

## MICROPROPAGACION DE LA VARIEDAD DE PIÑA CHAMPAKA F-153<sup>1</sup>

Harry Garita\*, Luis Gómez<sup>2</sup>/\*\*

**Palabras clave:** micropropagación, piña Champaka F-1531, Costa Rica.

### RESUMEN

### ABSTRACT

Se determinaron las condiciones necesarias para la micropropagación de la variedad de piña Champaka F-153. Apices y yemas de coronas e hijos laterales se cultivaron en 4 diferentes medios de cultivo. Para la etapa de establecimiento los medios se suplementaron con 0.2 mg/L 6-BAP+0.1 mg/L ANA y para la etapa de multiplicación con 1.0 mg/L 6-BAP+1.0 mg/L AIB. Para el enraizamiento en el invernadero, las plántulas se clasificaron según su peso y se sembraron en 4 diferentes sustratos: fibra de coco molida, turba: fibra de coco molida 1:1, turba y suelo:arena 1:1, sin aplicación de ANA. Al obtener un mejor resultado en la fibra de coco molida otras plantas se sembraron en este sustrato y se probaron 6 concentraciones de ANA para estimular el enraizamiento. El mejor medio para el establecimiento fue el descrito por Casale y García (1987), utilizando yemas de hijos. En la fase de multiplicación, el mejor medio fue el MS modificado suplementado con 1.0 mg/L 6-BAP+1.0 mg/L AIB. En la fase de invernadero, las plántulas de más de 0.5 g presentaron el mejor porcentaje de sobrevivencia. Las plántulas de piña micropropagadas fueron exitosamente aclimatizadas. El mejor sustrato para la fase de aclimatización fue la fibra de coco molida.

**Micropropagation of pineapple var. Champaka F-153.** *In vitro* propagation of pineapple variety Champaka F-153 (Champaka) was studied. The best conditions for its *in vitro* establishment and multiplication were determined. Apical and lateral buds from crowns and lateral shoots were cultured on four different culture media. For establishment, media was supplemented with 0.2 mg/L 6-BAP+0.1 mg/L NAA and for the multiplication media 1.0 mg/L 6-BAP+1.0 mg/L IBA were added. In order to obtain rooting, plants were classified according to weight, then 4 substrates were tested: coconut fiber, peat moss:coconut fiber 1:1, soil:sand 1:1 and peat moss. Best culture media for establishment was the one described by Casale and García (1987) using shoot buds. Multiplication was successfully achieved with the modified MS supplemented with 1.0 mg/L 6-BAP+1.0 mg/L IBA. Pineapple plantlets were productively acclimatized using coir as substrate.

1/ Recibido para publicación el 21 de marzo del 2000.

2/ Autor para correspondencia.

\* Licenciatura en Fitotecnia, Facultad de Agronomía,

Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

## INTRODUCCION

La piña (*Ananas comosus*) es uno de los cultivos con más auge para la exportación en Costa Rica. Las plantaciones de esta fruta en la zona norte y sur del país se han incrementado en los últimos años, al igual que las exportaciones (Quirós 1993), utilizándose variedades como la Champaka F-153, Cayena Lisa, Montelirio (Criolla), entre otras. Normalmente, la piña se reproduce de manera vegetativa, mediante el uso de brotes laterales, coronas e hijos basales. Esta forma de reproducción muestra varias desventajas: es muy lenta (DeWald et al. 1988), favorece la diseminación de plagas y enfermedades y el material utilizado como semilla presenta desuniformidad en su vigor y tamaño. Además, el material vegetativo es muy escaso, constituyéndose en un problema, si se considera que se necesitan aproximadamente entre 70-80 mil plantas por hectárea para establecer una plantación comercial (Garriga y Anderson 1988).

La técnica de micropropagación es una alternativa para solucionar varios de los problemas mencionados. Se puede obtener una gran cantidad de propágulos en poco tiempo, con una alta uniformidad de peso y tamaño y en un espacio reducido. También, las plantas obtenidas son genéticamente iguales a la planta madre, además de estar libres de enfermedades (Chu y Kurtz 1990).

Para la micropropagación de la piña se han publicado diferentes procedimientos (Zepeida y Sagawa 1981, DeWald et al. 1988, Zee y Munekata 1992). Sin embargo, no siempre los resultados obtenidos en otras latitudes y con otro material genético son reproducibles (Debergh y Read 1991).

El objetivo de este trabajo fue establecer un procedimiento para la micropropagación de la variedad de piña Champaka F-153.

## MATERIALES Y METODOS

### Desinfección de los explantes

Se utilizaron coronas e hijos laterales de la variedad Champaka F-153. Estas se deshojaron

completamente, quedando el tallo expuesto (Figura 1A). La sección apical del tallo se separó de la parte basal. Ambas secciones se lavaron con agua durante 5 min, seguido de una inmersión en alcohol de 70°/1 min. Posteriormente, se procedió de la siguiente manera:

- **Yemas de corona:** la parte basal de la corona se introdujo en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl): 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% ó 3.5%, en 2 tiempos de inmersión: 15 ó 25 min.
- **Yemas de los hijos laterales:** la sección basal de los hijos laterales se desinfectó en 1.0% ó 1.5% de NaOCl, en 2 tiempos de inmersión: 15 ó 25 min.
- **Apices:** las secciones apicales de la corona se desinfectaron en 1.0%, 1.5% ó 2.0% NaOCl, en 2 tiempos de inmersión: 15 ó 25 min.

