic response of leaf segments of 'MD2' hybrid pineapple seedlings grown in different treatments.**

Treatments	% exp. Morph. Resp.	Morph. Resp. type	Number of embryos	Number of shoots
<b>M1</b>	33.3	DO		20 ± 1.7 e
<b>M2</b>	66.6	IO		30 ± 2.22 c
<b>M3</b>	88.8	DSE	50 ± 2.63 b	50 ± 2.63 b
<b>M4</b>	88.8	DO		25 ± 2.63 d
<b>M5</b>	44.4	IO		20 ± 1.64 e
<b>M6</b>	55.5	IO		25 ± 2.01 d
<b>M7</b>	93.3	ISE	120 ± 8.18 a	120 ± 8.18 a
<b>M8</b>	48.8	IO		22 ± 2.63 e
<b>M9</b>	55.5	IO		25 ± 2.53 d
<b>M10</b>	44.4	IO		20 ± 1.37 e
<b>Chi-square</b>	28.821*	-	18.778*	38.002*



Percentage exp. Morph. Resp.: Percentage of explants with morphogenic response; Morph. Resp. type; Morphogenic response type (DO), direct organogenesis, DSE: direct somatic embryo; IO: Indirect organogenesis (callus or shoots), ISE: indirect somatic embryo; Number of embryos and Number of shoots per explant are mean  $\pm$  SD (standard deviation), Degree's freedom (df): 9. Significance level: \* 0.01 or less; same letters: not significant differences.



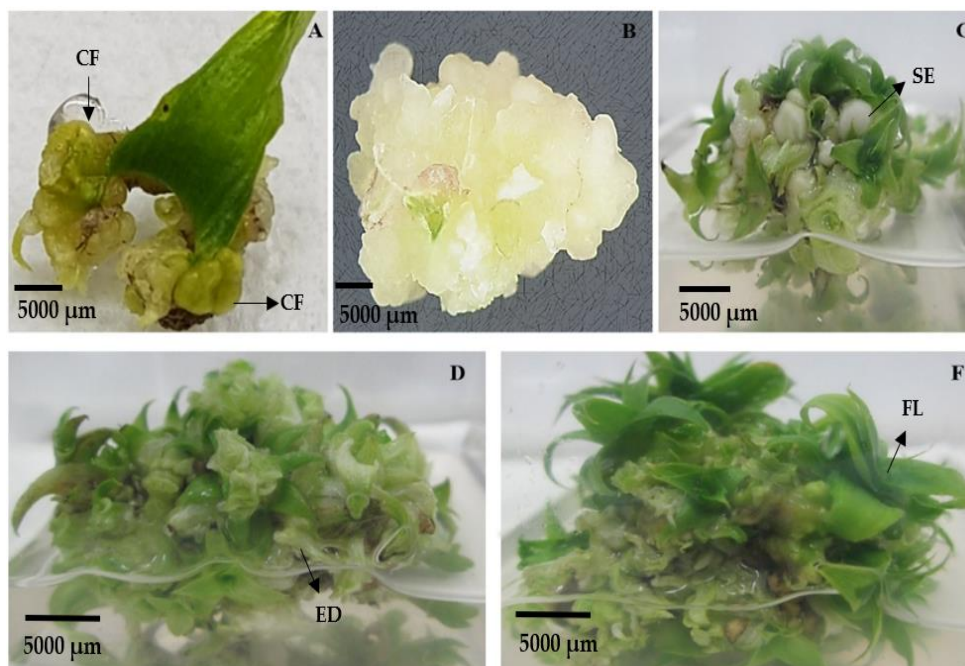
**Figure 2.2 Somatic embryos formed directly from 'MD2' hybrid pineapple explants in M3 treatment. (A, B) Direct formation of globular structures (GS) from leaf explants, (ED) advance stage of embryo development. (C) Asynchronous development of formed embryos; FLP: foliar leaf primordia.**

From the shoots obtained in all the treatments, the same number of plants was obtained in the rooting medium; this means that there was a 100% conversion of shoots to plants.

### **Indirect Somatic Embryogenesis (ISE)**

By analyzing the response of leaf explants to the different treatments, it could be observed that in all treatments containing 2,4-D, alone or in combination with BAP, there was callus formation, although only explants exposed to the treatment with 2 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D and 2 mg L<sup>-1</sup> of BAP (M7) showed the formation of an embryogenic callus that rapidly evolved to form somatic embryos. At 30 days of culture, this callus was characterized by showing a creamy white coloration and a semicompact consistency (Figure 2.3 A, B). In the treatments in which Picloram was present, the formation of a compact, slow-growing, beige-colored callus was observed, turning dark brown rapidly. After 60 days, isolated and minute outgrowths were visible on the periphery of the callus. Only in medium M7 (2 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D/2 mg L<sup>-1</sup> of BAP) was embryogenic callus formation observed, and 93.3% of the explants responded to the treatment (Table 2.2). In this treatment (M7), the callus

started in the basal zone of the leaf and, six weeks later, the first embryogenic structures (globular) became visible from a primary, vitreous white, incipient, semicompact callus. These first embryos of a faint green color emitted a leaf primordium, typical of monocotyledonous species, which allowed for the inferring that they had a well-defined apical meristem (Figure 2.3 A). After the first subculture (six weeks), a callus of semifrable consistency proliferated on the callus and formed 30 days after it was placed in the explant in the medium (Figure 2.3 B), which evolved to form an abundant and granular embryogenic callus, revealing numerous embryogenic structures at early and advanced stages of their development (Figure 2.3 C). These structures gave way to the appearance of numerous, tiny, pale green apices, which evolved into small buds located throughout the periphery of the callus, while in other areas of the callus there was an intense proliferation of embryogenic structures in early stages (globular), which shows an asynchrony typical of somatic embryogenesis (Figure 2.3 D). The high embryogenic capacity (120 SE/Explant) of the callus induced in the M7 medium ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  of 2,4-D and  $2 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP) was observed, differing significantly from the rest of the treatments evaluated. (Figure 2.3 E). The rapid evolution of somatic embryos from globular to an advanced stage, characteristic of somatic embryogenesis in monocot species, became evident.

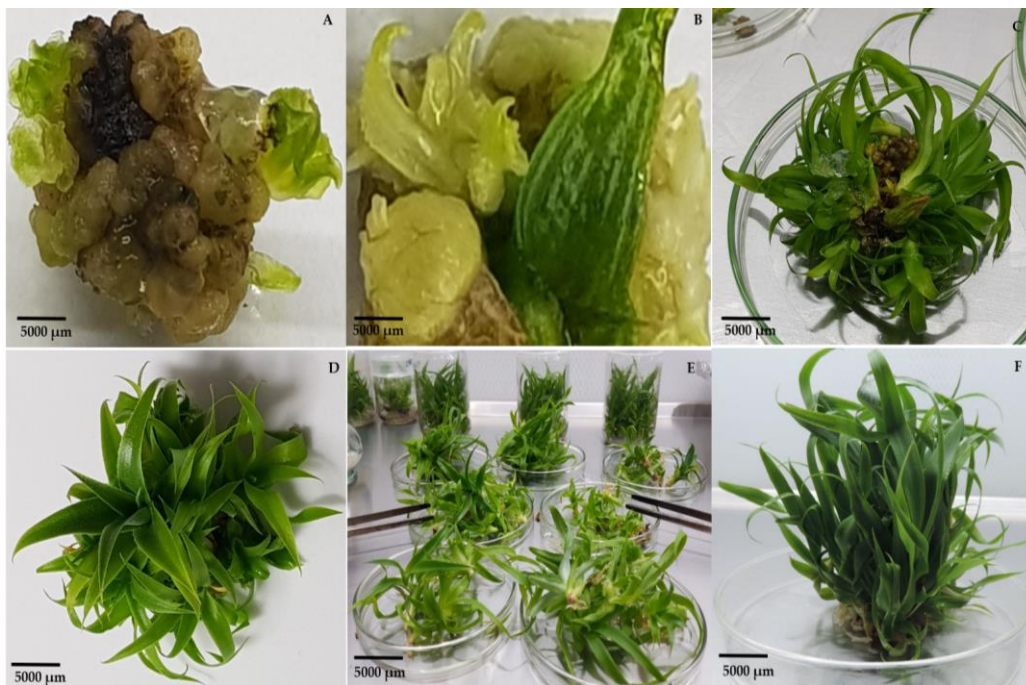


**Figure 2.3. Indirect somatic embryogenesis (ISE) from young leaves of 'MD2' pineapple grown in the M7 treatment ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  of 2,4-D and  $2 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP). (A) Incipient callus formed at the base of the leaf, CF: callus formation; (B)**

primary callus of vitreous white color, semicompact consistency; (C) embryogenic callus of greenish white color, with embryogenic structures (SE) visible at various stages of development; (D) appearance of globular embryos; ED: advance stage of embryo development; (E) high embryogenic capacity of the induced callus, with embryos multiplying and developing asynchronously; FL: foliar primordia.

