

MICROPROPAGACIÓN CLONAL Y ENRAIZAMIENTO *EX VITRO* DE *Ananas comosus* L. «PIÑA DE CASTILLA DEL CHOCÓ»

CLONAL MICROPROPAGATION AND *EX VITRO* ROOTING OF *Ananas comosus* L. «PIÑA DE CASTILLA DEL CHOCÓ»

NIZA SEPÚLVEDA*, MARÍA VICTORIA MURILLO*, ALBERT PALACIOS*, WILBER MURILLO*, MIGUEL A. MEDINA*

RESUMEN

Con el propósito de propagar masivamente la piña de castilla del Chocó, *Ananas comosus*, se multiplicaron *in vitro* brotes provenientes de ápices caulinares extraídos de hijos basales y se subcultivaron en un medio semisólido de Murashige y Skoog (MS), adicionando ocho tratamientos hormonales sin reguladores de crecimiento; 0,25 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA) + 0,5 mg/l de bencilaminopurina (6-BA), y 0,1 mg/l de ANA + 0,8 mg/l de BA, 0,3 mg/l de ANA + 1,0 mg/l de 6-BA, 0,5 mg/l de ANA + 1,5 mg/l de 6-BA, 0,8 mg/l de ANA + 1,8 mg/l de 1,0 mg/l de 6-BA, 0,5 mg/l de ANA + 1,5 mg/l de 6-BA, 0,8 mg/l de ANA + 1,8 mg/l de 6-BA, 1,0 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de 6-BA y 0,3 mg/l de ANA + 1,0 mg/l de 6-BA + 2 mg/l de ácido giberélico (AG3). A los 60 días, el número de brotes por explante (85,3) fue superior al usar 1 mg/l de ANA + 2 mg/l de BA; también el número de brotes cuyo tamaño fue >1 cm (70,3) y de 0,5 a 1 cm (8,5) fueron mayores, el enraizamiento fue *ex vitro*, y a los 30 días las plantas tenían en promedio ocho raíces de 1,5 cm.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; Micropropagación; Piña; Propagación masiva.

ABSTRACT

With the aim of propagating massively the species of pineapple *Ananas comosus* «Pineapple of castilla from Chocó», buds of apices extracted from basal shoots were multiplied *in vitro*. These buds were transferred into a liquid medium of Murashige and Skoog (MS), applying eight different types of hormonal treatments: No growth regulators; 0,25 mg/l of naphthaleneacetic acid (NAA) + 0,5 mg/l of benzylaminopurine (BA), y 0,1 mg/l of NAA + 0,8 mg/l of BA, 0,3 mg/l of NAA + 1,0 mg/l of BA, 0,5 mg/l of NAA + 1,5 mg/l of BA, 0,8 mg/l of NAA + 1,8 mg/l of BA, 1,0 mg/l of 6-BA, 0,5 mg/l of ANA + 1,5 mg/l of 6-BA, 0,8 mg/l of ANA + 1,8 mg/l of 6-BA, 1,0 mg/l of ANA + 2,0 mg/l of 6-BA and 0,3 mg/l of ANA + 1,0 mg/l of 6-BA + 2 mg/l gibberellic acid (AG3). Sixty day later, the number of shoots per explant (85,3) was greater when using 1 mg/l of NAA + 2 mg/l of BA; also the number of shoots with height between 0.5 and 1 cm (8,5) and > 1 cm (70,3) was greater, the rooting was *ex vitro*, at thirty days the plants had eight root of 1,5 cm.

Keywords: *In vitro* culture; Micropropagation; Pineapple; Massive propagation.

INTRODUCCIÓN

La piña es la planta más conocida de las 2,700 especies agrupadas en 56 géneros de la familia Bromeliaceae; es una fruta tropical cultivada para alimento en sistemas productivos (Montilla, 1992) y de pan coger en el departamento del Chocó. Su nombre científico es *Ananas comosus* (L.) Merr. y por no presentar semilla es una especie auto-incompatible que se propaga vegetativamente por brotes

laterales y el enraizado de las hijuelos que se encuentran en la parte superior del fruto. Su fruto es dulce y jugoso considerado como una infrutescencia estéril denominada baya que puede llegar a pesar 2 kg. La tasa de multiplicación de la piña es muy baja en forma natural, debido a que se utiliza como material de cultivo los hijuelos que nacen en las partes superiores de los frutos. De cada planta normalmente se obtiene un hijuelo, lo cual hace muy baja su propagación de forma natural (Páez, 1998).

* Grupo de Investigación en Biotecnología y Recursos Fitogenéticos, Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, Universidad Tecnológica del Chocó «Diego Luis Córdoba», Quibdó, Chocó, Colombia.
e-mail: mmedinarivas@gmail.com

Fecha de recibido: Mayo 29, 2008

Fecha de aprobación: Agosto 21, 2008

El interés por el cultivo de piña se ha incrementado, debido a su demanda de mercado como fruta fresca, materia prima para la agroindustria y producto de exportación. Sin embargo, los productores de piña tienen dificultad para cubrir las necesidades de plantas «hijos» para establecer nuevas plantaciones (Mathews y Ragan, 1979).

