

Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia"

Clonal multiplication and *in vitro* rooting of *Ananas comosus* L. "Queen Australia"

N. Mogollón¹, J. G. Díaz¹ y N. Hernández¹

¹Posgrados de Agronomía. Programa de Horticultura. Unidad de Biotecnología. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Apdo 400. Barquisimeto-Lara.

Resumen

Con el propósito de propagar masivamente la piña, *Ananas comosus* 'Queen Australia', se multiplicaron *in vitro* brotes provenientes de ápices caulinares extraídos de hijos basales. Estos se transfirieron a medio líquido de Murashige y Skoog (MS), adicionando tres tratamientos hormonales: sin reguladores de crecimiento; 0,01 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) + 1,0 mg.L⁻¹ de bencilaminopurina (BA) y 0,01 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BA + 2 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃). A las ocho semanas, el número de brotes explante⁻¹ (38,6) fue superior al usar 0,01 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BA; también el número de brotes cuyo tamaño fue >1 cm (22,3) y de 0,5 a 1 cm (12,8) fueron mayores. Para el enraizamiento se cultivaron brotes >1 cm en un medio semisólido de MS + ANA en las concentraciones de 0; 0,25; 0,50; 1,0 y 2,0 mg.L⁻¹. A las cuatro semanas, el mayor número de raíces (28,4) se registró al usar 2,0 mg.L⁻¹; mientras que la longitud máxima de raíces tuvo el mismo comportamiento en las cuatro dosis menores (1,3 a 1,6 cm), siendo superior a la longitud obtenida con 2,0 mg.L⁻¹ (0,5 cm). La multiplicación masiva se logró con la combinación BA-ANA en medio líquido; mientras que el enraizamiento fue satisfactorio con ANA en medio semisólido.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, micropropagación, piña, propagación masiva.

Recibido el 6-7-2004 ● Aceptado el 15-9-2004

¹Autor para correspondencia correo electrónico: norcam@intercable.net.ve; josegdiaz@hotmail.com

Abstract

With the aim of propagating massively the species of pineapple *Ananas comosus* "Queen Australia", 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 three different types of hormonal treatments: No growth regulators; 0.01 mg.L⁻¹ of naftaleneacetic acid (NAA) + 1.0 mg.L⁻¹ of benzylaminopurine (BA), and 0.01 mg.L⁻¹ NAA + 1.0 mg.L⁻¹ BA + 2.0 mg.L⁻¹ of gibberellic acid (GA₃). Eight weeks later, the number of shoots per explant (38.6) was greater when using 0.01 mg.L⁻¹ NAA + 1.0 mg.L⁻¹ BA; also the number of shoots with height between 0.5 and 1.0 cm (12.8) and > 1 cm (22.3) was greater. To carry out the rooting process, shoots with height over 1 cm were cultivated in a quasi-solid medium of MS + NAA in the following concentrations: 0, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹. After four weeks, the largest number of roots (28.4) was registered when using 2.0 mg.L⁻¹. NAA, while the maximum root length of the first four treatments was similar to each other (1.3 to 1.6 cm), being larger than the length obtained with 2.0 mg.L⁻¹. NAA (0.5 cm). The massive multiplication was achieved with the combination BA-NAA in liquid medium, whereas the rooting of the plants was met with ANA in quasi-solid medium.

Key words: *In vitro* culture, micropropagation, pineapple, massive propagation.

Introducción

La piña (*Ananas comosus* L.) es la especie mas importante de la familia Bromeliaceae, originaria de Sudamérica; se encuentra en forma natural al sur de Brasil, norte de Argentina y Paraguay y en los bordes meridionales de Amazonia (14). El interés por este cultivo se ha incrementado, debido a su demanda de mercado como fruta fresca, materia prima para la agroindustria y producto de exportación (7, 12). Sin embargo, los productores de piña tienen dificultad para cubrir las necesidades de plantas «hijos» para establecer nuevas plantaciones, para lo cual se estima que se requieren 30.000 plantas ha⁻¹. La carencia de plantas se debe a que la tasa de multiplicación es muy

baja en forma natural; además esta vía de propagación propicia la diseminación de enfermedades (7, 9, 12). En este sentido, la biotecnología ofrece alternativas tanto para el abastecimiento de material de plantación suficiente, como para mejorar la calidad de los frutos (7, 15). Mediante las técnicas de cultivo *in vitro* es posible la micropropagación masiva de la piña para la obtención de plantas que pueden ser ofrecidas a los productores (7). Esto ha sido reportado por varios autores, utilizando diferentes explantes: yemas de la corona (6), yemas axilares (1, 2, 10) y secciones de hojas (4, 5, 10), logrando regenerar brotes en diversos medios de cultivo. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como ob-

jetivo evaluar el efecto de reguladores del crecimiento sobre la multiplicación masiva y enraizamiento de los

brotos obtenidos *in vitro* en el cultivar de piña Queen Australia.

