

# REGENERACIÓN DE *Ananas comosus* (L.) Merr, ECOTIPO TABĒ KÄNÄ, MEDIANTE ORGANOGÉNESIS INDIRECTA

Adriana Pineda<sup>1</sup>, Teresa Edith Vargas<sup>1</sup> y Eva García de García<sup>1</sup>

## RESUMEN

La piña (*Ananas comosus*) es una especie de gran importancia agrícola y económica en Venezuela. El ecotipo de piña Tabĕ Känä representa una de las principales fuentes de actividad agrícola de los aborígenes de la etnia Piaroa del Amazonas venezolano. En esta investigación se estableció un sistema de regeneración *in vitro* via organogénesis, para multiplicar este importante ecotipo a partir de secciones de bases de hojas de vitroplantas. Se usaron tres medios de cultivo constituidos por las sales de Murashige y Skoog (MS): a) medio sin reguladores de crecimiento (MS1), b) medio más 5 mg·L<sup>-1</sup> de ANA, y 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de BA (MS2), y c) medio con 2,5 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D (MS3). A todos los medios se les adicionó tiamina, mio-inositol y sacarosa. En MS2 y MS3 se formaron callos en cuatro semanas. A los tres meses de cultivo, los callos presentaron indicios de desarrollo de órganos, siendo el tratamiento más eficiente para la inducción de la organogénesis el MS2, en el cual se obtuvo, a los siete meses, un promedio de 5,54 raíces y 4,98 brotes por explante. En el medio MS3 se obtuvo en el mismo tiempo, un promedio de 1,4 raíces y 1,78 brotes por explante. Del total de plantas transferidas a suelo se obtuvo un 95 % de sobrevivencia, después de tres meses de aclimatación.

**Palabras clave adicionales:** Brotes, callos, Piaroa, piña

## ABSTRACT

### Regeneration of *Ananas comosus*, ecotype Tabĕ Känä, by indirect organogenesis

Pineapple (*Ananas comosus*) is an agricultural species with high economic importance in Venezuela. The ecotype Tabĕ Känä represents one of the main sources of agricultural activity of the aboriginal Piaroa, in the Venezuelan Amazon. In this investigation, an *in vitro* regeneration system via organogenesis was established to multiply this interesting ecotype from leaf base sections of vitroplants. Three culture media consisting of Murashige and Skoog salts (MS) were used: a) medium without growth substances (MS1), b) medium with 5 mg·L<sup>-1</sup> ANA and 0.25 mg·L<sup>-1</sup> BA (MS2), and c) medium with 2.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D (MS3). All media were supplemented with thiamine, myo-inositol and sucrose. In MS2 and MS3, calli was formed in four weeks. After three months of culture, the calli showed evidence of organ development, being the MS2 the most efficient treatment for induction of organogenesis, with an average of 5.54 roots and 4.98 shoots per explant, after seven months. At this time, an average of 1.4 roots and 1.78 shoots per explant was obtained in MS3. After three months of acclimation, survival of 95 % was achieved in plants that were transferred to soil.

**Additional key words:** Shoots, calli, Piaroa, pineapple

## INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr, forma parte de la familia Bromeliaceae y todas las variedades de piña de interés comercial pertenecen a esa especie (Santa Cruz et al., 2006). Este fruto tropical tiene gran producción a nivel mundial, siendo Tailandia el principal productor. Venezuela ocupa el número catorce con una producción de 425.000 toneladas métricas, y en el país este cultivo representa el quinto rubro de origen vegetal en producción precedido por el arroz, azúcar, maíz y banano; se cultiva en los estados

Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Monagas, Anzoátegui, Sucre y los márgenes del río Orinoco en el estado Amazonas (FAOSTAT, 2012).

