

Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de tres cultivares de piña *Ananas comosus* (L. Merr.) del Chocó, Colombia

Clonal micropropagation and *ex vitro* rooting of of three cultivates of pineapple *Ananas comosus* (L. Merr.) from Chocó, Colombia

Miguel A. Medina Rivas*, Hilda Rocío Mosquera*, Cindy L. Aguilar Medina*

Resumen

Objetivos: Propagar masivamente tres cultivares de piña del departamento del Chocó, Colombia, *Ananas comosus* (L. Merr.). **Metodología:** Se multiplicaron *in vitro* brotes provenientes de ápices caulinares extraídos de hijos basales y de corona y se cultivaron en un medio de iniciación semisólido de Murashige y Skoog (MS, 1962), que contenía: 4 mg. l-1 tiamina-HCl, 0,5 mg/l de ANA, 0,5 mg/l de IBA y 0,5 mg/l de 6-BAP y pH ajustado a 5,8; 10 g/l de carbón activado y posteriormente en un medio de multiplicación con cuatro tratamientos hormonales; (1) 0,3 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA)+1,0 mg/l de bencilaminopurina (6-BAP), (2) 0,5 mg/l de ANA+1,5 mg/l de BAP, (3) 1,0 mg/l de ANA+3,0 mg/l de 6-BAP, (4) 1,0 mg/l de ANA+3,0 mg/l de 6-BAP+2 mg/l de ácido giberélico (AG3). El enraizamiento se realizó *ex vitro* se plantaron en materas en un medio preparado con tierra de hormiga, arena fina y musgo en proporciones iguales (1:1:1), desinfectadas con formaldehído un mes antes del iniciado el proceso. **Resultados:** A los 90 días, el número de brotes y tamaño de los brotes por explantes fue: cultivar 1 C1 (78,4±0,5) brotes y longitud del brote (2,5±0,03 cm); cultivar 2 C2: (85,7±0,5) brotes y longitud del brote (2,1±0,11 cm), Cultivar3 C3 (92,8±0,1) brotes y longitud del brote (1,6±0,07 cm). La mejor combinación de los reguladores de crecimiento fue de 1 mg/l de ANA y 3 mg/l de 6-BAP, lo cual indica que es necesaria la presencia de auxina y citoquinina para la brotación. El enraizamiento fue *ex vitro* y a los 90 días las plantas tenían en promedio de C1 (5,8±0,4) raíces y longitud de raíz (3,2±0,3 cm); C2 (5,4±0,1) raíces y longitud de raíz (3,9±0,8 cm); C3 (5,7±0,7) raíces y longitud de raíz (3,8±0,5 cm).

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

Abstract

Objective: Massively propagate pineapple three cultivars of Chocó in Colombia, *Ananas comosus* (L. Merr.). **Methodology:** *in vitro* multiplied buds of apices extracted from crown and basal children cultured in semisolid Murashige and Skoog initiation medium (MS, 1962) containing: 4 mg. l-1 thiamine HCl, 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l IBA and 0,5 mg/l 6-BAP and pH adjusted to 5,8; 10 g/l activated charcoal, and then a multiplication medium with four hormone treatments; (1) 0,3 mg/l of naphthalene acetic acid (NAA)+1,0 mg/l of benzylaminopurine (6-BAP), (2) 0,5 mg/L NAA+1,5 mg/l BAP, (3) 1,0 mg/l NAA+3,0 mg/l 6-BAP, (4) 1,0 mg/l NAA + 3,0 mg/l 6-BAP+2 mg/l of gibberellic acid (GA3). Rooting *ex vitro* was performed were planted in pots in a medium prepared with soil from ant, fine sand and moss in equal proportions (1:1:1), disinfested with formaldehyde a month before the process starts. **Results:** At 90 days, the number of shoots and shoots size of explants was: C1 (78,4±0,5) shoots and shoots length (2,5±0,03 cm); C2: (85,7±0,5) shoots and shoots length (2,1±0,11 cm), C3 (92,8±0,1) shoots and shoots length (1,6±0,07 cm). The best combination of growth regulators was 1 mg/l NAA and 3 mg/l de 6- BAP. lo indicating that the presence of auxin and citoquinina necessary for sprouting. The rooting was *ex vitro*, and at 90 days the plants had an average of: C1 (5,8±0,4) roots and root length (3,2±0,3 cm); C2 (5,4±0,1) roots and roots length (3,9±0,8 cm); C3 (5,7±0,7) roots and roots length (3,8±0,5 cm).

