

MICROPROPAGACIÓN CLONAL DE TRES VARIEDADES DE PIÑA NATIVAS DE LA REGIÓN AMAZÓNICA MEDIANTE CULTIVO DE YEMAS AXILARES Y APICALES

Héctor A. Blanco F., Teresa E. Vargas y Eva de García

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo establecer un sistema de propagación clonal eficiente de tres variedades de piña (*Ananas comosus* L., Merr.) autóctonas del Amazonas venezolano. Se cultivaron *in vitro* yemas apicales y laterales de las variedades ERUWÁ CANÁ (EC), TABÉ CANÁ (TC) y GOBERNADORA (GOB). En la fase inicial, explantes (con yemas) fueron descontaminados e inoculados en seis medios con diferentes concentraciones de auxinas, citocininas y tiamina. Se probaron dos valores de pH: 5,8 y 5,4. A las cuatro semanas hubo brotación de una yema axilar en TC (MI3), yema apical en EC (MI4) y yema axilar en GOB (MI6). Los medios MI1, MI4 y MI6 contenían 5mg·l⁻¹ de tiamina, con pH 5,4. Las concentraciones endógenas de auxinas y citocininas difieren en

cada una de las tres variedades y no se observó un patrón común en relación a las proporciones de auxinas y citocininas requeridas para la inducción de brotes. Solamente se observó brotación en medios con tiamina 5mg·l⁻¹ y pH 5,4 independientemente de la concentración de auxinas y citocininas presente en los medios. La multiplicación de los brotes en las tres variedades se obtuvo en medios con iguales concentraciones de auxinas y citocininas. La variedad TC presentó la mayor cantidad de brotes por explante (9, 18). El sistema de inmersión temporal 'RITA's' incrementó significativamente la tasa de multiplicación de los brotes. El enraizamiento de los vástagos se obtuvo *in vitro* en medios sin sustancias de crecimiento y el traslado a tierra fue exitoso.

Introducción

En Venezuela, la piña (*Ananas comosus* L., Merr.) es uno de los frutos autóctonos que ha mantenido su aceptación y conservado su cultivo, compitiendo con otras frutas exóticas. En el país, la piña es el sexto rubro vegetal en importancia después del arroz, maíz, caña de azúcar, plátano y banano. A nivel mundial, Venezuela ocupa el puesto número 12 entre los principales países productores con 363.075TM producidas en 2007 (FAO, 2009).

En la región Amazónica venezolana, el cultivo de la piña es llevado a cabo, principalmente, por aborígenes de la etnia Piaroa, localizada en Betania del Topocho, Municipio Átures, Estado Amazonas. Esta actividad económica for-

ma parte de su cultura ancestral.

El mecanismo reproductivo de la especie *Ananas comosus* (Bromeliaceae), es vegetativo (partenocárpico) y la tasa de crecimiento y multiplicación es lenta. El tiempo requerido para la fructificación, a partir de la siembra de propágulos, es cercano a un año (Roostika y Mariska, 2003). La propagación por el método convencional (vegetativo) de las plantas de piña produce un número muy limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para la plantación a gran escala. Además de la limitación del método convencional, los cultivos son atacados por insectos y hongos que producen marchitamiento, fusariosis y la pudrición de la base del tallo, enfermedades que perju-

dican el cultivo afectando negativamente la producción comercial del fruto (Santos y Matos, 1995; Coppens *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002).

El cultivo *in vitro* es una alternativa biotecnológica que permite la propagación masiva de plantas de piña libres de enfermedades y en tiempos relativamente cortos. El método de micropropagación ha sido utilizado por diferentes autores, obteniéndose diversos protocolos para el establecimiento de cultivo *in vitro* de la piña (Casale y De García, 1987; Sripaoraya *et al.*, 2003; Mogollón *et al.*, 2004; De García *et al.*, 2008; Saucedo *et al.*, 2008). Además, permite la obtención de plantas *de novo* mediante procesos organogénicos y embriogénesis somática (Sripaoraya *et al.*, 2003; Firoozabady y Gutter-

son, 2003; Roostika y Mariska, 2003; Firoozabady y Moy, 2004; Amin *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se tuvo como objetivo establecer un protocolo eficiente de multiplicación clonal masiva de tres variedades de piña autóctonas del Amazonas venezolano, a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares y/o apicales, aisladas de plantas provenientes de esa región. El material producido en esta investigación será entregado a la comunidad Piaroa para su evaluación en campo y posterior industrialización de los frutos.

Materiales y Métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado en el establecimiento

PALABRAS CLAVE / Amazonas / *Ananas comosus* / Cultivo *in vitro* / Piña / Propagación /

Recibido: 05/04/2010. Modificado: 26/04/2011. Aceptado: 02/05/2011.

Héctor A. Blanco. Licenciado en Biología y Estudiante del Postgrado en Botánica, Universidad Central de Venezuela (UCV). Asistente de Investigación, UCV, Venezuela (Proyecto PSUV-03-71617-2009/1).

Teresa Edith Vargas. Licenciada en Biología y Doctora en Ciencias, UCV, Asistente de Investigación, Instituto de Biología Experimental (IBE-UCV) y Profesora, UCV, Venezuela.