A las soluciones de NaOCl se les adicionó 3 gotas/L de Tween 20. El tratamiento fue por inmersión y en agitación constante. Finalmente, se realizó 3 lavados de los explantes con agua destilada estéril, dentro de una cámara de flujo laminar. Cada tratamiento consistió de 20 explantes.

### Fase de Establecimiento

En la cámara de flujo laminar se disectó y cultivó 80 yemas de coronas (0.5-0.8 cm), 80 yemas de hijos laterales (0.5-0.8 cm), e igual cantidad de ápices (0.2-0.4 cm), por cada tratamiento de desinfección descrito. Los explantes de cada método de desinfección se colocaron en 4 medios de establecimiento (20 explantes/medio): 1) Casale y García (C&G) (1987); 2) DeWald et al. (DW) (1988), 3) Zee y Munekata (Z&M) (1992) y 4) Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado (1/2 de macronutrientes, 4/5 de micronutrientes y 18.35 mg/L de Na<sub>2</sub>FeEDTA).

Se utilizó 10 ml de medio líquido en tubos de 25X150 mm, con puentes de papel filtro como soporte para los explantes. El medio fue autoclavado por un período de 20 min a una temperatura de 121°C y una presión de 2 kg/cm<sup>2</sup>. Una vez inoculados los explantes los tubos se colocaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h y con una temperatura de 24-26°C.

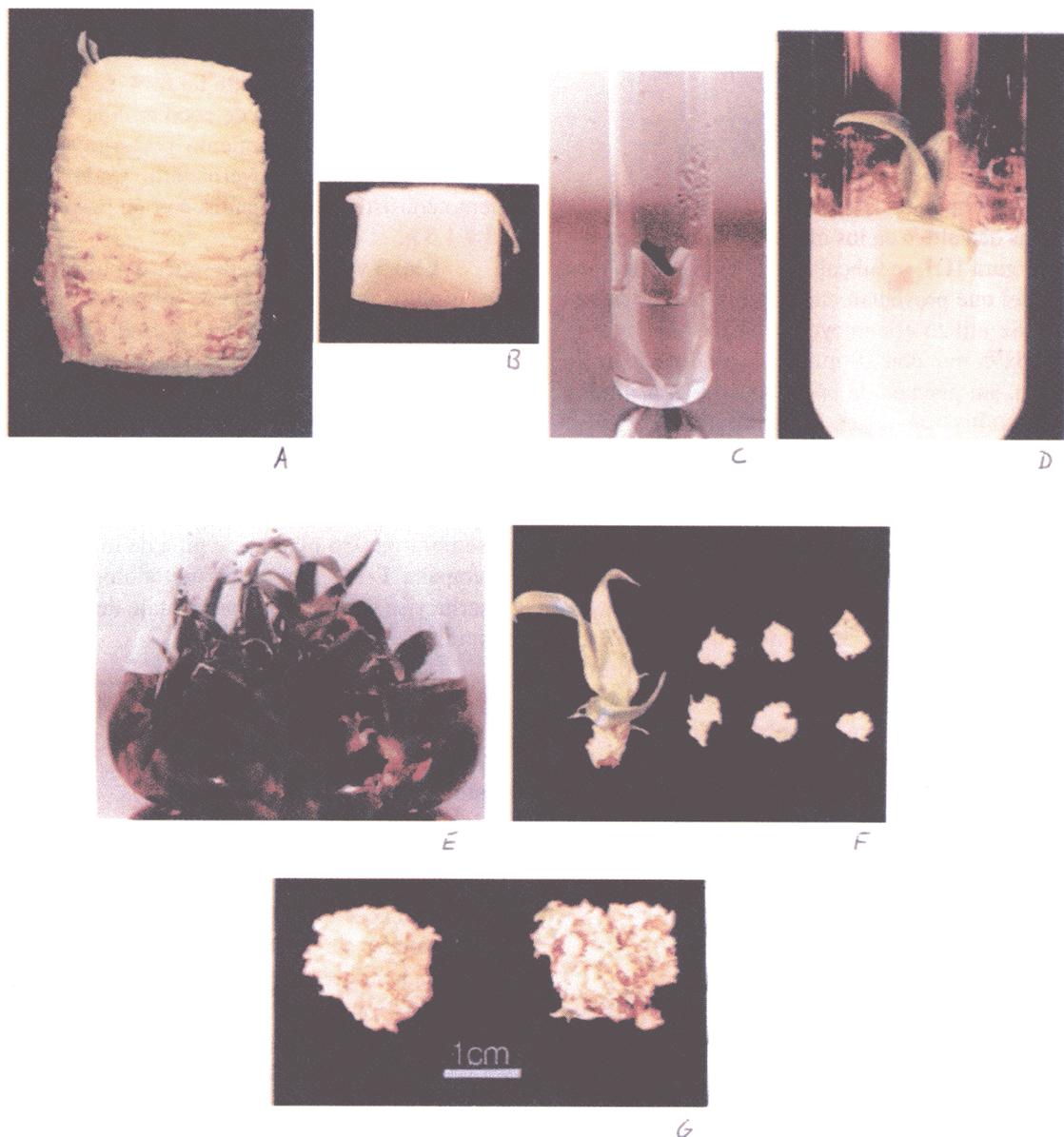


Fig. 1. Establecimiento y multiplicación de yemas axilares de piña, variedad Champaka F-153. A) Tallo sin hojas y raíces, B) Yema axilar (explante), C) Yema en fase de establecimiento, D) Plántula lista para multiplicación, E) Fase de multiplicación, F) Brotes de piña, G) Callos/protocormos.

