

Selección clonal de germoplasma élite de *Ananas comosus* L. «piña de castilla del Chocó» para la obtención de material de siembra para el establecimiento de cultivos comerciales, vía cultivo *in vitro*

Clonal selection of elite germplasm of *Ananas comosus* L. «Chocó castile pineapple» to obtain planting material for establishing crops, via *in vitro* cultivation.

Miguel A. Medina*, Robert Mena*

Resumen

Con el propósito de realizar la selección clonal de los mejores individuos de *Ananas comosus*, piña de castilla del Chocó, se multiplicaron *in vitro* brotes provenientes de ápices caulinares extraídos de hijos basales, que se subcultivaron en un medio semisólido de Murashige y Skoog (MS), adicionando ocho tratamientos hormonales: sin reguladores de crecimiento, 0.25 mg/l de ANA+0.5 mg/l (6-BA), 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 6-BA, 1 mg/l de ANA+2 mg/l de 6-BA, 0.3 mg/l de ANA+1 mg/l de 6-BA+2 mg/l de ácido giberélico (AG3). A los 60 días, el número de brotes por explante (295.5) fue superior al usar 1 mg/l de ANA+2 mg/l de BA; también el número de brotes cuyo tamaño fue >1 cm (200.6) y de 0.5 a 1 cm (9.5) 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

In order to perform clonal selection of the best individuals, 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 semisolid medium of Murashige and Skoog (MS), applying eight different types of hormonal treatments: No growth regulators; 0.25 mg/l of naftaleneacetic acid (NAA) + 0.5 mg/l of benzylaminopurine (BA), 0.1 mg/l de ANA+0.8 mg/l de BA, 0.3 mg/l de ANA+1 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 mg/l de ANA+2 mg/l de 6-BA, 0.3 mg/l de ANA+1 mg/l de 6-BA+2 mg/l gibberellic acid (AG3). Sixty day later, the number of shoots per explant (295.5) 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 (9.5) and >1 cm (200.6) 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

En el departamento del Chocó, por sus condiciones climáticas, existe una diversidad de recursos fitogenéticos (especies vegetales promisorias) para el fomento de la agricultura muy bien adaptados a este ambiente y con diferentes características. Estos

recursos pueden tener diversas utilidades en la agricultura, entre las que se mencionan dos bien importantes: 1. Al realizar una selección clonal se puede obtener germoplasma para cultivos comerciales partiendo de los mejores individuos y 2. Como fuente de genes para la mejora de cultivares comerciales, con lo que se maximiza la productividad y se reduce

* Grupo de Investigaciones en Biotecnología y Recursos Fitogenéticos, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Colombia.
e-mail: mmedinarivas@gmail.com

Fecha recepción: Septiembre 16, 2011

Fecha aprobación: Diciembre 22, 2011

la necesidad de utilización de insumos adicionales (Medina *et al.* 2011).

Con esta biodiversidad, el departamento del Chocó inicialmente no requiere abordar programas de mejora, solo requiere establecer programas de selección clonal para obtener los mejores individuos por sus características organolépticas y sus propiedades alimenticias y medicinales; una vez realizada esta selección, se puede aportar a la mejora de la calidad de productos comerciales relacionados en otras regiones del mundo, en donde los procesos de adaptabilidad son costosos por la vulnerabilidad asociada a la uniformidad de los cultivos. Estos materiales constituirán lo que se suele llamar «germoplasmas adecuados», es decir, que realmente suministran la mayor cantidad de beneficio con el menor costo porque se encuentran muy bien adaptados y presentan una alta resistencia frente a todo tipo de presiones ambientales, tales como inundaciones, sequías, plagas y enfermedades (Medina *et al.* 2008a).