### Indirect Organogenesis (IO) and Shoot Development

The results obtained showed that in the treatment in which  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  NAA was combined with  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP (M2), there was a high responsiveness to regeneration from the explant cells' leaf segment, so it showed a fast and efficient response to shoot formation (Figure 2.4). It is worth noting that in this treatment, an average of 30 shoots per explant were formed, which was significantly higher than in the rest of the treatments in which regeneration occurred via organogenesis, both directly and indirectly (Table 2.2). The formed shoots were characterized by their vigor and rapid development, which preserved the vascular connection with the maternal tissue during the first generation of shoots. Figure 2.4 shows the evolution of this regeneration process.



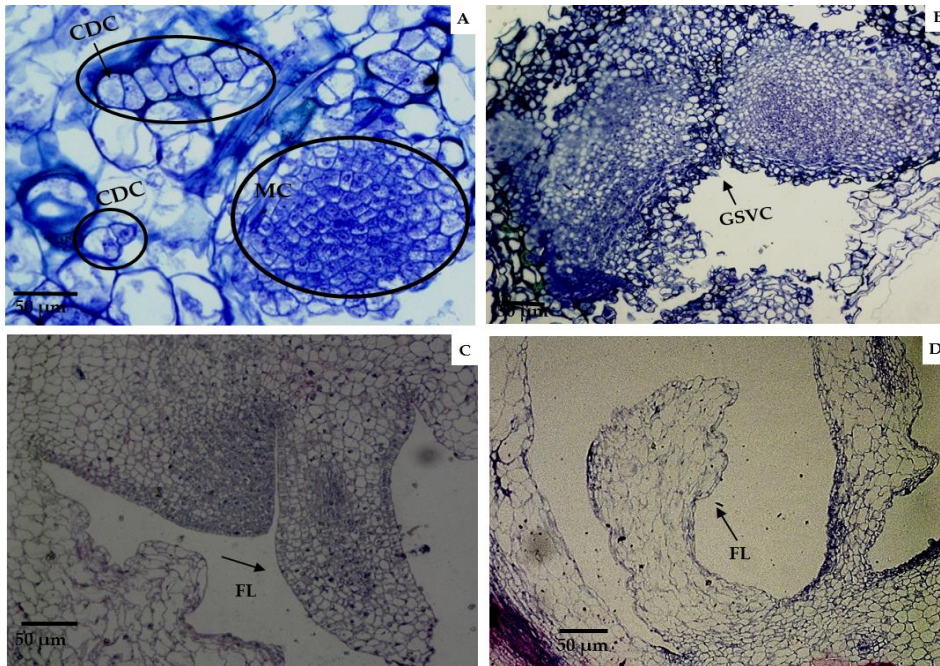
**Figure 2.4. Efficient regeneration of pineapple shoots in the M2 treatment. (A, B) Rapid and abundant proliferation of neoformations with a globular structure; (C, D) proliferation of multiple shoots from neoformations; (E, F) efficient shoot development.**

On the other hand, it was observed that the shoots formed in the M4 treatment developed and became suitable seedlings for transfer to the acclimatization phase in less time compared with the rest of the evaluated treatments. Therefore, this result allowed us to recommend this medium for the final stage of development of all the shoots obtained in the different regeneration pathways, either by direct and indirect somatic embryogenesis or by the direct organogenesis pathway. In treatments M5, M6, M8, M9, and M10 in which indirect organogenesis (IO) occurred via callus formation the callus formed was very slow growing with a compact consistency that quickly turned dark, so none of these treatments had embryogenic structures because only tiny shoots were formed in certain areas of the callus, which subsequently evolved favorably in plants. However, it should be noted that plant regeneration was very slow in these treatments.

#### **2.4.2 Histological Analysis**

The histological analyses of the morphogenic structures that originated from callus in the M7 treatment showed an intense cell division activity in callus cells, clearly distinguishing the formation of abundant, well-defined meristematic centers (Figure 2.5 A) as a prelude to somatic embryogenesis. These cells were characterized by being small and isodiametric, with a dense cytoplasm and a prominent vacuole. An intense asymmetric cell division was observed, the cells began to divide longitudinally and transversally, giving way to the histogenesis process (Figure 2.5 A), in which asynchronously, globular somatic embryos could be observed in the same callus and in an advanced stage of their development (Figure 2.5 B). There was not a vascular connection to maternal tissue. Through the longitudinal section of the embryo (Figure 2.5 C), the development of the central cylinder could be seen in the innermost part of the scutelum, where later the formation of leaf primordia can be seen (Figure 2.5 D).





**Figure 2.5. Histological samples that show the intense meristematic activity that occurred in the regeneration with the M7 treatment. (A) Meristematic cells (MC) in active cell division (CDC), vacuolated, isodiametric cells, and prominent nucleus are observed, as well as the successive divisions of the cells to give rise to the formation of the somatic embryo; (B) Globular embryos advanced in their development without vascular connection (GSVC) with the maternal tissue and where the suspensor rupture is appreciated; (C, D) Formation of the first leaf primordia (FL).**

### 2.4.3. Acclimatization

Once the developed *in vitro* plants reached 6 – 8 cm in height, they were isolated (Figure 2.6 A, B) and transferred to greenhouse conditions, where they were placed in trays containing a previously determined substrate mixture of red soil + coconut fiber + perlite (1:1:1) (data in process of publication) (Figure 2.6 C). The *in vitro* plants, after the hardening stage in the trays (45 days), were transplanted into bags where they remained for 16–20 weeks. After this time, the *in vitro* plants showed optimal development with long, thick, dark green, shiny, and turgid leaves, and thick and vigorous stems, which demonstrated an adequate physiological state (Figure 2.6 D). Survival of the *in vitro* plants exceeded 98% at the time of transfer to the field.



**Figure 2.6. (A, B) Isolation of *in vitro* plantlets obtained in M3 and M7 media and developed and elongated in M4 medium. (C) Acclimatization in trays with substrate in a greenhouse. (D) Pineapple plants regenerated *in vitro* and ready to be transferred to the field after 20 weeks in polyethylene bags.**

### 2.5. Genetic Stability of the Plants Obtained from *In Vitro* Regeneration.

SSR and ISSR markers were used to assess the genetic stability of pineapple plants that were regenerated in various treatments. Of the 20 SSR primers used for molecular analysis, 15 produced amplification products with adequate resolution and reproducibility to evaluate the genetic stability of the regenerated plants. Table 2.3 shows a total of 21 monomorphic bands for each primer, obtaining 100% monomorphism. The number of amplified fragments for each primer was between 1 and 2 bands, for an average of 1 fragment per primer among all the treatments evaluated. The height of the fragments obtained was in the range of 100 and 300 bp, and 100% monomorphism was observed in all treatments (Figure 2.7). This monomorphism was also corroborated by the analysis of randomly selected individual plants from the treatment where indirect embryogenesis M7 ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D /  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) occurred (Figure 2.7A–C) and the genetic stability of the pineapple *in vitro* plants regenerated in the 10 treatments evaluated for this marker could be appreciated.