Ocho semanas después se cuantificó: a) el porcentaje de sobrevivencia; b) el peso fresco de cada explante; c) el número de explantes que produjeron plántulas y d) el porcentaje de explantes oxidados. Además, cada semana se evaluó la producción de hojas.

### Fase de Multiplicación

Las plántulas obtenidas después de 8 semanas de cultivo en los medios de establecimiento (Figura 1D), se subcultivaron en el mismo medio del que provenían, con algunas modificaciones. Se utilizó erlenmeyers de 125 ml. y frascos de 55x95 mm con 20. ml de medio de cultivo líquido, sin puentes de papel filtro. Las plántulas se subcultivaron cada 6 semanas.

Las evaluaciones se realizaron cada 6 semanas. Al momento del subcultivo se evaluó la tasa de reproducción (plantas finales/plantas iniciales). Se hicieron 4 subcultivos y se calculó el promedio y el error estándar.

Debido a la formación de estructuras parecidas a un callo o protocormo (Figura 1G, Rangan 1984) se evaluó, en 2 ocasiones, la multiplicación a partir de éstas estructuras. Estas estructuras se colocaron en los medios de cultivo, en donde se había observado su producción. Se colocó 2 estructuras entre 0.4-0.6 g en cada frasco y el número de repeticiones varió entre 4 y 12. Se calculó su tasa de reproducción.

### Fase de aclimatización

**Efecto del tamaño de las plántulas sobre su sobrevivencia en invernadero.** Las plántulas de piña producidas en la fase anterior se separaron en 2 grupos según su peso: a) 0.2-0.8 g y b) 0.8-1.5 g. Luego, la base de las plántulas se trató, mediante inmersión, con una solución de Kilol (fungicida-bactericida) 5 ml/L durante 1 min. Las plántulas tratadas se sembraron en bandejas plásticas con 72 espacios, cada espacio permite introducir 53.93 cm<sup>3</sup> de sustrato. El sustrato empleado fue fibra de coco molida. Se emplearon 10 plantas por tamaño. A las 3 y 6 semanas des-

pués del transplante se evaluó: a) el porcentaje de sobrevivencia y b) el número y la longitud de raíces.

**Evaluación de diferentes sustratos.** Se evaluó el efecto de 4 sustratos: 1) fibra de coco molida; 2) mezcla de suelo:arena 1:1; 3) turba (suelo con aproximadamente un 60% de materia orgánica) y 4) turba:fibra de coco molida 1:1; en la sobrevivencia y crecimiento posterior de las plántulas de piña en invernadero. Cada tratamiento consistió de 18 plantas con un peso entre 0.8 y 1.5 g.

A las 3 y 6 semanas después del transplante se evaluó: a) el porcentaje de sobrevivencia; b) el número y longitud de raíces y c) el peso fresco y el peso seco de la parte aérea y radical.

El peso seco se obtuvo al colocar las bolsas de papel, que contenían las muestras, dentro de una estufa a 58°C por un período de 96 h.

Una vez establecido el mejor sustrato se realizó una prueba de escalamiento, en la cual se sembraron 936 plantas de piña de la variedad Champaka F-153, según la metodología antes descrita y se determinó el porcentaje de sobrevivencia.

## RESULTADOS

### Desinfección y establecimiento de los explantes

La menor contaminación se presentó con el uso de ápices (15.74% promedio). El porcentaje promedio de contaminación disminuyó al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) y en menor grado al aumentar el tiempo de inmersión (Cuadro 1). La causa principal de la contaminación fue aparentemente bacteriana. No se determinó el género o géneros de las bacterias contaminantes.

La sobrevivencia de los explantes fue mayor con ápices (80.69% promedio) (Cuadro 1). Dentro de las concentraciones de NaOCl y tiempos de inmersión, el mayor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo con el uso de 1.0% de NaOCl y 15 min de inmersión. En relación a los días necesarios para la emisión de la primera hoja, las

Cuadro 1. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre la contaminación, la sobrevivencia, la oxidación, los días a la emisión de la primera hoja y la regeneración de plántulas, para 3 diferentes explantes de piña, variedad Champaka F-153 cultivados *in vitro*. Evaluación a las 8 semanas de cultivo.