Keywords: Cultivate, *in vitro* culture, Massive propagation, Micropropagation, Pineapple.

* 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 recepción: Enero 17, 2014 Fecha aprobación: Marzo 20, 2014 Editor asociado: Valois H

Introducción

La familia Bromeliaceae propia de las zonas tropicales y templadas de América; incluye 2.700 especies agrupadas en 56 géneros; de las cuales la piña (*Ananas comosus* (L. Merr.) es la especie más conocida por ser una fruta tropical cultivada para alimento en sistemas productivos (Montilla 1992, FAO 2009). La ausencia de semillas la hace una especie autoincompatible por lo que se propaga vegetativamente por brotes laterales y de la parte superior del fruto, lo que hace una tasa de multiplicación muy baja de forma natural (Páez 1998). Además, los cultivos son atacados por insectos y hongos que producen marchitamiento, fusariosis y la pudrición de la base del tallo, enfermedades que reducen la producción de número de plantas por hectáreas disminuyendo la producción comercial del fruto (Santos y Matos 1995, Coppens *et al.* 1997, Rodríguez *et al.* 2002).

La producción en Colombia se basa principalmente en tres variedades: Perolera, Cayena lisa y Manzana, aun cuando existen otras en cultivos o áreas específicas y con mercados muy localizados como De Clavo y Piamba, éstas son: Dagua, Cambray, Hortona o Pan de Azúcar y Huitoto entre otras (Santos y Matos 1995). Sin embargo, los productores de piña tienen dificultad para cubrir las necesidades de plantas «hijos» para establecer nuevas plantaciones (Mathews y Ragan 1979).

En el departamento del Chocó, existen más de 10 cultivares o ecotipos de piña (cultivados de forma natural sin el uso de insumos agrícolas), los cuales no han sido estudiados genéticamente para definirlos como variedades, pero se pueden diferenciar por sus características organolépticas, morfología y tamaño; en épocas de cosechas hay una producción para la venta en los mercados locales pero hasta el momento no se conoce en los mercados nacionales por su baja producción.

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 (Santos y Matos 1995). Una alternativa biotecnológica que permite la propagación masiva de plantas de piña libres de enfermedades y en tiempos relativamente cortos es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetal además, permite que se realice una selección clonal de genotipos sobresalientes por sus

características agronómicas, organolépticas y de adaptación a ambientes específicos, resistentes a estrés biótico y abiótico, y ocurre durante todo el año por ser realizado en condiciones controladas (Gallardo 1995, Griffith 1998).

El cultivo *in vitro* o método de micropropagación, desde sus inicios ha tenido múltiples aplicaciones y diversas variaciones debido a que no es una metodología reproducible en todas las especies vegetales porque la respuesta de una metodología depende de la configuración genética de la especie, por lo tanto, siempre se debe iniciar con evaluar la respuesta cultural y morfogenética en cada experimento y en lo que respecta a la piña (*A. comosus* L. Merr.), ha sido utilizado, obteniéndose muchas vías para el establecimiento de cultivo *in vitro* (Casale y De García 1987, Sripaoraya *et al.* 2003, Mogollón *et al.* 2004, De García *et al.* 2008, Saucedo *et al.* 2008), desde la organogénesis directa, sin la fase de callo, hasta la obtención de plantas *de novo* a través de organogénesis indirecta y embriogénesis somática (Sripaoraya *et al.* 2003, Firoozabady y Gutterson 2003, Roostika y Mariska 2003, Firoozabady y Moy 2004, Amin *et al.* 2005).

Con el presente trabajo se pretende definir un protocolo eficiente de multiplicación clonal masiva de tres cultivares de piña (*A. comosus* L. Merr.) nativas del departamento del Chocó, Colombia, a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares y/o apicales aisladas de las plantas.

