

## Micropropagación y formación de callo de dos cultivares de piña champaka y md2

### Micropropagation and callus induction in the champaka and md2 pineapple cultivars

Bernardo Romero Ramírez<sup>1</sup>, Leticia Escobedo Bocardo<sup>2</sup>

#### Resumen

La piña (*Ananas comosus* L. (Merr)) es una planta de reproducción principalmente asexual, muy lenta por lo que se necesitan muchos años para la producción de cantidades suficientes de plantas cuando se desea abrir nuevas áreas al cultivo o una nueva variedad. Una opción para obtener material en corto tiempo es utilizar técnicas de micropropagación. El objetivo por ello del presente trabajo fue establecer un modelo adecuado de micropropagación e inducción de callo en los cultivares de piña (*Ananas comosus* L. (Merr)) Champaka y MD2 se partió de yemas axilares de la corona. En cada etapa de micropropagación se evaluaron diferentes concentraciones de fitoreguladores solas y combinadas utilizando como medio nutritivo base el MS (1962). Para la etapa de establecimiento del cultivo aséptico el mejor tratamiento en el cultivar Champaka estuvo compuesto por 0.5 mg l<sup>-1</sup> de Benzilaminopurina (BAP) y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de Ácido naftalenacético (ANA) con 37% de brotación y buena calidad de brote y en MD2 por 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg l<sup>-1</sup> de ANA con 40% de brotación y buena calidad de brote; para la etapa de propagación masiva en Champaka el mejor tratamiento estuvo compuesto por 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP con promedio de 4.3 brotes y en MD2 por 0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP con promedio de 4 brotes; mientras que en el enraizamiento *in vitro* para el cultivar Champaka y en MD2 la mejor respuesta se obtuvo con 0.2 mg l<sup>-1</sup> de ANA con promedio de 9.9 raíces respectivamente, los mejores resultados en formación de callo se obtuvieron con 0.4 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 10 mg l<sup>-1</sup> de ANA en el cultivar Champaka con peso de 8.03 g y con 0.2 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 12 mg l<sup>-1</sup> de ANA en MD2 con 7.96 g.

**Palabras Clave:** micropropagación, *Ananas comosus*, piña

#### Abstract

The pineapple (*Ananas comosus* L. (Merr)) is a plant of asexual and very slow reproduction for it takes many years for the production of sufficient plant quantities when needed to open new cultivate area or a new variety. An option to obtain material in a short time is using micropropagation techniques. The objective of this work was to establish an adequate micropopagation model and callus induction in the cultivars of Champaka and MD2 pineapple (*Ananas comosuss* L. (Merr)) starting from axillary buds of the crown. In each micropopagation phase, different fitoregulator concentrations were evaluated using as medium nutritious MS (1962). For the phase of establishment of the aseptic cultivation, the best treatment in the Champaka cultivar was composed by 0.5 mg l<sup>-1</sup> of Benzilaminopurina (BAP) and 0.5 mg l<sup>-1</sup> of naftalenacetic acid (ANA) with 37% shoot and good quality bud and in MD2 by 1 mg l<sup>-1</sup> of BAP and 1 mg l<sup>-1</sup> of ANA with 40% shoot and good quality bud; for the phase of massive propagation

processing was composed by 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of BAP with average of 4.3 bud and in MD2 for 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of BAP with average of 4 bud; while in vitro rooting for the Champaka cultivar, the best behavior was obtained with 0.2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of ANA with an average of 9.9 roots and in MD2 with the same concentration but with an average of 9.7, the better results in callus formation obtained with 0.4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of BAP and 10 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of ANA in the Champaka cultivar with a weight of 8.03 g and with 0.2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of BAP and 12 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of ANA in MD2 with 7.96 g.

**Key Words:** micropropagation, *Ananas comosus*, pineapple

## Introducción

La piña es la especie de mayor importancia económica dentro de la familia de las bromeláceas, recientemente se ha colocado entre los primeros lugares en la producción mundial, preferida por los países de clima templado donde se exporta (ASERCA, 2000). Es una planta de reproducción principalmente asexual. Cuando son producidas semillas tienen dificultad para germinar, lo que obstaculiza los programas de mejoramiento genético en esta especie (Coppens, 1995).

