

## ESTUDIO DEL CRECIMIENTO "IN VITRO" DE YEMAS DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) DE LA VARIEDAD CAYENA LISA

ANA L. RAMIREZ<sup>1</sup>

### RESUMEN

Los procesos organogénicos dependen en gran medida de la relación óptima de las concentraciones de auxinas y citoquininas endógenas y exógenas presentes en los cultivos. Los tejidos meristemáticos de piña cultivados en un medio adecuado pueden ser reproducidos. Con el fin de obtener un crecimiento apreciable en yemas de pi-

ña cultivadas "in vitro", fueron utilizadas diferentes modificaciones del medio Murashige y Skoog. Los mejores resultados fueron encontrados con los medios que contenían 0,25 mg BAP + 0,2 mg de ANA/litro aunque el segundo resultó más favorable para el crecimiento de los brotes aéreos. Las combinaciones de ANA y AIB solo garantizaron el establecimiento del cultivo.

### INTRODUCCION

Los tejidos meristemáticos de piña puestos en medios de cultivo con nutrientes adecuados pueden ser reproducidos. Teo (1974) plantea que es posible lograr que esas células proliferadas se diferencien en plántulas con raíces, las cuales son capaces de crecer normal e independientemente. Numerosos trabajos se han realizado utilizando el tejido meristemático de piña. Entre los más importantes se encuentran los de Lakamisita al (1974), Nozeran et al (1974), Mathews

et al (1976), Wakasa et al (1978), Mathews (1979), Drew (1980) y Herve et al (1981).

Este método de reproducción "in vitro" ofrece la posibilidad de multiplicar de forma rápida cultivos de difícil propagación como es el caso de la piña y llevar a la producción nuevos clones y variedades.

En el siguiente trabajo se exponen los resultados obtenidos al colocar yemas de piña en diferentes medios de cultivo.

### MATERIALES Y METODOS

#### Materiales utilizados y preparación

Como fuente de material se utilizaron yemas axilares de coronas de piña de la variedad Cayena Lisa. Las yemas tomadas fueron de la parte central de la corona, siguiendo las orientaciones de Nozeran et al (1974). Antes de la extracción de las mismas, las coronas fueron deshojadas cuidadosamente y lavadas con agua corriente;

los cortes se hicieron dejando de 3-4 mm de tejido subyacente alrededor de la yema. Después que las mismas fueron extraídas, se sumergieron en una solución antioxidante que contenía las sales de MS (1962), diluidas al 50 %, 125,4 mg de Cisteína, 99 mg de Meso inositol y 10,11 mg de tiamina, por litro de agua. Las yemas se mantuvieron en la misma hasta el momento del tratamiento; toda la manipulación posterior se realizó en condiciones acépticas.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ISCAH, La Habana.

## Desinfección del material

Buscando una mayor efectividad en la desinfección y analizando las experiencias de Gamborg et al (1975), Nancy Santana (1984), Martínez (1985) y Ana Luisa Ramírez (1984), se utilizó como desinfectante el cloro comercial (2,5 %) diluido al 10 % con 20 minutos de aplicación.

## Medios y condiciones de cultivo

Teniendo en cuenta resultados anteriores, Mathews et al (1976) y Ana Luisa Ramírez (1984), se utilizaron en el trabajo los siguientes medios:

- . Medio No. 1- MS + (0,1 mg ANA + 0,4 mg AIB + 2,1 mg Kinetina)/l.
- . Medio No. 2- MS (0,1 mg 24 D + 0,1 mg Kinetina)/l.
- . Medio No. 3- MS (0,25 mg BAP + 0,2 mg ANA)/l.

. Medio No. 4- MS (2,5 mg BAP + 0,2 mg ANA)/l.

En todos los casos el medio base utilizado fue el de Murashige et al (1962).

En cada siembra se utilizaron 60 tubos/medio y estas fueron repetidas 3 veces; posteriormente las yemas fueron sometidas a un régimen de 16 horas luz y una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

## Observaciones realizadas

Se realizaron observaciones periódicas (cada 7 días) del desarrollo del material efectuándose los trasplantes entre los 20 y 30 días después de la siembra, a 20 explantes de los medios 3 y 4. Se les midió la longitud a los 30 y 60 días de su colocación en el medio, aplicándole a los datos la prueba de Snedecor y Col. (1971), para diferencia entre medias de dos muestras independientes.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El crecimiento de los explantes comenzó como promedio una semana después que las mismas fueron puestas en cultivo. En sentido general, solo una cuarta parte de las yemas que llegaron a brotar fueron capaces de continuar su desarrollo.