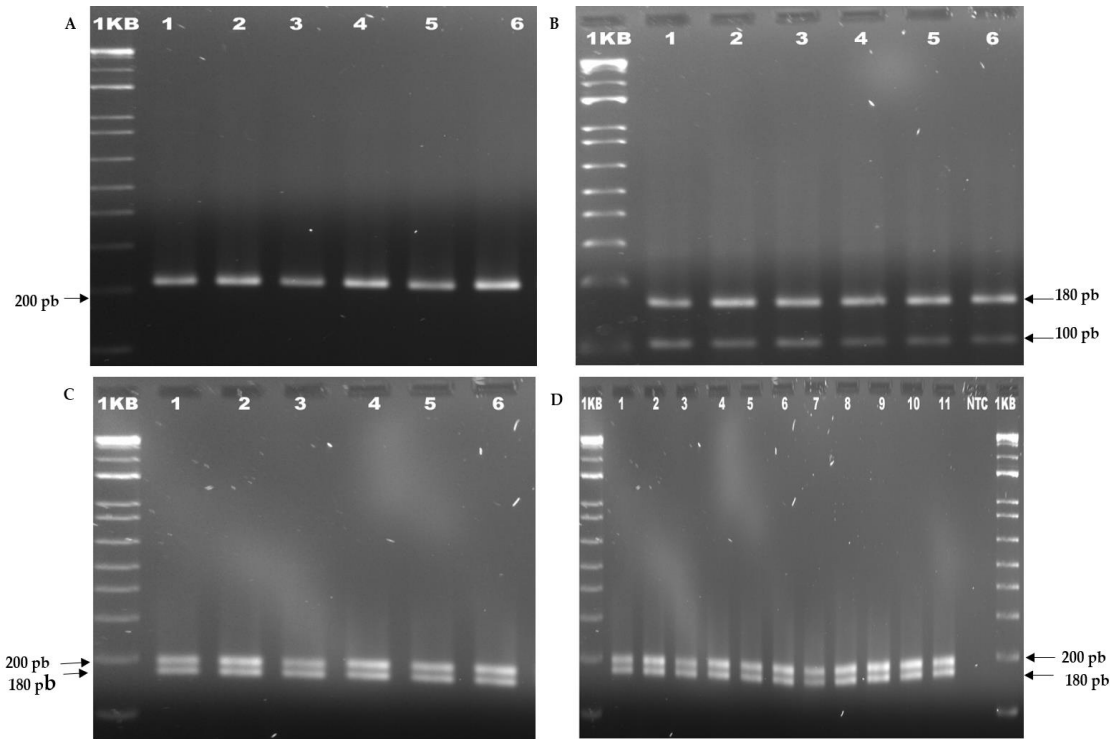
**Table 2.3. SSR primers (Wang *et al.*, 2017) used in this study, alignment temperature, and the number of monomorphic bands obtained with each primer.**

Primer	Secuencias (5' - 3')	Alignment Temperature (°C)	Monomorphic Bands (100)
<b>DT 33 8176</b>	F 5'-CTCCTCATCTACCGCACCTC-3' R 5'-CCCTAGACGACGACGAAGAG-3'	60	1
<b>DT 33 69 54</b>	F 5'-CATCCATCCATCCATCCAAT-3' R 5'-GTCGTTGATCATTGCAAAA-3'	60	2
<b>DT 33 65 61</b>	F 5'-GCAAATGAGGCCACAACTT-3' R 5'-GGGTGGTGTGGACTTTCTCT-3'	60	1
<b>DT 33 69 32</b>	F 5'-GCATGCCAAAGGAAAGAGTT-3' R 5'-CCCTGAACAAATCACCCAAC-3'	60	2
<b>DT 33 70 38</b>	F 5'-CCCTGAAGGTGGAGATTGTG-3' R 5'-AAAAACCAAACCTGGACA-3'	60	1
<b>DT 33 80 91</b>	F 5'-GCTGCTCTTGCTGCCAT-3' R 5'-AAGCCATAGGACCACCAC-3'	60	2
<b>CO731287</b>	F 5'-AGGGAAGCTTTGGAGGTCCAG-3' R 5'-TGCAATAGCGATGATAAACCCAG-3'	60	1
<b>CO 731629</b>	F 5'-AGAAGCGGAAGCGTGTG-3' R 5'-GCGGAGATCGAAGCACTC-3'	60	1
<b>CO 73 12 35</b>	F 5'-ATTTGAGCCCTTGGTCG-3' R 5'-TTTATGGGGTCGCGTCGG-3'	60	1
<b>CO 73 0888</b>	F 5'-CGCATCAGCGCAAACGC-3' R 5'-GGAAGCGAAAGGAGATCG-3'	60	2
<b>CO 73 18 16</b>	F 5'-CTCCTCAGCTTCGTCGCC-3' R 5'-GACGAGATTGGCGTATCCC-3'	60	1
<b>AJ845056</b>	F 5'-TGCTGGCTCTGTGGGATG-3' R 5'-TTAGGTTTTTCAGTGGAGAGAG-3'	60	1
<b>AJ 845081</b>	F 5'-ACATTCCTCAGAGTCACCAGC-3' R 5'-CACTAATCCTTGACCCAGACC-3'	55	2
<b>AJ845060</b>	F 5'-TGTAGGCATATGGTGGGTCTG-3' R 5'-ATCTCTTAATCCAAGGGCCG-3'	60	2
<b>AY098521</b>	F 5'-GTATATCGTGGATGCGGGAG-3' R 5'-AGCATCAAGGGTCCCGAGTT-3'	55	1

Of the five ISSR primers used for the analysis, all were appropriate to observe the monomorphism patterns with adequate resolution and reproducibility. Table 4 shows the total number of bands obtained by each primer, as well as the percentage of monomorphism. Of these 35 monomorphic bands, representing 89.74% of monomorphism, primers IS14 and IS17 were the ones that presented 100% monomorphic bands.

The number of amplified fragments for each primer ranged from 4 to 12 bands, for an average of seven fragments per primer, among all treatments evaluated. The height of the

fragments obtained was in the range of 250 to 2000 bp. Figure 8 shows the band profiles obtained with primer IS19, which showed the highest number of bands.



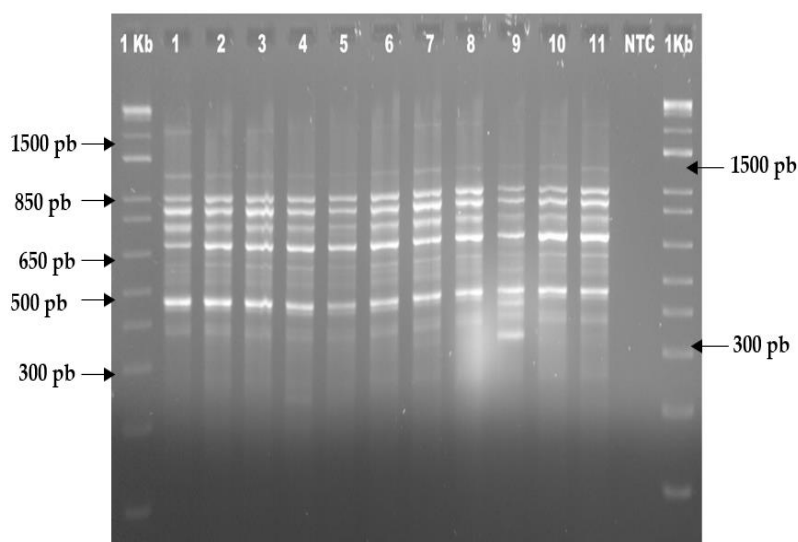
**Figure 2.7. Banding profiles obtained. (A) AJ 805,060 SSR primer. (B) DT 338,091 SSR primer. (C) CO primer 730,888, DNA profiles show 100% monomorphic bands in individual plants from the M7 treatment (2 mg L<sup>-1</sup>, 2,4D, and 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); Lane 1: Hybrid “MD2” donor material. Plants from M7 medium: Lanes 2, 3, 4, 5, and 6. (D) SSR CO 730,888 primer that showed 100% monomorphic bands in the analysis of regenerated plants in all treatments evaluated. 1: ‘MD2’ hybrid donor material; 2: sample of M1 regenerated plants (5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 3: sample of M2 regenerated plants (2 mg L<sup>-1</sup> ANA / 5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 4: sample of M3 regenerated plants (2 mg L<sup>-1</sup> ANA / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 5: sample of M4 regenerated plants (1 mg L<sup>-1</sup> ANA / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 6: sample of regenerated plants in treatment of M5 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D); 7: sample of regenerated plants in treatment of M6 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 8: sample of regenerated plants in treatment of M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 9: sample of regenerated plants in treatment of M8 (3 mg L<sup>-1</sup> P); 10: sample of regenerated plants of M9 (3 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); 11: sample of regenerated plants of M10 (5 mg L<sup>-1</sup> / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); NTC: nontemplate control.**



**Table 2.4. ISSR primers (Weiguo *et al.*, 2005) used in this study, alignment temperature used in the PCR, and the number of monomorphic and polymorphic bands obtained with each primer, PIC value, and percentage of monomorphism.**

Primer	Sequence (3'-5')	Alignment Temperature (°C)	Total Number of Bands	Number of Polymorphic Bands	Number of Monomorphic Bands	PIC	Monomorphism (%)
<b>IS 01</b>	(GACA) <sub>4</sub>	54	4	1	3	0.25	75
<b>IS 13</b>	(CT) <sub>8</sub> GT	54	8	1	7	0.30	87.5
<b>IS 14</b>	(AG) <sub>8</sub> TA	54	10	0	10	0	100
<b>IS 17</b>	(TG) <sub>8</sub> GT	54	5	0	5	0	100
<b>IS 19</b>	(AG) <sub>8</sub> TC	54	12	1	11	0.31	91.67

With respect to the monomorphism detected (Table 5), 100% could be seen with this marker in treatments M3 (2 mg L<sup>-1</sup> BAP / 2 mg L<sup>-1</sup> NAA), M4 (1 mg L<sup>-1</sup> BAP / 1 mg L<sup>-1</sup> NAA), M5 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D), M6 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP), and M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP). At the same time, it was visualized that the treatment with the lowest stability, 94.26%, was the one in which the highest concentration of Picloram, M10 (5 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP), was applied. When the PIC values were calculated, they were very low; an overall value of 0.298 was obtained, which indicates that these are genetically stable plants (Table 2.4).