En México en la década 80-89 el rendimiento promedio fue de 45.8 ton/ha y se observa que el rendimiento no se ha incrementado en los últimos años, una causa de ello, es el poco o nulo mejoramiento genético en el cultivo, esta situación ubica al país por debajo de los productores importantes de piña por ejemplo E. U. A. (Hawai) que supera las 80 ton/ha. (Dussel, 2002). En general los países productores de piña, comparten el problema de deficiencia de material de propagación, cuando se desea introducir una nueva variedad, abrir nuevas áreas de cultivo ó realizar pruebas experimentales. Dependiendo de la densidad y el cultivar requerido, se necesitan de 35,000 a 75,000 propágulos por hectárea. Los propágulos se obtienen aproximadamente 24 meses después de la siembra, si se desea la introducción a nivel comercial de una variedad, que produce dos propágulos por planta, se necesitarían alrededor de 30 años para tener suficiente material para sembrar una hectárea a partir de una planta (Rangan, 1985). La dificultad de propagar esta especie indica la conveniencia de emplear el cultivo *in vitro*. En la actualidad solo algunos países como Estados Unidos, Australia y Malasia han establecido tal metodología a escala comercial (George, 1996). De acuerdo a lo anterior, el presente trabajo consiste en desarrollar un modelo adecuada de micropropagación e inducción de callo en los cultivares de piña (*Ananas comosus* L (Merr)), Champaka y MD2.

## Metodología Experimental

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El material vegetal utilizado partió de coronas de los cultivares Champaka y MD2 las que fueron solicitadas al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias ubicado en Villa Isla Veracruz, las coronas se establecieron en invernadero donde se les dio el manejo adecuado de riegos y control

de plagas y enfermedades. El cultivar Champaka permaneció en invernadero seis meses mientras que el cultivar MD2 permaneció cuatro meses.

En establecimiento del cultivo aséptico se partió yemas de la corona (George, 1996) que fueron colocadas en el medio nutritivo MS con 3 concentraciones de ANA, 0.5, 1 y 2 mg l<sup>-1</sup> y 3 concentraciones de BAP, 0.5, 1 y 2 mg l<sup>-1</sup>, solas y combinadas, además del tratamiento compuesto por 2 mg l<sup>-1</sup> de ANA, 2 mg l<sup>-1</sup> de AIA y 2 mg l<sup>-1</sup> de KIN y el testigo, que en total conformaron 17 tratamientos.

En esta etapa fueron realizadas dos desinfecciones; en la primera se deshojaron las coronas y se lavaron con agua y tween 20, en la campana de flujo laminar se separaron sus yemas sumergiéndolas en alcohol al 70% v/v por 60 segundos y enjuagándolas tres veces con agua destilada estéril. La segunda consistió en sumergir las yemas en cloro al 20% v/v por 18 minutos y enjuagarlas tres veces con agua destilada estéril. Los explantes fueron trasladados al cuarto de incubación con temperatura de 25 ± 2 °C, intensidad lumínica de 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas. Se trasvasaron a medio fresco cada 20 días y permanecieron en esta etapa por 60 días los parámetros que se evaluaron fueron, porcentaje de brotación y calidad de brote.

Para la etapa de propagación masiva fueron seleccionados propágulos de los mejores tratamientos de la etapa de establecimiento del cultivo aséptico y fueron colocados para lograr su multiplicación en medio nutritivo MS, con 3 concentraciones de ANA, 0.1, 0.2 y 0.3 mg l<sup>-1</sup> y tres de BAP, 0.25, 0.5 y 1 mg l<sup>-1</sup> solas y combinadas además del testigo lo que conformaron en total 16 tratamientos. Después se trasladaron al área de incubación con temperatura de 25 ± 2 °C, intensidad lumínica de 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas, trasvasándose cada 20 días, durante 60 días, los parámetros que se evaluaron fueron: número de brotes y longitud de brotes.

