

**UIALB-DAA-2f-3)-d)-2000-1****Propagación clonal in vitro de piña (*Ananas comosus* L Merr) Variedades Champaka y Hawaiana\*.**

En el Ecuador existen aproximadamente 4.938 hectáreas sembradas de piña de exportación. En 1999, se exportó 9.817 toneladas métricas de piña fresca, equivalentes a 3.157.800 dólares. Los productores de piña del área de influencia de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), demandan de vitroplantas sanas y de alta calidad genética de las variedades Hawaiana y Champaka F-153, debido a la falta de material para siembra ya que en la propagación por métodos tradicionales no se dispone de gran cantidad de semilla cuando se requiere sembrar grandes extensiones de terreno. La micropropagación, permite clonar genotipos de plantas seleccionadas por sus características de alto rendimiento, resistentes a estrés y enfermedades, pudiéndose obtener una alta tasa de plantas libres de plagas y por ende, semilla de alta calidad fitosanitaria; además, se pueden obtener plantas en cualquier época del año ya que se trabaja bajo condiciones controladas.

De acuerdo a los antecedentes expuestos se planteo la presente investigación con la finalidad de establecer un protocolo para el establecimiento, multiplicación, y enraizamiento in vitro de yemas adventicias de retoños de corona de *Ananas comosus* L. Merr, variedad Hawaiana y Champaka F-153.

Se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, desde octubre del 2000 a diciembre del 2001. El proceso de micropropagación se inició a partir de yemas axilares de plantas adultas, de las variedades: Hawaiana y Champaka.

**A. Establecimiento e inducción del crecimiento**

El objetivo de esta etapa fue encontrar un medio de cultivo adecuado para el establecimiento in vitro de yemas axilares de las variedades de piña. La extracción y siembra de las yemas se realizó en la cámara de flujo laminar después de haber sido desinfectadas.

\*Saucedo. S. y Ramos L. Responsables de la investigación. Investigadora y Director, respectivamente, del Laboratorio de Biotecnología, UTEQ.

El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962)<sup>1</sup> suplementado con tiamina 5mg/l; myo-inositol 100 mg/l; sacarosa 30 g/l; además; auxinas AIA, ANA, AIB en concentraciones de 0.5 a 1mg/l y el BAP en concentraciones de 3 a 4 mg/l más sulfato de Adenina. Los explantes, fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

1. V1m1 = Champaka + MS + BAP (0.5 mg/l); AIB (1.0 mg/l) y ANA (1.0 mg/l)
2. V1m2 = Champaka + MS + BAP (1.0 mg/l); AIB (2.0 mg/l) y ANA (2.0 mg/l)
3. V2m1 = Hawaiana + MS + BAP (0.5 mg/l); AIB (1.0 mg/l) y ANA (1.0 mg/l)
4. V2m2 = Hawaiana + MS + BAP (1.0 mg/l); AIB (2.0 mg/l) y ANA (2.0 mg/l)

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 (variedades) x 2 (medios de cultivo) con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones (cada unidad experimental estaba conformada por ocho explantes). A los 21 días se evaluaron explantes contaminados, fenolizados, quemados y la supervivencia.

En esta fase no se presentaron diferencias estadísticas para explantes contaminados, fenolizados, quemados y vivos, tanto para variedades como para medios de cultivo (Cuadro 1).

**ESTABLECIMIENTO. LAB, BIOT, UTEQ, 2001\*.**

Variedades	Explantes			
	Contaminados	Fenolizados	Quemados	Vivos (%)
Champaka	1,72a	1,09a	1,12a	46,88a
Hawaiana	1,62a	0,90a	1,09a	56,25a
<b>Medios de Cultivo</b>				
MS+BAP 0,5 mg/l + AIB 1,0 mg/l + ANA 1,0 mg/l	1,80a	0,90a	0,90a	54,69a
MS+BAP 1,0 mg/l + AIB 2,0 mg/l + ANA 2,0 mg/l	1,55a	1,09a	1,31a	48,43a
<b>CV (%)</b>	22,21	22,15	34,19	26,65

\* Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey,  $P = 0,05$ ).