Metodología

Área de extracción del material vegetal. Designaremos los cultivares de la piña chochoana (*A. comosus* L. Merr.) de acuerdo con las regiones del Chocó donde más se cultivan. Para ello hemos seleccionado tres regiones: Cuenca alta del río Atrato (municipio de Lloró), cuenca media del río Atrato (corregimiento de Munguido, municipio de Quibdó) y cuenca media del río San Juan (municipio del Medio San Juan). La piña cultivada en el municipio de Lloró tiene en promedio: tamaño entre 10 y 20 cm, peso de 1 a 2 kg, poco jugosa, pulpa blanca muy fibrosa, aromática, dulce, de forma oval (Cultivar uno C1). La piña mayormente cultivada en el corregimiento de Munguido, se caracteriza por ser de tamaño promedio de 25 a 35 cm, peso de 2 a 4 kg, forma triangular,

Tabla 1. Medios de cultivos utilizados para la multiplicación *in vitro* de los brotes obtenidos en la fase de iniciación.

Tratamiento	Citoquinina 6-BAP mg/l	Auxina ANA mg/l	AG3 mg/l
1	1,0	0,3	0,0
2	1,5	0,5	0,0
3	3,0	1,0	0,0
4	3,0	1,0	2,0

sabor dulce, medianamente jugosa, pulpa de color blanco amarillenta (Cultivar dos C2). La piña del municipio del Medio San Juan, de tamaño entre 30 y 35 cm, con peso promedio entre 2.5 y 3.5 kg, mucho más jugosa que las anteriores y menos fibrosas, sabor dulce, aromática, pulpa color blanca (Cultivar tres C3).

Métodos

Material vegetal. Se utilizaron las coronas e hijuelos de frutescencia de tres cultivares de piñas (*A. comosus* L. Merr.) chocoanas provenientes de sembradíos de cada región; el material vegetal fue suministrado por los cultivadores de cada región.

Desinfección del material vegetal. A las coronas e hijuelos basales se les eliminó totalmente las hojas para exponer las yemas. Los tallos fueron lavados en solución de detergente, transferidos a una solución diluida al 20% (v/v) de cloro comercial por 10 min, luego lavados tres veces en agua destilada estéril en una cabina de flujo laminar (Daquinta *et al.* 1995, Dolgov *et al.* 1998), y así se obtuvieron los explantes primarios: yemas de la corona y el meristemo de los hijuelos (Fitchet-Purnell 1993).

Fase de iniciación, establecimiento e inducción del crecimiento de explantes de piña. El objetivo de esta etapa fue obtener brotes adecuado para la multiplicación *in vitro* de yemas axilares de piña (*A. comosus* L. Merr.) de los tres cultivares de piñas del departamento del Chocó. La extracción y siembra de las yemas se realizó en la cámara de flujo laminar después de haber sido desinfectadas.

Las yemas aisladas se cultivaron en un solo medio de cultivo semisólido que contenían 4 mg/l-1 tiamina-HCl, 0,5 mg/l de ANA, 0,5 mg/l de IBA, y 0,5 mg/l de 6-BAP y pH ajustado a 5,8, 10 g/l de carbón activado, incubados inicialmente en la oscuridad por ocho días y luego por cuatro semanas en condiciones de fotoperíodo con luz blanca, hasta obtener brotes de 1 cm de longitud aproximadamente.

Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave bajo condiciones estándar de presión y temperatura (1,1 kg·cm⁻² y 121°C) durante 20 min.

Fase de multiplicación y alargamiento de los brotes. En esta fase se evaluó el tipo y la concentración de los reguladores del crecimiento a emplear en la multiplicación *in vitro* de los tres cultivares de piñas (*A. comosus* L. Merr.) del departamento del Chocó. Para realizar este experimento se utilizaron vitroplantas provenientes de la etapa de iniciación y se utilizó el medio de cultivo MS, empleado inicialmente, adicionándole cuatro combinaciones de reguladores de crecimiento, para ello se utilizaron como variables la relación auxina ANA, citoquinina 6-BAP y AG3 (Tabla 1).

