



EVALUACION DE SISTEMAS DE DESINFECCION Y MEDIOS PARA LA MICROPROPAGACION DE LA PIÑA *Ananas comosus* L. Merry.

LUIS FERNANDO VELASQUEZ YEPES¹
JHON FREDY MUNERA MORALES¹
SONIA JARAMILLO VILLEGAS²
HERNAN GOMEZ LOPEZ³

RESUMEN

Se evaluaron diferentes sistemas de desinfección de las yemas de la corona de piña Ananas comosus L. Merry, al igual que algunos medios para la micropropagación.

Se ensayaron siete tratamientos de desinfección. Se encontró que el método más satisfactorio (30% de contaminación y 23% de viabilidad de las yemas) consistió en el siguiente proceso antes de la siembra:

- 1. lavar con agua y detergente las coronas previamente deshojadas,*
- 2. sumergir dichas coronas en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% por 5 minutos,*
- 3. enjuagar con agua destilada estéril,*
- 4. extraer las yemas bajo una cámara de flujo laminar,*
- 5. sumergir las yemas en la solución de NaOCl al 1% por 20 minutos,*

¹ Parte de este trabajo fue presentado por los dos primeros autores como trabajo de investigación para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

² Profesora Asociada. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Apartado 568.

³ Profesor Titular. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Apartado 568.

6. *enjuagar con agua destilada estéril,*
7. *desinfección con NaOCl al 0.7%, durante 20 minutos, seguida por tres enjuagues con agua destilada estéril.*

En la siembra, se utilizó el medio MS producido por Sigma (1988), suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, sacarosa al 3% y 80 mg L⁻¹ de sulfato de adenina. Se incubaron en un cuarto a 28°C, 60-65% de humedad relativa y de 1000 a 3000 lux.

En la fase de diferenciación e inducción de yemas axilares se probaron ocho tratamientos, cada uno de 50 subunidades experimentales. Se encontró que los reguladores de crecimiento (ANA y BA) favorecieron el desarrollo y la inducción de brotes (26%) en dosis de 0,4 mg L⁻¹ de ANA y 1,5-2,5 mg L⁻¹ de BA.

Con el fin de evaluar la consistencia del medio sobre el enraizamiento, se tomaron al azar 60 brotes bien desarrollados (3-4 cms y cinco meses de edad) con los componentes antes mencionados, excepto Sulfato de adenina. A los dos meses se evaluó el número promedio de raíces y la longitud de éstas. Se encontró que el medio gelificado no propició un mayor enraizamiento.

Palabras clave: piña, micropropagación, desinfección, Ananas comosus, enraizamiento.

ABSTRACT

EVALUATION OF SYSTEMS FOR DESINFECTION AND MICROPROPAGATION ON PINEAPPLE Ananas comosus L. Merry.

Several disinfection systems for pineapple buds and some micropropagation media were tested.

Seven disinfection treatments were studied. The most satisfactory method permitted to reach 30% of contamination and 23% of viability of buds. This method was the following before seedling:

1. *previous defoliate crowns, washing with water and detergent,*
2. *inmersion of buds in 1% NaOCl solution for 5 minutes,*
3. *washing with distilled and esteril water,*
4. *bud extraction under a laminar flux camera,*

5. *immersion of buds in 1% NaOCl solution for 20 minutes,*
6. *washing with distilled and esteril water,*
7. *desinfection with 0.7% NaOCl for 20 minutes and then washing three times with distilled and esteril water.*

Sigma (1988) M.S. medium was used for seedling; it was supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of tiamin, pyridoxin and nicotinic Acid, 3% saccharose and 80 mg L⁻¹ of adenine sulfate. It was incubated at 28-30°C, 60-65% relative humidity and 1000-3000 lux.

Axillary buds were proved during the differentiation and induction phases. It was found that ANA y BA grown regulators favored development and shoot induction (26%) at 0.4% mg L⁻¹ ANA and 1.5-2.5 mg L⁻¹ BA dosis.

In order to evaluate medium consistency on rooting, 60 high developed shoots were sowed, 30 in liquid medium and the other 30 in agar medium 0.8% with previously mentioned components except Adenine Sulfate. Two months later, average and length roots were measured. It was found that gel medium didn't originate a higher rooting.

Key words: Ananas comosus, pineapple, micropropagation, desinfection, rooting.

INTRODUCCION

La propagación de la piña se efectúa en forma asexual, sin embargo una de las dificultades más notorias del cultivo a nivel comercial, es la obtención de la semilla vegetativa con calidad y en cantidad suficiente, que garantice uniformidad, tanto en el ciclo vegetativo como en la cosecha. Los frutos deben cumplir con la calidad requerida por las empresas comercializadoras y/o procesadoras.

El cultivo de ápices *in vitro*, permite la clonación de material sano y de buena calidad, con tasas de multiplicación altas y en un tiempo relativamente reducido. Con esta investigación se logró desarrollar una metodología de micropropagación de piña relativamente eficiente, iniciando con la siembra *in vitro* de yemas de la corona, hasta la multiplicación, individualización, enraizamiento y adaptación *in situ*.

REVISION DE LITERATURA

Tipo de explante

La piña se propaga vegetativamente mediante hijuelos, brotes, bulbillos, "hapas", coronas y tocones. La tasa promedio de producción de propágulos en la variedad cayena lisa se aproxima a dos por año, por lo que se requerirían 30 años para producir suficiente material de siembra par una hectárea, empezando con una sola planta (Rangan, 1985).

La propagación *in vitro* de la piña ha sido investigada por varios autores y con diferentes materiales y/o variedades: Gutiérrez (1988); Mapes (1973); Pannetier y Lanaud (1976); Santos, Pinto y Rodríguez (1984) y Zepeda y Sagawa (1981) con Cayena lisa. Ramírez (1984) con Española roja. Poh and Khoon (1975), con "Mas Merach", "Singapore Sapanish", "Mauritius" y Cayena lisa. García (1984) con "Queen", Española Roja y Cayena lisa. Srinivasa, Doreswamy and Chacko (1981), con un híbrido entre "Queen y Kew", y Casale y De García (1987), con Española Roja, Nacional y Brecheche.