Explante	Tratamiento	Oxidación (%)	Contaminación	Sobrevivencia (%)	Días 1 <sup>era</sup> hoja (nº)	Explante a plántula (%)
Apices	1.0%-15'	2.70	16.22	81.08	31.50	78.38
	1.0%-25'	2.90	5.79	92.75	33.25	59.42
	1.5%-15'	2.53	31.64	65.82	29.75	45.56
	1.5%-25'	5.41	9.46	82.43	35.00	68.91
	2.0%-15'	1.32	14.47	81.58	28.00	63.15
	2.0%-25'	2.60	16.88	80.52	31.50	61.03
	<b>Promedio</b>	<b>2.91</b>	<b>15.74</b>	<b>80.69</b>	<b>31.50</b>	<b>62.74</b>
Yemas de hijos	1.0%-15'	2.56	71.79	26.64	24.50	21.79
	1.0%-25'	7.69	60.26	34.62	31.50	19.23
	<b>Promedio</b>	<b>5.12</b>	<b>66.02</b>	<b>30.63</b>	<b>28.00</b>	<b>20.51</b>
Yemas de coronas	1.0%-15'	6.25	67.50	27.50	21.00	17.50
	1.0%-25'	17.50	56.25	25.00	22.75	21.25
	<b>Promedio</b>	<b>11.87</b>	<b>61.87</b>	<b>26.25</b>	<b>21.87</b>	<b>19.37</b>

yemas de coronas presentaron un desarrollo más acelerado (Cuadro 1). El período para que los 3 tipos de explante emitieran la primera hoja fue, en promedio, de 21-32 días. El porcentaje de explantes que regeneraron plántulas fue superior para ápices (62.74%) y muy similar entre yemas de hijos laterales (20.51%) y yemas de coronas (19.37%).

En un intento por disminuir la contaminación presente en ambos tipos de yemas, se utilizaron concentraciones de NaOCl mayores y menores a 1.0%. Aunque las yemas presentaron una menor contaminación utilizando una concentración de NaOCl 3.5% con una inmersión de 15 y 25 min, el desarrollo de estas fue nulo (datos no presentados).

En general, la oxidación presentada en los 3 tipos de explante fue baja. Sin embargo, en las yemas de corona la oxidación fue entre 2 y 4 veces mayor a la observada en los otros explantes.

La obtención de plántulas a partir del explante inicial fue similar para ápices (73.5%) y yemas de hijos laterales (73%) y aproximadamente 20% menor a partir de yemas de corona (53.5%) (Cuadro 2). El medio de cultivo influyó

en la conversión a plántulas de los explantes iniciales. Para ápices, el mayor número de plántulas se obtuvo en el medio MS modificado (87%), mientras que para yemas de corona y yemas de hijo lateral la mayor conversión a plántulas ocurrió en el medio C&G (67% y 86% respectivamente) (Cuadro 2).

### Fase de multiplicación

El tipo de explante y el medio de cultivo también influyeron sobre la multiplicación *in vitro* de la variedad Champaka F-153 (Cuadro 2). Luego de 4 subcultivos, las yemas de corona presentaron la mayor tasa de multiplicación promedio (5.50 brotes/explante), seguidas por las yemas de hijo lateral (3.23 brotes/explante) y por los ápices (2.35 brotes/explante). En relación a los medios de cultivo, el medio MS modificado favoreció la formación del mayor número promedio de brotes en ápices (3.25), aunque no fue diferente a los medios C&G (2.35) y DW (2.45). En el medio Z&M se produjo el menor número de brotes (1.35). En las yemas de corona, los

Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo sobre el establecimiento inicial y la multiplicación *in vitro* de la piña variedad Champaka F-153 a partir de 3 tipos de explante.

Explante	Medio de cultivo	Explante a plántula (%)	Tasa de multiplicación* (Brotos final/inicial)
Apice	C&G	67	2.35±0.63
	DW	70	2.45±0.38
	Z&M	68	1.35±0.28
	MS	87	3.25±0.34
	<b>Promedio</b>	<b>73.5</b>	<b>2.35</b>
Yemas de corona	C&G	67	*****
	DW	56	*****
	Z&M	32	5.75±1.21
	MS	59	5.25±0.79
	<b>Promedio</b>	<b>53.5</b>	<b>5.50</b>
Yemas de hijo lateral	C&G	86	2.57±0.44
	DW	71	*****
	Z&M	80	1.08±0.31
	MS	55	6.05±0.77
	<b>Promedio</b>	<b>73.0</b>	<b>3.23</b>

\* Determinada en el cuarto subcultivo

\*\*\*\*\* Pérdida por contaminación

medios Z&M y MS modificado indujeron la producción de un número similar de brotes, 5.75 y 5.25, respectivamente. No fue posible establecer el efecto de los medios C&G y DW para este tipo de explante debido a la contaminación que se presentó en ellos durante los subcultivos. En las yemas de hijo lateral, el mayor número de plántulas se obtuvo en el medio MS modificado (6.05), le siguió el medio C&G (2.57) y por último el medio Z&M (1.08). Los explantes en el medio DW se perdieron por contaminación, durante los subcultivos.

En los medios MS modificado y Z&M se formaron estructuras parecidas a un callo, similares a las denominadas por Rangan (1988) como protocormos (Figura 1). Las mismas presentaron una alta tasa de multiplicación, especialmente en el medio MS modificado (Cuadro 3).

### Fase de aclimatización

La sobrevivencia de las plántulas dependió del peso inicial de las mismas. Las plántulas

de mayor peso (> 0.8 g) mostraron una mayor sobrevivencia. La aplicación de la auxina ácido naftalenacético (ANA) no favoreció la sobrevivencia ni el enraizamiento de las plántulas (datos no presentados).

Con base en los resultados anteriores, se realizó una prueba adicional con el fin de determinar el efecto del sustrato sobre el establecimiento en invernadero de las plántulas. El mayor porcentaje de sobrevivencia de plántulas, número y longitud de raíces se obtuvo al sembrar las plántulas en fibra de coco molida. En la mezcla arena:suelo ninguna plántula sobrevivió al transplante (Cuadro 4) (Figura 2B, 2C).