La etapa de enraizamiento *in vitro* se inició con plántulas procedentes de la etapa de propagación masiva, las cuales se trasvasaron y mantuvieron en un medio MS sin reguladores de crecimiento, por espacio de 30 días, posteriormente se trasvasaron a un medio adicionado con las concentraciones y combinaciones de BAP (0, 0.01, 0.02 y 0.03 mg l<sup>-1</sup>) y ANA (0, 0.1, 0.2 y 0.3 mg l<sup>-1</sup>) para lograr el enraizamiento *in vitro*. Permanecieron en área de incubación, con temperatura de 25 ± 2 °C, intensidad lumínica de 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas y se cambiaron cada 21 días a medio fresco por 60 días los parámetros que se evaluaron fueron longitud de raíces y número de raíces por planta.

Para la fase de inducción de callo se utilizaron propágulos de la etapa de establecimiento del cultivo aséptico, los cuales se colocaron en el medio MS con 4 concentraciones de ANA, 2, 5, 10 y 12 mg l<sup>-1</sup> y 3 concentraciones de BAP, 0, 0.2 y 0.4 mg l<sup>-1</sup> las cuales se combinaron obteniendo 12 tratamientos. Luego fueron llevados al cuarto de incubación con temperatura de 25 ± 2 °C, intensidad lumínica de 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas. Cada 30 días, los explantes se trasvasaron a medio fresco, por 75 días tiempo en que se pesaron para su evaluación.

## Resultados Y Discusión

Para los cultivares Champaka y MD2 los cuadrados medios de los análisis de varianza, (Cuadros 1 y 2) indicaron alta significancia en por ciento de brotación, calidad de brote, número de brotes, número de raíces, longitud de raíces y peso de callo para tratamientos, excepto para longitud de brotes, en Champaka no existió significancia.

Esto indicó que las combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas provocaron diferentes comportamientos en las etapas de establecimiento del cultivo aséptico, propagación masiva, enraizamiento *in vitro* e inducción de callo, para los dos cultivares.

Cuadro 1. Cuadrados medios para tratamientos y su significancia en la micropropagación de piña cultivar MD2.

FV	GL	% B	CB	GL	NB	LB	G L	NR	LR	G L	PC
Tratami ento	16	256.30 **	0.08* *	15	3.9* *	0.09* *	15	27.08 **	4.89* *	8	10.48 **
Error	51	67.70	0.00	80	0.41	0.03	96	2.62	0.40	54	0.33
CV		28.8	29.1		26.6	24.0		24.6	38.5		9.1

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, CV=Coeficiente de variación, % B=Porcentaje de Brotación; CB=Calidad de Brote, NB=Número de brotes, LB=Longitud de brotes, NR=Número de raíces, LR=Longitud de raíces, PC=Peso de callo, ns, \*, \*\* =No significancia, Significancia a 0.05 y Significancia a 0.01 respectivamente.

Cuadro 2. Cuadrados medios para tratamientos y su significancia en la micropropagación de piña cultivar Champaka.

FV	GL	% B	CB	GL	NB	LB	G L	NR	LR	G L	PC
Tratami ento	16	257.16 **	0.08 **	15	4 **	0.11 ns	15	20.1 **	3.25 **	8	12.44 **
Error	51	95.16	0.02	80	0.74	0.06	96	5.3	0.23	54	0.10
CV		35.4	44.6		35.8	33.4		32.7	35.4		4.6

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, CV=Coeficiente de variación, % B=Porcentaje de Brotación; CB=Calidad de Brote, NB=Número de brotes, LB=Longitud de brotes, NR=Número de raíces, LR=Longitud de raíces, PC=Peso de callo, ns, \*, \*\* =No significancia, Significancia a 0.05 y Significancia a 0.01 respectivamente.

En Champaka la prueba de Duncan (0.05) para comparación de medias de por ciento de brotación (Figura 1) colocó como mejores tratamientos al 17, (ANA, AIB y KIN 2 mg l<sup>-1</sup> de cada uno de ellos), 6 (0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> ANA), 5 (0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0 de ANA) y 16 (2 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 2 mg l<sup>-1</sup> ANA) todos ellos con un promedio de 37 % de brotación. Mientras que en el cultivar MD2 los mejores tratamientos fueron el 11 (1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg l<sup>-1</sup> de ANA), el 10 (1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA) y el 6 (0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> ANA) en los cuales se obtuvo un porcentaje de brotación de 40%. Existe diferencia en los cultivares en cuanto al mejor porcentaje de brotación, siendo mayor en MD2. Como se puede observar este porcentaje de brotación es bajo y es un problema importante, como lo menciona Gutiérrez *et al* (1991), que encontró un porcentaje de brotación en piña cultivar Cayena lisa de 25%.