El pH de los medios de cultivos se ajustó a 5,7±0,1 y se esterilizó a 1,1 kg cm² y 121°C, durante 20 min. Se cultivó un explante por frascos de compota con 10 ml del medio, los cuales se dejaron en una cámara de crecimiento a 27±1°C a 15 horas de fotoperíodo por 30 días, la intensidad luminosa fue de 1.500 a 2.000 luz fría/suministrada por tubos fluorescentes de 36W, Silvana) equivalente a 34-90 m E/s/m². Para la propagación masiva, esta fase se repite varias veces hasta obtener el número de plantas deseadas.

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 brotes formados por cada uno de los cultivares en los diferentes medios de cultivo.

Enraizamiento *ex vitro*. Los brotes de cuatro cm de longitud, obtenidos en la fase de multiplicación, se trasplantaron para el enraizamiento *ex vitro*; se eliminaron sus hojas basales y se plantaron en materas en un medio preparado con tierra de hormiga, arena fina y musgo en proporciones iguales (1:1:1), desinfectadas con formaldehído un mes antes de iniciado el proceso, en donde se regaban con el medio

de cultivo inicial sin regulador de crecimiento y después de cuatro semanas se trasladaron a un invernadero cubiertos con una cúpula hecha de botellas de gaseosas de un litro y en donde gradualmente se expusieron al ambiente. El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental estuvo constituida por un matas con un 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

Fase de iniciación. Se observó que a las cuatro semanas de cultivo, hubo brote de una yema apical en todos los cultivares, con una longitud de 3 a 4 mm aproximadamente; después de cuatro semanas adicionales en el mismo medio, hubo alargamiento de las hojas y alargamiento del vástago (1 a 3 cm) y el alargamiento se incrementó con el tiempo sin que se observara brotación lateral (Figura 1A).

Fase de multiplicación de los brotes. A las cuatro semanas (Figura 1B) en los brotes en los medios de multiplicación se observó que en el cultivar C1 en el medio uno, presentó 18 brotes de 3 mm, en el medio dos 19 brotes de 2 a 3 mm, en el medio tres 20 brotes entre 3 y 4 mm, en el medio cuatro 25 brotes; en el cultivar C2, en el medio de cultivo uno, se observaron 8 brotes, en el medio dos 15 brotes de 2 mm, y en el medio tres 25 brotes entre 2 y 3 mm, en el medio

cuatro, 22 brotes; en el cultivar C3 en el medio uno, se observó la aparición de 18 brotes de 4 mm en el medio dos, 15 brotes de 4 mm y en el medio tres 18 brotes entre 3 y 5 mm, en el medio cuatro 17 brotes; los brotes fueron laterales alrededor del brote inicial (Figura 1C). A las 12 semanas (Figura 1D), el incremento del número de brotes fue notablemente importante. En la Tabla 2 se evidencia el incremento del número de brotes con el tiempo dependiendo del medio de cultivo; los brotes se trasplantaron cada dos semanas a un medio fresco con las mismas condiciones. Después de 16 semanas (Figura 1E), el número de brotes en los medios tres y cuatro fueron aproximadamente 200 en los cultivares C1 y C3.

De estos clústeres, se separaron brotes individuales y se plantaron en medio fresco en donde solo contenía como regulador del crecimiento AG3; con el propósito de observar el crecimiento, la elongación de estos brotes fue similar en los medios sin reguladores de crecimiento que en presencia de AG3 de 3 a 4 cm después de ocho semanas.

Fase de enraizamiento ex vitro. Después de una semana de enraizamiento *ex vitro*, se observó la aparición de los primeros vestigios de raíces de 1 a 2 mm, en todos los cultivares; a las cuatro semanas las raíces fueron en promedio 5 de 2 cm y a las 12 semanas el enraizamiento fue masivo con raíces de hasta 5 cm y las plantas mostraron gran vitalidad (Tabla 3).

Discusión

Existen reportes donde indican condiciones óptimas para la proliferación de piñas *in vitro* que coinciden con los resultados del presente trabajo en lo referente a la presencia de ANA y 6-BAP en los

Tabla 2. Efectos de tres concentraciones de BAP, ANA y AG en la etapa de multiplicación y tres cultivares de piña después de ocho semanas de cultivo.