En el caso de la piña, la cantidad de yemas capaces de brotar después de puestas en cultivo es difícil de determinar, así como el por ciento de plántulas que puedan alcanzar un tamaño adecuado para el trasplante al suelo. Como aspecto generalizado se observó en todos los medios utilizados que entre el 20-30 % de los fragmentos portadores de las yemas, a la semana de haber sido puestas en cultivo, comenzaban a presentar un necrosamiento en toda la superficie de contacto con el medio.

Para tratar de solucionar esta situación se efectuaron trasplantes a otros medios frescos, realizando antes eliminación de la capa necrosada que recubría el material. En la mayoría de los casos no hubo respuesta y el crecimiento continuó demasiado lento.

Herve et al (1981) plantean que en el cultivo de la piña, las yemas axilares que han comenzado su desarrollo pueden necrosarse rápidamente, debiéndose este efecto a la emisión de sustancias tóxicas excretadas por el explante inicial, formando así una capa necrosada que las cubre.

En el desarrollo del trabajo se observó también una gran heterogeneidad en el crecimiento, independiente del medio utilizado (Nozeran et al, 1974). Refiriéndose al crecimiento "in vitro" de yemas de piña, plantea la dependencia que este presenta con algunos factores en particular con su estado fisiológico y con las condiciones bajo las cuales debe desarrollarse (medio nutritivo, temperatura y luminosidad).

## Comportamiento de los medios

El medio MS con 0,1 mg ANA, 0,4 mg AIB y 2,1 mg de Kinetina/l recomendado por Mathews (1976), ofreció buenos resultados para el comienzo del desarrollo. A los 30 días de la siembra fue necesario el cambio para otro medio con AIA (0,2 mg/l) para garantizar la continuidad del mismo.

En el medio MS con 0,1 mg de 2,4-D y 0,5 mg de Kinetina las yemas comenzaron su desarrollo normal pero al iniciarse la emisión de hojas estas aparecían muy unidas y en forma de roseta. Esta forma de crecimiento fue también encontrado por Panetier et al (1976), al realizar trasplante sobre medio enriquecido con Bencil adenina (0,01 mg) más ácido indol-butírico (0,1 mg); el autor atribuyó este fenómeno a problemas de iluminación. Por

nuestra parte pudimos constatar que cuando las plantas fueron trasplantadas a un medio enriquecido con AIA en iguales condiciones de luminosidad, las mismas comenzaron a alargarse, las nuevas hojitas fueron normales, pero su crecimiento continuó lento; a los 70 días solamente alcanzaban 2 cm de longitud y solo en algunos casos aislados existían esbozos de raíces.

Los mejores resultados fueron encontrados al utilizar los medios MS con 0,25 mg BAP más 0,2 mg ANA y MS con 2,5 mg BAP más 0,2 mg ANA.

En la primera etapa el crecimiento fue normal para ambos medios. A los 14 días ya se percibía en las yemas un tenue color verde; a los 30 días se observaron las pequeñas hojitas. Al realizarse el análisis de la diferencia entre medias de la altura de las pequeñas plantas para ambos medios, no se encontraron diferencias, aun

que se observaba cierta superioridad en el segundo medio; la heterogeneidad del crecimiento se puso de manifiesto nuevamente. Al hacerse el análisis de la altura a los 60 días, se encontraron diferencias favorables para el medio que contenía 2,5 mg BAP y 0,2 mg ANA (Tabla I).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y en otros anteriores (Ramírez, Ana L., 1984-1985), la primera parte del desarrollo de los explantes podía lograrse sin dificultad. Sin embargo, sería interesante la utilización de las combinaciones de BAP y ANA en la segunda etapa que comprende el desarrollo foliar y radical; en el cultivo de la pina esta etapa del crecimiento resulta tan importante como la primera, ya que el trasplante a los invernaderos no alcanza éxito si las pequeñas plantas no poseen una altura superior que 5 cm.