En la prueba de escalamiento realizada con el sustrato fibra de coco molida, se obtuvo 95.2% de sobrevivencia de plántulas de la variedad Champaka F-153 en el invernadero.

La Figura 2 resume el procedimiento propuesto para la micropropagación de la variedad Champaka F-153. El mismo involucra 2 medios de cultivo, uno para la etapa de establecimiento (C&G) y otro para la etapa de multiplicación

Cuadro 3. Tasa de multiplicación de callos/protocormos de la variedad Champaka F-153 cultivados en diferentes medios.

Origen del callo y/o protocormo	Medio de cultivo	Subcultivo	
		I	II
Apices	Z&M	2.90 <sup>1</sup> ±0.80 <sup>2</sup>	1.12±0.58
	MS modificado	6.26±0.92	2.83±0.51
Yema hijo	Z&M	3.16±0.75	1.42±0.70
	MS modificado	6.14±0.64	5.40±0.78
Yema corona	Z&M	1.46±0.48	6.12±1.9
	MS modificado	9.05±1.04	8.50±1.68

<sup>1</sup> Promedio, <sup>2</sup> Error estándar.

Cuadro 4. Efecto de diferentes sustratos en la sobrevivencia, el número y longitud de las raíces de las plántulas micropropagadas de piña var. Champaka F-153, a las 6 semanas de trasplante a invernadero.

Sustrato	Sobrevivencia (%)	Longitud raíz (cm)	Número raíces
Arena:Suelo 1:1	0.00	0.00	0.00
Turba:Fibra de coco molida 1:1	27.78	1.30	1.60
Fibra de coco molida	50.00	2.06	2.89
Turba	38.89	0.714	1.00

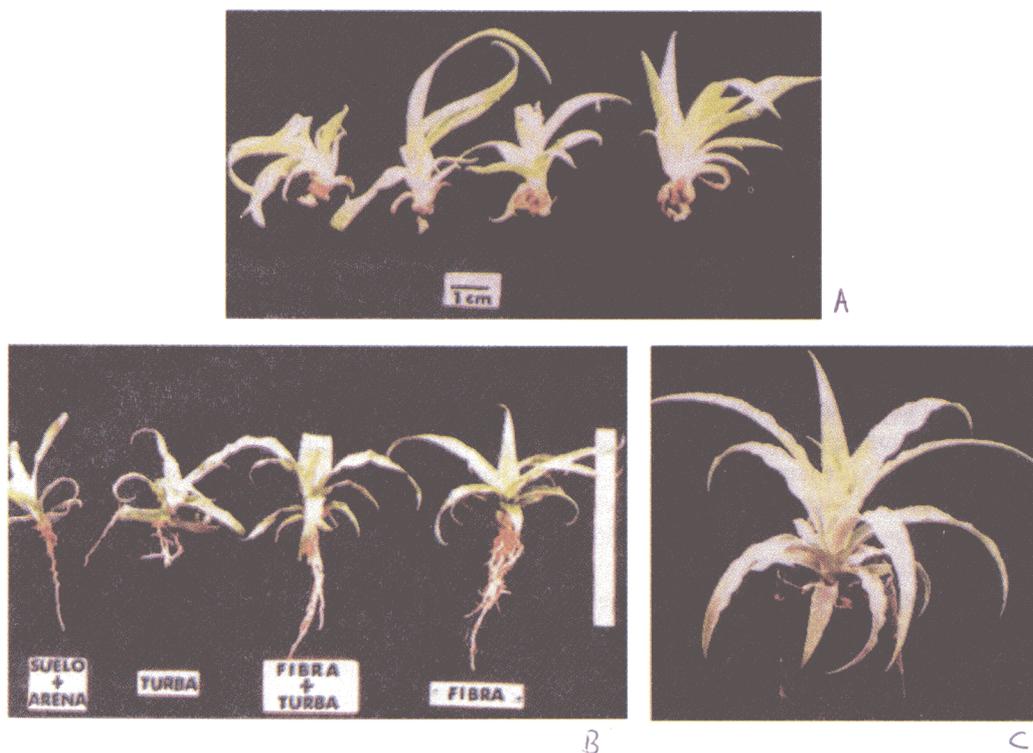


Fig. 2. Fase de aclimatización y enraizamiento para plántulas de piña provenientes de condiciones *in vitro*. A) Plántulas para siembra en invernadero, B) Plántulas después de los tratamientos en sustratos, C) Planta en invernadero.

(MS modificado). Cada medio contiene una combinación particular de auxinas/citocininas. En el medio C&G ANA (2 mg/L)+BAP (1 mg/L), mientras que en el MS modificado AIB + BAP (1 mg/L cada uno). En ambas etapas se utiliza medio líquido. En la etapa de establecimiento con puentes de papel filtro y en la etapa de multiplicación en agitación constante 100 rpm.