Como explantes se han usado puntas de raíz, ápices terminales, porciones subapicales y tejido del tallo, obtenidos de coronas enraizadas. También se han utilizado yemas axilares de coronas, tallos e hijuelos (Casale y De García, 1987; Drew, 1980; García, 1984; Gutiérrez, 1988; Mathews and Rangan, 1979; Poh y Khoon, 1975; Rangan, 1985; Santos; Pinto y Rodríguez, 1984; Srinivasa; Doreswamy y Chacko, 1981).

García (1984) afirma que las yemas axilares procedentes de la corona, poseen un índice menor de contaminación y mayor porcentaje de viabilidad, con respecto a las yemas de los bulbillos e hijuelos, además su distribución en el tronco de la corona, no afecta la viabilidad de las mismas. Sin embargo, Gutiérrez (1988) y Drew (1980) reportan un mayor porcentaje en la viabilidad de yemas de hijuelos y bulbillos, mientras que en yemas de corona, sólo se obtuvo entre 5% y 10% de viabilidad.

Desinfección

Para la desinfestación de yemas de diferentes partes de la planta, se han empleado básicamente productos mercuriales y clorados, con un tratamiento previo o a la vez con algún tipo de detergente. El producto más usado es el bicloruro de mercurio, así: 0.1% del producto por dos minutos (Poh y Khoon, 1975); al 0.1% y por tres minutos y enjuague de las yemas con agua destilada estéril (Mathews y Rangan, 1979).

El cloro es usado principalmente como hipoclorito de sodio (NaOCl), así: al 0.5% por 60 minutos, más tres gotas de "Tween" a la corona, luego al extraer las yemas, se realiza una desinfección al 0.05% por 20 minutos (Zepeda, 1981); NaOCl al 2.62% por 20 minutos, más tres gotas de "Tween" (a la corona), luego se sumerge en alcohol al 70% por un minuto y por último se extraen las yemas en una cámara de flujo laminar y se sumergen en

NaOCl al 1.31%, por 15 minutos obteniéndose un 10% de contaminación pero solo un 5% en la supervivencia de las yemas de la corona (Gutiérrez, 1988).

Efectuando también desinfección doble (corona-yema) García (1984) empleó un cloro comercial, no especificado, al 1,2% por 20 minutos a la corona, y al 0,8% por 10 minutos sobre las yemas, obteniendo un 16% de contaminación.

Drew (1980); Ramírez (1984) y Santos, Pinto y Rodríguez (1984) han descrito protocolos de desinfección de la corona de la piña, usando previamente cualquier tipo de surfactante como detergentes y alcohol; con el fin de facilitar la penetración de los productos desinfectantes.

Medios de cultivo y establecimiento in vitro

García (1984) afirma que en la etapa de establecimiento (posterior a la desinfección) se pueden distinguir tres posibles evoluciones: las yemas se tornan de color verde y brotan; el tejido se necrosa, tomando un color marrón; el tejido permanece de color blanco, pero no se detecta ningún tipo de crecimiento.

La fórmula más generalizada para los medios de cultivo en trabajos con piña es la propuesta por Murashige and Skoog (1962); citados por Casale y De García (1987); Gutiérrez (1988); Mathews y Rangan (1981); Ramírez (1984); Rangan (1985); Santos *et al* (1984); Srinivasa *et al* (1981) y Zepeda y Sagawa (1981). Algunos investigadores han realizado ligeras modificaciones (Drew, 1980; García, 1984; Poh y Khoo, 1975 y Sigma, 1988).

Se han utilizado medios sólidos con diferentes concentraciones de agar (Drew, 1980; García, 1984; Gutiérrez, 1988; Mathews y Rangan, 1979; Ramírez, 1984), medios líquidos estacionarios los cuales pueden causar vitrificación y reducción de la viabilidad (García, 1984) y medios líquidos en agitación, los cuales llegan a triplicar el desarrollo de los brotes (Casale y De García, 1987; García, 1984; Santos; Pinto y Rodríguez, 1984; Zepeda y Sagawa, 1981).

Se destaca una gran variedad de combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, incluso dentro de subcultivos. Drew (1980) encontró que benzil amino purina (BAP) y cinetina en las etapas I y II, podía producir hasta 100.000 plantas a partir de una yema de corona en un año. García (1984) evaluó concentraciones de 0.1 mg L⁻¹ de la combinación zeatina o BAP con ácido indol acético (AIA) y cinetina con ácido indol butírico (IBA) en la primera etapa, para la segunda aumentó la concentración de tales combinaciones a 1.0 mg L⁻¹ y no encontró diferencias significativas entre las combinaciones y concentraciones utilizadas, por lo que concluyó que en las primeras etapas, el desarrollo es determinado por el balance hormonal endógeno.

Gutiérrez (1988) evaluó diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA) (a 0,3 mg L⁻¹) y Benzil Amino purina (BAP) (0-2,5, 5,0-7,5 y 10.0 mg L⁻¹) y observó que a mayor concentración se lograba mayor inducción de

brotos en bulbillos, coronas e hijuelos, pero de origen adventicio, y las plántulas regeneradas presentaron un amplio rango de variación somaclonal, lo que puede ser útil en mejoramiento genético de la especie.

Al parecer concentraciones de BAP del orden de 0,5-3,0 mg L⁻¹ estimula la formación de brotes de origen axilar y de 3,0-10,0 mg L⁻¹ se generan brotes adventicios.

La formación de brotes se logra con la interacción de una auxina AIA y una citoquinina BAP a bajas concentraciones, pues la piña determina su desarrollo por el balance hormonal endógeno (Casale y De García, 1987; García, 1984 y Gutiérrez, 1988).

Otros investigadores han evaluado diferentes relaciones de hormonas (auxinas-citocininas) a bajas concentraciones (2.0 y 1.0 mg L⁻¹) en medios suplementados con sulfato de adenina (40 mg L⁻¹) y NaH₂PO₄ · H₂O (170 mg L⁻¹), alcanzando una producción de 60.000 plantas al año por corona (Casale y De García, 1987).