La comparación de medias (Duncan, 0.05), para la calidad de brote Champaka mostró que el mejor tratamiento fue el 6 (0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA) con buena calidad de brote (0.6) y se observó que los tratamientos con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin ANA generaron mala calidad de brotes. Mientras que en MD2 el mejor tratamiento fue el 11 (1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg l<sup>-1</sup> de ANA) con muy buena calidad de brote (0.65). Tomando en cuenta los dos parámetros porcentaje de brotación y calidad de brote se tiene que el mejor tratamiento en Champaka fue la combinación 0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA y en MD2, 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg l<sup>-1</sup> de ANA, estas concentraciones difieren a las encontradas por Dewald *et al* (1988) de 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 2 mg l<sup>-1</sup> de ANA en el cultivar Cayena lisa y Fitchet (1990) de 2 mg l<sup>-1</sup> de ANA, 2 mg l<sup>-1</sup> de AIB y 2 mg l<sup>-1</sup> de KN en el cultivar de piña Queen, lo que se ha observado en todas estas combinaciones son las mismas concentraciones de cada fitorregulador, por lo que el balance de auxinas y citocininas agregadas en la primera etapa debe ser equilibrado.

En cuanto a número de brotes las comparaciones de medias (Duncan, 0.05) para los 2 cultivares indican que el tratamiento 13 (1 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin ANA) fue el mejor con 4 brotes por planta para el cultivar MD2, y 4.3 brotes por plántula en Champaka. La tendencia que se observó para los dos cultivares fue que los tratamientos que solo contenían BAP presentaron un comportamiento superior a los otros tratamientos, obteniéndose con ellos mayor número de brotes por plántula. Estos resultados son similares a los encontrados por Cordeiro *et al* (1999), que la mejor respuesta la obtuvo con la concentración de 0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP obteniendo en promedio 5 brotes por plántula en el cultivar champaka.

La prueba de comparación de medias (Duncan, 0.05) del cultivar Champaka para longitud de brotes, el tratamiento 15 (1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.2 mg l<sup>-1</sup> de ANA) fue superior con 1 centímetro de longitud; mientras que en MD2 con el tratamiento 1 (sin fitorreguladores) se logró la mayor longitud de brotes (1 centímetro.).

Para número de raíces en los dos cultivares, el tratamiento superior según la prueba de comparación de medias de Duncan (0.05) fue el tratamiento 3 (0.2 mg l<sup>-1</sup> de ANA sin BAP); con 9.7 raicillas para el cultivar MD2 y 9.9 para el cultivar Champaka.

En los dos cultivares la prueba de medias de Duncan (0.05) para longitud de raíces indicó que el mejor tratamiento fue el 1 (sin reguladores de crecimiento) en los 2 cultivares presentando longitud promedio de 2.9 centímetros, aunque en MD2 los tratamientos 1 (sin reguladores), 5 (0.01 mg l<sup>-1</sup> de BAP) y 2 (0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA) resultaron estadísticamente iguales, con promedios de 2.9, 2.7 y 2.7 centímetros de longitud de raíces respectivamente. En caso del cultivar MD2 el tratamiento 1 (sin fitorreguladores) ocupó el segundo lugar en la prueba de medias para número de raicillas y el primer lugar en longitud de raicillas, mientras que para Champaka el tratamiento 2 (0.1 mg l<sup>-1</sup> de ANA) se ubicó en el cuarto lugar para longitud de raicillas y en primer lugar para número de raicillas. Varios autores han obviado los fitorreguladores en la etapa de enraizamiento *in vitro*, obteniendo con ello buenos resultados (Gutiérrez, 1991; Almeida, 1998)

En la etapa de inducción de callo para el cultivar Champaka la prueba de medias Duncan (0.05) indicó que el tratamiento superior fue el 11 (0.4 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 10 mg l<sup>-1</sup> de ANA) y tuvo peso promedio de 8.03 g, mientras que en MD2 el mejor peso de 7.96 g se obtuvo con el tratamiento 8 (0.2 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 12 mg l<sup>-1</sup> de ANA) resultados diferentes fueron encontrados por Benega *et al.* en 1997, donde formó callo adicionando únicamente 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA en medio MS (50%), sin embargo en el

presente estudio se observa como parte esencial el uso de ANA en mayores cantidades ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) comparado con el de BAP .