## DISCUSION

### Desinfección y establecimiento de los explantes

El establecimiento *in vitro* de los explantes resultó la etapa más crítica para la micropropagación de la piña, debido a la alta contaminación que se presentó, ocasionando la pérdida de una gran cantidad de explantes. La contaminación fue principalmente de tipo bacteriano. Este es un problema común en el cultivo *in vitro* de plantas y difícil de eliminar. Su origen puede ser externo o interno (endofitos). En muchos casos los métodos convencionales de desinfección superficial, a base de hipoclorito de sodio o de calcio, no son efectivos, como ocurrió con las yemas de coronas e hijos laterales. Algunos factores que pudieron favorecer este tipo de contaminación son: la forma y arreglo de las hojas de piña y el hecho de que se empleó material proveniente de campo. En el primer caso, se favorece la permanencia de un mayor número de microorganismos, así como un ambiente húmedo propicio para el crecimiento de los mismos. En el segundo caso, el crecimiento de las plantas donadoras de explantes en condiciones controladas ha probado ser efectivo en la reducción de la contaminación *in vitro*, particularmente si dicho acondicionamiento incluye el manejo del agua y la aplicación de antibióticos y fungicidas (Reed et al. 1998).

Los ápices mostraron un porcentaje de contaminación mucho menor en comparación con las yemas. El cultivo de ápices y meristemas se recomienda como método para obtener cultivos *in vitro* libres de contaminantes en varias especies, particularmente leñosas, debido a que la mayoría de los microorganismos son eliminados

(Cassells 1991). Sin embargo, el uso de meristemas apicales presenta algunas limitantes: 1) es necesaria una gran cantidad de coronas para obtener un número adecuado de ápices; 2) se requiere de espacio disponible para el almacenamiento y/o siembra de las coronas; 3) mayor gasto de mano de obra al tener que deshojar y desinfectar una gran cantidad de material vegetal; 4) una tasa de multiplicación *in vitro* más baja que la de las yemas. Por otra parte, los ápices presentan la ventaja de que el riesgo de obtener variaciones somaclonales al cultivarlos es menor (Demarly 1986), además es posible obtener plantas libres de virus (Chu y Kurtz, 1990).

Los tratamientos de desinfección con concentraciones de NaOCl mayores al 2% permitieron obtener un alto porcentaje de explantes limpios, pero produjeron una inhibición total del crecimiento de las yemas. Resultados similares fueron descritos por Aghion y Beauchesne (1960). Los tratamientos de desinfección implican un compromiso entre explantes libres de contaminación y explantes que conserven la capacidad de crecer y desarrollarse *in vitro*. Los ápices soportaron concentraciones de NaOCl de hasta un 4% sin que se afectara su desarrollo *in vitro* (datos no mostrados). Los ápices están más cubiertos que las yemas, por lo que el desinfectante no penetra hasta ellos, además que les garantiza mayor limpieza.

El medio de cultivo influyó sobre la iniciación del crecimiento y desarrollo de los 3 tipos de explante de la variedad Champaka F-153. La concentración de sales, el balance de reguladores de crecimiento (auxinas/citocininas) y otros componentes adicionales del medio son factores que influyen sobre la respuesta *in vitro* de diferentes explantes (George y Sherrington 1984). El medio C&G, que favoreció el establecimiento inicial de los 3 tipos de explante, contiene sulfato de adenina (SA), el cual estimula el rompimiento de la latencia de las yemas axilares de piña (Casale y García 1987) y una relación auxina y citoquinina (2:1), la cual ha sido encontrada favorable para el desarrollo *in vitro* de la piña (Martín, S. 1994. College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii. Comunicación Personal.). Sin embargo, la

relación auxina/citocinina y el tipo de regulador de crecimiento pueden variar según el genotipo (variedad de piña) (Hosoki y Asahira 1980, Mathews y Rao 1982). El bajo porcentaje de oxidación obtenido en el establecimiento de los 3 tipos de explante concuerda con lo expuesto por Litz y Jaiswal (1991), quienes indican que en cultivos como la papaya y la piña la oxidación es muy poca o nula ya que estas no producen fenoles u otras sustancias que se oxiden. La mayor oxidación en las yemas axilares de coronas se debe posiblemente a su mayor edad.

### Fase de multiplicación

La fase de multiplicación se realizó en medio líquido. Marchal y Alvard (1988) señalan que este estado del medio de cultivo estimula un mayor crecimiento y multiplicación de los explantes de piña que los medios sólidos. La piña, y las bromelias en general, poseen una alta capacidad para absorber agua y nutrientes por los tricomas de las hojas (Casale y García 1987).

Al igual que en la fase de establecimiento, el medio de cultivo influyó en la tasa de multiplicación de los explantes de piña. Los medios utilizados, además de los componentes ya mencionados, difieren en su constitución mineral, aunque parten de la base original del Murashige y Skoog (MS 1962). Las sales minerales afectan la multiplicación *in vitro* de los explantes (George y Sherrington 1984). El MS modificado consiste en una reducción del 50% de los macroelementos, un aumento de 4 veces en el contenido de KI de la formulación original y ligeras variaciones en la concentración de microelementos. Los medios C&G y DW mantienen el contenido de macro y microelementos original y el medio Z&M reduce tanto los macros y los microelementos en un 75%. El MS ha sido señalado como un medio con un fuerte desbalance iónico y contenidos de nitrógeno elevados. Esto parece afectar el establecimiento y multiplicación *in vitro* de algunas especies (George y Sherrington 1984). El medio MS modificado favoreció consistentemente la formación de nuevos brotes a partir de los 3 tipos de explante; la reducción de los macroelementos

al 50% favoreció la multiplicación de la variedad Champaka F-153. Reducciones mayores (75%, Z&M) resultaron perjudiciales. El tipo y concentración de los reguladores de crecimiento también determina la tasa de multiplicación *in vitro* de los explantes (George y Sherrington 1984).