Materiales y métodos

Multiplicación. En esta etapa se utilizaron brotes de piña "Queen Australia" de 1,0 cm de longitud, aproximadamente, provenientes del cultivo *in vitro* de ápices caulinares extraídos de hijos basales, los cuales se establecieron en medio semisólido (8 g.L⁻¹ de agar) de Murashige y Skoog (MS) (13), adicionando 1,0 mg.L⁻¹ de bencilaminopurina (BA) y 0,01 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA). Dichos brotes se transfirieron a un medio líquido, cuya formulación fue igual a la empleada para el establecimiento, incorporando tres tratamientos. T1: sin reguladores de crecimiento; T2: 0,01 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BA (1, 2, 4) y T3: igual a T2, pero adicionando 2 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) (7). El pH del medio se ajustó a 5,7 ± 0,1 y se esterilizó a 121°C y a 15 lb.pul² de presión por 15 minutos. Se cultivaron dos explantes por frascos de 180 ml de capacidad con 20 ml del medio, los cuales se colocaron en una mesa de agitación (30 rpm) a 33,8 μmol.m⁻².s⁻¹ de luminosidad y 16 horas de fotoperíodo, durante 8 semanas. El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento y un frasco como unidad experimental. Las variables evaluadas fueron: número y tamaño de

brotos; esta última clasificada de la siguiente manera: >1 cm; de 0,5 a 1 cm y < 0,5 cm.

Enraizamiento. Para esta etapa se seleccionaron brotes mayores de 1 cm provenientes de la fase de multiplicación, eliminando sus hojas basales y colocándolos en un medio semisólido de MS, adicionando ANA en las siguientes concentraciones: 0 (T1); 0,25 (T2); 0,50 (T3); 1,0 (T4) y 2,0 (T5) mg.L⁻¹. Una vez cultivados en forma similar a la señalada anteriormente, se colocaron a 135 μmol.m⁻².s⁻¹ de luminosidad por 4 semanas. El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco con 2 explantes. Las variables estudiadas fueron el número y longitud máxima de raíces.

Para evaluar los resultados obtenidos en las etapas de multiplicación y enraizamiento, los datos fueron procesados estadísticamente mediante el programa Cohort 2, versión 6,003 (3), 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 altamente significativas para la variable número de brotes por explante, resultando superior el tratamiento con 0,01 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BA, con un promedio de 38,6 brotes/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 22,3 y 12,8, respectivamente. Por el contrario, para los brotes inferiores a 0,5 cm, todos los tratamientos hormonales generaron resultados similares (cuadro 1). A pesar de que en el T3 estaba presente el ácido giberélico, regulador de crecimiento que promueve el alargamiento celular, el tamaño de los brotes fue

inferior que en el T2. Esto posiblemente se debió a la combinación con BA, la cual estimula la formación de brotes o a que la dosis empleada no fue la más adecuada (15).

Los resultados obtenidos en esta fase son similares a los reportados para las variedades de piña "Primavera" y "Perola" (1), donde la bencilaminopurina fue efectiva para la proliferación de los brotes, aunque utilizada en concentraciones mayores. Sin embargo, el número de brotes explante⁻¹ fue inferior 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

Cuadro 1. Efecto de la bencilaminopurina (BA) y los ácidos naftalenoacético (ANA) y giberélico (AG₃) sobre el número de brotes por explante y número de brotes por tamaño obtenido durante la etapa de multiplicación *in vitro* de *Ananas comosus* "Queen Australia".

Tratamientos (mg.L ⁻¹)	Número de brotes.explante ⁻¹	Número de brotes.tamaño alcanzado ⁻¹		
		> 1 cm	0,5 – 1 cm	< 0,5 cm
T1 Testigo	3,1 ^c	2,8 ^c	0,1 ^c	0,2 ns
T2 1,0 BA + 0,01 ANA	38,6 ^a	22,3 ^a	12,8 ^a	3,5
T3 1,0 BA + 0,01 ANA + 2,0 AG ₃	13,8 ^b	11,7 ^b	1,2 ^b	0,9
CV	16,5	13,8	11,5	18,2

Defiencias abreviaturas

mg.L⁻¹ de ácido indol acético y 2 mg.L⁻¹ de cinetina con 40 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina (2). A pesar de la mayor cantidad de reguladores de crecimiento, reportaron menores tasas de multiplicación que las obtenidas en la presente investigación.