Eva de García. Licenciada en Biología, UCV, Venezuela. M.Sc., University of Wisconsin-Madison, EEUU. Doctora en Ciencias, UCV, Venezuela. Profesora, UCV, Venezuela. Dirección: Laboratorio de Bio-

tecnología Vegetal. Instituto de Biología Experimental (IBE). Facultad de Ciencias, UCV. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas 1041. Venezuela. e-mail: evacrisga@hotmail.com

CLONAL MICROPROPAGATION OF THREE VARIETIES OF AMAZONIAN PINEAPPLE THROUGH CULTURE OF AXILAR AND APICAL BUDS

Héctor A. Blanco F., Teresa E. Vargas and Eva de García

SUMMARY

The objective of the present study was to establish an efficient clonal propagation of three varieties of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.) indigenous to the Venezuelan Amazon. Apical and lateral buds of varieties: ERUWÁ CANÁ (EC), TABÉ CANÁ (CT) and GOVERNOR (GOB), were grown in vitro. In the initial phase, explants (with buds) were decontaminated and inoculated on six different media with various combinations of auxins, cytokinins and thiamine. Two pH values, 5.8 and 5.4, were tested. After four weeks of culture, there was axillary bud sprouting from TC (MI3), apical bud from EC (MI4), and axillary bud from GOB (MI6). The media MI1, MI4 and MI6 contained $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ thiamine and had pH 5.4. The endogenous concentrations

of auxins and cytokinins differed in each of the three varieties, and there was no common pattern in relation to the proportions of auxins and cytokinins required for induction of outbreaks. There was sprouting only in media with thiamine $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and pH 5.4, regardless of the concentrations of auxins and cytokinins present in the media. Shoot multiplication in the three varieties was obtained in media containing equal concentrations of auxins and cytokinins; the TC variety had the highest number of shoots per explant (9, 18). The 'RITA' temporary immersion system increased significantly the rate of shoot multiplication. Rooting of shoots was obtained in media free of growth substances and transfer to the ground was successful.

MICROPROPAGAÇÃO CLONAL DE TRÊS VARIEDADES DE ABACAXI NATIVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA MEDIANTE CULTIVO DE GEMAS AXILARES E APICAIS

Héctor A. Blanco F., Teresa E. Vargas e Eva de García

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um sistema de propagação clonal eficiente de três variedades de abacaxi (*Ananas comosus* L., Merr.) autóctones do Amazonas venezuelano. Cultivaram-se in vitro gemas apicais e laterais das variedades ERUWÁ CANÁ (EC), TABÉ CANÁ (TC) e GOVERNADORA (GOB). Na fase inicial, explantes (com gemas) foram descontaminados e inoculados em seis meios com diferentes concentrações de auxinas, citocininas e tiamina. Provaram-se dois valores de pH: 5,8 e 5,4. Após quatro semanas houve brotação de uma gema axilar em TC (MI3), gema apical em EC (MI4) e gema axilar em GOB (MI6). Os meios MI1, MI4 e MI6 continham $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina, com pH 5,4. As concentrações endógenas de auxinas e citocininas diferem em cada uma das

três variedades e não se observou um padrão comum em relação as proporções de auxinas e citocininas requeridas para a indução de brotos. Somente se observou brotação em meios com tiamina $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ e pH 5,4 independentemente da concentração de auxinas e citocininas presente nos meios. A multiplicação dos brotos nas três variedades sfoi obtida em meios com iguais concentrações de auxinas e citocininas. A variedade TC apresentou a maior quantidade de brotos por explante (9,18). O sistema de imersão temporal 'RITA's' incrementou significativamente a taxa de multiplicação dos brotos. O enraizamento dos vástagos se obteve in vitro em meios sem substâncias de crescimento e o traslado a terra foi exitoso.

de la micropropagación (Figura 1) estaba constituido por coronas e hijuelos basales de infrutescencias de tres variedades de piña amazónicas conocidas localmente como ERUWÁ CANÁ (EC), TABÉ CANÁ (TC) y GOBERNADORA (GOB), provenientes de los sembradíos de piña cultivados por los Piaroa en Betania del Topocho, estado Amazonas, Venezuela. El material vegetal fue facilitado por la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales (FUDECI).

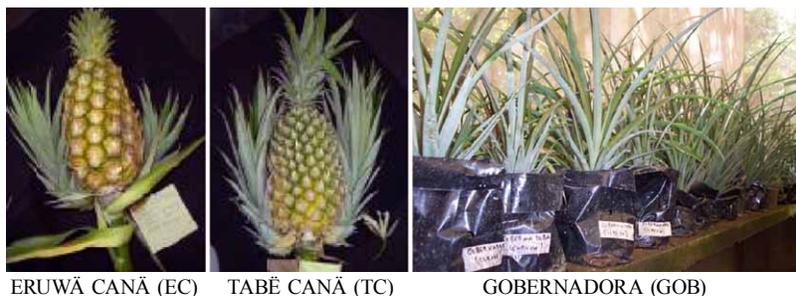


Figura 1. Muestras de piña traídas del Amazonas. En EC y TC se observan las coronas e hijuelos basales de la infrutescencia. En GOB se muestran varios hijos basales pasados a tierra.

vegetal

A las coronas e hijuelos basales se les elimina totalmente las hojas para exponer las yemas. Los tallos 'desnudos' fueron lavados en solu-

ción jabonosa por 20min., transferidos a una solución diluida al 20% (v/v) de cloro comercial por 10min., luego lavados tres veces en agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Final-

mente, los explantes se sumergieron en desinfectante-esterilizador GERDEX sin diluir por 20min. El componente activo de GERDEX es el bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio 10%. De seguidas se procedió al aislamiento e inoculación de las yemas axilares y apicales en los medios de iniciación, bajo un ambiente estéril en la cámara de flujo laminar.