El ecotipo de piña Tabĕ Känä, autóctono del Amazonas, es uno de los once ecotipos que son cultivados en esa región principalmente por los aborígenes de la etnia Piaroa. La planta posee hojas con espinas en sus márgenes y el fruto se caracteriza por ser más dulce y de mayor tamaño, en comparación con los frutos de la variedad comercial Española Roja. Es usado predominantemente para consumo como fruta fresca, en jugos y conservas.

Recibido: Abril 3, 2014

Aceptado: Agosto 29, 2014

<sup>1</sup> Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. e-mail: eva.cristina.garcia@gmail.com; teoriedu@gmail.com

A. *comosus* presenta incompatibilidad reproductiva expresada por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el tercio superior del estilo, por lo que su propagación tradicional se realiza vegetativamente mediante brotes laterales y por el enraizado de las hojas de la corona. Los Piaroa cultivan las piñas autóctonas de la región como parte de su cultura ancestral y la multiplican por el método convencional. Sin embargo, por este método obtienen un número limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para la plantación a mayor escala.

La propagación *in vitro* ha sido ampliamente utilizada para lograr la rápida multiplicación de numerosas especies vegetales, y entre ellas, la piña (Roostika y Mariska, 2003; Amin et al., 2005; Roostika et al., 2012). El éxito de esta técnica en escala comercial depende de la habilidad de transferir las plantas a condiciones *ex vitro*, la adecuada implementación de la técnica empleada y la obtención de una alta tasa de supervivencia de las plantas (Hazarika, 2006).

Debido a la importancia agrícola y económica del ecotipo de piña Tabē Kānā para la actividad frutícola de la comunidad Piaroa del Amazonas venezolano, en este trabajo se planteó establecer un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis como método de propagación clonal de la misma para la obtención de vitroplantas que puedan ser multiplicadas como material de propagación para suplir las necesidades de los productores, y favorecer la actividad productiva de esta comunidad. Parte de este material pasaría a formar parte del germoplasma *in vitro* de la institución ejecutora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El área de recolección de las plantas de piña correspondió a la región habitada por indígenas de la etnia Piaroa, ubicada en la cuenca hidrográfica del río Cataniapo, municipio Atures del estado Amazonas, aproximadamente a 30 km de la capital del estado. El clima de esta región se puede considerar de tipo tropical monzónico, con una corta estación seca comprendida entre los meses de enero y marzo, precipitación anual de 2847 mm y temperatura que oscila entre 24 y 32 °C. Los suelos predominantes son oxisoles y ultisoles, con baja capacidad de intercambio catiónico, bajos contenidos de nutrientes y alta acidez (Villa et al.,

2012).

Se emplearon como explantes segmentos de bases de hojas de aproximadamente 25 mm<sup>2</sup> provenientes de plantas micropropagadas de *A. comosus* del ecotipo autóctono del Amazonas Tabē Kānā obtenidas a partir de yemas de la corona e hijos basales de las mismas, y mantenidas *in vitro* durante 8 meses a 25±1 °C, bajo luz blanca continua de 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, en el banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (De García et al., 2008; Blanco et al., 2011).

Los medios de cultivo utilizados durante la investigación se prepararon en base a las sales de Murashige y Skoog (MS), suplementados con 0,4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 con NaOH 0,1 M y se añadieron 8 g·L<sup>-1</sup> de agar como agente gelificante. Un volumen de 30 mL de estos medios fue distribuido en frascos de vidrio y posteriormente esterilizado en autoclave durante 20 minutos (121 °C y 0,1 MPa).

Se establecieron tres diferentes medios de cultivo: a) el medio control MS1, al cual no le fueron añadidos reguladores de crecimiento, b) el medio MS2 al cual se le añadieron 5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA) más 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA), y c) el medio MS3 que recibió la adición de 2,5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D). Las concentraciones de los fitoreguladores se seleccionaron basados en experiencias previas donde se demuestra que el 2,4-D es efectivo en originar callos organogénicos en explantes de órganos de piña cultivados *in vitro* (Roostika et al., 2012; Pineda et al., 2012), lo que permitiría disminuir el costo del método. El caso del ANA en combinación con BA, también es producto de estudios previos realizados con la variedad de piña Española Roja (Pineda et al., 2012). Por su parte, el medio de Murashige y Skoog ha propiciado mejor respuesta que otros medios cuando se ha utilizado para el cultivo *in vitro* de otra especie crasulácea como el cocuy (González et al., 2012).