Los medios que contenían una combinación de auxina/citocinina (C&G, MS modificado y DW) favorecieron una mayor multiplicación de los explantes que el medio Z&M que solo incluyó la citocinina BAP. Además, la combinación AIB/BAP (MS modificado) fue más favorable en esta etapa que las combinaciones ANA/BAP (medio DW) o AIA/Kinetina (medio C&G). Sin embargo, todo debe ser analizado en función de los medios de cultivo como tales, ya que solo la evaluación de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en un mismo medio podría permitir separar el efecto de cada factor sobre la tasa de multiplicación de los explantes.

Con relación al tipo de explante, las yemas de corona y de hijos laterales presentaron una tasa de multiplicación mayor a la de los ápices (Cuadro 2). El número de yemas preexistentes en cada explante está relacionado con su capacidad de multiplicación *in vitro*. Rangan (1984) señala que explantes con una mayor edad ontogénica presentan una alta tasa de multiplicación *in vitro*.

Algunos explantes presentaron una tasa de multiplicación desuniforme, similar a lo observado por McCown (1986), citado por Remphrey et al. (1993). En algunos casos son necesarios varios subcultivos para la estabilización de la tasa de multiplicación.

Las plantas provenientes del "callo" o de las estructuras similares a protocormos deben ser cuidadosamente analizadas para su estabilidad genética. En piña es frecuente la aparición de variantes somaclonales, por lo que se prefieren vías directas de regeneración como la proliferación de yemas axilares.

### Fase de aclimatación

El tamaño de las plántulas alcanzado *in vitro* afectó su establecimiento y desarrollo *ex vitro*. Plántulas con un mayor peso fresco mostraron un mayor porcentaje de sobrevivencia. Esto coinci-

de con la observación general de que plantas de mayor tamaño (10 cm) muestran una mayor tasa de sobrevivencia y acúmulo de materia seca que aquellas de menor tamaño (Chen et al. 2000).

Al comparar la respuesta de enraizamiento de las plántulas en los diferentes sustratos, se estableció que la fibra de coco molida y la turba:fibra de coco molida (1:1) generaron respuestas similares. El primer sustrato presenta algunas características favorables, como son: alta retención de humedad, excelente drenaje, ausencia de malezas y patógenos, mantiene la humedad más fácilmente que la turba, lenta descomposición y es un recurso renovable (Meerow 1994).

Otra ventaja de usar fibra de coco molida es que las raíces penetran mejor el sustrato formando un mejor adobe. Estas características aseguran un menor estrés para la plántula al momento de ser trasplantadas, ya que las raíces corren un menor riesgo de romperse y además permanecen con la mayoría del sustrato.

Según la metodología descrita, el 95% de las plántulas de la variedad Champaka F-153 producidas *in vitro* sobreviven su trasplante a invernadero y muestran un crecimiento activo. La Figura 3 resume el procedimiento propuesto para la micropropagación de dicha variedad. El mismo puede servir de base para la reproducción de otras variedades de piña de interés.