**Figure 2.8. ISSR primer (IS 19) showed the highest number of bands. 1:Hybrid 'MD2' donor material; 2: sample from regenerated plants in M1 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 3: sample from regenerated plants in M2 (2 mg L<sup>-1</sup> NAA / 5 mg L<sup>-1</sup> BAP); 4:**

sample from regenerated plants in M3 (2 mg L<sup>-1</sup> NAA / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 5: sample from regenerated plants in M4 (1 mg L<sup>-1</sup> NAA / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 6: sample from regenerated plants in M5 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D); 7: sample from regenerated plants in M6 (1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D / 1 mg L<sup>-1</sup> BAP); 8: sample from regenerated plants in M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D / 2 mg L<sup>-1</sup> BAP); 9: sample from regenerated plants in M8 (3 mg L<sup>-1</sup> P); 10: sample from regenerated plants in M9 (3 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); 11: sample from regenerated plants in M10 (5 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP); NTC: nontemplate control.

**Table 2.5. Levels of genetic stability detected by ISSR in the evaluated treatments.**

Treatments	TBMT/TBM	Monomorphism (%)
<b>M1</b>	34/35	97.14
<b>M2</b>	34/35	97.14
<b>M3</b>	35/35	100
<b>M4</b>	35/35	100
<b>M5</b>	35/35	100
<b>M6</b>	35/35	100
<b>M7</b>	35/35	100
<b>M8</b>	34/35	97.14
<b>M9</b>	34/35	97.14
<b>M10</b>	33/35	94.26
<b>Donor Plant</b>	35/35	100

## 2.5. Discussion

Conceptually, the differences between somatic embryogenesis and organogenesis basically distinguish one from the other by the presence of both poles in the somatic embryo (caulinar and radical) and not so in organogenesis; in addition, somatic embryos have no vascular connection with the mother tissue and multiply adventitiously (secondary embryogenesis). In the present investigation, morphogenesis occurred only in the basal segments of the pineapple leaf and demonstrated a structure that was not directly connected to the callus, which subsequently emitted leaves and roots without requiring induction of the process. However, a radical pole is appreciated, apparently structurally rudimentary compared to that of the somatic embryo of other species. Figure 2.2 F, G shows the intense multiplication of the structures, which allows maintaining the cultures at different stages of development: callus proliferation, multiplication of morphogenic structures, and plant development. In the study, different types of tissues were observed: nodular and creamy, compact and brown, and friable and brown, and it was noted that in the treatment with 2,4-D in the presence of BAP (M7), there was a rapid formation of callus and a greater number of these, which may be related to the fact that 2,4-D is a synthetic regulator that stimulates a rapid synchronized cell division (Firoozabady y Moy, 2004; Sripaoraya *et al.*, 2003; Yancheva *et al.* 2003). It was also observed that when the concentrations of 2,4-D and BAP were increased, callus texture was favored and embryogenic callus was obtained, which coincides with that reported by other researchers (Kouadio *et al.*, 2017), who recommended combining cytokinin and auxin to induce embryogenesis in pineapple.

It is worth noting that several years ago, other auxin origin regulators were highlighted to induce callogenesis in pineapple, since many authors considered that in this crop, 2,4-D sometimes inhibited the induction of callus (Nouri *et al.*, 2017; Roostika *et al.*, 2015; Cisneros *et al.*, 1996). However, in the present research, the efficiency of 2,4-D in the induction of embryogenic structures that gave rise to many plants with respect to Picloram was perceived, which disagrees with what was cited by the authors. Therefore, it is not possible to generalize methodologies or work protocols, since the culture media and the selected strategies must be specific for each particular situation, and at the same time, it

must be considered that not all cultivars respond in the same way to in vitro morphogenesis because there must be an interaction or synergic action between the exogenous treatments and the particular endogenous conditions of the plant in question to favor the formation of competent organogenetic meristematic centers in particular areas of the callus and, subsequently, their determination for the development of specific organs (Bennicci *et al.*, 2007). It can be inferred from in vitro regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis that the pattern concerning in vitro regeneration of pineapple plants, in the opinion of several authors, is not well defined (Firoozabady y Moy, 2004; Sripaoraya *et al.*, 2003) Some consider embryogenic callus to be yellowish in color and nodular in appearance, even though no embryos can be distinguished, and use the term “shoots” for plants regenerated from embryogenic tissues (Firoozabady y Moy, 2004). Similarly, if somatic embryos are considered to develop from different structures with a closed vascular system, the term “seedlings” should be the most appropriate, according to other authors (Bennicci *et al.*, 2007).

In the organogenetic system, shoot regeneration was achieved in two ways: shoots were regenerated directly from the bases of the treatment leaves (M1 and M4), or structures of nodular and globular appearance were formed (adventitious organogenesis) (M2), by which multiple sprouting was obtained. It should be appreciated that a group of authors who have worked with species of the Bromeliaceae family (Paola *et al.*, 2015) demonstrated that the basal region of bromeliad leaves presents vascular elements as intercalary axillary meristems that attribute a high regenerative potential to the cells in dedifferentiation when activated by growth regulators and that the induction and development of monopolar structures generates adventitious shoots with high frequencies and that these structures, when isolated from a single explant, can respond and generate adventitious shoots from nodule cultures. Specifically, in the case of the *Vriesea* species, several lines of evidence suggest that the in vitro regenerative pathway follows a specific pattern associated with nodule cluster cultures (Paola *et al.*, 2020) as competent morphogenic structures that are globular in shape, translucent to yellowish in color, and compact in texture. They also posit that, under suitable conditions, these nodule clusters develop into a series of small (0.5 cm long) buds called microhotels, which elongate to give rise to shoots. This terminology is used by them in in vitro regenerative systems in bromeliads and suggests that there are probably some species in this family that exhibit a third morphogenic route, intermediate between somatic embryogenesis and

organogenesis, and that probably exceeds the morphogenic potential of the two best known routes (Paola *et al.*, 2020; Paola *et al.*, 2015) so that future research in culture could value a more in-depth study in this regard.

Although SSR primers have been used to assess the genetic diversity of species (Makaranga *et al.* 2018; Wang *et al.*, 2017) their application in the analysis to detect the incidence of somaclonal variation has not been reported. In turn, ISSRs proved to be very useful in the analysis of the genetic stability of micropropagated plants by different breeding methods (Leite *et al.*, 2016). Hence, in the present investigation, a set of SSR and ISSR primers were used to try to analyze the entire pineapple genome, and the levels of monomorphism that were detected by both methods were evaluated, which was very useful because the application of only one type of molecular marker can underestimate the levels of monomorphism and genetic stability (Borsai *et al.*, 2020). In the evaluation of the results obtained with each marker, ISSRs were shown to be more informative because they provided a greater number of bands than SSRs and were able to detect certain percentages of polymorphism in three of the treatments evaluated: M1 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP), M2 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP / 2 mg L<sup>-1</sup> NAA), and M10 (5 mg L<sup>-1</sup> P / 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP). However, when the PIC value was analyzed, the polymorphism was found to be negligible, which could be considered as monomorphism. The explanation for these differences in the resolution of the two marker systems could be related to the specificity of the species with each primer used (Norhayati *et al.*, 2020) and the characteristic of ISSRs to express many bands compared to SSRs that express few, which consequently influences greater polymorphism. However, using both techniques to analyze the genetic stability in the established regeneration protocols was extremely beneficial because it allowed us to show that they are suitable for clonal propagation of this valuable fruit tree.

The present research is necessary and of great benefit since the response of *A. comosus* to growth regulators with respect to plant regeneration is considered by many researchers as variable, so that similar studies are necessary in the crop to deepen the more precise knowledge of its relationship with the different types of growth regulators, their combinations, and doses capable of stimulating a regenerative process at high frequency. From the different treatments established, it was possible to systematically characterize by optical microscopy the formation and development of morphogenic structures that gave rise to embryogenic and organogenetic tissues that can be propagated and used

continuously as a source for the regeneration of new plants. In addition, when the multiplication coefficient was analyzed, a protocol of high efficiency in short-term regeneration was obtained, since an average of 120 plant shoots representing clones of the hybrid 'MD2' was estimated. It was demonstrated that they are genetically homogeneous plants, so it is expected that the relevant characteristics, such as its high vitamin C and total soluble solids content, its low acidity, the striking color of its pulp, and its long shelf life, which distinguish it from the rest of the pineapple cultivars and make it the most demanded in the international market, will be maintained.