Los explantes se inocularon en los medios de cultivo en cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia a razón de 10 secciones por frasco, con 5 réplicas cada uno, obteniéndose un total de 50 explantes por tratamiento. El material fue incubado en una cámara de

crecimiento a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, en total oscuridad durante un mes para la inducción de la formación de callo y una vez que los explantes daban origen a tejidos de callo, los tejidos eran transferidos a otra cámara de crecimiento con condiciones de luz fluorescente continua ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y temperatura de  $27 \pm 1$  °C. La transferencia de los explantes fue realizada a medios con composición química igual a la original, suplementados con  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido ascórbico, con la finalidad de prevenir la oxidación. La transferencia del material a medio fresco se realizó cada dos meses.

Para evaluar el proceso organogénico, en cada cultivo se realizaron determinaciones del porcentaje de explantes con formación de callo, promedio de raíces por explante, promedio de brotes por explante e índice de formación de brotes. Asimismo, se llevó el registro de las características del callo y explantes, tiempos de respuesta, porcentaje de contaminación de los explantes y porcentaje de plantas aclimatadas. Todas las observaciones fueron realizadas utilizando una lupa estereoscópica.

El índice de formación de brotes (IFB) se calculó mediante la siguiente fórmula (Kikuta y Okazawa, 1984):

$$IFB = \frac{N^{\circ} \text{ brotes formados} \times N^{\circ} \text{ explantes con brotes}}{(N^{\circ} \text{ explantes cultivados})^2}$$

Con el fin de establecer la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro*, se observaron los cambios estructurales de los tejidos. Para ello se llevó a cabo un estudio anatómico del material vegetal, para determinar si la organogénesis ocurría en forma directa o indirecta. Se efectuaron cortes a mano alzada del material vegetal en las diferentes etapas del proceso de regeneración, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina en solución acuosa al 1 % y fijado en glicerina al 50 %. Los cortes anatómicos fueron observados a través de microscopios ópticos de luz visible y de luz polarizada. En cada caso, se tomaron fotografías utilizando una cámara digital acoplada a ellos.

Para la aclimatación de las plantas regeneradas, se transfirieron 50 de ellas obtenidas por organogénesis, con una altura aproximada de 6 cm, a un sustrato conformado por suelo abonado con residuos orgánicos de plantas, y arena lavada en una proporción 1:1 y se colocaron durante 15 días en propagadores con alta humedad (80-93 % de humedad relativa) y baja luminosidad (10

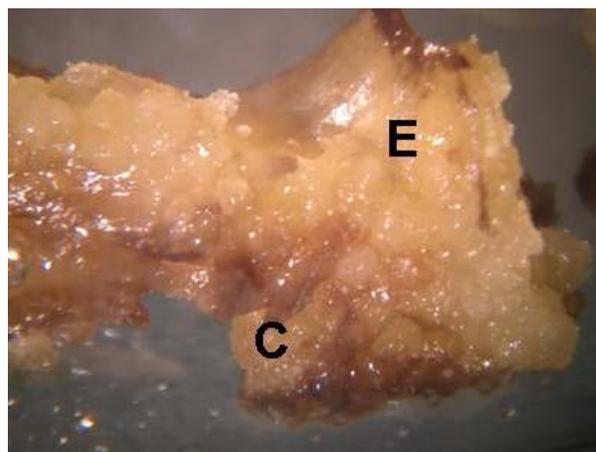
$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Luego, las plantas fueron transferidas a condiciones de vivero durante tres meses y finalmente llevadas al campo a plena exposición solar.