C1		Cultivares C2		C3		Concentración reguladores de crecimiento en mg/l		
Nº brotes por explante	Longitud de brote: cm	Nº brotes por explante	Longitud de brote: cm	Nº brotes por explante	Longitud de brote: cm	6-BAP	ANA	AG3
25,7±0,7	1,8±0,07	31,3 ±03	1,6±0,07	33,1±0,5	1,7±0,03	1,0	0,3	0
45,2±0,8	2,1±0,05	41,5 ±07	1,9±0,04	39,3±0,3	1,9±0,05	1,5	0,5	0
85,7±0,5	2,1±0,11	78,4 ±05	2,5±0,03	92,8±0,1	1,6±0,07	3,0	1,0	0
97,5±1,1	2,1±0,05	79,3 ±06	2,6±0,09	90,8±0,6	1,8±0,01	3,0	1,0	2

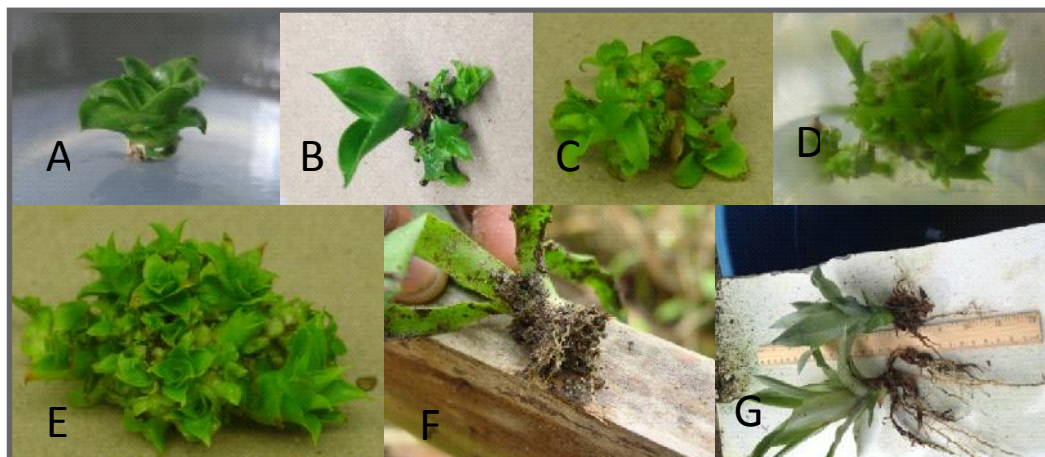


Figura 1. Proceso de propagación de la piña chocoana *in vitro*. Fase de iniciación. A. Dos semanas; Fase de multiplicación. B. Cuatro semanas, C. Ocho semanas, D. Doce semanas, E. 16 semanas. Enraizamiento *ex vitro*: F. Cuatro semanas, G. Doce semanas.

medios de cultivo y tienen diferencia notable en lo referente a las concentraciones utilizadas, como los reportados por Garita y Gómez (2000) quienes indican el uso de 0,2 mg·l⁻¹ BAP y 0,8 mg·l⁻¹ ANA para la variedad de piña Champaka F-53; los reportados por Rahman *et al.* (2001) muestran máxima proliferación de brotes a partir de yemas axilares de piña utilizando 1,0 mg·l⁻¹ BAP y 0,1 mg·l⁻¹ ANA; investigaciones realizadas por Khan *et al.* (2004) reportaron proliferación eficiente *in vitro* de brotes de piña, en medio MS con 0,5 mg·l⁻¹ BAP, y ANA 0,001 mg·l⁻¹; las investigaciones de Firoozabady y Gutterson (2003) reportaron altas tasas de multiplicación de brotes de piña variedad *Cayena lisa* en medios MS líquidos con una combinación de 1,5 mg·l⁻¹ BAP y 0,5 mg·l⁻¹ ANA; estos resultados son similar a los nuestros en medio sólido, en donde se observó gran multiplicación utilizando 1,5 mg/l de 6-BAP y 0,5 mg/l de ANA. Trabajos realizados por Mogollón *et al.* (2004) lograron un elevado índice de multiplicación de brotes de *A. comosus* (L. Merr.) Queen Australia en medio de cultivo MS utilizando 1,0 mg·l⁻¹ BAP y 0,01 mg·l⁻¹ ANA.