## 2.6 Conclusions

*In vitro* regeneration of pineapple hybrid 'MD2' was achieved in different ways: shoots regenerated directly from the bases of the leaves (M1 and M4), adventitious organogenesis (M2), indirect organogenesis occurred via callus formation (M5, M6, M8, M9, and M10) direct somatic embryogenesis (M3), and indirect somatic embryogenesis (M7). The most efficient treatment was M7 (2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 mg L<sup>-1</sup> BAP) because indirect somatic embryogenesis occurred, with an average of 120 somatic embryos per explant. The application of ISSR and SSR to analyze the genetic stability in the different established regeneration protocols demonstrated that they are suitable for the clonal propagation of this valuable fruit tree. Pineapple plants regenerated *in vitro* were shown to maintain the genetic identity of the donor genotype, which means that indirect somatic embryogenesis can be applied for clonal propagation of *A. comosus*.

### Author Contributions

Conceptualization, N.S. B., and A.K.-D.; methodology, A.C.-F., F.A.B.-P., A.G.-A., D.P.-B. and J.O.M.-C.; investigation, A.K.-D., S.A.A.-V., Y.R.-L. and A.C.-V.; writing—original draft preparation, A.K.-D. and N.S.-B.; writing—review and editing, L.G.I.-A., J.O.M.-C., D.P.-B. and N.S.-B.; project administration, N.S.-B. and A.C.-F.; funding acquisition, N.S.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Funding

This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), grant number PN/2016/3953.

### Acknowledgments

To Yasmin A. Sánchez-Rodríguez, Anuar A. Magaña-Alvarez, and Hernán Morffi-Mestre for technical support.

## CAPITULO III

### Discusión General, Conclusiones y Perspectivas.

#### 3.1 Discusión General.

Se evaluaron seis protocolos para la regeneración de la piña mediante morfogénesis indirecta, vía formación de callos a partir de bases de hojas. En ellos, se apreciaron diferentes tipos de tejidos: nodulares y cremosos, compactos y marrones y friables y marrones y se notó en los tratamientos con el 2,4D en presencia de BAP, una rápida formación de callos y un mayor número de estos, lo que puede estar relacionado a que el 2,4D es un regulador sintético que estimula a una rápida división celular sincronizada (Nouri *et al.*, 2017). También se observó que los callos tuvieron una mejor apariencia en los tratamientos donde se empleó el BAP, lo que coincide con lo informado por Kouadio *et al.*, (2017), quienes combinaron citoquininas y auxinas para inducir callogénesis en piña y constataron que la combinación de ambos reguladores mejoró la textura de los callos.

En diversos estudios (Kouadio *et al.*, 2017; Roostika *et al.*, 2015) se probaron otros tipos de reguladores de origen auxínico, que resultaron de gran potencial para inducir callogénesis en piña, porque se había informado por otros autores, que en este cultivo, el 2,4D no era eficaz en la inducción de callo embriogénico (Cisneros y Daquinta 1995). Sin embargo, en esta investigación se encontró que con el uso del Picloram, la desdiferenciación y la diferenciación celular fueron más demoradas que con el 2,4D, lo que discrepa de lo citado por los autores antes mencionados. Esto se atribuye a una interacción o acción sinérgica entre los tratamientos exógenos y a las condiciones endógenas particulares de la planta en cuestión, lo que va a favorecer, primeramente, la formación de centros meristemáticos competentes en zonas particulares del callo, y posteriormente, su determinación para el desarrollo de órganos específicos (Yancheva *et al.*, 2003). Por ello, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo, porque los medios de cultivo y las estrategias seleccionadas deben ser específicas para cada situación en particular, e igual se debe considerar que no todos los cultivares responden de la misma manera a la morfogénesis *in vitro*.



En el sistema organogénico, la regeneración de los brotes se logró de dos maneras: los brotes se regeneraron directamente a partir de las bases de las hojas, y se formaron neoformaciones de apariencia globulares y nodulares, las que dieron lugar a una brotación múltiple, por lo que también se pudo apreciar morfogénesis indirecta vía organogénesis adventicia. De manera general, se obtuvo un alta capacidad de regeneración, lo que puede estar relacionado con el tipo de explante que se utilizó, que fueron base de hojas de plantas jóvenes, que en este cultivo, la base de las hojas es la sección que mejor responde al proceso de regeneración, porque al estar en las proximidades de los meristemas axilares, contiene regiones meristemáticas o posee tejidos con células que se dividen rápidamente y que son susceptibles a la morfogénesis (Firoozabady *et al.*, 2004). También, se observó en el microscopio óptico la presencia de una pared muy gruesa en las células que rodean los centros meristemáticos lo que reafirma la hipótesis de que hay una relación entre la formación de una barrera estructural para el paso y control de sustancias nutritivas y el desarrollo de los meristemas (Bennicci *et al.*, 2007). Además, se pudo detallar la diferenciación de hebras vasculares en los brotes, lo que puede mejorar la translocación de productos del metabolismo y especialmente de compuestos capaces de promover la organogénesis (Giovannellia *et al.*, 2004).

Akdemir *et al.*, (2016) plantearon que las citoquininas suelen inducir altas tasas de multiplicación y que su uso durante largos períodos de cultivo está vinculado al desarrollo de trastornos morfofisiológicos como la variación somaclonal y / o inestabilidad genética. Sin embargo, en el presente estudio se empleó el BAP en casi todos los tratamientos acompañados con auxinas, como el 2,4D, Picloram y ANA y se obtuvo muy poca inestabilidad. Hay que tener en cuenta, que la variación somaclonal depende del cultivar, del tipo de explante con el que se trabaje, y del número de subcultivos que se realicen (Dhurve *et al.*, 2021). Algunos autores como Lázaro *et al.*, (2018) detectaron un alto número de somaclones en cactáceas, con subcultivos continuos cada 30 días, en la propagación y determinaron, que a partir del octavo subcultivo empezaba a inducirse la variación. En cambio, Leite *et al.*, (2016) para el análisis de la estabilidad genética de un banco de germoplasma de piña, conservado *ex situ*, seleccionaron plantas en el quinto subcultivo, y detectaron que se mantuvo la fidelidad genética, ya que en la mayoría de los perfiles electroforéticos sólo se obtuvo un 7% de polimorfismo. Vale destacar que, en el estudio de caso, se realizaron subcultivos prolongados cada 45 días y no a los 30, y a su

vez, las muestras para el análisis molecular fueron tomadas en el sexto subcultivo, las plantas que se regeneraron por organogénesis adventicia y organogénesis directa, y en el octavo subcultivo las plantas obtenidas a través de callos, o sea no tuvieron largos períodos de conservación, además, se trabajó con la base de hojas de plantas jóvenes, hojillas que estaban en formación, no completamente desarrolladas, por lo que han sido menos expuestas a los reguladores del crecimiento.

Aunque se han empleado algunos cebadores SSR para evaluar la diversidad genética de la especie (Makaranga *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017), su aplicación para analizar la incidencia de la variación somaclonal no se había informado, pero al ser marcadores muy polimórficos, se decidió incluirlos para compararlos con los ISSR, que resultaron muy útiles en el análisis de la estabilidad genética de plantas de piña micropropagadas por diferentes métodos de cultivo (Leite *et al.*, 2016). De ahí, que en la presente investigación se emplearon un conjunto de cebadores SSR e ISSR para abarcar todo el genoma de la piña y se evaluaron los niveles de monomorfismo que fueron detectados con ambos métodos, lo cual resultó muy útil, debido a que la utilización de un solo tipo de marcador molecular pudiera subestimar los niveles de monomorfismo y estabilidad genética (Borsai *et al.*, 2020).

En la valoración de los resultados obtenidos con cada marcador, se mostraron los ISSR más informativos, debido a que aportaron mayor número de bandas que los SSR, y fueron capaces de detectar ciertos porcentajes de polimorfismo en tres de los tratamientos evaluados: B1 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP), B2 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP/ 2 mg L<sup>-1</sup> ANA) y M6 (5 mg L<sup>-1</sup> P/ 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP). Pero cuando se analizó el valor de PIC, se corroboró que era ínfimo el polimorfismo, lo que se consideró monomorfismo. La explicación de estas diferencias en la resolución de los dos sistemas de marcadores, pudiera estar relacionado con la especificidad de la piña para cada cebador utilizado (Norhayati *et al.*, 2020) y por las características propias de los ISSR, de expresar muchas bandas, en comparación con los SSR que generalmente son de pocas, lo que consecuentemente influye en un mayor polimorfismo. No obstante, la aplicación de ambas técnicas para analizar la estabilidad genética de las plantas regeneradas, en los protocolos establecidos, resultó de gran utilidad, ya que permitió demostrar que son idóneos para este objetivo en la propagación clonal de este valioso frutal.