El análisis estadístico de los datos se realizó a través de análisis de varianza y pruebas de Duncan utilizando el programa Statistica versión 5.5.

## RESULTADOS

**Establecimiento del cultivo *in vitro*:** En el proceso de establecimiento del cultivo *in vitro*, se obtuvo un porcentaje mínimo de contaminación fúngica y bacteriana, observándose un 100 % de explantes libres de contaminación en el medio MS1 y MS2, y 90 % en el medio MS3. Esta baja tasa de contaminación se corresponde con explantes extraídos de plantas obtenidas y mantenidas *in vitro*.

**Inducción del callo:** Los explantes cultivados en el medio control (MS1) no presentaron cambios morfológicos y sólo se observó la oxidación de los mismos. En los medios MS2 y MS3 se observaron cambios en los explantes a partir de la tercera semana de cultivo, notándose la deformación externa del explante debido a un crecimiento diferencial en su superficie, presencia de hiperhidricidad de los tejidos externos y cambio de coloración del explante (verde a amarillento). Posteriormente, a las seis semanas, se observó callo granular friable de color claro en la región donde se realizó el corte de la hoja para escindir el explante (Figura 1).



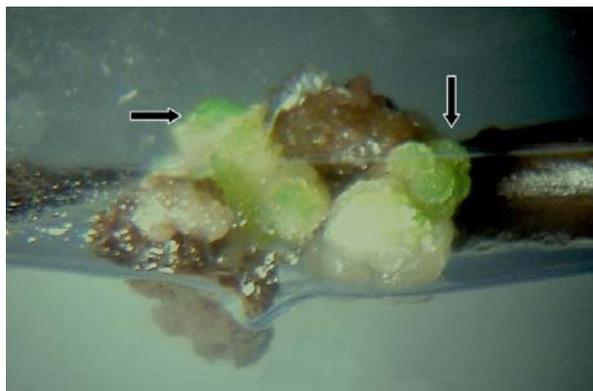
**Figura 1.** Explante de piña Tabē Kānā a los dos meses de cultivo *in vitro*. C: Callo formado E: Tejido original

A los tres meses de cultivo, se pudo observar que los explantes en el medio MS2 presentaron aproximadamente el triple de cantidad de callo que los explantes cultivados en el medio MS3, y en ambos casos los callos fueron de apariencia heterogénea, con zonas amarillentas translúcidas friables, otras zonas compactas de coloración marrón conformada por tejido oxidado y otras zonas de color verde, donde posteriormente ocurrió la regeneración de brote (Figura 2). En algunos casos, el callo se formó únicamente en los extremos del explante y en otros en toda la superficie de éste.

En el medio MS2 se obtuvo un mayor porcentaje de explantes con formación de callos en comparación con el medio MS3 a los tres meses de crecimiento (84 vs. 10 %;  $P \leq 0,05$ ); no obstante, a los siete meses se logró una alta proporción de explantes con callo formado (90-100 %) en ambos medios de cultivo, sin diferencias entre ellos (Cuadro 1).

**Regeneración de brotes:** Se encontró mayor número de raíces y de brotes por explante en el

MS2 con relación al MS3 ( $P \leq 0,05$ ), tanto a los tres como a los siete meses de cultivo (Cuadro 1). En promedio, la respuesta en el MS2 cuadruplicó la respuesta obtenida en el MS3 para las variables mencionadas. Similar tendencia mostró el índice de formación de brotes.