**A. Multiplicación y elongación de los brotes**

El objetivo de esta fase fue evaluar el tipo y la concentración de la citoquinina a emplear en la multiplicación in vitro de las variedades de piña en estudio. Para realizar este experimento se utilizaron vitroplantas proveniente de la etapa de establecimiento, las mismas que fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

1. V1B1 = Champaka + MS + BAP (3.0 mg/l)
2. V1B2 = Champaka + MS + BAP (3.5 mg/l)
3. V1B3 = Champaka + MS + BAP (4.0 mg/l)
4. V2B1 = Hawaiana + MS + BAP (3.0 mg/l)
5. V2B2 = Hawaiana + MS + BAP (3.5 mg/l)
6. V2B3 = Hawaiana + MS + BAP (4.0 mg/l)

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 (variedades) x 3 (concentraciones de BAP) con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones (cada unidad experimental estaba conformada por ocho explantes). A los 60 días se evaluó número de brotes por explante, longitud promedio de brotes y vigor.

En esta fase, la var. Champaka presentó mayor número de brotes por explante. En cambio, para longitud y vigor de los brotes no se encontraron diferencias estadísticas con respecto a la var. Hawaiana. Con la concentración de 3,5 y 4,0 mg/l de BAP se encontró el mayor número de brotes y con 3,0 mg/l de BAP la mayor longitud de brotes (Cuadro 2).

1/ Medio de cultivo formulado por Murashige y Skoog en el año de 1962

**CUADRO 2. EFECTOS SIMPLES DE DOS VARIEDADES DE PIÑA Y TRES CONCENTRACIONES DE BAP EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN. LAB, BIOT, UTEQ, 2001\*.**

Variedades	Explantes		
	Nº Brotes/explantes	Long. Prom. de brotes	Vigor
Champaka	9,75 <sup>a</sup>	0,49a	2,08a
Hawaiana	8,67 <sup>b</sup>	0,46a	1,92a
<b>Concentración de BAP</b>			
3,0 mg/l	3,63 <sup>b</sup>	0,59a	1,75a
3,5 mg/l	12,13 <sup>a</sup>	0,44 <sup>b</sup>	2,00a
4,0 mg/l	11,88 <sup>a</sup>	0,39 <sup>b</sup>	2,25a
<b>CV (%)</b>	13,60	17,52	22,05

\* Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey,  $P = 0,05$ ).

Lo anterior se reflejó para el número de brotes en la significación de la interacción "variedad x concentración de BAP". En esta, la var. Champaka presentó su mejor comportamiento con 3,5 y 4,0 mg/l de BAP y, la var. Hawaiana con 3,5 mg/l de BAP (Figura 1).

**FIGURA 1. INTERACCIÓN “VARIEDAD x CONCENTRACIÓN DE BAP” EN EL NÚMERO DE BROTES EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN. LAB. BIOT, UTEQ, 2001**

Asimismo, para longitud del brote, la variedad Champaka se manifestó mejor con 3,0 mg/l de BAP y, la var, Hawaiana en 3,0 y 3,5 mg/l de BAP (Figura 2).

**FIGURA 2. INTERACCIÓN “VARIEDAD x CONCENTRACIÓN DE BAP” EN LA LONGITUD DE BROTES POR EXPLANTE EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN. LAB. BIOT, UTEQ, 2001.**

**A. Enraizamiento y aclimatación ex vitro**

El objetivo en esta fase, fue la de determinar la mejor concentración de las auxinas AIB y ANA en el enraizamiento de las vitroplantas de las var Champaka y Hawaiana.