Enraizamiento. En esta etapa se detectaron diferencias altamente significativas para las dos variables evaluadas (cuadro 2). El número de raíces se incrementó a medida que aumentó la dosis de ANA, obteniéndose el mayor promedio de raíces (28,4) con 2,0 mg.L⁻¹ de ANA. Con respecto a la longitud máxima de raíces, los primeros cuatro tratamientos tuvieron el mismo comportamiento, variando de 1,6 a 1,3 cm, siendo superiores al T5, en el cual se registró el promedio de longitud de raíz mas bajo (0,47 cm). Debido a que el proceso de rizogénesis también ocurrió en el tratamiento sin reguladores, se considera que la auxina no es necesaria para el enraizamiento, ni crecimiento de las raíces de piña, lo cual también fue encontrado durante

la propagación *in vitro* de los cultivares "Española Roja", "Nacional" y "Brecheche" (2), así como en "Perola" y "Primavera" (1). Esto difiere de otros autores (6) que han reportado buenos resultados con la aplicación de 1 mg.L⁻¹ de ANA para inducir la rizogénesis en la piña.

Para el enraizamiento de brotes *in vitro* de *Aechmea fascista*, bromeliacea ornamental de gran importancia hortícola, se utilizó el ANA en las dosis de 0,5 a 2,0 mg.L⁻¹, no detectándose diferencias significativas entre ellas (8), lo cual difiere de lo encontrado en el cultivar de piña en estudio. Sin embargo, recomendaron el uso de la menor concentración de ANA (0,5 mg.L⁻¹), con la cual obtuvieron 6,9 raíces de 1,09 cm de longitud, logrando alta sobrevivencia de las vitroplantas. Así mismo, para enraizar los brotes de "Queen Austarlia" se sugiere la dosis de 0,25 mg.L⁻¹, la cual mejoró significativamente el número de raíces (7,1) y la longitud de las mismas (1,6 cm). Dichos valores se consideran suficientes para la aclimatación de las vitroplantas (11).

Cuadro 2. Efecto del ácido naftalenoacético sobre el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *Ananas comosus*. "Queen Australia".

Acido Naftalenoacético (mg.L ⁻¹)	Número de raíces	Longitud máxima de raíces (cm)
0 (T1)	4,1 ^d	1,6 ^a
0,25 (T2)	7,1 ^{cd}	1,6 ^a
0,50 (T3)	10,6 ^c	1,6 ^a
1,0 (T4)	16,1 ^b	1,3 ^a
2,0 (T5)	28,4 ^a	0,5 ^b
CV (%)	12,6	10,5

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan (P≤0,01).

Conclusión

Se logró una alta tasa de multiplicación clonal *in vitro* de *Ananas comosus* 'Queen Australia', con la combinación 1,0 mg.L⁻¹ de BA + 0,01 mg.L⁻¹ de ANA adicionada en medio

líquido con agitación; mientras que el enraizamiento fue estimulado con 0,25 mg.L⁻¹ de ANA en medio semisólido.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Centroccidental «Lisandro

Alvarado por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación

Literatura citada

1. 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: 235-242.
2. Casale, I. y E. de García. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. AVEVIV 2:3-18
3. CoHort Software. 1990. CoHort 2 Statistical Package. Bekerly, California.
4. Daquinta, M., R. Benega, T. Martínez y R. Castillo. 1995. Estaquillado de hojas de piña *in vitro*. Centro de Bioplantás. Instituto Superior Agrícola de Ciego de Ávila. Cuba. Centro Agrícola 2: 82-87.
5. Dolgov, S.V., T. V. Shushkova y A. P. Firsov. 1998. Pineapple (*Ananas comosus* Mess.) regeneration from leaf explants. Acta Hort. 461: 439-444.
6. Fitchet-Purnell, M. 1993. Maximum utilization of pineapple crowns for micropropagation. Acta Hort. 334: 325-330
7. Gallardo, M. 1995. Biotecnología aplicada al cultivo de la piña. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 p.
8. 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*. Memorias del XV Congreso Venezolano de Botánica. Diciembre, 2003. Mérida. Edo. Mérida. pp. 62.
9. Griffith, L.P. 1998. Tropical Foliage Plants. A Grower's Guide. Ball Publishing Batavia, Illinois. USA. 318 p.
10. Mathews, V.H. y T.S. Ragan. 1979. Multiple plantlets in lateral bud an leaf explant *in vitro* cultures of pineapple. Scientia Hort. 11: 319-328.
11. 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*. LIII Convención Anual de AsoVAC. Noviembre, 2003. Maracaibo, Edo. Zulia. Acta Científica Venezolana. pp 45.
12. Montilla de Bravo, I. 1992. El cultivo de la piña en la Región Occidental. En: Tirado, M. (Ed.). Curso sobre Fruticultura Tropical. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Estación Experimental Monagas. Maturín. 184 p.

13. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
14. Páez, M.G. 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas* spp. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 42:128-132.
15. Smith, R. 2000. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments.* Academic Press. San Diego. USA. 231p.