**Figura 2.** Estructuras en los callos de piña Tabē Känā (MS2) a los tres meses de cultivo *in vitro*. Las flechas señalan estructuras organogénicas de color verde

**Cuadro 1.** Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de organogénesis en segmentos de bases de hojas de piña ecotipo Tabē Känā a los tres y siete meses de crecimiento

Medio de cultivo	Formación de callo (%)	Promedio de raíces por explante	Promedio de brotes por explante	Índice de formación de brotes
Tres meses de crecimiento				
MS1	0	-	-	-
MS2	84 a	1,78 a	3,43 a	3,13
MS3	10 b	0,44 b	0,79 b	0,71
Siete meses de crecimiento				
MS1	0	-	-	0
MS2	100 a	5,54 a	4,98 a	4,98
MS3	90 a	1,40 b	1,78 b	1,60

MS1: Medio sin sustancias de crecimiento; MS2: Medio con  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA; MS3: Medio con  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

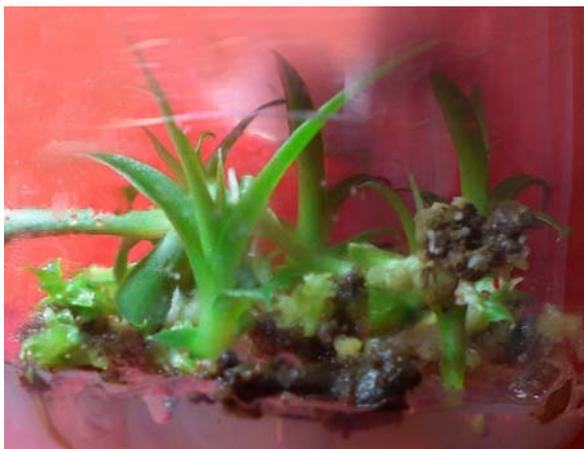
Los brotes regenerados en el MS2 (Figura 3) alcanzaron una mayor altura a los siete meses de cultivo, en comparación a los brotes obtenidos en el MS3 (7,0 y 6,2 cm, respectivamente). Para ese momento, las raíces formadas en ambos medios de cultivo alcanzaron una longitud promedio de 2,0 cm y presentaron una raíz notablemente desarrollada, de color amarillento y con numerosos pelos radicales.

En la Figura 4 se puede observar el corte longitudinal de yemas formadas *de novo* en el MS2, a partir de callo organogénico a los siete

meses de cultivo. El corte muestra haces vasculares de diferentes brotes originados en la masa callosa, lo que indica la presencia de una organogénesis ocurrida por vía indirecta, ya que los haces vasculares no se originan a partir de un tejido diferenciado preexistente; este proceso se observó en callos que crecían tanto en MS2 como en MS3.

El proceso se inició con la formación de callos en el explante a partir de la tercera semana de cultivo; algunos de ellos dieron origen a brotes y otros a raíces después de dos meses de cultivo en

el MS2 y a partir de los tres meses en el MS3 (Figura 5).



**Figura 3.** Brotes de piña Tabë Känä a los siete meses de cultivo *in vitro* (medio MS2)



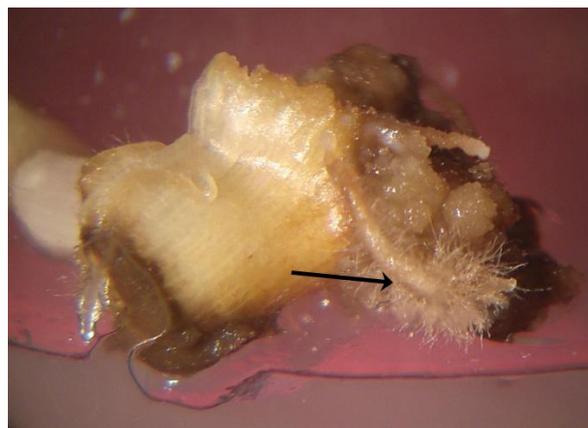
**Figura 4.** Corte longitudinal de multiyemas de piña Tabë Känä (medio MS2). La flecha muestra los haces vasculares

**Aclimatación de las plantas regeneradas:** Luego de transferir plantas de 4 a 6 cm de altura a un sustrato con suelo mineral y mantenerlas en propagadores, se obtuvo 95 % de sobrevivencia. En la Figura 6A se observan las plantas luego de tres meses de aclimatación, y en la Figura 6 B un año después de trasladadas al campo.