La presente investigación resultó de gran beneficio, ya que pone en práctica una metodología para la propagación clonal del híbrido de piña 'MD2', donde se obtuvo un alto número de plantas a partir de callos que se indujeron en la base de hojas, con la combinación de los fitorreguladores 2,4D y BAP, (Tratamiento M7). Se apreció el gran número de células meristemáticas en división celular activa, que estimula este tratamiento, lo que responde al alto porcentaje de multiplicación observado y posteriormente, se puso en práctica una metodología que permitió un óptimo desarrollo de las plantas en la fase de aclimatización. Por lo que hay que resaltar que se logró un sistema eficiente de regeneración a corto plazo de plantas libres de enfermedades, con buen vigor, genéticamente homogéneas y con un alto nivel de supervivencia *ex vitro*, en el híbrido de piña de mayor demanda en el mercado internacional.

### 3.2 CONCLUSIONES

La regeneración *in vitro* del híbrido de piña 'MD2' se logró de diferentes maneras: brotes regenerados directamente desde la base de las hojas (M1 y M4), organogénesis adventicia (M2), organogénesis indirecta a través de la formación de callos (M5, M6, M8, M9, y M10) embriogénesis somática directa (M3) y embriogénesis somática indirecta (M7).

El tratamiento más eficiente fue el M7 (2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP), donde ocurrió embriogénesis somática indirecta, con un promedio de 120 embriones somáticos por explante.

La aplicación de ISSR y SSR en el análisis de la estabilidad genética, demostró que los diferentes protocolos de regeneración establecidos son adecuados para la propagación clonal de este valioso frutal.

Se demostró que las plantas de piña regeneradas *in vitro* mantienen la homogeneidad genética del genotipo donante, lo que significa que la embriogénesis somática indirecta se puede aplicar para la propagación clonal de *A. comosus*.

La metodología implementada en la fase de aclimatización permitió obtener un alto porcentaje de supervivencia de las plantas en el campo.

Se propone desarrollar un sistema eficiente para la propagación clonal del híbrido de piña 'MD2' mediante embriogénesis somática indirecta.

### 3.3 Perspectivas

A partir de los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral, las perspectivas de transferencia se orientan en dos direcciones:

En primer plano, implementar el sistema de regeneración a corto plazo propuesto en esta investigación, a otros cultivares de *A. comosus* que se necesiten aumentar su coeficiente de multiplicación y a la vez mantener la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

En un segundo plano, establecer un protocolo que induzca variabilidad genética para ampliar la base genética requerida para desarrollar un programa de mejoramiento genético por métodos biotecnológicos en esta especie.

## REFERENCIAS

Abdul, N. A., Chin, B., Razik, M., Madon, M., Khalid, N., Syafawati, N. (2018). Abscisic acid and salinity stress induced somaclonal variation and increased histone deacetylase (HDAC) activity in *Ananas comosus* var. 'MD2'. *Plant Cell Tiss. Org.*, 133, 123 -135.

Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Onay, A., Ozden, Y. (2016). Detection of variation in long term micro propagated mature pistachio via DNA based molecular markers. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 180, 1301-1312.

Al-Saif, A. M., Hissain, A. B., Taha, R. M. (2011). Effects of benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on proliferation and shoot growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 5291- 5295.

Aguilera, G. A., Puentes, C. L., Morillo, Y. (2022). Importancia de los recursos genéticos de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. Comosus) en Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 33, 48 - 171.

Anderson, J. A., Churcill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., Sorrels, M. E. (1992). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36, 181-186.

Antony, E., Taybi, T., Courbot, MIC., Smith, J. A. C., Borland, A. M. (2008). Cloning, localization and expression analysis of vacuolar sugar transporters in the CAM plant *Ananas comosus* (pineapple). *J Exp Bot*, 59, 1895 - 1908.

Aragón, C., Carvalho, L., González-Olmedo, J. L., Escalona, M., Amancio, S. (2012). The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. var 'MD-2') as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Report*, 31, 757-769.

Aragón, C., Pascual, P., González-Olmedo, J. L., Escalona, M., Carvalho, L., Amancio, S. (2013). The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions: proteomic and pranscriptomic profiles. *Plant Cell Report*, 32, 1807-1818.

Atta, R., Laurens, L., Boucheron, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat, V., Chriqui, D. (2009). Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *The Plant Journal*, 57, 626 - 644.

Atawia, A. R., Gioushy, E. L., Sherif, S. S., Kotb, O. M. (2016). Studies on micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.) *Middle East Journal of Agriculture Research*, 05, 224 - 232.

Azcón, J., Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (3ra ed.). Barcelona. McGraw Hill Interamericana. pp. 669.

Baldotto, M. A., Baldotto, L. P., Canellas, F., Olivares, L. (2010). Growth promotion of pineapple 'Vitória' by Humic Acids and burkholderia spp. during acclimatization. *Brasileira de Ciencia do Solo*, 34, 1593 - 1600.

Bartholomew, D. P. (2009). 'MD-2' Pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. *Pineapple News*, International Society of Horticultural Science. *Hawaii*, 8, 2 - 5.

Blanco, H. A., Vargas, T. C., García, T. (2017). Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*, L. Merr.). *Colomb. Biotechnol.*, 19, 7- 20.

Bennici, A., Mori, B., Tani, C., Bussi, B. (2007). Callogenesis and organogenesis in pineapple: A histological and ultrastructural study of developing callus and morphogenic processes. *Hortic. Sci.*, 21, 19 - 27.

Borsai, O., Harta, M., Szabo, K., Kelemen, C. D., Andrecan, F. A., Codrea, M. M., Clapa, D. (2020). Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* propagated blackberry plants using RAPD and SRAP molecular markers. *Hortic. Sci.*, 47, 21 - 27.

Brand, A., Quimbaya, M., Tohme, J., Chavarriaga-Aguirre, P. (2019). Arabidopsis LEC1 and LEC2 orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava. *Front. Plant Sci.*, 10, 673.

---

Carlier, J. D., Sousa, N. H., Santo, T. E., Coppens d' Eeckenbrugge, G., Leitão, J. M. (2012). A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. *Mol. Breed.* 29, 245 - 260.

Cerrato, I. (2013). Estudio de mercado para la comercialización de la piña 'MD2', [online], disponible en <http://pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/3357>. Consultado el 28 de junio de 2018.

Ceusters, N., Valcke, R., Frans, M., Claes, J. E., Ende, W. V., Ceusters. J. (2019). Performance index and PSII connectivity under drought and contrasting light regimes in the CAM Orchid *Phalaenopsis*. *Front Plant Sci*, 10, 10 -12.

Cisnero, A., Daquinta, M., Rodríguez, Y., Escalona, M., Luna, I., Borroto, C. (1996). Influencia de los reguladores del crecimiento clorinados en la embriogénesis somática en piña. *Rev. Bras. Frutic.*, 18, 269 - 274.

Cuéllar, J. F., Somoza, C. E. (2015). Multiplicación *in vitro* de piña 'MD2' (*Ananas comosus* L. Merr) haciendo uso de fertilizantes comerciales. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 4, 77- 87

Daquinta, M., Benegas, R. (1997) Brief review of tissue culture of pineapple. Newsletter of the pineapple. Working Group, International Society Horticultural Science. *Hawai*, 3, 7 – 9.

Difonzo, G., Vollmer, K., Caponio, F., Pasqualone, A., Carle, R., Steingass, C. B. (2019) Characterisation and classification of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) juice from pulp and peel. *Food Control*, 96, 260 - 270.

Dhurve, L., Kumar, K. A., Bhaskar, J., Sobhana, A., Francies, R. M., Mathew, D. (2021) Wide variability among the 'Mauritius' somaclones demonstrates somaclonal variation as a promising improvement strategy in pineapple (*Ananas comosus* L.). *Plant Cell Tiss. Org.*, 145, 701 - 705.

Desjardins, Y., Dubuc, J. F., Badr, A. (2009). In vitro culture of plants: a stress full activity. *Acta Hort*, 812, 29 - 50.



---

El-Sherif, N. A. (2018). Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability. Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II – Soil-Water Plant Nexus. <https://doi.org/10.1007/698>. Consultado 10 de septiembre 2022.

Elizondo, J. A., Campos, C. (2014). Características nutricionales de la cáscara de piña ensilada con cantidades crecientes de urea y heno<sup>1</sup>. *Nutrición Animal Tropical*, 8, 51 - 71.

Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., Borroto, C. G. (1999). Pineapple micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Report.*, 18, 743 - 748.

Espinosa, C. (2014). Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Anana comosus* L. Merr.). Tesis de Maestría. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. México. pp. 42.

Farahani, F. (2014). Micropropagation and growth of *in vitro* pineapple (*Ananas comosus* Merr) in Iran. *Plant Archives*, 14, 337- 341.

Feng, S., Tong, H., Chen, Y., Wang, J., Chen, Y., Sun, G., He, J., Wu, Y. (2013). Development of pineapple microsatellite markers and germplasm genetic diversity analysis. *Biomed Res. Int.*, 317912.

Firoozabady, E., Moy, Y. (2004). Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 40, 67 - 74.

Freschi, L., Rodríguez, M. A., Domínguez, D. S., Purgatto, E., Van Sluys, M. A., Magalhaes, J. R., Kaiser, W. M., Mercier, H. (2010). Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiology*, 152, 1971-1985.

Garcidueñas, J. A. (2013). Caracterización morfológica y molecular de piña (*Ananas Comosus*, (L.) Merr.) Híbrido 'MD2' y su establecimiento in vitro. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Chapingo, México. pp.100.

- Goncalves, S., Martins, N., Romano, A. (2017). Physiological traits and oxidative stress markers during acclimatization of micropropagated plants from two endangered *Plantago* species: *P. algarbiensis* Samp. and *P. almogravensis* Franco. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 53, 249.
- Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development*, 134, 3539 - 3548.
- Gupta, M., Chyi, J., Romero, S., Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet.*, 89, 998 -1006.
- Guzmán, N. M. (1988). Obtención de plantas de piña (*Ananas comosus*, (L.) Merr) por cultivo *in vitro* a partir de yemas axilares de la corona. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. pp. 80.
- Hikal, W. M., Mahmoud, A. A., Hussein, A. H., Ahl, S. A., Bratovcic, A., Tkachenko, K. G., Kakaniova, M., Maldonado, R. (2021). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) waste streams, characterization and valorization: An overview. *Open J. Ecol.*, 11, 610 - 634.
- Horstman, A., Bemer, M., Boutilier, K. A. (2017). Transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4, 201- 216.
- Huchin, J., Jiménez, P., Moo, F. (2016). Diagnóstico de la producción de piña del municipio Bacalar, Quintana Roo. 21 Encuentro Nacional sobre Desarrollo Regional en México, Mérida del 15-18 de noviembre.
- Hurtado, O., De Fera, M., Veitía, N., Pérez, A. (2015). Efecto de la fertilización foliar en la aclimatización de plantas de *Ananas comosus* L. Merr. cultivar 'Cayena Lisa'. *Bioteología Vegetal*, 15, 143 - 149.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell Online*, 25, 3159 - 3173.

---

Jaji, K., Man, N., Nawi, N. M. (2018). Factors affecting pineapple marker supply in Johor, Malaysia. *Int. Food Res. J*, 25, 365 - 371.

Kareem, A., Radhakrishnan, D., Wang, X., Bagavathiappan, S., Trivedi, Z. B., Sugimoto, K., Prasad, K. (2016). Protocol: A method to study the direct reprogramming of lateral root primordia to fertile shoots. *Plant Methods*, 12, 1-14.

Kouadio, O., Kouadio, S., Sodie, Y., Kouassi, K., Oumar, S., Koffi, F., Kouakou, T. (2017). Improved callogenesis and somatic embryogenesis using amino acids and plant growth regulators combination in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae). *Eur. J. Biotechnol. Biosci.*, 5, 6 - 16.

Kuhn, B. M., Nodzynski, T., Errafi, S. (2017). Flavonol - induced changes in PIN2 polarity and auxin transport in the *Arabidopsis thaliana* rol1-2 mutant require phosphatase activity. *Sci Rep.*, 7, 41906.

Kumar, A. (2021). Utilization of Bioactive Components Present in Pineapple Waste: A Review. *The Pharma Innovation Journal*, 10, 954 - 961.

Leitao, J. M. (2018). Genetic mapping in pineapple. In: Ming, R. (ed.) Genetics and genomics of pineapple, Springer International Publishing, Cham, pp. 61- 68.

Leite, R., Fortes, C., Da Silva, C. A., Hilo, E., Henrique, P., Pereira, M. A., Duarte, F. V. (2016). Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. *Plant Cell Tiss. Org.*, 127, 123 -133.

Li, Q., Deng, C., Xia, Y., Kong, L., Zhang, H., Zhang, S., Wang, J. (2017). Identification of novel miRNAs and miRNA expression profiling in embryogenic tissues of *Picea balfouriana* treated by 6-benzylaminopurine. *PLoS ONE*, 12, 1 - 17.

Lin, W., Xiao, X., Zhang, H., Li, Y., Liu, S., Sun, W., Zhang, W., Wu, Q. (2019). Whole-genome bisulfite sequencing reveals a role for DNA methylation in variants from callus culture of pineapple (*Ananas comosus* L.). *Genes*, 10, 877.

---

Loyola, V. M., De la Peña, C., Galaz, R. M. (2008). Plant tissue culture in: Walker J. M, Rapley, R. (eds) Molecular Biomechanics Handbook. Humana Press, Totowa, pp 875 - 904.

Makaranga, A., Songelael, M., Ndee, A., Mnene, E., Mbwambo, G., Lema, K., Godfrey, A., Kachiwile, M., Mrema, M., Theodosy, J. (2018). Diversity and genetic identity of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) in Tanzania based on microsatellite markers. *Afr. J. Biotechnol.*, 17, 811- 817.

Márquez, R., Pérez, C., Ku, A., Galaz, R. M., Loyola, V. M. (2018). Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 255, 695 - 708.

Mengesha, A., Ayenew, B., Tadesse, T. (2013). Acclimatization of *in vitro* propagated pineapple (*Ananas comosus* (L.), var. 'Smooth Cayenne') plantlets to *ex vitro* condition in Ethiopia. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 317- 323.

Mercado, J. N., Tortoledo, O., García, J. M., Báez, R., García, B. Y., Ávila, J., Corella, D. A., Cruz, M. C., Velásquez, D., Zuñiga, B. S. (2019). Calidad comercial de piña 'MD2' (*Ananas comosus* L.) tratada en postcosecha con ácido 2-hidroxibenzoico. *Rev. Iberoam. Tec. Poscosecha*, 20, 1-15.

Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., Vilgays, R. (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.*, 31, 2274 - 2280.

Mondragón, D., Ramírez, I., Flores, M., García, J. (2011). La familia Bromeliaceae en México. pp 89. <https://www.researchgate.net/publication/267324886>

Morales, M., Hernández, M. S., Cabezas, M., Barrera, J., Martínez, O. (2001). Caracterización de la maduración del fruto de piña nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. INDIA. *Agronomía Colombiana*, 18, 7 - 13.

Munive, L. (2015). Producción del cultivo de piña cv. 'Golden' en la Selva Central Mazamari - Satipo (Junín). Tesis de Licenciatura, Lima, Perú. pp. 45.

---

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15, 473 - 497.

Nashima, K., Hosaka, F., Terakami, S., Kuniyama, M., Nishitani, C., Moromizato, CH., Takeuchi, M., Shoda, M., Tarora, K., Urasaki, N., Yamamoto, T. (2020). SSR markers developed using next-generation sequencing technology in pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *Breeding Science*, 70, 415 - 421.

Nelson, B. J., Asare, P., Arthur Junior, R. (2015). *In vitro* growth and multiplication of pineapple under different duration of sterilization and different concentrations of benzylaminopurine and sucrose. *Biotechnology*, 14, 35 - 40.

Neri, J. C., Meléndez, J. B., Vilca, N. C., Huaman, E., Silva, R., Oliva, M. (2021). Effect of planting density on the agronomic performance and fruit quality of three pineapple cultivars (*Ananas comosus* L. Merr.). *International Journal of Agronomy*, 5, 559 - 564.

Nievola, C. C., Kraus, J. E., Freschi, L., Sousa, B. M., Mercier, H. (2005). Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 832 - 837.

Norhayati, S. I., Abdul, S. A., A b, S. F.; Zainal, R. A., Mohd, M. F., Zubir, N. M., Zaynol, R. (2020). Genetic Diversity of Pineapple (*Ananas comosus*) Germplasm in Malaysia Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Trop. Life Sci. Res.*, 31, 15.

Nouri, F., Farahani, F., Noormohammadi, Z. (2017). Somaclonal variation in the *in vitro* regenerated pineapple (*Ananas comosus*): Investigation of the cellular characteristics, biochemical specificities and ISSR markers. *Phytol. Balc.*, 23, 73 - 83.