Cultivo in vitro de yemas

Fase de iniciación (supresión de latencia e inducción de crecimiento). Las yemas aisladas fueron cultivadas en me-

Desinfección del material

TABLA I
MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS PARA LA SUPRESIÓN DE LATENCIA E INDUCCIÓN DEL CRECIMIENTO EN YEMAS AISLADAS DE LAS TRES VARIEDADES DE PIÑAS

Medios	BAP (mg·l ⁻¹)	ANA (mg·l ⁻¹)	AIB (mg·l ⁻¹)	Tiamina (mg·l ⁻¹)	pH	Estado físico del medio
MI 1*	0,5	1,0	1,0	0,4	5,8	sólido
MI 2*	1,0	2,0	2,0	0,4	5,8	sólido
MI 3=MM 1	1,0	0,5	0,5	5,0	5,4	líquido
MI 4**	1,0	2,0	2,0	5,0	5,4	sólido
MI 5***	1,0	0,01	0,0	5,0	5,4	líquido
MI 6***	1,0	0,01	0,0	5,0	5,4	sólido
MM2****	2,0	-	-	5,0	5,4	líquido

* Modificado por Casale y De García (1987), ** propuesto por Casale y De García (1987), *** propuesto por Mogollón *et al.* (2004), **** propuesto por Sriparaya *et al.* (2003), MI 3= MM1: medio utilizado tanto para iniciación como para multiplicación de brotes.



Figura 2. Brotes obtenidos por la supresión de latencia en los explantes. a: brote de TC en MI3, colocado sobre un puente de papel de filtro en contacto con medio líquido dentro de un tubo de ensayo, b: vástago con raíces de EC cultivado en medio sólido MI4, c: vástago de GOB en medio sólido MI6.

dio con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con mioinositol 100mg·l⁻¹, sacarosa 30g·l⁻¹, tiamina-HCl y diferentes concentraciones (Tabla I) de los reguladores de crecimiento bencil-aminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB). Los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave bajo condiciones estándar de presión y temperatura (1,1kg·cm⁻² y 121°C) durante 20min. Después de inoculados en los medios, los explantes fueron incubados a 25°C bajo luz blanca continua a 56μmol·m⁻²·s⁻¹.

Fase de multiplicación y alargamiento de los brotes. Los brotes obtenidos en la fase de iniciación fueron cuidadosamente separados y transferidos a medios de multiplicación (MM1 y MM2) y bajo dos condiciones físicas: a) en constante agitación a 137rpm, y b) en recipiente de inmersión temporal automatizada (RITA). Este equipo fue regulado para sumergir los brotes en el medio líquido por un

periodo de 0,5h cada 12h. Las concentraciones de tiamina-HCl y de los reguladores de crecimiento, así como las condiciones físicas y el pH de los medios se presentan en la Tabla I.

Se evaluó el número de brotes y la longitud de vástagos formados por cada una de las variedades estudiadas, en los diferentes medios de crecimiento. Se aplicó la prueba t-Student para la comparación por pares de medias (P ≤ 0,05). Se aplicó ANOVA de una sola vía con Tukey.

Fase de enraizamiento. Los vástagos adventicios de 2cm de longitud, regenerados en medios de multiplicación, fueron transferidos a medio MS sólido sin reguladores de crecimiento (MS0), para la inducción de formación de raíces. Todos los cultivos fueron incubados bajo luz blanca permanente a 56μmol·m⁻²·s⁻¹ a 25°C.

Después de las ocho semanas de crecimiento en

MS0 se evaluó el número y longitud de las raíces formadas por cada una de las tres variedades de piña estudiadas. Se aplicó la prueba t-Student para la comparación por pares de medias (P ≤ 0,05). Se aplicó ANOVA de una vía con Tukey.

Resultados

Fase de iniciación

En la etapa de iniciación del cultivo se observó una alta contaminación de los explantes por hongos y bacterias, en las muestras colectadas en el Amazonas. La var. EC presentó el mayor porcentaje de contaminación y el menor lo presentó la var. GOB. El empleo de GERDEX en la última fase del protocolo de desinfección resultó favorable por la disminución de dicha contaminación.

