

TASA DE MULTIPLICACIÓN DE DOS VARIEDADES DE PIÑA (*Ananas comosus* L. MERRILL): CAYENA LISA Y GOLDEN SWEET, UTILIZANDO MEDIOS SÓLIDO Y LÍQUIDO EN CULTIVO «IN VITRO»¹

MONTIEL CACERES, M. B.²
VILLALBA, N.³

ABSTRACT

In the laboratory of Biotechnology of the National Agronomic Institute (IAN), located in the Caacupé city, Cordillera department, among the months of April of the year 2006 and February of the 2007, an experiment was carried out with the objective of evaluating the rate of multiplication of two pineapple varieties, Smooth Cayenne and Golden Sweet, through the cultivation «*in vitro*» of meristem that were sowed in medium of Murashige and Skoog 1962, (MS), added with vitamins of Heinz and Mee 1969, in accustomed to physical states (to which 8 agar gr/l was added) and i liquidate, that was put in agitation to 50 rpm. It was possible to study the effects of different combinations of Bencil Amino Purina (BAP) and Acido Naftaleno Acético (ANA), in the phase of multiplication of direct micropropagation, for they were added it three hormonal treatments: without regulators of growth; 1 mg/l of BAP + 1 mg/l of ANA and 2 mg/l of BAP + 1 mg/l of ANA. The statistical design was that of Complete Blocks the Chance in Parcels and Divided Sub-parcels, with 3 repetitions. To the eight weeks it was evaluated the number of buds for explante, watching it that was higher using 1 mg/l of BAP + 1 mg/l of ANA in liquid medium in agitation, for the variety Smooth Cayenne (134) and Golden Sweet (78). As for the treatment between solid, in the concentrations of 2 mg/l BAP and 1 mg/l of ANA, 19 and 7 buds were counted by explante for Smooth Cayenne and Golden Sweet respectively.

Key words: Pineapple, varieties, micropropagation, medium.

RESUMEN

En el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Agronómico Nacional (IAN), ubicado en la Ciudad de Caacupé, Departamento de Cordillera, Paraguay, entre los meses de Abril del año 2006 y Febrero del 2007, se realizó un experimento con el objetivo de evaluar la tasa de multiplicación de dos variedades de piña, Cayena Lisa y Golden Sweet, a través del cultivo «*in vitro*» de meristemas que fueron sembradas en medios sólido y líquido de Murashige & Skoog 1962, (MS), suplementado con vitaminas de Heinz & Mee 1969, al primer medio se adiciono agar, y el líquido fue puesto en agitación a 50 rpm. Fue posible estudiar los efectos de diferentes combinaciones de Bencil Amino Purina (BAP) y Acido Naftaleno Acético (ANA), en la fase de multiplicación de micropropagación directa, para ello se aplicaron tres tratamientos hormonales: sin regulador de crecimiento; 1 mg/l de BAP + 1 mg/l ANA y 2 mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA. El diseño estadístico fue el de Bloques Completos el Azar en Parcelas y Sub-parcelas Divididas, con 3 repeticiones. A las ocho semanas fue evaluado el número de brotes por explante, observándose que fue superior al usar 1 mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA en estado físico líquido en agitación, para la variedad Cayena Lisa (134) y Golden Sweet (78). En cuanto al tratamiento en medio sólido, en las concentraciones de 2 mg/l BAP y 1 mg/l de ANA, se contabilizaron 19 y 7 brotes por explante para Cayena Lisa y Golden Sweet respectivamente.

Palabras clave: Piña, variedades, micropropagación, medio.

¹ Parte de la tesis de grado presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ingeniería Agronómica. Departamento de Producción Agrícola.

² Ing. Agr. Egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica. Departamento de Producción Agrícola.

³ Prof. Ing. Agr. Docente a Tiempo Completo. Departamento de Producción Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias-UNA.

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es una especie tropical de gran interés económico y de amplio consumo en todo el globo terrestre. Es cultivado en casi todos los países de clima tropical y subtropical, especialmente en países en desarrollo por lo que se lo considera como una alternativa interesante para la diversificación agrícola para determinadas zonas del país. En el Paraguay, es un rubro de mucha aceptación con posibilidad de exportación a países vecinos, principalmente Argentina y Uruguay (Enciso, 1997).