La micropropagación permite selección clonal de genotipos sobresalientes por sus características organolépticas, rendimiento, resistentes a plagas y enfermedades; se obtiene una alta tasa de plantas para semillas en cualquier época del año ya que se trabaja en condiciones controladas (Gallardo, 1995; Griffith, 1998).

La línea básica de la investigación en nuestro laboratorio de cultivo de tejidos está orientada, en un futuro, a mejorar la especie chocoana y optimizar su cultivo, mediante trabajos de colección de germoplasma regional tropical.

Se pretende obtener material para propagación, que provenga de plantas de calidad superior, con frutos de buena conformación y tamaño buenas características organolépticas; es importante tener en cuenta que los diferentes métodos de propagación natural para la piña son extremadamente lentos y poco viables para establecimientos de cultivos comerciales intensivos. Por tanto, se ha realizado el presente trabajo con el objeto de establecer un método alternativo para el establecimiento y multiplicación de *Ananas comosus* L. Merr mediante las técnicas de cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del material vegetal. Se emplearon hijuelos y coronas de fruto utilizándose como explantes primarios yemas de la corona y el meristemo de los hijuelos (Fitchet-Purnell, 1993). Una vez obtenido el material vegetal, se procedió a eliminar progresivamente el seudo tallo a una altura aproximada de 10 cm por encima de la inserción de

la hoja en el corno basal, eliminando raíces del rizoma hasta que se observen los tejidos blancos internos (Daquinta *et al.*, 1995; Dolgov *et al.*, 1998).

Aislamiento y cultivo del ápices caulinares. El material vegetal se lavó en una solución de detergente y se enjuagó con suficiente agua destilada; la desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar.

Multiplicación. En esta etapa se utilizaron brotes de piña «de Castilla del Chocó» de 1 cm de longitud aproximadamente, provenientes del cultivo *in vitro* de ápices caulinares extraídos de hijos basales y de corona, que se establecieron en medio básico semisólido (7 g/l de agar) de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), por 20 días hasta obtener los brotes.

Los brotes se transfirieron a un medio que contenía bencilaminopurina (BA) y ácido naftalenoacético (ANA). Con ocho tratamientos hormonales, sin reguladores de crecimiento: 0,25 mg/l de ANA + 0,5 mg/l de bencilaminopurina (6-BA), y 0,1 mg/l de ANA + 0,8 mg/l de BA, 0,3 mg/l de ANA + 1,0 mg/l de 6-BA, 0,5 mg/l de ANA + 1,5 mg/l de 6-BA, 0,8 mg/l de ANA + 1,8 mg/l de 1,0 mg/l de 6-BA, 0,5 mg/l de ANA + 1,5 mg/l de 6-BA, 0,8 mg/l de ANA + 1,8 mg/l de 6-BA, 1,0 mg/l de ANA + 2,0 mg/l de 6-BA y 0,3 mg/l de ANA + 1,0 mg/l de 6-BA + 2 mg/l de ácido giberélico (AG3)). El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 0,1$ y se esterilizó a 121°C y a 15 lb.pul-2 de presión por 15 minutos. Se cultivó un explante por frascos de compota con 10 ml del medio, los cuales se colocaron en una cámara de crecimiento a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ a 15 horas de fotoperíodo 60 días, la intensidad luminosa fue de 1.500 a 2.000 lux fría/suministrada por tubos fluorescentes de 36W, Silvana) equivalente a 34-90 m E/s/m².

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento y un

Tabla 1
Efecto de la bencilaminopurina (BA) y los ácidos naftalenoacético (ANA) y giberélico (AG3)
sobre el número de brotes por explante y el tamaño de los brotes obtenido en el proceso
de micropropagación de *Ananas comosus* «Piña de castilla del Chocó»

Tratamientos			Brotes por explantes	Número de brotes - Tamaño alcanzado		
6.BA	ANA	GA3		> 1 cm	0,5 - 1 cm	< 0,5 cm
0	0	0	1,0	1,0	0,0	0,0
0,25	0,25	0	2,6	1,6	1,0	0,0
0,8	0,1	0	5,7	4,3	0,5	1,2
1,0	0,3	0	9,4	5,5	2,4	1,3
1,5	0,5	0	25,9	20,4	4,1	1,4
1,8	0,8	0	45,7	35,6	8,2	
2,0	1,0	0	85,3	70,3	8,5	
1,0	0,3	2,0	9,4	5,5	0,4	1,3

frasco como unidad experimental (CoHort Software). Las variables evaluadas fueron número y tamaño de brotes; esta última clasificada de la siguiente manera: >1 cm; de 0,5 a 1 cm y <0,5 cm.

Enraizamiento *ex vitro*. Para esta etapa se seleccionaron brotes mayores de 1 cm provenientes de la fase de multiplicación, eliminando sus hojas basales y colocándolos en materas en un medio preparado con tierra de hormiga, arena fina y musgo en proporciones iguales. El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental estuvo constituida por un matera con 1 explante. Las variables estudiadas fueron el número y la longitud máxima de raíces.