A las cuatro semanas de cultivo se observó brotación de una yema axilar en la var. TC y de

una yema apical en EC en los medios MI3 y MI4, respectivamente. Los brotes tenían una longitud de ~4mm, y después de permanecer cuatro semanas adicionales en sus respectivos medios, hubo alargamiento de las hojas en TC y alargamiento del vástago (4cm) y formación de raíces en EC (Figura 2). En los medios MI1 y MI2 no tuvo lugar la supresión de latencia (Tabla II). Debido a la baja producción de brotes de las vars. EC y TC en la fase de iniciación, se decidió trabajar con el protocolo propuesto por Mogollón *et al.* (2004) para la siembra del explante inicial de la variedad GOB. Se emplearon los medios siguientes: MI5 sólido con 1mg·l⁻¹ de BAP, y MI6 líquido con la misma concentración de sustancias de crecimiento, ambos con 4mg·l⁻¹ de tiamina y pH 5,4 (Tabla I). Se evidenció la emergencia de un brote adventicio en MI6 a las cuatro semanas, y después de ocho semanas de crecimiento en el mismo medio, se observó el vástago de 5,3cm. (Figura 2). En el medio MI5 no ocurrió supresión de la latencia (Tabla II).

Fase de multiplicación

El brote adventicio de TC, obtenido en la fase de inicia-

TABLA II
MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE LOS BROTES DE PIÑA OBTENIDOS EN LA FASE DE INICIACIÓN

Medios	Variedades	Agitación de medios	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes (cm)
*MM1	EC	Constante (15) ** RITA	7,13 ± 0,18 ^a --	1,06 ± 0,17 ^a --
		Constante (7) ** RITA (10) ***	9,18 ± 1,26 ^b 39,4	0,71 ± 0,09 ^a
	GOB	Constante (15) ** RITA	6,83 ± 1,48 ^a --	0,84 ± 0,09 ^a --
*MM2	EC	Constante (2) ** RITA	0 --	0 --

* MM: medios de multiplicación, ** valores entre paréntesis indican el número inicial de brotes cultivados en MM1 distribuidos en 4 folias, *** valor entre paréntesis indica el número de brotes cultivados en MM1 en el sistema RITA. Valores con letras distintas dentro de una variable indican diferencias estadísticamente significativas. Se aplicó la prueba t-Student para la comparación por pares de medias (P ≤ 0,05). Se aplicó ANOVA de una vía con Tukey. La doble raya (--) significa que no se utilizó la RITA.

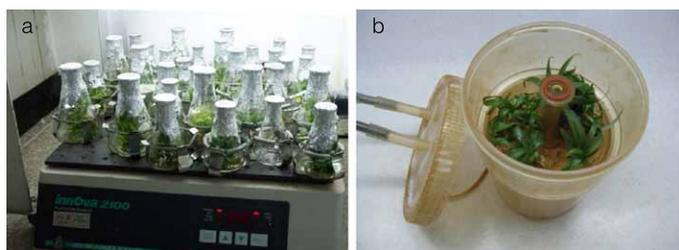


Figura 3. Vástagos de piña formados a partir de brotes cultivados en medios de multiplicación durante ocho semanas. a: agitación continua, b: inmersión temporal en recipiente de inmersión temporal automatizada (RITA).

TABLA III
DATOS DE LA MULTIPLICACIÓN CLONAL
DE LOS BROTES

Variedad	Número de raíces promedio *	Longitud de raíces promedio * (cm)
EC	2,2 ±0,5 a	1,47 ±0,3 a
TC	2,1 ±0,4 a	2,2 ±0,2 b
GOB	3,5 ±0,5 b	2,2 ±0,2 b

Valores con distinta letra dentro de una variable indican diferencias estadísticamente significativas. Se aplicó la prueba t-Student para la comparación por pares de medias ($P \leq 0,05$). Se aplicó ANOVA de una vía con Tukey. * n= 10.

ción, fue transferido al medio MM1. El mismo formó ocho brotes después de ocho semanas en agitación continua (Figura 3). El brote adventicio de EC, obtenido en la fase de iniciación, fue transferido al medio MM2 y después de ocho semanas y con agitación constante no hubo multiplicación sino elongación del vástago de EC. Este vástago alargado se dividió longitudinalmente en dos y se colocó en MM1 y MM2. A las ocho semanas hubo multiplicación de EC (cuatro brotes) en el medio MM1 (Figura 3). Estas experiencias demostraron que el medio MM1 induce la multiplicación clonal de las dos variedades y el MM2, que carece de auxina, no funciona como inductor de la multiplicación. Es necesaria la presencia de citocininas y auxinas en los medios de multiplicación para la proliferación de brotes de las piñas amazónicas.

El brote adventicio de GOB, obtenido en la fase de iniciación, fue dividido longitudinalmente en dos y luego, ambas mitades transferidas únicamente a MM1, con base en los resultados obtenidos en la multiplicación de las variedades TC y EC. En ocho semanas de cultivo se obtuvie-

ron en total 17 brotes para las dos secciones del brote inicial (Figura 3).

Los primeros dos repiques para las tres variedades de piña en MM1 sirvieron para aumentar el número de brotes adventicios y en el tercer repique en dicho medio, se tomaron muestras (cuatro fiolas) de cada variedad para la estimación de número de brotes por explante y longitud de brotes. La variedad TC mostró un número significativamente mayor de brotes por explante (9,18 ±1,26) en medio MM1 con agitación constante, en comparación con las otras dos variedades de piñas amazónicas, cuyas diferencias en el número de brotes por explante no fueron estadísticamente significativas (Tabla II y Figura 5a). Las tres variedades de piñas no mostraron diferencias significativas en la longitud promedio de los brotes en medio MM1 con agitación constante (Tabla II y Figura 5b).