La piña pertenece a la familia Bromeliceae, cuenta con 56 géneros y 2700 especies, en el departamento del Chocó es de amplia dispersión; en casi todos los municipios y en los mercados locales se encuentran diversas variedades que se diferencian por su tamaño, color de la concha, sabor, olor, color, textura de la pulpa y características organolépticas variadas; es una fruta tropical de la biodiversidad del Chocó, cultivada para alimento en sistemas productivos (Montilla 1992) y de pancoger en el departamento del Chocó; su nombre científico es *Ananas comosus* (L.) Merr. y por no presentar semilla es una especie autoincompatible que se propaga vegetativamente por brotes laterales y el enraizado de los 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 utilizan como material de cultivo los hijuelos que nacen en las partes superiores de los frutos. De cada planta normalmente se obtiene un hijuelo, lo que hace muy baja su propagación de forma natural (Páez 1998).

El interés por el cultivo de piña se ha incrementado, por su demanda de mercado como fruta fresca, materia prima para la agroindustria y producto

de exportación. Sin embargo, los productores de piña siempre han tenido dificultad para cubrir las necesidades de plantas «hijos» para establecer nuevas plantaciones (Mathews y Ragan 1979); por tanto, se hace necesario realizar una selección clonal de los mejores individuos para que los agricultores puedan obtener semillas certificadas en cantidad y calidad para el establecimiento de cultivos comerciales, para este propósito, la micropropagación, como técnica biotecnológica, permite realizar selección clonal de genotipos sobresalientes por sus características organolépticas, rendimiento, resistentes a plagas y enfermedades; con esta técnica, se obtiene un alto número de plántulas para semillas en cualquier época del año porque se trabaja en condiciones controladas (Gallardo 1995, Griffith 1998).

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 de selección clonal para el establecimiento y multiplicación de *Ananas comosus* L. mediante las técnicas de cultivo *in vitro* (Medina *et al.* 2008b).

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 observaron los tejidos blancos internos (Daquinta *et al.* 1995, Dolgov *et al.* 1998).

Aislamiento y cultivo de 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 (Medina *et al.* 2008^a).

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 así: 1) sin reguladores de crecimiento, 2) 0.25 mg/l de ANA+0.5 mg/l (6-BA), 3) 0.1 mg/l de ANA+0,8 mg/l de BA, 4) 0.3 mg/l de ANA+1,0 mg/l de 6-BA, 5) 0.5 mg/l de ANA+1,5 mg/l de 6-BA, 6) 0.8 mg/l de ANA+1.8 mg/l de 6-BA, 7) 1.0 mg/l de ANA+2.0 mg/l de 6-BA y 8) 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 ± 0.1 y se esterilizó a 121°C y a 15 lb pul- 2 de presión por 15 minutos.

Los explantes se sembraron en medio de cultivo sólido en recipientes de vidrio de 100 ml de capacidad con tapadera de plástico, con unos 10 ml de medio de cultivo sólido y a razón de cuatro explantes por recipiente. Durante el período de cultivo los botes se sellaron con parafilm para evitar una excesiva evaporación, se colocaron en una cámara de crecimiento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ a 15 horas de fotoperíodo 60 días, la intensidad luminosa fue de 1500 a 2000 lux fría/ suministrada por tubos fluorescentes de 36W, equivalente a 34-90 m E/s/m². 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; esta última clasificada de la siguiente manera: >1 cm; de 0.5 a 1 cm y <0.5 cm.

Resultados y discusión

Multiplicación. Se observó que hubo diferencias significativas para la variable número de brotes por explante, resultando superior el tratamiento (T7) 1 mg/l de ANA+2 mg/l de 6-BA con un promedio de 295.5 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 200.6 y 9.5 respectivamente. Por el contrario, para los brotes inferiores a 0.5 cm todos los tratamientos hormonales generaron resultados similares (Tabla 1), contrastando el tratamiento (T8) que contenía ácido giberélico, regulador de crecimiento que promueve el alargamiento celular, con el tratamiento (T4) sin dicho regulador; se encontró que el efecto del ácido giberélico fue evidente porque duplicó el tamaño promedio de los brotes mayores a 1 cm. Por el contrario, para los brotes inferiores a 0.5 cm, se tuvo el mismo promedio de crecimiento. 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.* 2003, Smith 2000).