Las sales (MS) suplementadas con leche de coco 25% V/V promueven el desarrollo de brotes individuales, entre cuyas características se cuentan un promedio de 58 hojas desarrolladas en un tiempo de dos meses, los cuales se multiplican en un medio con la mitad de las sales (MS), suplementado con 1,3 mg L⁻¹ de BAP. De esta manera se desarrollan, en promedio, tres brotes en un mes, llegando a una producción de 8.000 plantas por año (Zepeda y Sagawa, 1981).

Ramírez (1984) encontró que una vez iniciado el crecimiento de las yemas, no era conveniente retirar las citoquininas del medio (cinetina), puesto que un alto porcentaje de las yemas, interrumpían su crecimiento en poco tiempo.

Medios líquidos en agitación (150 rpm) suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y cinetina (1.0 mg L⁻¹) y sulfato de adenina (20 mg L⁻¹), estimularon el desarrollo de 98 plántulas por explante, en un tiempo no indicado (Poh and Khoon, 1975).

Es posible inducir formación de callos en brotes originados de yemas de corona, con concentraciones relativamente altas de (IBA), (ANA) y cinetina (Rangan, 1985). Con semillas *in vitro* a concentraciones bajas de IBA y BAP (0.1 mg L⁻¹), el embrión se transformaba en callo y los fragmentos de callo con primordios de brotes subcultivados en ANA e IBA (2.0 mg L⁻¹) y BAP (2.5 mg L⁻¹), formaron plantas con buen desarrollo radical (Srinivasa; Doreswamy y Chacko, 1979).

Se han evaluado los efectos de algunas vitaminas, aminoácidos y otros suplementos orgánicos adicionados al medio: inositol, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, sulfato de adenina, como los más importantes. Biotina, ácido fólico, pantotenato de calcio, riboflavina, ácido ascórbico, L cisteína, glicina y tirosina (Casale y De García, 1987; Drew, 1980; Gutiérrez, 1988; Mapes, 1973; y Mathews y Rangan, 1979).

Dentro de estas sustancias vale la pena destacar el sulfato de adenina, pues al parecer esta sustancia estimula el desarrollo de los órganos formados (Casale y García, 1987; Mapes, 1973; Mathews, 1979 y Murashige, 1974).

La leche de coco en concentraciones de 15-25% V/V ha dado buenos resultados (García, 1984; Gutiérrez, 1988; Mapes, 1973; Mathews y Rangan, 1981) al igual que la caseína hidrolizada 400 mg L⁻¹ (Mathews y Rangan, 1979; Mathews, 1979; Rangan 1985). Como fuente de energía se ha utilizado la sacarosa 20 a 30 gr L⁻¹ (Casale y De García, 1987; Gutiérrez, 1988; Ramírez, 1984 y Drew, 1980).

Gutiérrez (1988) después de muchos ensayos encontró que las citoquininas inhiben el enraizamiento y la calidad del sistema radical fue mejor al eliminar las auxinas y adicionar carbón activado al medio, por lo que concluyó que el enraizamiento *in vitro* de la piña, no requiere reguladores de crecimiento. El enraizamiento *in situ* de la piña ha dado buenos resultados, cuando se aplica agua en abundancia (Casale y De García, 1987; García, 1984).

Se considera que las condiciones de incubación de los cultivos son los siguientes:

1. el medio de cultivo con un pH que varía entre 5.4-5.8 (Casale y De García, 1987; Gutiérrez, 1988; Mathews, 1979; Poh y Khoon, 1975 y Srinivasa *et al*, 1981),
2. la temperatura, entre 24 y 30°C (Casale y De García, 1987; Gutiérrez, 1988; Mathews, 1979; Poh y Khoon, 1975; Ramírez, 1984 y Zepeda y Sagawa, 1981),
3. la intensidad luminosa, desde 900 lux (Mathews y Rangan, 1979) a 2100 lux (Zepeda, 1981), pero la intensidad más comúnmente usada es 1500 lux (García, 1984; Gutiérrez, 1988),
4. el fotoperíodo, 18 horas de luz (Poh y Khoon, 1975) y 16 horas (García, 1984; Gutiérrez, 1988; Ramírez, 1984). Casale y De García (1987) recomienda luz continua,
5. la humedad relativa, 50-60 (Mathews, 1979).

MATERIALES Y METODOS

La investigación se efectuó en las instalaciones del laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, con una temperatura promedio anual de 25°C y una humedad relativa de 65-70%.

El proceso de la investigación se llevó a cabo en las siguientes fechas:

1. desinfección: noviembre de 1990 a mayo de 1991,

2. multiplicación: julio a octubre de 1991,
3. enraizamiento: agosto a octubre de 1991,

Se utilizaron yemas de coronas de piña *Ananas comosus* L. Merry variedad cayena lisa, procedentes del Valle del Cauca y donadas por una empresa de conservas de la ciudad, razón por la cual entre un lote y otro se observó cierta heterogeneidad, especialmente en el grado de madurez y estado fitosanitario de los frutos. las coronas se tomaron al azar.

Desinfección

Se evaluaron siete tratamientos de desinfección, para lo cual se tomaron al azar 20 coronas, éstas se deshojaron manualmente, se lavaron con agua abundante y se introdujeron en una solución jabonosa durante 10 minutos, se enjuagaron y se procedió a extraer 10 yemas por corona, efectuando tres cortes en forma piramidal. Se inició el proceso de desinfestación con hipoclorito de sodio en su forma comercial (clorox al 5,25% de NaOCl), más tres gotas de tween. Las yemas en la solución desinfectante fueron trasladadas a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, donde se continuó con la segunda desinfección (Tabla 1).

TABLA 1. Concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de desinfección de yema de piña (*Ananas comosus* L. Merry).

Tto.	1a. Concent. NaOCl %	Tiempo Desinfec. minutos	2a. Concent. NaOCl %	Tiempo Desinf. minutos	Desinfección Previa*	
					NaOCl %	Tiempo min.
A	2,0	25	1,0	25		
B	2,0	15	1,0	15		
C	1,0	35	0,5	35		
D	1,0	20	0,5	20		
E	0,5	20	0,25	20	1,0	5
F	1,2	20	1,0	20	1,2	5
G	1,0	20	0,7	20	1,0	5

* Estos tratamientos se hicieron después de evaluar los cuatro primeros, por lo que se adicionó una desinfestación previa a la corona con NaOCl por cinco minutos. Esta se hizo luego del lavado con agua jabonosa.