Adicionalmente se evaluó, solamente en la variedad TC, la eficiencia de la multiplicación de brotes mediante inmersión temporal y utilizando el sistema RITA, el cual ha sido reportado como muy eficiente en la multiplicación de

muchas especies de plantas de variedades de piña (Escalona *et al.*, 1999; González-Olmedo *et al.*, 2005; De García *et al.*, 2008). Se transfirieron 10 brotes adventicios de TC al sistema RITA con medio MM1. Después de ocho semanas se obtuvieron 39,4 brotes/explante (Tabla II y Figura 3) que al compararlo con el número de brotes por explante obtenidos en fiolas con agitación constante (9,18 ±1,26), se evidencia que RITA es un sistema eficaz para la multiplicación de brotes.

Fase de enraizamiento

Vástagos adventicios de >2cm de largo, obtenidos por multiplicación, fueron recultivados en medio MS sólido sin reguladores de crecimiento (MS0). Entre las 8-10 semanas de crecimiento en MS0 las vitro-plantas adquieren más vigor debido al desarrollo de raíces (Figura 4). GOB fue la variedad de mayor vigor, debido a que produjo mayor número de raíces promedio (3,5 ±0,5) de mayor longitud promedio (2,2cm ±0,2cm; Tabla III). Las variedades EC y TC presentaron los menores valores en el número de raíces promedio (2,2 ±0,5 y 2,1 ±0,4 respectivamente) y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, pero sus valores fueron significativamente diferentes a los observados en la var. GOB (Figura 5c). EC alcanzó la menor longitud de raíces promedio por vástago (1,47 ±0,3cm), significativamente menor a la de TC y GOB (Tabla III y Figura 5d). En general, las tres variedades de piñas amazónicas produjeron raíces adventicias en medio MS0, y las plantas se adaptaron fácilmente al ser transferidas a tierra.

Discusión

En las tres variedades de piña estudiadas, la supresión de la latencia de los explantes ocurrió a las cuatro semanas de cultivo, únicamente en los medios de inducción que con-

tenían 5mg·l⁻¹ tiamina-HCl, auxina y citocinina a diferentes concentraciones y con pH ajustado a 5,4. Estos resultados coinciden con los de Casale y De García (1987) trabajando con las variedades Española Roja, Nacional y Brecheche, los de Garita y Gómez (2000) con la var. Champaka F-153, y los de De García *et al.* (2008) en Española Roja, quienes obtuvieron inducción de brotes a partir de yemas trabajando con esas mismas condiciones. La gran diferencia estuvo en los cortos tiempos de respuesta de los respectivos explantes.

Los explantes de las variedades amazónicas cultivados en medios de inducción con 0,4mg·l⁻¹ de tiamina y pH 5,8 (MI1 y MI2) no respondieron a la inducción, independientemente de la concentración de auxina y citocinina utilizada. La cantidad de auxina y citocinina que requieren los explantes de las variedades en estudio para alcanzar la ruptura de la latencia de las yemas es variable. Los brotes obtenidos a partir de yema axilar de TC, yema apical de EC y yema axilar de GOB se formaron en MI3, MI4 y MI6, respectivamente. El medio MI3 (líquido) contiene una proporción 1:1 citocinina:auxina y el medio MI4 (sólido) contiene una proporción 1:4 de citocinina:auxina, y el medio MI6 (sólido) contiene un a proporción 100:1 citocinina:auxina. Esto indica que además de la presencia de 5mg·l⁻¹ de tiamina y pH 5,4 es necesaria la presencia de auxina y citocinina en el medio de cultivo, en concentraciones dependientes de la concentración endógena de dichas sustancias en el explante. Estos resultados concuerdan con los reportados por Casale y De García (1987), Garita y Gómez (2000), De García *et al.* (2008), Saucedo *et al.* (2008) y Sepúlveda *et al.* (2008), quienes también lograron la supresión de latencia de yemas axilares de plantas adultas de distintas variedades de piña cultivadas in vitro, utilizando principalmente BAP y

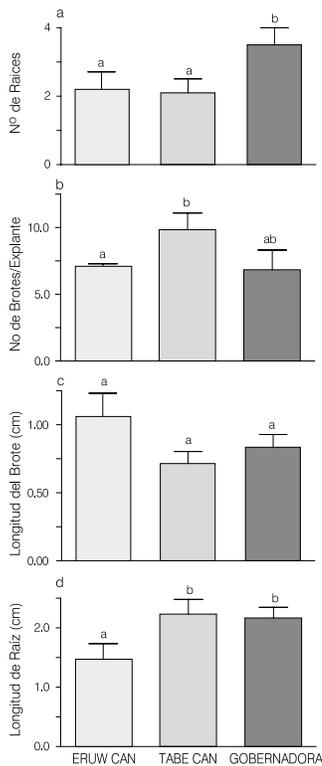


Figura 5. Evaluación de crecimiento. a: número de brotes por explantes en cada una de las variedades estudiadas, b: longitud de los brotes formados en cada una de las variedades durante la etapa de multiplicación, c: número de raíces totales formadas por cada variedad a las 10 semanas de cultivo, d: longitud de las raíces formadas por cada variedad a las 10 semanas de cultivo. Valores marcados con diferente letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$; test de Student).