La planta puede ser aprovechada con distintos fines, del tallo puede extraerse bromelina (enzima proteolítica de uso medicinal), siendo también fuente de almidón. Las hojas pueden ser utilizadas para la obtención de fibras. El fruto se utiliza tanto para consumo al natural como para procesamiento industrial en diversas formas como jugos, pedazos cristalizados, dulces, licor, vinagre y aguardiente. Como subproducto de su industrialización, pueden obtenerse alcohol, ácidos cítricos, málico y ascórbico, como también raciones para animales (Miranda, 1996).

En cuanto a las variedades de piña la más cultivada, en casi todos los países de clima tropical y subtropical es la Cayena Lisa, representando divisas para la exportación de la fruta industrializada o natural (Enciso, 1997).

Según Villalobos & Thorpe (1991) el cultivo de tejidos es una técnica de la Biotecnología que consiste en aislar una porción de la planta (explante), sea esta una célula, tejido u órgano, bajo condiciones físicas y químicas apropiadas. Las técnicas de cultivo «*in vitro*» son ampliamente utilizadas con diversos propósitos como el mejoramiento genético, obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, conservación de germoplasma y micropropagación. Entre las diferentes técnicas, la micropropagación ha sido utilizada en diferentes cultivos, sobre todo en aquellos que usan la propagación vegetativa, como sistema de multiplicación.

De acuerdo a Giacomelli (1982) la piña es una planta propagada vegetativamente, pudiéndose usar para la plantación mudas de varios tipos como: corona, hijuelo y reventón o vástago. La disponibilidad de mudas es un problema serio para los agricultores, y la calidad puede estar comprometida por la posible aparición de fusariosis. Se pueden obtener mudas sanas y de buena calidad fitosanitaria con el empleo de la técnica de micropropagación «*in vitro*», además de nuevos genotipos con resistencia a la fusariosis, a través de la separación de las plantas que presenten el mayor número de características favorables en el momento de la cosecha.

El presente trabajo tiene por objetivo determinar la tasa de multiplicación, utilizando diferentes dosis de auxinas y citoquininas en medios sólido y líquido, de dos variedades de piña en cultivo «*in vitro*».

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en Laboratorio de Biotecnología del Instituto Agronómico Nacional (IAN), ubicado en Caacupé, Departamento de Cordillera, entre los meses de Abril del año 2006 y Febrero del 2007.

Fueron multiplicadas dos variedades de piña, Cayena Lisa y Golden Sweet, se seleccionaron aquellas mudas del tipo corona, que presentaban las mejores características agronómicas, luego se eliminaron las hojas externas y la base de los tallos.

Se lavaron los tallos en una pileta con agua y detergente, y se enjuagaron dejando correr el agua de la canilla hasta eliminar totalmente el detergente. Luego se sumergieron los tallos en alcohol al 70 % por 3 segundos y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se continuó con la transferencia del material a hipoclorito de calcio al 1 % y unas gotas de Tween 20 por 20 minutos, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, a partir de esta fase los trabajos posteriores se llevaron a cabo en la cámara de flujo laminar. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, se efectuó la escisión de las yemas axilares, que fueron extraídas con auxilio de un bisturí de la porción intermedia de los tallos, en forma de pirámide, preservando aproximadamente 2 mm de tejido adyacente. Estas yemas fueron envueltas en una gasa y sumergidas en hipoclorito de calcio al 1 % por 10 minutos y se enjuagaron tres veces con agua estéril. El medio de cultivo consistió en las sales básicas de Murashige & Skoog (1962). Se suministraron además: tiamina como fuente de vitaminas, ácido nicotínico, glicina, piridoxina, pantotenato de calcio, sacarosa, mioinositol, y los reguladores de crecimiento BAP y ANA. El pH fue ajustado en 5,7 y solidificado con 7 gramos de agar, posteriormente se distribuyeron en tubos de ensayo conteniendo 15 ml del medio de cultivo.