Finalmente se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril y se sembraron en frascos pequeños (3 cm de altura por 1 cm de diámetro), con un ml de medio líquido y se cubrieron con tres capas de polietileno autoadhesivo (vinilpel).

El medio de cultivo utilizado fue el siguiente: sales de MS (sigma 6899) suplementados con mioinositol (100 mg L⁻¹) y tiamina. HCl (1.0 mg L⁻¹), ácido nicotínico (1,0 mg L⁻¹), piridoxina (1,0 mg L⁻¹), sulfato de adenina (80 mg L⁻¹) y sacarosa (30 gr L⁻¹).

Los 200 frascos con su respectiva yema se dividieron en cuatro unidades experimentales cada una con 50 frascos, los cuales fueron tomados del total al azar. Los cuatro grupos se ubicaron separados sobre un agitador a 120 rpm, el cual estaba ubicado en un cuarto con temperatura media de 28°C, humedad relativa 60-65% e intensidad lumínica de 1000 a 3000 lux. Se realizaron observaciones cada cuatro días, descartando luego de cada revisión las yemas contaminadas y registrando las yemas necrosadas, activas (verdes) y las inactivas (blancas).

Ensayo sobre el efecto de reguladores de crecimiento

Se probaron cuatro concentraciones de BAP en combinación con dos concentraciones de ANA, así (0-0); (1,5-0); (2,5-0); (3,5-0); (0-0,4); (1,5-0,4); (2,5-0,4) y (3,5-0,4). Las yemas se desinfectaron según el protocolo indicado en el tratamiento G (Tabla 1), dados los resultados obtenidos en los ensayos de desinfección.

Las yemas brotaron al mes de sembradas, luego se transplantaron a un recipiente más grande (5.5 cm de altura por 5 cm de diámetro). Cada cuatro días y durante dos meses se observaron las características que exhibían los brotes en cuanto a tamaño y supervivencia.

Prueba comparativa de enraizamiento con medio gelificado y medio líquido

Se aislaron brotes completamente diferenciados, de tres a cuatro centímetros de altura y cinco meses después de sembrados. Se sembraron 50 en medio gelificado con agar (8 gr L⁻¹) y 50 en medio líquido, con los componentes ya indicados en la prueba de desinfección, pero suprimiendo el sulfato de adenina. Se hicieron observaciones por dos meses sobre la longitud y número de raíces emitidas en ambos tipos de medio.

Diseño experimental

En los dos primeros ensayos se utilizó un diseño C.A., cuya unidad experimental estaba compuesta por 50 subunidades (una yema en un recipiente con un ml de medio) con cuatro replicaciones.

Para efectuar el análisis de varianza, se realizaron transformaciones para buscar que las variables tuvieran una distribución normal y estabilizar varianzas, ya que originalmente se presentaban con distribución binomial.

Las transformaciones fueron Ar Seno \sqrt{x} y $\sqrt{x+0.5}$ para analizar la contaminación y la brotación respectivamente en la fase de desinfección y Ar Seno \sqrt{x} para mortalidad y brotación en la fase de diferenciación.

TABLA 2. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de desinfección sobre la contaminación de las yemas.

Tto	% de yemas contaminadas Repeticiones				% Promedio de Tto.	% de yemas brotadas Repeticiones				% Promedio de Tto.	% de yemas inactivas	% de yemas necrosadas
	I	II	III	IV		I	II	III	IV			
A	2	2	0	0	1,0	0	0	0	0	0	70,0	29,0
B	4	0	4	2	2,5	0	2	2	2	1,5	74,0	22,0
C	14	16	4	2	9,0	2	2	4	4	3,0	19,5	68,5
D	30	36	30	32	32,0	20	12	16	10	14,5	16,5	37,0
E	66	54	46	56	55,5	6	16	20	16	14,5	4,5	25,5
F	42	28	30	36	34,0	2	2	2	0	1,5	0,5	64,0
G	20	32	34	34	30,0	18	26	28	20	23,0	2,0	45,0