En el presente trabajo, los explantes de los tres cultivares de piña *A. comosus* (L. Merr.) brotaron en cinco semanas, indicando la supresión de la latencia de los explantes en el medio de inducción que contenían 4 mg·l⁻¹ tiamina-HCl, 0,5 mg/l de ANA, 0,5 mg/l de IBA, y 0,5 mg/l de 6-BAP y pH ajustado a 5,8. Estos resultados coinciden con los reportados por Blanco, Vargas y De García (2011), Danso *et al.*

Tabla 3. Enraizamiento *ex vitro* de brote de piñas obtenidos de la fase de multiplicación después de 12 semanas.

Cultivar	N° de raíces/planta	Longitud de las raíces en cm
C1	5,4±0,1	3,9±0,8
C2	5,8±0,4	3,2±0,3
C3	5,7±0,7	3,8±0,5

(2008), con tres variedades de piña amazónica; las investigaciones de Casale y De García (1987) con las variedades Española Roja, Nacional y Brecheche, los resultados de Garita y Gómez (2000) con la variedad Champaka F-153 y los reportes de García *et al.* (2008) con la variedad Española Roja, quienes obtuvieron inducción de brotes a partir de yemas utilizando dos auxinas y una citoquinina.

En el presente trabajo se realizó una etapa de una semana no utilizada por los investigadores reportados, lo cual establece una diferencia importante de una semana de incubación en la oscuridad y para evitar oxidación del explante se le adicionó al medio de cultivo semisólido, carbón activado 10 g/l lo cual permitió la supervivencia de los explantes en su totalidad (Sepúlveda y Medina 2008).

Al considerar la fase de multiplicación en nuestro trabajo se observó que hubo diferencias significativas para la variable número de brotes por explante, resultando superior el tratamiento con 1,0 mg/l de ANA+3,0 mg/l de BAP, con un promedio de 92,8

brotos por explante en C3 con longitud de brotes promedio de 1,6 cm, 85,7 brotes para C1 con longitud de 2,1 cm y 78,4 brotes en C2 con longitud de 2,5 cm; se observa que a mayor número de brotes por explantes, el tamaño de los brotes es menor (Tabla 1) lo cual indica que el incremento en la concentración del 6-BAP aumenta el número de brotes pero el crecimiento de los brotes es más lento, posiblemente debido a la limitación del crecimiento por contacto entre brotes. A pesar de que en el tratamiento 4 estaba presente el ácido giberélico, este fue similar al tratamiento 3, el AG3 regulador de crecimiento que promueve el alargamiento celular, el tamaño de los brotes fue similar que en el tratamiento 4. Esto posiblemente se debió a la combinación con 6-BAP, que estimula la formación de brotes limitando el crecimiento, o posiblemente a que la dosis empleada no fue la más adecuada (Mogollón *et al.* 2004, Smith 2000).

En lo referente a los cultivares, el cultivar C3 con 92,8 brotes no fue significativamente diferente al cultivar C1 con 85,7 brotes, pero sí hubo diferencia significativa con el cultivar C2 con 78,4 brotes por explantes.

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, porque 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 combinando 2 mg/l de ácido indol acético y 2 mg/l de cinetina con 40 mg/l de sulfato de adenina (Casale y De García, 1987), (Blanco, Vargas y De García, 2011). A pesar de la mayor cantidad de reguladores de crecimiento, reportaron menores tasas de multiplicación que las obtenidas en esta investigación, en donde la presencia de citoquinina 6-BAP y la auxina ANA fueron necesarias para la brotación de los explantes.