El medio fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120 °C y 1,5 atm de presión. Después de la esterilización del material, los explantes fueron incubados en las siguientes condiciones: en cámara de crecimiento con 28° C de temperatura y 16 horas de luz. Se realizaron 6 subcultivos (cambio a medio fresco) cada 15 días durante tres meses aproximadamente.

Después del establecimiento del cultivo, los explantes sobrevivientes de la primera etapa fueron subcultivadas una vez que alcanzaron 2 cm de longitud. Los medios utilizados fueron sólido y líquido, y las concentraciones de fitoreguladores fueron diferentes combinaciones de Bencil Amino Purina (BAP) y Acido Naftaleno Acético (ANA). Para el medio sólido se utilizó Agar y el medio

El diseño experimental fue en Bloques Completos al Azar en Parcelas y Sub-parcelas divididas, con tres repeticiones, en total se contó con 36 unidades experimentales (explantes regenerados de la fase de establecimiento), los que se mantuvieron en la fase de multiplicación para luego medir la variable (Tabla 1).

TABLA 1- Tratamientos, estados físicos del medio, variedades y concentraciones de hormonas, que fueron utilizados en la fase de multiplicación.

Tratamiento	Estado físico del medio	Variedad	Concentración de hormonas (mg/l)
T ₁	Sólido	Cayena	Sin hormonas
T ₂	Sólido	Cayena	BAP 1 y ANA 1
T ₃	Sólido	Cayena	BAP 2 y ANA 1
T ₄	Sólido	Golden	Sin hormonas
T ₅	Sólido	Golden	BAP 1 y ANA 1
T ₆	Sólido	Golden	BAP 2 y ANA 1
T ₇	Líquido	Cayena	Sin hormonas
T ₈	Líquido	Cayena	BAP 1 y ANA 1
T ₉	Líquido	Cayena	BAP 2 y ANA 1
T ₁₀	Líquido	Golden	Sin hormonas
T ₁₁	Líquido	Golden	BAP 1 y ANA 1
T ₁₂	Líquido	Golden	BAP 2 y ANA 1

Se pudo medir el estado físico, la variedad y la combinación de concentraciones de Auxinas y Citoquininas más eficientes. La variable evaluada fue el número de brotes por explante.

Una vez agrupados los datos, estos fueron transformados con la fórmula ($\sqrt{+1}$), y se procedió a realizar los cálculos del análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tabla 2 se notan los valores obtenidos en relación a la tasa de multiplicación de brotes (número medio de brotes por explante), cultivados «*in vitro*».

El tratamiento donde el estado físico fue sólido estacionado, en concentraciones de 1 mg/l de la citoquinina BAP y 1 mg/l de la auxina ANA, la tasa de multiplicación obtenida fue de 11 y 5 brotes por explante, para las variedades Cayena Lisa y Golden Sweet, respectivamente.

Entre los tratamientos de consistencia sólida, se obtuvo la tasa de multiplicación más elevada para la combinación de 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, totalizando 19 brotes para la variedad Cayena Lisa y 7 brotes para Golden Sweet.

Casale & García (1987) utilizando la variedad Española Roja en medio MS sólido estacionado y adicionando 2 mg/l de ANA + 2 mg/l de AIA + 2 mg/l de BAP; a las dos semanas de la evaluación observaron una media de 3 brotes por explante.

TABLA 2- Tasa de multiplicación (número de brotes por explante) a las ocho semanas de inoculación de dos variedades de piña, en medios sólido y líquido MS, suplementado con BAP y ANA, en diversos tratamientos.

Tratamientos	Estado físico del medio	Variedad	Concentración de hormonas (mg/l)	Nº medio de brotes por explante
T ₁	Sólido	Cayena	Sin hormonas	0
T ₂	Sólido	Cayena	BAP 1 y ANA 1	11
T ₃	Sólido	Cayena	BAP 2 y ANA 1	19
T ₄	Sólido	Golden	Sin hormonas	1
T ₅	Sólido	Golden	BAP 1 y ANA 1	5
T ₆	Sólido	Golden	BAP 2 y ANA 1	7
T ₇	Líquido	Cayena	Sin hormonas	8
T ₈	Líquido	Cayena	BAP 1 y ANA 1	134
T ₉	Líquido	Cayena	BAP 2 y ANA 1	93
T ₁₀	Líquido	Golden	Sin hormonas	3
T ₁₁	Líquido	Golden	BAP 1 y ANA 1	78
T ₁₂	Líquido	Golden	BAP 2 y ANA 1	56