A: NaOCl (2%) 25 min + NaOCl (1%) 25 min

B: NaOCl (2%) 15 min + NaOCl (1%) 15 min

C: NaOCl (1%) 35 min + NaOCl (0.5%) 35 min

D: NaOCl (1%) 20 min + NaOCl (0.25%) 20 min

E: NaOCl (0.5%) 20 min + NaOCl (0.25%) 20 min + NaOCl (1%) 5 min

F: NaOCl (1.2%) 20 min + NaOCl (1.0%) 20 min + NaOCl (1.2%) 5 min

G: NaOCl (1.0%) 20 min + NaOCl (0.7%) 20 min + NaOCl (1.0%) 5 min

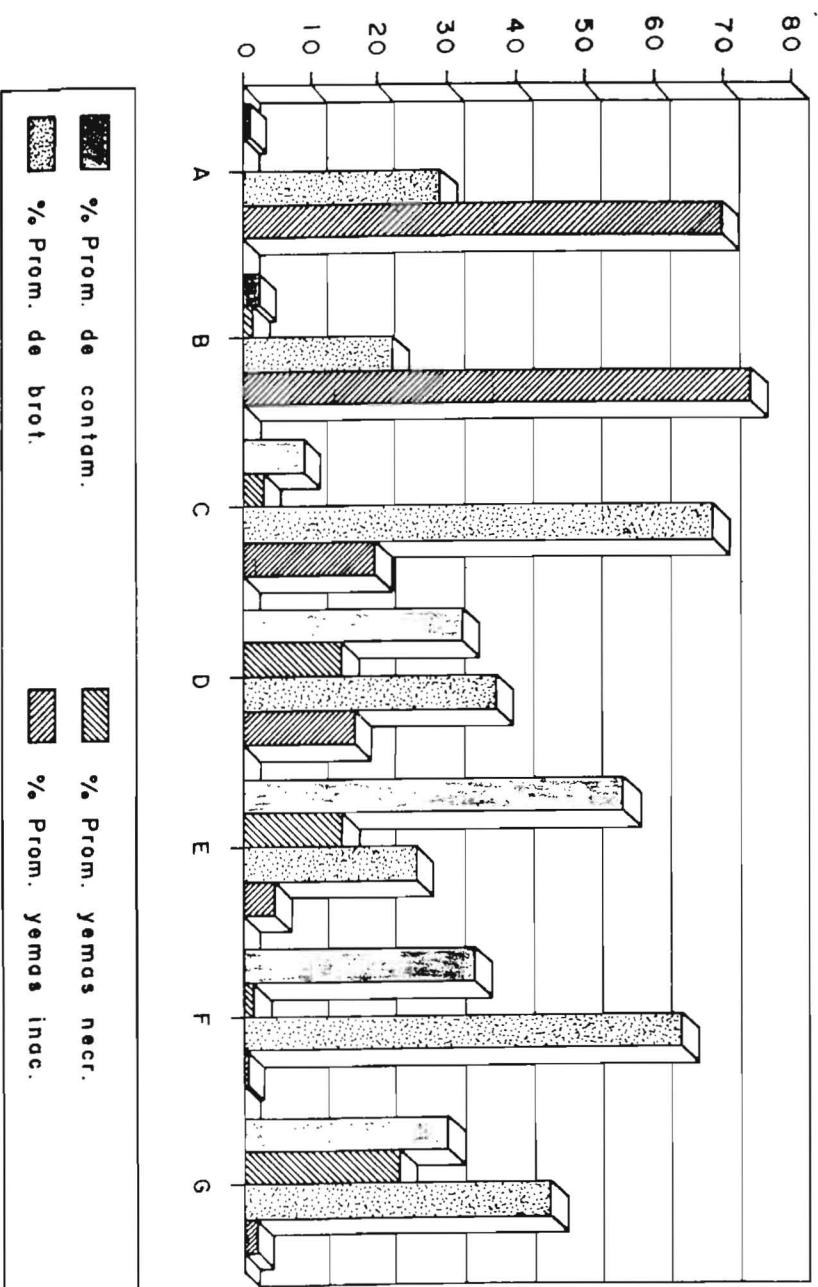


FIGURA 1. Resultados de la fase de desinfección de yemas de pinya.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fase de desinfección

En la Tabla 2, Figura 1, se pueden apreciar los resultados de desinfección de cada uno de los siete tratamientos evaluados. Aunque se lograron resultados satisfactorios, es posible realizar nuevos ajustes de acuerdo al estado de cada material.

De estos resultados se puede deducir que a mayor concentración de hipoclorito, se obtiene un mayor número de yemas inactivas y necrosadas, sin o con bajas brotaciones.

La reducción del tiempo de desinfección de 35 (tratamiento C) a 20 minutos, aumentó la contaminación (tratamiento D) pero la brotación y/o viabilidad de las yemas se aumentó en cinco veces, por que se determinaron los otros tres tratamientos evaluados, variando las concentraciones ligeramente, pero manteniendo el tiempo de 20 minutos, pues al parecer un tiempo mayor, permite más penetración del ingrediente activo, impidiendo el adecuado desarrollo de los brotes a partir de las yemas.

Se observó que una desinfección previa a la corona por 5 minutos con NaOCl al 1% y luego a las yemas en concentraciones de 1.0% y 0.7% por 20 minutos; reducía la contaminación, manteniendo una brotación alta (23%), en relación a los resultados reportados por Gutiérrez (1988), para yemas de corona de la misma variedad (5% de supervivencia).

Al hacer el análisis de varianza y observando los resultados de la prueba múltiple de promedios (Duncan) (Tabla 3) se observa que para efectos de contaminación, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos A-B y los D, F y G, siendo mayor la contaminación en el tratamiento E. Respecto a la brotación (Tabla 4), se descartó el tratamiento A (no produjo brotes) y se encontró que el mejor fue el tratamiento G.

Los coeficientes de variación para contaminación y brotación fueron relativamente altos (16,9 y 17,9), posiblemente debido a la variabilidad del material, puesto que las coronas se obtuvieron de frutos que procesan las empresas de conservas en la ciudad y por lo tanto no se tuvo ningún control sobre el origen y manejo del material.

Por otro lado Casale y De García (1987) argumentan que los problemas de contaminación de las yemas axilares de piña, al parecer se deben a la forma y arreglo de las hojas, ya que la unión entre éstas y el tallo, se constituye en un reservorio de humedad y se acumulan partículas de suelo, materia orgánica, restos de hojas y algunos insectos, condiciones muy apropiadas para el crecimiento de los microorganismos. Además los antibióticos utilizados producen disminución del crecimiento de las yemas y no contrarrestan efectivamente la contaminación.

TABLA 3. Prueba múltiple de promedios Duncan para contaminación, fase de desinfección.

Tratamiento	Promedio	
A: NaOCl (2%) 25 min + NaOCl (1%) 25 min	6,0924	a
B: NaOCl (2%) 15 min + NaOCl (1%) 15 min	8,8147	a
C: NaOCl (1%) 35 min + NaOCl (0.5%) 35 min	16,3044	b
D: NaOCl (1%) 20 min + NaOCl (0.25%) 20 min	34,4353	c
E: NaOCl (0.5%) 20 min + NaOCl (0.25%) 20 min + NaOCl (1%) 5 min	48,1943	d
F: NaOCl (1.2%) 20 min + NaOCl (1.0%) 20 min + NaOCl (1.2%) 5 min	35,6063	c
G: NaOCl (1.0%) 20 min + NaOCl (0.7%) 20 min + NaOCl (1.0%) 5 min	33,0880	c
Promedio	26,0765	

CV = 16,9%

TABLA 4. Prueba múltiple de promedios Duncan para brotación, fase de desinfección.