Al considerar la fase de multiplicación, los medios que indujeron mayor proliferación de brotes fueron los que contenían la relación de citoquinina/auxina (1,5 mg/l y 0,5 mg/l; 3,0 mg/l y 1,0 mg/l en los tres cultivares de piñas del Chocó. Para lograr un número significativo de brotes que permitieran tener un

número de réplicas suficientes para la medición de la tasa de multiplicación y longitud de los brotes, los brotes obtenidos en la fase de inicio fueron multiplicados en tres subcultivos sucesivos, los medios 2 y 3 fueron los que indujeron mayor proliferación, coincidiendo con los resultados obtenidos por De Wald *et al.* (1988), quienes obtuvieron altas tasas de proliferación de brotes de Cayena lisa y los cultivares Perolera y PR-I-67, en medios con 8 μ M (2 mg·l⁻¹) BAP y 10,8 μ M (2 mg·l⁻¹) ANA (proporciones iguales de BAP y ANA).

En experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Sepúlveda *et al.* 2008, Medina y Mena 2011) se observó que en medios de cultivos sin auxina, no presentaban proliferación de brotes, solo crecimiento de los existentes. Estos resultados indican que también en la fase de multiplicación de los cultivares utilizados aisladamente, se requiere la presencia de la auxina ANA y la citoquinina 6-BAP para la proliferación de los brotes; la diferencia de concentración observadas en los trabajos reportados, se puede deber a las concentraciones endógenas de las plantas fuentes de explantes, lo que dependerá de las condiciones naturales de cultivo y su adaptación al ambiente donde evolucionaron, es decir a la suma de todas las combinaciones de genes resultante de la evolución de la especie en un ambiente específico porque la configuración genética, en último, define la respuesta cultural en un medio artificial, por esa razón, los resultados de cultivo de tejido no son reproducibles en especies aún idénticas adaptadas a ambientes diferentes, por lo tanto, las variedades de piñas reportadas y los cultivares de nuestro trabajo son diferentes genéticamente, si consideramos las respuestas culturales y morfogenéticas.

En general, se pudo observar que el crecimiento de los brotes en presencia de la combinación de reguladores del crecimiento (ANA y 6-BAP) en las condiciones adecuadas en los medios indicados, se logra la dominancia apical y el explante proveniente de la yema de la corona o hijuelos de piña, se convierte directamente en brote y después de cuatro a 16 semanas el explante original se transforma en una masa ramificada de brotes o un cluster o racimo de brotes basales. Cuando estos racimos en miniaturas se separan en brotes individuales y se plantan en medios frescos (en donde el nivel de citoquinina se ha incrementado, se repite el ciclo de multiplicación

de brotes) (Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Universidad Tecnológica del Chocó, datos no publicados) (Sepúlveda *et al.* 2008).

Conclusiones

La combinación de los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) y bencilamino purina (6-BAP) permite la propagación masiva de los tres cultivares de piña del Chocó en un promedio alto, indicando que las concentraciones endógenas de los cultivares son similares porque la multiplicación ocurrió en todos los cultivares en niveles importantes. La mejor combinación de los reguladores de crecimiento fueron 1 mg/l de ANA y 3 mg/l de 6-BAP lo cual indica que es necesario la presencia de la auxina y citoquinina para la brotación y multiplicación de la piña *A. comosus* (L. Merr.). Los cluster de brotes formados durante el proceso de multiplicación son la base para la propagación masiva de piñas del Chocó *A. comosus* (L. Merr.) por esta vía porque a partir de ellos se obtienen el número de plantas deseado por multiplicaciones sucesivas de los brotes asilados.

El uso del ácido giberélico AG3, en el medio de cultivo como fitohormona que permite el crecimiento rápido de los brotes, no presentó efecto importante en el crecimiento de las plantas *in vitro*, porque no hubo diferencia entre las plantas cultivadas en ausencia de esta fitohormona, esto se pudo deber a que la concentración utilizada no fue la ideal o que predominó el efecto del ANA y 6-BAP sobre el AG3.

El enraizamiento *ex vitro* es efectivo y ocurre en menor tiempo que enraizamiento *in vitro* y a diferencia con el *ex vitro*, se obtienen raíces más fuertes permitiendo un trasplante al suelo con facilidad y mejor adaptabilidad al ambiente natural.