ANA como reguladores de crecimiento.

En el caso del medio sólido MI6 que contenía una proporción 100:1 de citocinina:auxina, éste fue utilizado por Mogollón *et al.* (2004) para la micropropagación de *A. comosus* 'Queen Australia', logrando tanto el establecimiento de ápices caulinares extraídos de hijos basales como la multiplicación clonal de vástagos *in Vitro*; en el presente caso solo se usó la fase en la fase de iniciación de la var. GOB, y los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos para las vars. TC y EC cultivadas en medios con menores concentraciones de BAP, una sustancia que en altas concentraciones puede

originar variaciones somaclonales.

En relación a la fase de multiplicación, el medio MM1, con proporción 1:1 citocinina:auxina, indujo la proliferación de vástagos adventicios en las tres variedades de piñas amazónicas. Los brotes obtenidos en la fase de iniciación fueron multiplicados en dos repiques sucesivos en MMI con la finalidad de lograr un número significativo de brotes que permitieran tener un número de replicas suficientes para la estimación de la tasa de multiplicación de brotes y la longitud de vástagos adventicios. En el medio de multiplicación MM2, sin auxina, no se observó proliferación de vástagos, solo crecimiento de los existentes. Estos resultados indican que también en la fase de multiplicación de estas variedades se requiere tanto de citocininas como de auxinas; por otra parte, los mismos coinciden con los obtenidos por De Wald *et al.* (1988), quienes obtuvieron altas tasas de proliferación de vástagos adventicios de Cayena lisa y los cultivares Perolera y PR-I-67, en medios con $8\mu\text{M}$ ($2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) BAP y $10,8\mu\text{M}$ ($2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) ANA (proporciones iguales de BAP y ANA).

Algunos reportes sobre las condiciones óptimas para la multiplicación de piñas *in vitro* coinciden con los resultados del presente trabajo, pero difieren en la proporción de BAP y ANA utilizadas, en algunos casos por un amplio margen, como son los casos de Garita y Gómez (2000) quienes reportaron el uso de $0,2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y $0,8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA para Champaka F-53; de Rahman *et al.* (2001) quienes reencontraron máxima proliferación de brotes a partir de yemas axilares de piña utilizando $1,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y $0,1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA; Firoozabady y Gut-

terson, (2003) reportaron altas tasas de multiplicación de vástagos de *A. comosus* var. Cayena Lisa en medios MS líquidos con una combinación de $1,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA; Mogollón *et al.* (2004) lograron una alta tasa de multiplicación clonal de vástagos de *A. comosus* 'Queen Australia' utilizando $1,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y $0,01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA; Khan *et al.*, (2004) reportaron multiplicación *in vitro* eficiente de vástagos adventicios de piña, cultivar Giant Kew, reportando la combinación BAP $1,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y ANA $0,1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ como el tratamiento óptimo para la multiplicación de los vástagos; y, finalmente, Danso *et al.* (2008) ensayaron distintas combinaciones de BAP y ANA en medios tanto sólidos como líquidos para la multiplicación de *A. comosus* var. MD2 y reportaron que la combinación $5,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA, en medio líquido incrementó significativamente la tasa de multiplicación de brotes.

Varios autores han usado auxinas diferentes al ANA para la multiplicación de brotes, como Saucedo *et al.* (2008), quien evaluó el efecto de distintas concentraciones de BAP

en la multiplicación de las variedades de piña Champaka y Hawaiana, manteniendo constante la dosis de ácido indolacético (AIA) en $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y reportaron esa concentración de AIA y $3,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP como la combinación más adecuada para la proliferación de brotes. También se ha utilizado otras citocininas en lugar de BAP para la multiplicación de los brotes. Akbar *et al.*, 2003 usaron $1,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ cinetina (K) en combinación con ANA $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, en medios MS sólidos y obtuvieron la formación *de novo* de vástagos adventicios de *A. comosus*, cv Madhupur, vía organogénesis indirecta.

También se ha logrado la multiplicación de la piña utilizando solamente BAP como regulador de crecimiento. Sri-paoraya *et al.*, (2003) lograron la multiplicación de *A. comosus* cv. Phuket, utilizando solamente $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP en el medio. Estos resultados difieren de lo observado en el presente trabajo, en el cual no se obtuvo multiplicación de brotes de la variedad ERUW CANÁ en medio MS líquido con $2,0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y sin auxinas (MM2).