Se utilizaron vitroplantas de la etapa de multiplicación con una altura de cuatro a cinco centímetros, con 2 ó 3 pares de hojas. Posteriormente fueron colocadas en un sustrato de arena bajo tunel de polietileno y con un riego de Microjet con una frecuencia de tres minutos cada tres horas. Las vitroplantas fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

1. V1a1 = Champaka + AIB (50 mg/l)
2. V1a2 = Champaka + ANA(50 mg/l)
3. V1a3 = Champaka Sin hormona
4. V2a1 = Hawaiana + AIB (50 mg/l)
5. V2a2 = Hawaiana + ANA(50 mg/l)
6. V2a3 = Hawaiana sin hormona

En esta etapa se dispuso de un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 (variedades) x 3 (hormonas) con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones (cada unidad experimental estaba conformado por ocho explantes). A los 45 días se evaluó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces por planta, longitud de raíces, vigor y supervivencia.

Las variedades de piña presentaron diferencias estadísticas para porcentaje de enraizamiento, longitud , vigor y porcentaje de sobrevivencia.

La variedad Champaka solo presento mayor porcentaje de raíces; en cambio, la var. Hawaiana presentó mayor longitud de raíz, vigor y sobrevivencia (Cuadro 3).

Solamente en el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia se encontraron diferencias estadísticas para las hormonas ANA presento los mayores valores.

**CUADRO 3. EFECTOS SIMPLES DE DOS VARIEDADES DE PIÑA Y TRES CONCENTRACIONES DE HORMONA EN LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO. LAB, BIOT, UTEQ, 2001\*.**

Variedades	Explantes				
	Enraiz. (%)	Nº de raíces/ por planta	Prom.Long. de raíces	Vigor (Esc:1-3)***	Sobrevivencia (%)
Champaka	79,17b	7,00a	2,26b	2,08b	79,16b
Hawaiana	93,75a	7,25 <sup>a</sup>	3,55a	2,83a	93,75a
<b>Hormona</b>					
AIB**	78,13b	6,88 <sup>a</sup>	2,64a	2,50a	78,13b
ANA**	92,19a	7,88 <sup>a</sup>	2,78a	2,25a	92,19a
SIN HORMONA	89,07ab	6,63 <sup>a</sup>	3,30a	2,63a	89,06ab
<b>CV%</b>	11,56	14,13	22,54	17,28	11,56

\* *Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey,  $P = 0,05$ ).*

\*\*AIB = *Acido indolbutirico*; ANA = *Acido naftalenacético*

\*\*\*1 = *Bajo*; 2 = *Medio*; 3 = *Alto*

En relación a la interacción “variedad x tipo de hormona”, se encontró significación para la misma en todas las variables estudiadas. Encontrándose una mejor respuesta a la aplicación de hormonas por parte de la var. Hawaiana, no así para la var. Champaka, cuya mejor respuesta es sin hormonas (Figuras 3, 4, y 5).

**FIGURA 3. INTERACCIÓN “VARIEDAD X TIPO DE HORMONA” EN EL PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO EN LA FASE DE ENRAIZAMIENTO. LAB. BIOT, UTEQ, 2001.**

**FIGURA 4. INTERACCIÓN “VARIEDAD X TIPO DE HORMONA” EN EL PROMEDIO LONGITUD DE RAICES EN LA FASE DE ENRAIZAMIENTO. LAB. BIOT, UTEQ, 2001.**

**FIGURA 5. INTERACCIÓN “VARIEDAD X TIPO DE HORMONA” EN EL PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA EN LA FASE DE ENRAIZAMIENTO. LAB. BIOT, UTEQ, 2001.**

De acuerdo con los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- En la fase de establecimiento el mejor medio de cultivo fue el MS suplementado con 0,5 mg/l de BAP, 1.0 mg/l de AIB y 1.0 mg/l de ANA para las dos variedades.
- En la fase de multiplicación la variedad Champaka presento mejor respuesta en el medio de cultivo suplementado con 4,0 mg/l de BAP y la variedad Hawaiana con la concentración de 3,5 mg/l de BAP en cuanto a número de brotes/explante.
- Se obtuvo un buen porcentaje de enraizamiento y supervivencia en la variedad Champaka sin la utilización de hormona y en la variedad Hawaiana con la hormona AIB 50 mg/l.