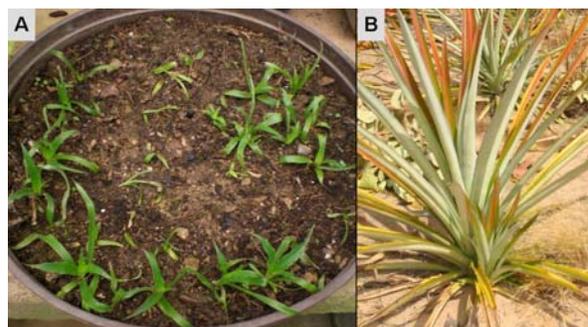
## DISCUSIÓN

El uso de bases de hojas como explantes

resultó satisfactorio para la propagación vía organogénesis del ecotipo de piña Tabë Känä tal como ha sido reportado para diferentes variedades de piña (Firoozabady y Moy, 2004; Pineda et al., 2012; Roostika et al., 2012). En relación a este punto, Firoozabady y Moy (2004) señalan que las bases de las hojas de piña presentan regiones meristemáticas (meristemos axilares) o poseen tejidos con células jóvenes de rápida división, las cuales son sensibles a los procesos de morfogénesis en condiciones de cultivo de tejidos *in vitro*. Adicionalmente, Alves et al. (2006) reportan que la zona basal de las hojas de las monocotiledóneas y especialmente de las bromelias, presenta elementos vasculares con células competentes para la rediferenciación cuando son activadas por señales reguladoras.



**Figura 5.** Raíces de piña Tabë Känä (flecha) obtenidas *in vitro* (medio MS3)



**Figura 6.** Vitroplantas de piña Tabë Känä. A. Aclimatadas en umbráculo. B. Establecida en el campo en el municipio Atures del estado Amazonas

No se observó la formación de callo en los explantes de hojas cultivados en el medio sin reguladores de crecimiento (MS1). Es decir, para

lograr la respuesta del explante fue necesario aplicar fitoreguladores y modificar el balance hormonal endógeno de los explantes. La formación de callo se observó en los explantes cultivados en los medios MS2 ( $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA +  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA) y MS3 ( $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D), a las tres semanas de cultivo, alcanzando 100% de explantes con callo en el medio MS2 a los siete meses. Este resultado es similar al reportado por Amin et al. (2005), quienes obtuvieron callos en *A. comosus* cv. Giant Kew en bases de hojas a partir de la cuarta semana de cultivo en un medio MS suplementado con una auxina y una citocinina (2,4-D y BA). Los períodos de tiempo para la iniciación del callo reportados en el presente trabajo, y los señalados por Amin et al. (2005), resultaron mayores que el reportado por Sripaoraya et al. (2003), quienes indican que obtuvieron la formación de callos a las dos semanas de cultivo a partir de bases de hojas de piña cv. Phuket, en medio MS suplementado igualmente con  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la presencia de pequeñas regiones con células totipotentes, capaces de formar nódulos meristemáticos bajo condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, apropiadas, y expresar su determinación hacia el inicio de eventos morfogénicos, que se traduce en la formación de brotes, y/o raíces, dependiendo fundamentalmente del balance auxina/citocinina (Christianson y Warnick, 1983). Un aspecto interesante en esta investigación es que no fue necesaria la transferencia de los callos a un medio de regeneración ya que la formación de raíces y/o brotes en los explantes ocurrió en los mismos medios de inducción de callo.