Los mismos autores arriba mencionados reportaron para las variedades de piña Primavera y Perola, que el BAP fue efectivo para la proliferación de los brotes, aunque utilizado en mayores concentraciones (5 mg/l), además de la adición de otros compuestos como ANA (2 mg/l) + IBA (2 mg/l) en medio MS en estado físico sólido. Al cabo de dos semanas obtuvieron una variación de 1 a 3 brotes en ambas variedades.

Se observó que ambas variedades en estado sólido y cuando no contenían en su composición los fitoreguladores mencionados, no presentaron o presentaron una baja tasa de multiplicación, 0 y 1 respectivamente (Tabla 1). La aparición de brotes en Cayena quizás se deba a la presencia de los fitoreguladores en forma endógena en la planta.

Los tratamientos de consistencia sólida, mostraron tasas de multiplicación marcadamente inferiores al estado físico líquido en agitación.

La variedad Cayena Lisa obtuvo el mayor número de brotes, en total 134, en estado físico líquido, mantenido en mesa de agitación y en concentraciones de 1 mg/l de la citoquinina BAP y 1 mg/l de la auxina ANA, mientras que la variedad Golden Sweet, para la misma concentración de hormonas presentó 78 brotes por explante (Tabla 2).

Se observó una elevada tasa de multiplicación, aunque inferior al anterior, para el tratamiento, que consistió en estado físico líquido, en agitación y con la concentración de 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, donde se obtuvieron 93 brotes por explante para Cayena y 56 para Golden (Tabla 2).

Estos resultados fueron superiores a los encontrados por Miranda (1996), que obtuvo una media de 11 brotes por explante al cabo de 60 días, utilizando medio de cultivo MS líquido estacionado, adicionando 1 mg/l de ANA + 1 mg/l de BAP, en la fase de multiplicación, para la variedad Cayena Lisa.

Mogollón et al. (2004), trabajando con brotes de piña de la variedad Queen Australia, utilizando medio MS líquido con la adición 0,01 mg/l de ANA + 1 mg/l de BA y colocados en una mesa agitadora a 30 rpm, obtuvieron una media de 39 brotes por explante, al cabo de ocho semanas de inoculación.

En este trabajo, con el tratamiento al cual no se adicionaron los fitorreguladores, donde la consistencia fue líquida y puesto en mesa de agitación, se observó que la tasa de multiplicación fue de 8 brotes por explante para Cayena y 3 para Golden (Tabla 2). Miranda (1996) trabajando con el mismo tratamiento, variedad Cayena y medio líquido estacionado obtuvo 1 brote por explante. El Análisis de Varianza (Tabla 3) mostró diferencias estadísticamente significativas para la variedad, el estado físico del medio y la concentración de reguladores de crecimiento.

TABLA 3- Cuadrados medios de los valores observados para Número de brotes por explante de piña en etapa de multiplicación «in vitro» en el Instituto Agronómico Nacionales la ciudad de Caacupé, Departamento Cordillera, 2006/7.

Fuente de variación	Fc	Ft
Repetición	5.921*	0.009
V	7.101 *	0.014
E	103.176**	0.000
C	45.779**	0.000
V x C	1.276ns	0.299
V x E	1.919ns	0.180
E x C	17.553**	0.000
V x E x C	0.093ns	0.912

* = significativo al 5 % de probabilidad, ** = no significativo
V = Variedad; E = Estado físico del medio; C = Concentración de Reguladores de Crecimiento

Los análisis estadísticos realizados, demostraron que hubo diferencias significativas para la interacción «Estado Físico del Medio x Concentración de Reguladores de Crecimiento» (Tabla 3). En la etapa de multiplicación «in vitro» de la piña, la asociación, en las mismas concentraciones de auxinas y citoquininas muestran un efecto sinérgico, para promover la formación de brotes.