Tabla I: Altura de las plantas.

| Variantes | Días de cultivo | X    | 2     | DM       |
|-----------|-----------------|------|-------|----------|
| A         | 30              | 0,90 | 2,41  | 0,153 NS |
| B         | 30              | 0,99 | 1,03  |          |
| A         | 60              | 1,21 | 0,163 | 207 *    |
| B         | 60              | 3,15 | 0,802 |          |

## REFERENCIAS

- BREW, R.A. 1980. Pineapple Tissue Culture Unequaled for Rapid Multiplication. Queensland Agricultural Journal. 106 (5): 447-451.
- GAMBORG, D.L. AND L.M. WETENN. 1975. Plant Tissue Culture Methods. National Research Council of Canada. p. 231-234.
- HERVE, M.; R. NOZERAN ET G. DUCREUX. 1981. Variation de l'expression épineux chez l'Ananas comosus (L. Merr.), Variété Cayenne lisse cultivée "in vitro". (Sin publicar) Université Paris-Sud. Centre d'Orsay.
- LAKSMISITA, G.; R. SINGH ET C.P.A. IYES. 1974. Plantlets Through Shorttip Culture in Pineapples. Curr. Sci. India 43, (22): 724-725.
- MATHEWS, HELENA; T.S. RANGAN ET W.S. NARANGANA. 1976. Micropropagation of Ananas sativus "in vitro". Z. Pflanzphysiol. 79: 450-454.
- MATHEWS, HELENA. 1979. Multiple Plantlets in Lateral Bud and Leaf Explant "in vitro" Culture of Pineapple. Scientia Horticulturae 11: 319-328.
- MARTINEZ, O. 1985. Instituto de Ciencia Animal. Comunicación personal.
- MURASHIGE, T. ET F. SKOOG. 1962. Revised Medium of Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant 15: 473-497.
- NOZERAN, R. 1974. Premiers résultats obtenus concernant à l'utilisation des cultures in vitro pour résoudre certains problèmes posés par la multiplication végétative de l'ananas. Sin publicar. Inst. de Botanique Université Paris-Sud. Orsay.
- NOZERAN, R. ET L. BANCILLION. 1974. Multiplication végétative chez les végétaux vasculaires. Colloque de morphogénèse, 7-8 mars. Orsay. Sin publicar. Société Botanique de France.

- SNEDECOR, G.W. AND W.G. COCHRAN. 1971. 6ta. ed. *Métodos estadísticos*. México, Editorial Continental. p. 364-366.
- TEO, C.K. 1974. *Clonal propagation of pineapple by Tissue Culture*. Planter 50 (575): 58-59.
- WAKASA, K.; C. KOGA ET M. KUDO. 1979. *Differentiation from "in vitro" Culture of Ananas comosus*. Japan J. Pl. Breed. 28 (2): 284-292.
- PANNETIER, C. ET C. LANAUD. 1976. *Divers aspects de l'utilisation possible de culture in vitro pour la multiplication végétative de l'Ananas comosus L. Merr. Variété Cayenne Lisse*. Fruits 31(12): 739-750.
- RAMIREZ, ANA L. 1984. *Reproducción de la piña (Ananas comosus L. Merr), mediante cultivo de tejidos*. Cultivos Tropicales 6 (3): 681-697.
- RAMIREZ, ANA L. 1985. *Determinación de un método adecuado de desinfección en el cultivo "in vitro" de la piña (Ananas comosus L. Merr.)*. Cultivos Tropicales. (En prensa).
- SANTANA, NANCY. 1984. *Cultivo de tejidos en caña de azúcar (Saccharum sp)*. Cultivos Tropicales 6 (3): 611-622.

### ABSTRACT

"IN VITRO" CULTURE OF PINEAPPLE (*Ananas comosus* L.) SPROUTS, SMOOTH CAYENE VAR.

Organogenetical processes depend greatly on the optimum relationship between endogenous and exogenous cytokinin and auxin concentrations, which are present in the crop. Meristematic tissues of pineapple growing in an adequate medium can be

reproduced. Different modifications of Murashige & Skoog's medium were used to achieve a valuable "in vitro" culture of pineapple sprouts. The best results were recorded with media containing 0,25 mg BAP : 0,2 mg ANA/1, although the latter was much more profitable for aerial sprouts. Combinations of ANA and AIB just assured crop establishment.

Manuscrito recibido el 1/IV/86.