Cabe también resaltar el notable incremento en la tasa de multiplicación de la variedad TC obtenido al utilizar los equipos de inmersión temporal, en los que la producción incremen-

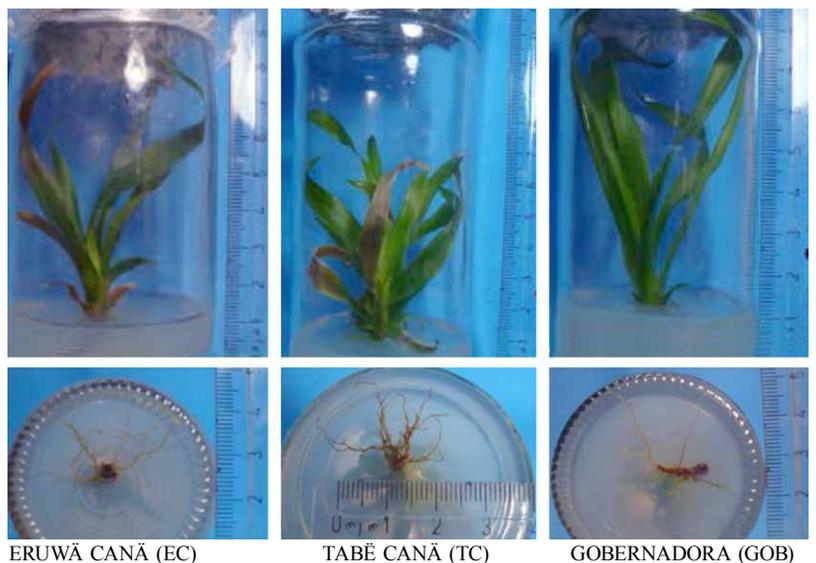


Figura 4. Vitro-plantas de piñas amazónicas en fase de enraizamiento.

ta de 9,18 a 39,4 brotes por explante (Tabla II). Estos coinciden con los resultados obtenidos por otros investigadores, como Escalona *et al.* (1999), quien trabajó con *A. comosus* L. Merr y observó que la inmersión temporal incrementa la multiplicación y el peso fresco y seco de los brotes en 42 días de cultivo; De García *et al.* (2008), quienes obtuvieron altas tasas de multiplicación de brotes de Española Roja utilizando 2,0mg·l⁻¹ BAP y 2,0mg·l⁻¹ ANA en un sistema de inmersión temporal.

Los vástagos de las tres variedades amazónicas obtenidos en la fase de multiplicación, con una longitud mínima de 2cm de longitud, fueron enraizados en medios MS sin hormonas (MS0). Otros trabajos publicados sobre enraizamiento de piña coinciden con los resultados del presente trabajo al obtener enraizamiento efectivo de vástagos en ausencia de reguladores de crecimiento. De García *et al.* (2008) obtuvieron buenos resultados de enraizamiento de las vitropiantas pertenecientes a la variedad Española Roja en MS0. Igualmente, los vástagos de *A. comosus* cv. Phuket, regenerados tanto por embriogénesis somática como por organogénesis, enraizaron sin problemas en MS0 (Sripaoraya *et al.*, 2003). Wakasa *et al.* (1978) trabajando en el cultivo *in vitro* de *A. comosus* cv. Cayena Lisa cepa Mitsubishi, lograron el enraizamiento de todas las vitropiantas regeneradas de distintos tipos de explantes. Mogollón *et al.* (2004) ensayando con distintas concentraciones de ANA en medios MS consideraron que la adición de esta hormona no es necesaria para la inducción rizogénica de *A. comosus* cv. Queen Australia, y por otra parte, Casale y De García, (1987) obtuvieron formación de raíces en vitropiantas de piña pertenecientes a las variedades Española Roja, Brecheche y Nacional en apenas tres

días sembradas en tierra. Sin embargo, otros trabajos hacen referencia al mejoramiento del enraizamiento de vitropiantas de piña utilizando auxinas.

Saucedo *et al.* (2008) obtuvieron porcentajes de enraizamiento significativamente altos de vitropiantas de *A. comosus* variedad Hawaiana suplementando el medio MS con ANA 50mg·l⁻¹. Mogollón *et al.* (2004) observaron que ANA suplementado al medio MS incrementa el enraizamiento de vitropiantas de piña del cultivar Queen Australia, obteniendo mayor número de raíces promedio a una concentración de 2mg·l⁻¹ de la hormona. Khan *et al.* (2004) ensayaron distintas concentraciones de ANA y AIB en medios basales de Murashige y Skoog (1962) con la mitad de la fuerza iónica (½MS) y observaron que 1,0mg·l⁻¹ AIB fue el mejor tratamiento para la inducción rizogénica. Akbar *et al.* (2003) trabajando con *A. comosus* cv Madhupur encontraron que 2,0mg·l⁻¹ AIB suplementado al medio ½MS fue la condición más favorable para la formación de raíces adventicias, sin observar su formación en medios sin auxina.

En otros casos se ha reportado el uso de combinaciones de auxinas para el enraizamiento de vitropiantas de piña Cayena Lisa regeneradas tanto por embriogénesis somática como por organogénesis, utilizando medios ½MS suplementados con 3µM (0,56mg·l⁻¹) ANA y 2,5µM (0,51mg·l⁻¹) AIB (Firoozabady y Moy, 2004). Similarmente, en los vástagos regenerados de *A. comosus* var. Giant Kew, hubo mejoramiento del enraizamiento utilizando la combinación ANA-AIB, ambas a 0,2mg·l⁻¹, en medios ½MS (Amin *et al.*, 2005). Rahman *et al.* (2001) igualmente utilizaron la combinación ANA 0,2mg·l⁻¹ y AIB 0,2mg·l⁻¹ pero en medio basal MS para enraizamiento *in vitro* de plantas de piñas. Tam-

bién, vástagos regenerados de *A. comosus* variedad MD2, fueron enraizadas exitosamente en medios MS suplementados con la combinación de ANA-AIB (ambas a 1mg·l⁻¹; Danso *et al.*, 2008).