Tratamiento	Promedio	
B: NaOCl (2%) 15 min + NaOCl (1%) 15 min	1,4359	a
C: NaOCl (1%) 35 min + NaOCl (0.5%) 35 min	1,8512	a
D: NaOCl (1%) 20 min + NaOCl (0.5%) 20 min	3,8414	b
E: NaOCl (0.5%) 20 min + NaOCl (0.25%) 20 min + NaOCl (1%) 5 min	3,0003	b
F: NaOCl (1.2%) 20 min + NaOCl (1.0%) 20 min + NaOCl (1.2%) 5 min	1,4359	a
G: NaOCl (1.0%) 20 min + NaOCl (0.7%) 20 min + NaOCl (1.0%) 5 min	4,8288	c
Promedio	2,8656	

CV = 17,9%

TABLA 5. Efecto del BA y el ANA en la diferenciación de yemas.

Tto.	BAP	ANA	A	B	C	D	E	F	D ₁
mg/11									
1	Testigo		38,5	32,0	1,5	6,0	22,0	0,425	9,79
2	1,5	0,0	35,0	36,0	0,0	17,0	12,0	1,085	26,02
3	2,5	0,0	30,5	34,5	0,0	24,0	11,0	0,848	34,51
4	3,5	0,0	38,5	28,0	0,0	20,5	13,0	0,570	33,68
5	0,0	0,4	32,0	37,5	2,0	11,0	17,5	0,481	16,13
6	1,5	0,4	36,5	30,5	3,0	17,0	13,0	1,055	26,75
7	2,5	0,4	40,5	34,0	0,5	16,0	9,0	1,015	26,90
8	3,5	0,4	29,0	41,5	0,0	23,5	6,0	0,961	32,93

A : % promedio de yemas contaminadas

B : % promedio de yemas necrosadas

C : % promedio de yemas inactivas

D : % promedio neto de brotación

E : % promedio de mortalidad (yemas inicialmente brotadas y que terminaron necrosadas)

F : promedio del tamaño de las yemas en centímetros

D₁: % promedio real de brotación

Al hacer un cultivo y análisis microbiológico, se encontró que la contaminación que se presentó era debida a pseudomonas y levaduras, las que producen una apariencia lechosa en los medios de cultivo.

Ensayo sobre el efecto de los reguladores de crecimiento en la brotación inicial, fase de diferenciación.

El efecto de la relación ANA-BAP, en distintas concentraciones, se evaluó sobre aspectos como necrosamiento de yemas (B), yemas inactivas (C) (blancas), brotación neta y real (D* y D**), mortalidad de yemas brotadas (E) y longitud de brotes (F) y cuyos resultados se observan en la Tabla 5.

Allí vemos que los numerales A, B y C, presentan cifras similares entre los tratamientos.

Esta tabla dió origen a la Figura 2, en la que se grafican los datos indicados en las columnas D, D₁, E y F, se observan claramente los resultados obtenidos con los ocho tratamientos evaluados; los datos sobre brotación muestran que los tratamientos sin BAP (T1 y T5, Tabla 5) presentaron un menor número de yemas brotadas y la prueba múltiple de promedios (Tabla 6) corrobora tal afirmación, pues sólo hay diferencias significativas entre estos

tratamientos y los que tienen BAP. La Figura 2 muestra una mejor respuesta a los tratamientos 3, 4 y 8.

Pannetier y Lanaud (1976) explican que es difícil determinar el número de yemas viables, ya que se observa una gran heterogeneidad, debido en gran parte a los estados de ontogénesis de las yemas en el momento de la extracción. De ahí que se ha planteado la necesidad de trabajar con plantas madres o donantes de explantes, buscando controlar la variabilidad del material, lo que no se pudo hacer en este caso.

Tran Thanh Van (1981) argumenta que son tan importantes las condiciones ambientales, nutricionales y fitohormonales a los cuales se somete el explante, situación que se observa en las Tablas 6 y 7, como la influencia que tiene el pasado de la planta madre sobre dicho explante, pues un pretratamiento a ésta, puede moldear características fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

TABLA 6. Prueba múltiple de promedios Duncan de brotación, fase de diferenciación.

Tratamiento	BAP mg L ⁻¹	ANA mg L ⁻¹	Promedios	
T 1	0	0	17,7518	a
T 2	1,5	0	30,3092	b
T 3	2,5	0	35,9490	b
T 4	3,5	0	35,3990	b
T 5	0	0,4	23,2790	a
T 6	1,5	0,4	31,0743	b
T 7	2,5	0,4	31,1467	b
T 8	1,5	0,4	34,8995	b
Promedio			29,9761	

Por otro lado Debergh y Moore citados por García (1984), estudiaron varias especies y relacionaron el estado fisiológico de las plantas madres con la viabilidad del material en cultivo *in vitro* y concluyeron que era absolutamente necesario el establecer una fase que denominan cero y que se refiere al tratamiento homogéneo de las plantas madres, para obtener un material seleccionado de alta viabilidad. Dicen que como estado óptimo debe entenderse no sólo el aspecto exterior del material, sino las condiciones intrínsecas de la planta en la época de fertilización, maduración, condiciones hídricas, método de cultivo, etc.