Paola, J., De Conti, D., Guerra, M. P., Dal Vesco, L. L., Pescador, R. (2020). Dynamics of proteins, carbohydrates and global DNA methylation patterns during induction of nodular cluster cultures from seeds of *Vriesea reitzii*. *Acta Scientiarum. Agron.* 42, 442 - 448.

Paola, J., Schmidt, C. E., Guerra, M. P., Bouzon, Z., Dal Vesco, L. L., Pescador, R. (2015). Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea*

friburgensis Mez var. paludosa L. B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme and *A. Costa* (Bromeliaceae). *J. Microsc. Ultra.*, 3, 200 - 209.

Pazmino, D. M., Rodríguez, M., Romero, M. C., Archilla, A., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M. (2011). Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: Role of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.*, 34, 1874 -1889.

Pérez, M., Flores, M., Martínez, M., Soto, M., García, R., Padilla, D., Castillo, I. (2020). Anti-virulence activities of some *Tillandsia* species (Bromeliaceae). *Botanical Sciences*, 98, 117-127.

Piven, N. M., Barredo, F. A., Borges, I. A., Herrera, M. A., Mayo, A., Herrera, J. L., Robert, M. L. (2001). Reproductive Biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *Am. J. Bot.*, 88, 1966 - 1976.

Pradeep, M., Sarla, N., Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9 - 17.

Prigge, M., Gutiérrez, M. V. (2014). Pineapple Photosynthesis and Leaf Sap pH as a Surrogate of CAM Performance in the Field. A Research Advance. Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for *Horticultural Science*, 21, 18 - 23.

Pulianmackal, A. J., Kareem, A. V., Durgaprasad, K., Trivedi, Z. B., Prasad, K. (2014). Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Plant Science*, 5, 1 -17.

Ramírez, I. (2004). Bromelias. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. Cap. 4. 183 - 184. <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios>.

Reinhardt, D. H., Bartholomew, D., Duarte, F. V., Portugal, A. C., Pinto de Carvalho, T., Pereira de Pádua, R., Junghans, D. T., Pires de Matos, A. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Rev. Bras. Frutic*, 40, 1- 22.

Rodríguez, R., Becquer, R., Pino, Y., López, D., Rodríguez, R., Gustavo, Y. (2016). Producción de frutos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 'MD-2' a partir de vitroplantas. *Cultivos Tropicales*, 37, 40 - 48.

Roostika, I., Khumaida, N., Wahyuning, S. (2015). RAPD analysis to detect somaclonal variation of pineapple *in vitro* cultures during micropropagation. *Biotropia*, 22, 109 - 119.

Roostika, I. T., Mariska, I. (2003). *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: Its utilization and prospect. *Buletin Agrobio*, 6, 34 - 41.

Rueda N. (2019). Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas. Tesis de Licenciatura, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia. pp. 63.

Russel, A. (2017). Piña miel: Un nuevo producto para aumentar la competitividad. 40 casos de éxitos. SAGARPA, 1 – 18. Available online: [https://www.redinnovagro.in/casosexito/2017/Pi%C3%B1a\\_Amador\\_Russell.pdf](https://www.redinnovagro.in/casosexito/2017/Pi%C3%B1a_Amador_Russell.pdf) (Consultado 22 de noviembre 2021).

Ruzin, S. E. (1999). Plant microtechnique and microscopy; Oxford University Press: New York, NY, USA, 198, p. 322.

Roca, W., Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones Cali, Colombia. CIAT. pp. 969.

Santos, M., Buso, G., Torres A. (2008). Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple (*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal) using RAPD markers. *Genet. Mol. Res.* 7, 1097 - 1105.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). Planeación Agrícola Nacional Piña Mexicana 2017-2030. <http://www.sagarpa.gob.mx>.

---

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). Resumen Nacional Intención de cosecha de México. <http://www.gob.mx/siap/acciones-y>. Consultado 10 de agosto 2022.

Shamin, M. D., Kumar, M., Ranjan, T., Ranjan, R., Kumar, A., Kumar, P., Kumar, V., Kumar, P. (2016). Importance of micropropagation in pineapple for disease free plantlets and rapid multiplication. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 5, 359 - 362.

Sharma, S. K., Millam, S., Hedley, P. E., McNicol, J., Bryan, G. J. (2008). Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: An auxin led perspective. *Plant Mol. Biol.*, 68, 185 - 201.

Shahbandeh, M. (2022). Global pineapple production by leading countries 2020. Disponible en: <http://www.statista.com/>. Consultado 27 de Julio de 2022.

Shoda, M., Urasaki, N., Sakiyama, S., Terakami, S., Hosaka, F., Shigeta, N., Nishitani, C., Yamamoto, T. (2012). DNA profiling of pineapple cultivars in Japan discriminated by SSR markers. *Breed. Sci.* 62, 352 - 359.

Silva, R. L., Ferreira, C. F., Ledo, C. A., Souza, E. H., Costa, M. A., Souza, F. V. (2016). Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 123 -133.

Sousa, N., Carlier, J., Santo, T., Leitao, J. (2013). An integrated genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Sci. Hortic.* 157, 113 -118.

Souza, W. C., Nascimento, M., Oliveira, M., Porcino, H., Silva, A. (2017) Genetic diversity of *Fusarium* spp. in pineapple 'Pérola' cultivar. *Fungal Biol.*, 120, 265 - 278.

Sripaoraya, S., Power, B. J., Davey, M. R. (2003). Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 39, 450 - 454.



---

Su, Y. H., Liu, Y. B., Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4, 616 - 625.

Sugimoto, K., Gordon, S. P., Meyerowitz, E. M. (2011). Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation. *Trends in Cell Biology*, 21, 212 - 218.

Sugimoto, K., Jiao, Y., Meyerowitz, E. M. (2010). Arabidopsis Regeneration from Multiple Tissues Occurs via a Root Development Pathway. *Developmental Cell*, 18, 463 - 471.

Tan, X., Calderon, L., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446, 640 - 645.

Tapia-Tussell, R., Quijano, A., Rojas, R., Larque, A., Perez, D. (2005). A fast, simple and reliable high-yielding method for ADN extraction from different plant species. *Mol. Biotechnol.*, 31, 137-139.

Urasaki, N., Goeku, S., Kaneshima, R., Takamine, T., Tarora, T., Takeuchi, M., Moromizato, C., Yonamine, K., Hosaka, F., Terakami, S. (2015). Leaf margin phenotype-specific restriction-site associated DNA-derived markers for pineapple (*Ananas comosus* L.). *Breed. Sci.* 65, 276 - 284.

Usman, I. S., Abdulmalik, M. M., Sani, A. I. A., Muhammad, A. S. (2013). Development of an efficient protocol for micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne). *African Journal of Agricultural*, 8, 2053 - 2056.

Villalobos, V. M., Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación, conceptos, metodología y resultados (1 ed). En Roca, W. Mroginski, L. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. pp. 128 - 133.

Wang, J. S., He, J. H., Chen, J. R., Chen, Y. Y., Qiao, F. (2017). Genetic diversity in various accessions of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) using ISSR and SSR markers. *Biochem. Genet.*, 55, 347 - 366.

- 
- Weiguo, Z., Zhihua, Z., Xuexia, M., Sibao, W., Lin, Z., Yile, P., Yongping, H. (2005). Genetic relatedness among cultivated and wild mulberry (Moraceae: Morus) as revealed by inter-simple sequence repeat analysis in China. *J. Plant Sci.*, 86, 251 - 257.
- Wild, B., Wanek, W., Postl, W., Richter, A. (2010). Contribution of carbon fixed by RubisCO and PEPC to phloem export in the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1375 - 1383.
- Wójcik, A., Wójcikowska, B., Malgorzata D. (2020). Current Perspectives on the Auxin-Mediated Genetic Network that Controls the Induction of Somatic Embryogenesis in Plants. *International Journal and Molecular Sciences*, 21, 1 - 18.
- Wöhrmann, T., Weising, K. (2011). In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor. Appl. Genet.* 123, 635 - 647.
- Wu, K., Jones, R., Danaeberger L., Scolnik, P. A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3257- 3258.
- Yancheva, S. D., Golubowicz, S., Fisher, E., Lev-Yadun, S., Flaishman, A. (2003). Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Sci.*, 165, 299 - 309.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y. (2009). Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *Hort Science*, 44, 757 - 763.
- Zhang, J., Liu J., Ming, R. (2014). Genomic analyses of the CAM plant pineapple. *J Exp Bot.*, 65, 3395 - 3404.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, R. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176 - 183.