Los resultados obtenidos en esta fase son similares a los registrados 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 y

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» procedente de Munguidó

Tratamientos	Brotos por explantes			Número de brotes - Tamaño alcanzado			
	6.BA	ANA	GA ₃	>1 cm	0.5-1 cm	<0.5 cm	
T1	0	0	0	1,0	1,0	0,0	0,0
T2	0,5	0,25	0	4,6	3,6	4,0	0,0
T3	0,8	0,1	0	7,7	5,3	4,5	1,2
T4	1,0	0,3	0	9,4	5,9	3,4	1,3
T5	1,5	0,5	0	35,9	25,3	6,1	1,4
T6	1,8	0,8	0	49,3	45,6	8,8	—
T7	2,0	1,0	0	295,5	200,6	9,5	—
T8	1,0	0,3	2,0	15,4	9,5	0,8	1,3

para piña del Chocó, utilizando las mismas concentraciones de reguladores del crecimiento (Medina *et al.* 2008).

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 García 1987).

Por tanto, desde el punto de vista de la selección clonal, para la que se requiere un método de multiplicación *in vitro* eficiente y reproducible, la metodología expuesta en estos resultados es por lo menos en parte aplicable a diversas variantes botánicas de esta especie; teniendo en cuenta los diferentes orígenes y la diversidad de la especie el grado de multiplicación es alto.

Conclusiones

La combinación de los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) 1 mg/l y bencil amino purina (BA) 2 mg/l se propone como un tratamiento efectivo para realizar la selección clonal de la «piña de Castilla del Chocó», que permita la propagación masiva, al haber arrojado los mejores resultados con un promedio de 295.5 brotes por explante; también resultó ser más efectivo que el ácido giberélico (GA3) en la generación de explantes mayores de un centímetro.

Literatura citada

- Almeida WA de, Matos AP de, Souza A da S. 1995. Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Hort.* 425: 235-42.
- Casale M, García E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. Caracas: Centro de Botánica Tropical. p. 248-69.
- Daquinta M, Benega R, Martínez T, Castillo R. 1995. Estaquillado de hojas de piña *in vitro*. Centro de Bioplantas, Instituto Superior Agrícola de Ciego de Ávila. Cuba. *Centro Agrícola.* 2: 82-7.
- Dolgov SV, Shushkova TV, Firsov AP. 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*. Maracay: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 p.
- Griffith LP. 1998. *Tropical foliage plants*. Batavia: A Grower's Guide. Vancouver: Ball Publishing. 318 p.
- Mathews VH, Ragan TS. 1979. Multiple plantlets in lateral bud an leaf explant *in vitro* cultures of pineapple. *Scientia Hort.* 11: 319-28.
- Medina M, Nuez F, Prohen J. 2008a. Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de *Ananas comosus* L. «Piña de Castilla del Chocó». *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo.* 27 (2): 144.
- Medina MA, Prohen J, Nuez F. 2008b. Estrategias para la conservación y utilización de la biodiversidad agrícola del departamento del Chocó. *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo.* 27 (2): 129-43.
- Medina, MA, Prohen J, Nuez F. 2011. Recursos fitogenéticos silvestres y cultivados del departamento del Chocó, Colombia. *Rev Biodivers Neotrop.* 1 (1): 5-16.
- Mogollón N, González M, Liendo M. 2003. Efecto de dos tipos de reguladores en el enraizamiento del cocuy (*Agave cocui* Trelease) cultivado *in vitro*. LIII Convención Anual de AsoVAC. Maracaibo, Venezuela. *Acta Científica Venezolana.* 45 p.
- 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.
- Páez MG. 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. 231 p.