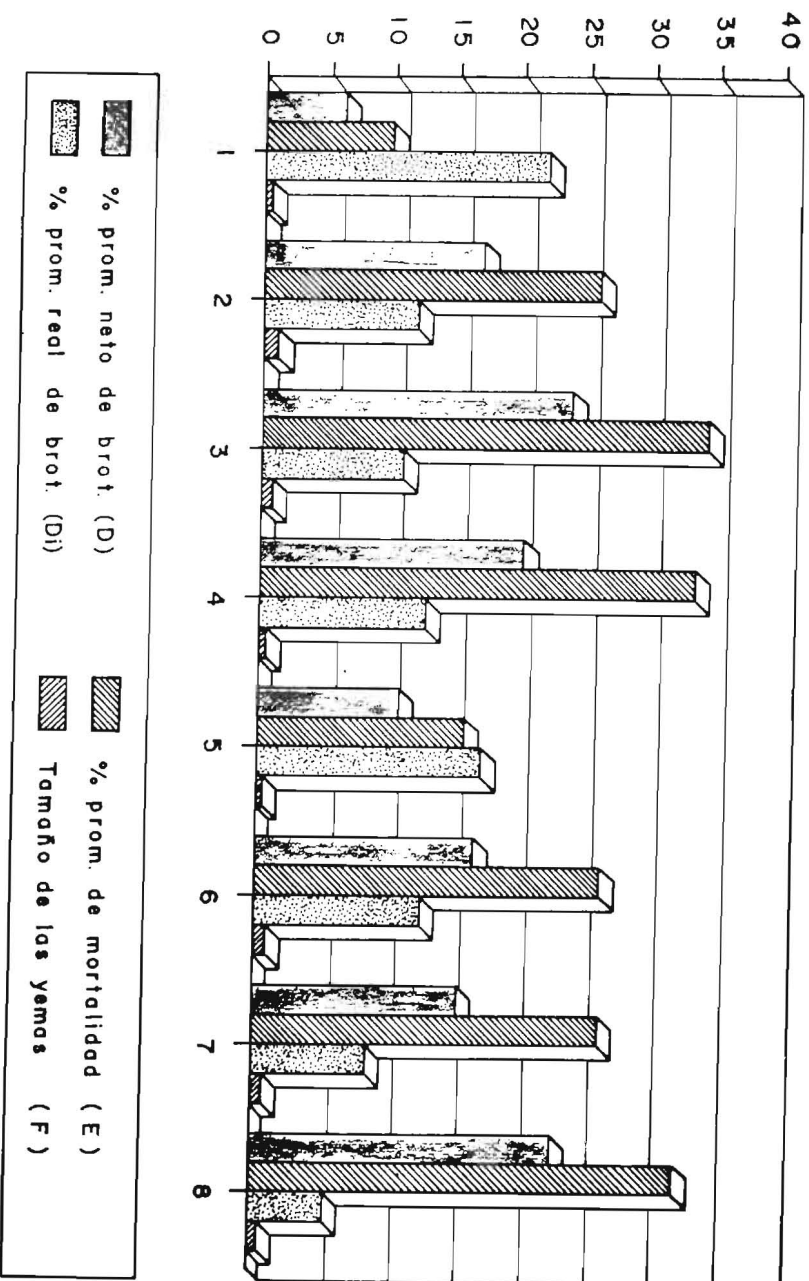


FIGURA 2. Resultados de la fase de diferenciación de yemas de piña.

La longitud de los brotes fue estimulada por BAP a concentraciones de 1,5 mg L⁻¹ hasta 2,5 mg L⁻¹. Al parecer una concentración mayor a 3,5 mg L⁻¹ de BAP tiende a disminuir el tamaño de los brotes (Figura 2, Tabla 5) y a estimular la formación de yemas adventicias, lo que coincide con lo dicho por Poh y Khoo (1975), Hosoki y Asahira (1980); García (1984) y Gutiérrez (1988).

Los coeficientes de variación para brotación y mortalidad fueron 15,7% y 23,15% respectivamente. Las razones de éstas ya fueron discutidas.

Los resultados indican la necesidad de utilizar especialmente citoquininas (BAP) en la fase de establecimiento del cultivo, lo que coincide con las recomendaciones de Casale y De García (1987), pero que contrarían las conclusiones de García (1984) y Gutiérrez (1988), quienes concluyeron que las yemas de corona, están abastecidas por un contenido hormonal endógeno, que les permite un desarrollo inicial adecuado, de modo que cualquier adición externa resulta innecesaria.

Ramírez (1984) observó que los medios que carecieron de citoquininas presentaron el más alto porcentaje de mortalidad de las yemas, al igual que lo observado para los tratamientos 1 y 5 que carecían de esta hormona (Tabla 7).

TABLA 7. Prueba múltiple de promedios Duncan de mortalidad, fase de diferenciación.

Tratamiento	BAP mg L ⁻¹	ANA mg L ⁻¹	Promedios	
T 1	0	0	27,6654	c
T 2	1,5	0	19,7866	ab
T 3	2,5	0	19,2195	ab
T 4	3,5	0	20,9436	abc
T 5	0	0,4	24,6157	bc
T 6	1,5	0,4	20,4788	abc
T 7	2,5	0,4	17,1913	ab
T 8	3,5	0,4	13,6329	a
Promedio			20,4417	

Lataena citado por Ramírez (1984) plantea que la mortalidad de las yemas, luego de iniciado el crecimiento y brotación, puede estar influenciado por innumerables factores como el grado de desarrollo fisiológico de la yema en el momento de la siembra, así como los daños ocasionados en el proceso de manipulación de la misma y el deterioro que pudieran causar los agentes esterilizantes.

Cuando se usa una citocinina en combinación con una auxina, los brotes generados son de mayor tamaño y Moore (1984) afirma que el efecto más obvio de las auxinas, es la promoción del alargamiento celular y que su uso en conjunto con las citoquininas, ha sido básico para lograr resultados satisfactorios en muchas especies de plantas cultivadas *in vitro*.

Prueba comparativa de enraizamiento

Al realizar la prueba de T para comparar la media de enraizamiento (Tabla 8), con respecto al número y longitud de raíces, no se encontró una diferencia significativa cuando se utilizó como sustrato de enraizamiento el medio gelificado con 0.8% de agar y el medio líquido.

No es necesaria la adición de reguladores de crecimiento para inducir el enraizamiento (Gutiérrez, 1988), pues tanto en medio sólido como en líquido, se logró inducir la formación de raíces, sin adicionar auxinas. En cuanto a la consistencia física del medio, algunos autores recomiendan el medio sólido (Gutiérrez, 1988; Srinivasa; Doreswamy y Chacko, 1981; Zepeda y Sagawa, 1981) y otros indican que han obtenido mayor enraizamiento en líquido (Mathews, 1979; Rangan, 1985).

Al parecer en piña es más económico el enraizamiento *ex vitro*, para lo cual es necesario eliminar las hojas más externas y sembrar en un sustrato como turba y arena (1:1) con alta humedad y sombreado (Casale y De García, 1987; García, 1984).