Cabe destacar la autonomía, en relación a los requerimientos de auxina, que presentan los vástagos de las tres variedades en estudio a los fines de su enraizamiento *in vitro*, lo cual representa una ventaja económica para el sistema de propagación aquí presentado.

Conclusiones

La ruptura de la latencia en las yemas presentes en los explantes de las variedades de piñas estudiadas constituyó un obstáculo para el establecimiento del cultivo; las variedades estudiadas fueron recalcitrantes a los medios probados en la etapa inicial. La supresión de la latencia se obtuvo a las cuatro semanas de cultivo en explantes de las tres variedades creciendo en medios de inducción que contenían 5mg·l⁻¹ tiamina-HCl y con pH ajustado a 5,4, independientemente del balance hormonal y estado físico del medio de cultivo.

Los resultados sugieren que las concentraciones endógenas de auxinas y citocininas son diferentes en cada una de las tres variedades, y en consecuencia no se observa un patrón común en relación a las proporciones de auxinas y citocininas requeridas para la inducción de formación de brotes en los explantes de las variedades de piña analizadas.

Se estableció que para la multiplicación de los brotes se requiere la presencia de auxinas y citocininas en proporciones equivalentes. El sistema de inmersión temporal es altamente recomendable para incrementar la tasa de multiplicación de los brotes.

Los vástagos resultantes del proceso de multiplicación son independientes de la

presencia de auxina en el medio para la formación de raíces *in vitro*, en contraste con los reportes de otros autores para diversas variedades de piña.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Carmen García por su colaboración en la elaboración de este documento, y a la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales (FUDECI) y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela la colaboración institucional y financiamiento de la investigación.

REFERENCIAS

- Akbar MA, Karmakar BK, Roy SK (2003) Callus induction and high frequency plant regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *Plant Tiss. Cult. 13*: 109-116.
- Amin MN, Rahman MM, Rahman KW, Ahmed R, Hossain MS, Ahmed MB (2005) Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf-derived callus cultures of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Giant Kew). *Int. J. Bot. 1*: 128-132.
- Casale I, De García E (1987) Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *ACEV-IV 2*: 3-18.
- Coppens G, Leal F, Duval MF (1997) Germoplasm resources of pineapples. *Hort. Rev. 21*: 133-175.
- Danso KE, Ayeh KO, Oduro V, Amiteye S, Amoatey HM (2008) Effect of 6-Benzylaminopurine and Naphtalene Acetic Acid on *In vitro* production of MD2 pineapple planting materials. *World Appl. Sci. J. 3*: 614-619.
- De García E, Garay A, Vargas TE, Blanco H (2008) Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). *Mem. Inst. Biol. Exper. (UCV) 5*: 181-184.
- De Wald MG, Moore GA, Sherman WB, Evans MH (1988) Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Rep. 7*: 535-537.
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González J, Borroto C, Desjardins Y (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) plant propagation in temporary immersion system. *Plant Cell Rep. 18*: 743-748.

- FAO (2009) *Production of Pineapple Crops from Venezuela*. FAO Statistic Division 2009. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Firoozabady E, Gutterson N (2003) Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Rep.* 21: 844-850.
- Firoozabady E, Moy Y (2004) Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 67-74.
- Garita H, Gómez L (2000) Micro-propagación de la variedad de piña Champaka F 153. *Agron. Costarric.* 24: 63-73.
- González-Olmedo JI, Fundora Z, Molina LA, Albulnour J, Desjardins Y, Escalona M (2005) New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactor. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 87-90.
- Khan S, Nasib A, Saeed BA (2004) Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pak. J. Bot.* 36: 611-615.
- Mogollón N, Díaz JC, Hernández N (2004) Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 21: 15-21.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised médium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Rahman KW, Amin MN, Azad MA (2001) *In vitro* rapid propagation of pineapples clones (*Ananas comosus* L. Merr). *Plant Tiss. Cult. II*: 47-53.
- Rodríguez Y, Mosqueda M, Companioni B, Arzola M, Borrás O, Pérez MC, Lorenzo JC, Santos R (2002) Bioassay for *in vitro* differentiation of cultivar pineapples resistance levels to Heart Rot disease. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 613-616.
- Roostika I, Mariska I (2003) *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. *Bul. AgroBio* 6: 34-40.
- Santos JR, Matos AP (1995) Pineapple breeding for resistance to Fusariosis in Brazil. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 21: 137-145.
- Saucedo SG, Ramos EL, Varas E, Carmigniani F (2008) Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) Variedades Champaka y Hawaiana. *Cienc. Tecnol.* 1: 49-54.
- Sepúlveda N, Murillo MV, Palacios A, Murillo W, Medina MA (2008) Micro propagación clonal y enraizamiento ex vitro de *Ananas comosus* L. "pina Castilla del Choco". *Inv. Biodiv. Des.* 27: 144-147.
- Sripaoraya S, Marchant R, Power JB, Davey MR (2003) Plant Regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39: 450-454.
- Wakasa K, Koga Y, Kudo M (1978) Differentiation from *in vitro* culture of *Ananas comosus*. *Jap. J. Breed.* 28: 113-121.