En el medio MS2 ( $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ANA +  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA) se obtuvo un promedio de 4,98 brotes por explante a los siete meses de cultivo. Otros investigadores también han obtenido brotes de piña vía organogénesis *in vitro*, utilizando los fitoreguladores ANA y BA en los cultivares de piña ‘Cayena Lisa’ (Firoozabady y Gutterson, 2003), ‘Phuket’ (Amin et al., 2005), y ‘Española Roja’ (Pineda et al., 2012). Al respecto, Sinha y Roy (2002), en un trabajo con *Gladiolus primulinus*, reportan el efecto positivo de la combinación BA/ANA sobre la formación de brotes.

La organogénesis observada en esta investigación, tanto en el medio MS2 como en el MS3, fue indirecta; sin embargo, Roostika y Mariska (2003) reportaron el desarrollo de organogénesis tanto directa como indirecta en explantes de piña cultivada en medios similares al MS2. Estos autores cultivaron yemas apicales y obtuvieron regeneración de brotes, un 99 % vía organogénesis directa y 86 % vía indirecta. Pineda et al. (2012), usando también los mismos medios MS2 y MS3, para cultivar secciones de base de hoja de la variedad Española Roja, observaron organogénesis indirecta de brotes y raíces en medio MS2, y formación directa e indirecta de raíces en medio MS3. La organogénesis directa indica que los explantes contienen células con balances endógenos de reguladores de crecimiento, lo cual les permite estar predeterminados para el proceso organogénico (Christianson y Warnick, 1988).

En el medio de cultivo MS3, suplementado solamente con auxina (2,4-D), se obtuvo un promedio de 1,78 brotes/explante a los siete meses de cultivo. Otros investigadores también han reportado la inducción de organogénesis en diferentes especies vegetales usando el 2,4-D (Khanam et al., 2000; Vidoz et al., 2004; Pineda et al., 2012).

En el presente estudio, si bien en el medio MS3 se logró la inducción de formación de órganos (brotes y raíces), se observa que los resultados fueron significativamente inferiores a los alcanzados en el medio MS2 (Cuadro 1), por lo que se sugiere que la presencia en el medio del BA, una citocinina que induce división celular, originó un balance de reguladores de crecimiento que potencia el efecto del ANA sobre el proceso organogénico en el tejido calloso de estos explantes. Soneji et al. (2002), trabajando con un sistema similar al nuestro, demostraron la necesidad de la presencia de auxinas y citocininas en el medio para optimizar la organogénesis.

Es interesante hacer notar que a diferencia de otros trabajos (Sripaoraya et al., 2003; Amin et al., 2005; Roostika et al., 2012), en la presente investigación, tanto el proceso de inducción de callos como la diferenciación de órganos, se logró en un mismo medio, y no fue necesario cambiar ni variar la concentración de los fitoreguladores, lo cual representa un ahorro en el costo del protocolo

de propagación utilizado.

Con relación a la importancia de que se lleve a cabo la fase de aclimatación, la misma radica en lograr la adaptación de las plantas obtenidas *in vitro* a condiciones autótrofas, donde tendrán que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración (Santa Cruz et al., 2006). En nuestra investigación se logró un alto porcentaje de aclimatación de las plantas de piña ecotipo Tabë Känä obtenidas por organogénesis *in vitro*, empleando individuos de 4-6 cm de altura. Por su parte, Dal Vesco et al. (2001), utilizando plantas micropropagadas *in vitro* de piña cv. Pérola, encontraron que el mayor porcentaje de aclimatación (93,8 %) se obtuvo en plantas transferidas al sustrato cuando tenían más de 7 cm de altura. Asimismo, Casale y De García (1987), De García et al. (2008) y Pineda et al. (2012) lograron un 100 % de supervivencia de plantas micropropagadas de piña var. Española Roja, empleando un sustrato de arena y suelo abonado, similar a la composición del utilizado en la presente investigación.