Estos resultados refuerzan el concepto de que la interacción entre los reguladores de crecimiento hacen que la piña sea considerada una de aquellas plantas que, para una mayor proliferación de brotes, sea tratada como dependiente no solo de las citoquininas, sino también de las auxinas. Además, otros investigadores como Miranda (1996), refuerza la hipótesis de que la multiplicación de brotes «in vitro» puede ser maximizada

con el empleo del conjunto de dos o mas grupos de reguladores de crecimiento.

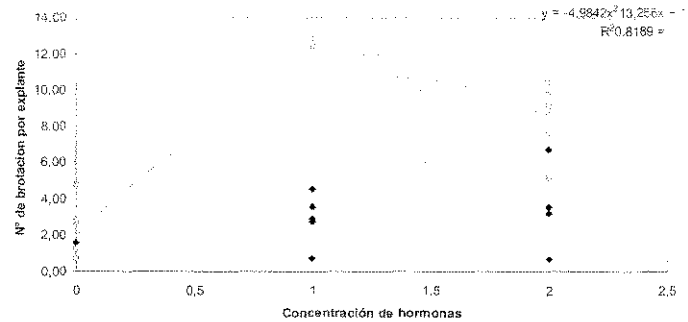


FIGURA 1- Relación entre la concentración de hormonas y el número de brotes por explante en función al estado físico del medio.

m 1 = Estado Sólido del medio; m 2 = Estado Líquido del medio

En relación al estado físico del medio, se observó que el medio líquido proporciona un número medio de nuevos brotes mayor que el medio sólido (Figura 1), favoreciendo los procesos organogénicos en la piña, coincidiendo con Casale & García (1987), quienes mencionan, que el proceso de multiplicación se ve favorecido por la utilización del medio líquido, quizá esto se deba a la gran capacidad que tiene la piña, y las bromelias en general, para absorber agua y nutrientes por los tricomas de la hojas.

La tasa de multiplicación también fue favorecida por la utilización de la mesa agitadora, coincidiendo con la experimentación de Rangan, mencionado por Miranda (1996), quien afirma que la agitación de frascos conteniendo el medio de cultivo en estado líquido durante el crecimiento, promueve el aumento del número de brotes formados en piña, comparándolo con aquellos mantenidos en medios sólido y líquido estacionario.

CONCLUSIONES

Se logró una alta tasa de multiplicación clonal de las variedades Cayena Lisa y Golden Sweet, obteniéndose 134 y 78 brotes por explante respectivamente.

La multiplicación «in vitro» de la piña fue optimizada en medio líquido con agitación a 50 rpm.

Se estimula la brotación, con todas las combinaciones de los reguladores de crecimiento, especialmente en la combinación de 1 mg/l de la citoquinina (BAP) y 1 mg/l de la auxina (ANA).

LITERATURA CITADA

- CASALE, J; GARCIA, E. 1985. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. In: ACEVIV BOLETIN CIENTÍFICO (2, 1985, Bogota, CO). Trabajos presentados. MONTES, V. (Ed.). Bogota, CO: ACEVIV. p. 1-18.
- ENCISO, C. 1997. Variedades de piña. In: LA PIÑA: RECOMENDACIONES TÉCNICAS PARA SU CULTIVO (1998, Instituto Agronómico Nacional, PY). Trabajos presentados. ENCISO, C. (Ed.). Caacupé, PY. p. 7-12.
- GIACOMELLI, E. 1982. Variedade e propagacao. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE ABCAXICULTURA (1., 1982, Jaboticabal, Sao Paulo, BR). Trabajos presentados. RUGGIERO, C. (Ed.). San Pablo, BR. p. 77-83.
- MIRANDA, I. 1996. Poliaminas e micropropagacao do abacaxixeiro (*Ananas comosus* L. MERR.) cv. Smooth cayenne. Tesis (M. Sc.). Botucatu, BR: Instituto de Biociencias de Botucatu. UEP. 107 p.
- MOGOLLON, N; DIAZ, J; HERNANDEZ, N. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento «*in vitro*» de *Ananás comosus* L. «Queen Australia» (en línea). Barquisimeto, VE. Consultado 28 enero 2007. Disponible en www.revfacagronluz.org/ve
- VILLALOBOS, V; THORPE, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W; MROGINSKI, L. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Cali, CO: Ciat. p. 127-141.