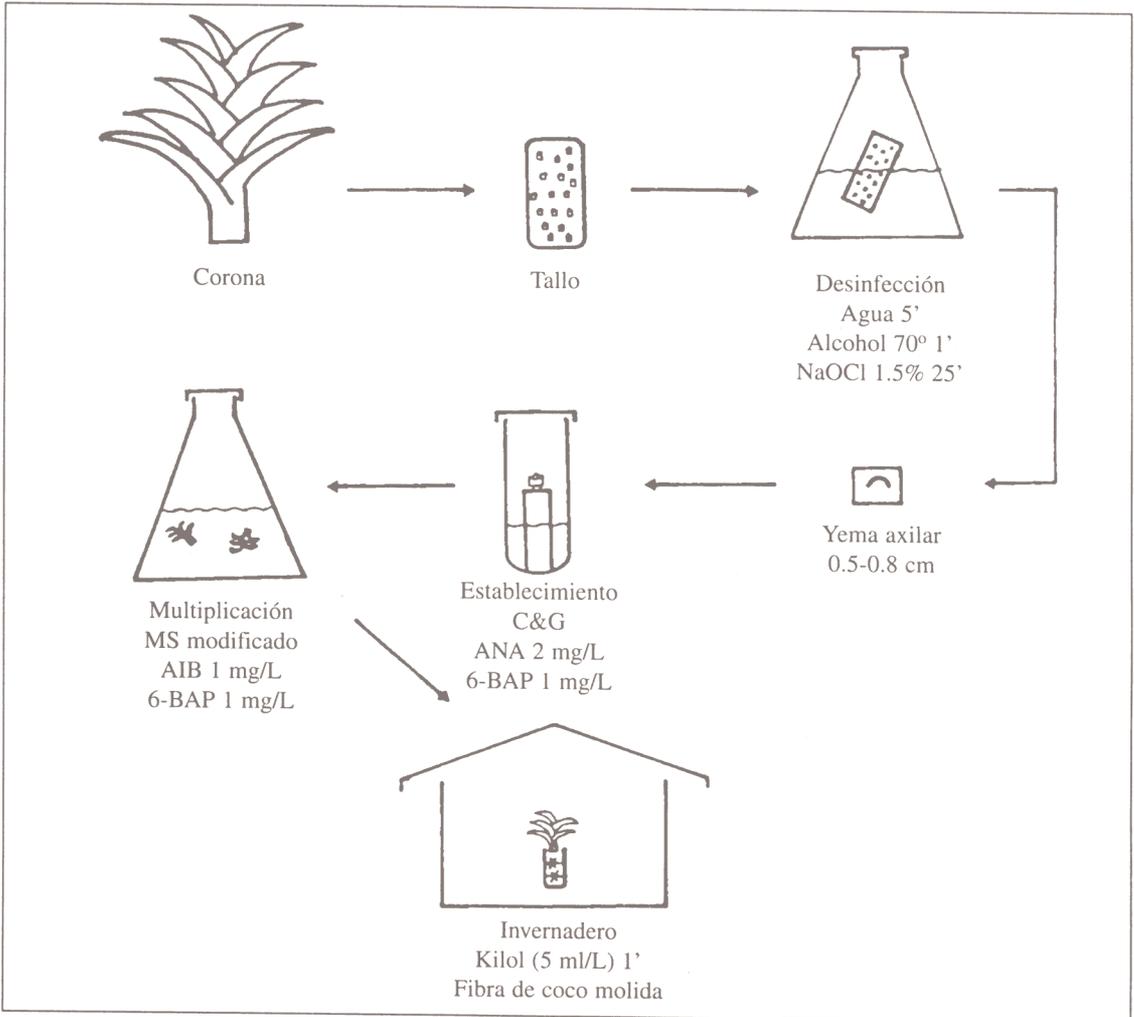


Fig. 3. Procedimiento recomendado para la micropropagación de piña variedad Champaka F-153.

## AGRADECIMIENTOS

A la empresa Pindeco S.A. por suministrar el material de Champaka F-153 para la ejecución del presente trabajo.

## LITERATURA CITADA

- AGHION, D.; BEAUCHESNE, G. 1960. Utilisation de la technique de culture stérile d'organes pour obtenir des clones d'ananas. *Fruits* 15(10):444-446.
- CASALE, I.; GARCIA, E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de 3 variedades de piña. *In: Boletín Científico del Centro de Botánica Tropical, Universidad Central de Venezuela* 2:3-18.
- CASSELLS, A. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. *In: Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Ed. by P. Debergh, R. Zimmerman. p. 31-44.
- CHEN, J.J.; LIU, M.C.; HO, Y.H. 2000. Size of *in vitro* plantlets affects subsequent tuber production of acclimated cala lily. *HortScience* 35:290-292.
- CHUI, KURTZ S. 1990. Commercialization of plant micropropagation. *In: Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for propagation and breeding*. Ed. by P. Ammirato, D. Evans, W. Sharp, Y. Bajaj. Macmillan Publishing Company, New York, U.S.A. v. 5, p. 126-164.
- DEBERGH, P.; READ, P. 1991. Micropropagation. *In: Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Ed. by P. Debergh, R. Zimmerman. p. 1-14.
- DEMARLY, Y. 1986. Experimental and theoretical approach of *in vitro* variations. *In: Somaclonal variations and crop improvement*. Ed. by J. Semal. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands. p. 84-99.
- DeWALD, M.; MOORE, G.; SHERMAN, W.; EVANS, M. 1988. Identification of pineapple cultivars by isozyme genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(6):935-938.
- DeWALD, M.; MOORE, G.; SHERMAN, W.; EVANS, M. 1988. Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Reports* 7:535-537.
- GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited, Basingstoke, England. 709 p.
- HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. 1980. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. *HortScience* 15(5):603-604.
- LITZ, R.; JAISWAL, V. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. *In: Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Ed. by P. Debergh, R. Zimmerman. p. 247-264.
- MARCHAL, J.; ALVARD, D. 1988. Influence du rythme de renouvellement des solutions de culture *in vitro* d'ananas sur milieu liquide. *Fruits* 43(12):701-707.
- MATHEWS, V.; RAO, P. 1982. *In vitro* plant regeneration in lateral bud explants of *Cryptanthus bromelioides* Var. Tricolor M. B. Foster. *Plant Cell Reports* 1:108-110.
- MEEROW, A. 1994. Growth of two subtropical ornamentals using coir (coconut mesocarp pith) as a peat substitute. *HortScience* 29(12):1484-1486.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (15):473-497.
- J.XX 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(1):26-37.
- RANGAN, T. 1984. Pineapple. *In: Handbook of Plant Cell and Tissue Culture, Crop Species*. Ed. by P. Ammirato, D. Evans, W. Sharp, Y. Yamada. Macmillan Publishing Company, New York, U.S.A. v. 3, p. 373-382.
- REMPHREY, W.; PALMER, C.; BLOUW, M. 1993. *In vitro* branching in relation to repeated subculture in two cultivars of *Potentilla fruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32(2):235-240.
- RUMOROSO, M.; MADRIGAL, O.; NAVARRO, R.; TENCIO, L. 1991. Estudio de factibilidad para el establecimiento de una planta productora de inoculantes para leguminosas. Preparación y evaluación de proyectos. UNED. 78 p.
- ZEE, F.; MUNEKATA, M. 1992. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. *HortScience* 27(1):57-58.
- ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. 1981. *In vitro* propagation of pineapple. *HortScience* 16(4):495.