Literatura citada

- Almeida de WA, de Matos AP, Souza A. 1995. Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Acta Hort.* 425: 235-42.
- 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: 128-32.
- Blanco FH, Vargas TE, de García T, De García E. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piñas nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. *Inverciencia.* 36 (6): 437-43.
- Casale I, De García E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *ACEV.* IV (2): 3-18.
- CoHort Software. 1990. Bekerly: CoHort 2 Statistical Package.
- Coppens G, Leal F, Duval MF. 1997. Germoplasm resources of pineapples. *Hort Rev.* 21: 133-75.
- Danso KE, Ayehe KO, Oduro V, Amiteye S, Amoatey HM. 2008. Effect of 6-Benzyl-aminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials. *World Appl Sci J.* 3: 614-9.
- Daquinta M, Benega R, Martínez T, Castillo R. 1995. Estaquillado de hojas de piña *in vitro*. Centro de Bioplasmas, Instituto Superior Agrícola de Ciego de Ávila, Cuba. *Centro Agrícola.* 2: 82-7.
- De García E, Garay A, Vargas TE, Blanco H. 2008. Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). *Mem Inst Biol Exper. (UCV)* 5: 181-4.
- De Wald MG, Moore GA, Sherman WB, Evans MH. 1988. Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 7: 535-7.
- Documento del Primer Simposio Internacional de Piñicultura. Bogotá. Memorias, 1993. p. 1-3.
- Dolgov SV, Shushkova TV, Firsov AP. 1998. Pineapple (*Ananas comosus* Mess.) regeneration from leaf explants. *Acta Hort.* 461: 439-44.
- FAO. 2009. *Production of pineapple crops from Venezuela*. FAO, Statistic Division. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?Page ID=567#anchor>
- Firoozabady E, Gutterson N. 2003. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Rep.* 21: 844-50.
- Firoozabady E, Moy Y. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *in vitro Cell Dev Biol Plant.* 40: 67-74.
- Fitchet-Purnell M. 1993. Maximum utilization of pineapple crowns for micropropagation. *Acta Hort.* 334: 325-30.
- Gallardo M. 1995. *Biotechnología aplicada al cultivo de la piña*. Maturín: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 pp.
- Garita H, Gómez L. 2000. Micropropagación de la variedad de piña Champaka F 153. *Agron Costarric.* 24: 63-73.
- Griffith LP. 1998. *Tropical foliage plants. Batavia: A Grower's Guide*. NY. Ball Publishing. 318 pp.
- Khan S, Nasib A, Saeed BA. 2004. Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pak J Bot.* 36: 611-5.
- Mathews VH, Ragan TS. 1979. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* cultures of pineapple. *Scientia Hort.* 11: 319-28.
- Medina MA, Mena R. 2011. Selección clonal de germoplasma élite de *Anana comosus* L. «piña de castilla del Chocó» para la obtención de material de siembra para el establecimiento de cultivos comerciales, vía cultivo *in vitro*. *Rev Biodivers Neotrop.* 1 (2): 122-5.
- 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.
- 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 pp.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised meedium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant. 15*: 473-97.
- Páez MG. 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas* spp. *Proc Interamer Soc Trop Hort. 42*: 128-32.
- Rahman KW, Amin MN, Azad MA. 2001. *in vitro* rapid propagation of pineapples clones (*Ananas comosus* L. Merr). *Plant Tiss Cult. 11*: 47-53.
- Rodríguez Y, Mosqueda M, Companioni B, Arzola M, Borrás O, Pérez MC, et al. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of cultivar pineapples resistance levels to heart rot disease. *in vitro Cell Dev Biol Plant. 38*: 613-6.
- Roostika I, Mariska I. 2003. *in vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. *Bul Agro Bio. 6*: 34-40.
- Santos JR, Matos AP. 1995. Pine apple breeding for resistance to Fusariosis in Brazil. *Rev Fac Agron. (Maracay) 21*: 137-45.
- 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. Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de *Ananas comosus* L. «piña Castilla del Chocó». *Investigación Biodiversdad Dessarrollo. 27*: 144-7.
- Smith R. 2000. *Plant tissue culture. Techniques and experiments*. San Diego: Academic Press. 231 pp.
- 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*: 450-4.