CONCLUSIONES

1. Altas concentraciones de NaOCl y/o tiempos muy prolongados (mayores de 20 minutos) inhiben la brotación de las yemas de piña.
2. La brotación y crecimiento de yemas axilares son estimuladas principalmente por BAP en concentraciones de 1,5-2,5 mg L⁻¹. La carencia de éste incrementó la mortalidad prematura de las yemas brotadas.
3. Los medios gelificado y líquido no presentaron diferencia significativa sobre el estímulo y desarrollo de raíces de plántulas que crecen *in vitro*.
4. Se puede considerar que las yemas de corona de piña, variedad cayena lisa, se desarrollan adecuadamente en un medio MS suplementado con tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (1,0 mg L⁻¹), sulfato de adenina (80 mg L⁻¹), inositol (100 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), BAP (1,5-2,5 mg L⁻¹) y ANA (0,4 mg L⁻¹).

TABLA 8. Efecto de la consistencia del medio sobre el enraizamiento de plantas de piña *Ananas comosus* L. Merry.

No. Planta	Medio Gelificado Número de raíces	Con agar 0.8 % Longitud	Medio Líquido Número de raíces	Longitud
1	3	1,63	2	1,60
2	8	2,60	3	2,50
3	6	1,34	2	1,90
4	5	2,00	3	1,00
5	4	1,65	4	1,50
6	4	2,40	5	2,20
7	3	2,40	5	2,60
8	5	2,00	5	0,80
9	4	0,80	3	0,95
10	4	1,20	2	1,30
11	5	1,60	2	1,20
12	3	4,00	2	3,60
13	5	1,60	4	2,00
14	3	0,80	3	0,50
15	4	1,80	6	1,25
16	7	1,70	6	2,00
17	3	2,40	5	0,60
18	5	0,70	6	0,50
19	3	0,80	3	2,20
20	5	1,20	3	1,00
21	4	1,70	5	1,40
22	5	1,70	8	1,90
23	5	1,20	5	2,00
24	6	1,40	4	1,20
25	8	2,50	3	2,30
26	7	3,50	7	1,90
27	6	2,50	6	2,30
28	5	2,00	4	2,10
29	4	1,60	5	2,50
30	3	0,70	5	2,10
Promedio	4,77	1,80	4.20	1,69

BIBLIOGRAFIA

- CASALE O., Iroma y De GARCIA, G. E. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *En: ACEVIV*. Vol. 2 (1987); p. 3-18.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *En: Physiologia Plantarum*. Vol. 59 (1983); p. 270-276.
- DEL CORRAL, A.; GUTIERREZ, M. y TRILLOS G., O. Producción de plantas madres de clavel y crisantemo libres de patógenos por medio de cultivo de tejidos. Medellín, 1983. 93 p. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
- DREW, R.A. Pineapple tissue culture unaqualed for rapid multiplication. *En: Queensland Agricultural Journal*. Vol. 106, No. 5 (sep/oct. 1980); p. 447-451.
- ESPINAL T., L. Perfiles ecológicos de rutas colombianas y de los ríos Cauca y Magdalena. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1989. 125 p.
- GARCIA, G. Propagación de la piña americana *Ananas comosus* por cultivo de tejidos *in vitro*. *En: XOBA, Revista de Agricultura*. Vol. 4, No. 2 (1984); p. 20-33.
- GUTIERREZ E., M.A. Efecto de la Benciladenina, ácido indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de la piña *Ananas comosus* L. Merry cultivar "cayana lisa". México, 1988. 70 p. Tesis (Maestría en Ciencias, Especialista en Fruticultura). Centro de Fruticultura Chapingo. Colegio de Postgraduados.
- HOSOKI, T. and ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. *En: Hortscience*. Vol. 15, No. 5 (1980); p. 603-604.
- MACLUSKIE, H. Pineapple propagation, a new method in Sierra Leone. *En: Tropical Agriculture*. Vol. 60 (1983); 192 p.
- MAPES, M.O. Tissue culture of bromeliads. *En: Proceedings International Plant Propagator's Society*. Vol. 23 (1973); p. 47-55.
- MATHEWS, V. and RANGAN, T.S. Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. *En: Scientia Horticulturae*. Vol. 11 (1979); p. 319-328.
- MOORE, G.M. Mechanisms of hormone action in plants. *En: International Plant Propagator's Society. Combined Proceedings*. Vol. 34 (1984); p. 79-90.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *En: Annual Review Plant Physiology*. Vol. 25 (1974); p. 235-166.
- PALACIO, R. y SALGAR S., M. Rescate y cultivo de embriones inmaduros del híbrido de *Carica papaya* L. por *Carica pubes* cons. Medellín, 1988. p. 7-15. Tesis (Biología). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

- PANNETIER, C. et LANAUD, C. Divers aspects de l'utilisation possible des cultures *in vitro* pour la multiplication vegetative de l'*Ananas comosus* L. Merry., variete "cayenne lisse". *En: Fruits*. Vol. 31, No. 12 (1976); p. 739-750.
- POH, T. and KHOON, C.B. Tissue culture of pineapple. p. 51-58. *En: Natural Plant Tissue Culture Symposium*. Malasia: Kuala Lumpur, 1975.
- RAMIREZ, A. Reproducción de la piña *Ananas comosus* L. Merry mediante cultivo de tejidos. *En: Cultivos Tropicales*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Vol. 6, No. 3 (1984); p. 681-695.
- RANGAN, T.S. Pineapple. *En: Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 3 (1985); p. 373-382.
- SANTOS C., J. R.; PINTO de C., G.A. y RODRIGUEZ, E.M. Micropropagação do abacaxizeiro. p. 124-127. *En: CONGRESO BRASILEIRO DO FRUTICULTURA (7º: 1984: Sao Paulo)*. Anais do VII Congresso Brasileiro do Fruticultura. Sao Paulo: s.n., 1984.
- SIGMA. Plant cell culture reagents:Murashige and Skoog based media. New York: Sigma Chemical, 1988. 10 p.
- SRINIVASA, R.N.K.; DORESWAMY, R. and CHACKO, E.K. Differentiation of plantlets in hybrid embryo callus of pineapple. *En: Scientia Horticulturae*. Vol. 15 (1981); p. 235-238.
- TRAN THANH VAN, K.M. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. *En: Annual Review Plant Physiology*. Vol. 32 (1981); p. 291-311.
- ZEPEDA, O. and SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. *En: Hortiscience*. Vol. 16, No. 4 (1981); 495 p.