Para evaluar los resultados obtenidos, los datos se procesaron estadísticamente mediante el programa Cohort 2, versión 6,003 realizando el análisis de la varianza correspondiente al diseño empleado. Para la separación de medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significación del 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación. Se observó que hubo diferencias significativas para la variable número de brotes por explante, resultando superior el tratamiento con 1 mg/l de ANA + 2 mg/l de BA, con un promedio de 85,3 brotes por explante. Esta misma respuesta se presentó para los tamaños de brotes superiores a 1 cm y entre 0,5 a 1 cm, en los cuales se registró el mayor número de brotes con promedios de 70,3 y 8,5 respectivamente. Por el contrario, para los brotes inferiores a 0,5 cm todos los tratamientos hormonales generaron resultados similares (Tabla 1). A pesar de que en el tratamiento 8 estaba presente el ácido giberélico, este tratamiento fue similar al 4 con la diferencia que se le adicionó ácido giberélico, regulador de crecimiento que promueve el alargamiento celular, el tamaño de los brotes fue similar que el tratamiento 4. Esto posiblemente se debió a la combinación con BA, que estimula la formación de brotes o a que la dosis empleada no fue la más adecuada (Mogollón *et al.*, Smith, 2000).

Los resultados obtenidos en esta fase son similares

a los reportados para las variedades de piña «Primavera» y «Perola» (Almeida *et al.*, 1995), donde la bencilaminopurina fue efectiva para la proliferación de los brotes, aunque utilizada en concentraciones mayores. Sin embargo, el número de brotes por explante fue superior al de «Queen Australia», ya que variaron de 1,4 a 3,2 en ambos cultivares. Por otra parte, los resultados difieren de los observados en los cultivares «Española Roja», «Nacional» y «Brecheche», en los que la multiplicación acelerada se logró combinado 2 mg/l de ácido indol acético y 2 mg/l de cinetina con 40 mg/l de sulfato de adenina (Casale y García, 1987). A pesar de la mayor cantidad de reguladores de crecimiento, reportaron menores tasas de multiplicación que las obtenidas el presente trabajo de investigación.

CONCLUSIONES

1. La combinación de los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) y bencil amino purina (BA) permite la propagación masiva de la piña de castilla del Chocó en un promedio alto.
2. La mejor combinación de los reguladores de crecimiento fueron 1 mg/l de ANA y 2 mg/l de BA.
3. Cuando se agregó al medio de cultivo el ácido giberelico (GA3), no presentó efecto importante en el crecimiento de las plantas *in vitro*.
4. El enraizamiento *ex vitro* es efectivo y ocurre en menor tiempo que *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- Almeida de, W.A.**, A. P. de Matos y A. da S. Souza. 1995. Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Hort.* 425: 235-42.
- Casale, I.** y E. de García. 1987. *Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña*. AVEVIV.2:3-18.
- CoHort Software.** 1990. Bekerly: CoHort 2 Statistical Package.
- Daquinta, M.**, R. Benega, T. Martínez y R. Castillo. 1995. Estaquillado de hojas de piña *in vitro*. Centro de Bioplasmas, Instituto Superior Agrícola de Ciego de Ávila. Cuba. *Centro Agrícola.* 2: 82-7.
- Dolgov, S.V.**, T. V. Shushkova y A. P. Firsov. 1998. Pineapple (*Ananas comosus* Mess.) regeneration from leaf explants. *Acta Hort.* 461: 439-44.
- Fitchet-Purnell, M.** 1993. Maximum utilization of pineapple crowns for micropropagation. *Acta Hort.* 334: 325-30.
- Gallardo, M.** 1995. *Bioteconología aplicada al cultivo de la piña*. Maturín: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 p.
- González, M.**, N. Mogollón y J.G. Díaz. 2003. Efecto del ácido naftalenoacético y el tamaño del explante sobre el enraizamiento de *Aechmea fasciata* cultivada *in vitro*. Mérida: Memorias del XV Congreso Venezolano de Botánica, diciembre, 2003. p. 62.
- Griffith, L.P.** 1998. *Tropical foliage plants*. Batavia: A Grower's Guide. Ball Publishing. 318 p.
- Mathews, V.H.** y T.S. Ragan. 1979. Multiple plantlets in lateral bud an leaf explant *in vitro* cultures of pineapple. *Scientia Hort.* 11: 319-28.
- Mogollón, N.**, M. González y M. Liendo. 2003. Efecto de dos tipos de reguladores en el enraizamiento del cocuy (*Agave cocui* Trelease) cultivado *in vitro*. *Acta Cient Venez.* 1: 45-9.
- Montilla de Bravo, I.** 1992. El cultivo de la piña en la región occidental. En: Tirado, M. (Ed.). *Curso sobre fruticultura tropical*. Maturín: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Estación Experimental Monagas. 184 p.
- Murashige, T.** y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-97.
- Páez, M.G.** 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas* spp. *Proc Interamer Soc Trop Hort.* 42: 128-32.
- Smith, R.** 2000. *Plant tissue culture. Techniques and experiments*. San Diego: Academic Press. 231p.