## Conclusiones

Se encontraron combinaciones adecuadas de reguladores de crecimiento para cada uno de los cultivares de piña, Champaka y MD2, en las etapas de establecimiento del cultivo aséptico, propagación masiva, enraizamiento *in vitro* e inducción de callo.

- Para la etapa de establecimiento del cultivo aséptico el mejor tratamiento en el cultivar Champaka estuvo compuesto por  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de Benzilaminopurina (BAP) y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de Ácido naftalenacético (ANA) con 37% de brotación y buena calidad de brote y en MD2 por  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA con 40% de brotación y buena calidad de brote.
- Para la etapa de propagación masiva en Champaka el mejor tratamiento estuvo compuesto por  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con promedio de 4.3 brotes y en MD2 por  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con promedio de 4 brotes; mientras que en el enraizamiento *in vitro* para el cultivar Champaka y en MD2 la mejor respuesta se obtuvo con  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA con promedio de 9.9 raíces respectivamente.
- Los mejores resultados en formación de callo se obtuvieron con  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $10 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en el cultivar Champaka con peso de 8.03 g y con  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $12 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en MD2 con 7.96 g. Con ello se obtuvo la metodología adecuada para los dos cultivares.

## Literatura Citada

Almeida **W A, A P Matos, A S Souza 1998**. Effects Of Benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L) MERR.). Acta Horticulturae 425:450-453.

ASERCA**2000**. Claridades agropecuarias. Octubre. México D. F. Dr. Mario Barreiro Perera. Pp. 6-31.

Benega **R, M Cisneros, A Martínez, J Torres, I Hidalgo, C G Hugon, 1997** *In vitro* germination and callus formation in pineapple hybrid seeds (*Ananas comosus* (L) Merr.) Acta Horticulturae.. No 425, 243-246.

Coppens **G E y D M France 1995** Bases genéticas para definir una estrategia de mejoramiento de la piña. CIRAD-FLHOR 21: 95-118.

Cordeiro **S J, R M Valderez, G C Alves, Joquebede B C e D Correia 2001** Efeito das citocininas thidiazuron e Benzilaminopurina na multiplicacao de gemas *in vitro* de abacaxizeiro cv Cayenne Campac (*Ananas comosus* (L) Merr.) *in*: EMBRAPA boletín informativo No 01-025. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuaria Tropical. pp: 1-6.

Dewald **M G, moore, W B S Sherman and H M Evands (1989)** production of pineapple *in vitro*. Plant Cell Reports. 7:535-537

Dussel **P E 2002** Condiciones y propuestas de política para los clusters del limón Mexicano en Colima y la piña en Veracruz. Editorial Plaza y Valdés. México D.F. 270 p.

- George **E F 1996** Plant Propagation by Tissue Culture Part 2 in Practice. Second Edition. Exegetics Limited. Edington, Wilts England. 1361 p.
- Fitchet **M 1990** Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapples. *Acta Horticulturae* 275:261-266.
- Gutierrez **E M, M A Villegas, A J, Rodríguez y P M, López (1991)**, Efecto benziladenina, ácido indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de piña. *Agro ciencia; Serie Fitociencia; Vol. 2; Num. 2, Abril-junio*. Pp. 127 y 128
- Guzmán **N A 1990** Micropropagación de piña, Champaca y MD-2 de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) a partir de yemas axilares de la corona. *In: FIRA boletín informativo No 217 Vol. XXII. Micropropagación vegetal en México pp.: 23-30*.
- Rangan. **T S 1985** Pineapple *In: Handbook of plant cell culture*. Ed. Sharp, Evans, Ammirato and Yolanda. Vol. 3 MacMillan Publishers. New York pp. 373-380.