### CONCLUSIONES

En esta investigación se logró el establecimiento de un sistema de organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* a partir de segmentos de bases de hojas de plantas del ecotipo autóctono del Amazonas Tabë Känä, siendo el medio de cultivo MS2 (5 mg·L<sup>-1</sup> de ANA y 0,25 mg·L<sup>-1</sup> de BA) el tratamiento más eficiente para la inducción de dicho proceso, produciendo 4,98 brotes por explante.

Tanto el medio MS2 (con ANA y BA) como el MS3 (con 2,4-D) indujeron procesos de diferenciación y en ambos se logró observar organogénesis indirecta de raíz y brote. Sin embargo, la mayor formación de estos órganos en callos de secciones de bases de hojas ocurrió en el medio MS2, lo que indica que la presencia de la citocinina (BA) originó un balance de reguladores de crecimiento que potencia el efecto del ANA sobre ambos procesos organogénicos. El 95 % de las vitroplantas obtenidas se aclimataron exitosamente a las condiciones de vivero.

La inducción de callo y la diferenciación de brotes y raíces ocurrió en el mismo medio (MS2 o MS3), y no se requirió de cambiar o variar las concentraciones de los fitoreguladores de crecimiento, lo cual abarata el costo del sistema.

### AGRADECIMIENTO

A las instituciones que financiaron esta investigación: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV (proyecto PSU-7617-2009/2) y al Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT) (proyecto contrato N° 201201031).

### LITERATURA CITADA

1. Alves, G., L. Vesco y M. Guerra. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae* 110: 204-207.
2. Amin, M., M. Rahman, K. Rahman, R. Ahmed, M. Hossain y M. Ahmed. 2005. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Giant Kew] *Intl. J. Bot.* 1: 128-132.
3. Blanco, H., T. E. Vargas y E. de García. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica, mediante cultivo de yemas axilares y apicales. *Interciencia* 36(6): 437-443.
4. Casale, I. y E. de García. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *Aceviv* 2: 3-18.
5. Christianson, M. y A. Warnick. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Environmental Biology* 95: 228-293.
6. Christianson, M. y A. Warnick. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *Hortic. Sci.* 23: 515-519.
7. Dal Vesco, L., A. de Almeida, G. Zaffari, R. Onofre, M. Dos Reis y M. Guerra. 2001. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. *Fruits* 56: 143- 154.
8. De García, E., A. Garay, T.E. Vargas y H. Blanco. 2008. Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). *Mibe (UCV)* 5: 181-184.
9. FAOSTAT. 2012. Estadísticas de la FAO. <http://faostat.fao.org/> (consulta del 2/9/2014).
10. Firoozabady, E. y N. Gutterson. 2003. Cost-

- effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell. Rep.* 21: 844-850.
11. Firoozabady, E. y Y. Moy. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 67-74.
  12. González, M., N. Mogollón, G. Alvarado, A. Giménez y T. Capote. 2012. Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cocuy (*Agave cocui* Trelease). *Bioagro* 24(1): 39-44.
  13. Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Hort.* 108: 105-120.
  14. Khanam, N., C. Khoo y A. Khan. 2000. Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 62: 125-133.
  15. Kikuta, Y. y Y. Okazawa. 1984. Control of root and shoot-bud formation from potato tuber tissue cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 61(1): 8-12.
  16. Pineda, A., T.E. Vargas, M. Escala, y E. de García. 2012. Organogénesis *in vitro* en piña 'Española Roja' y morfoanatomía de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro* 24 (3): 175-186.
  17. Roostika, I. y I. Mariska. 2003. *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. *Buletin AgroBio* 6: 34-40.
  18. Roostika, I., N. Khumaida, I. Mariska y G.A. Wattimena. 2012. Indirect organogenesis and somatic embryogenesis of pineapple induced by dichlorophenoxy acetic acid. *Journal AgroBiogen* 8(1): 8-18.
  19. Santa Cruz, S., D. Graciano-Ribeiro, J. Batista, T. Aquino y L. Copati. 2006. Anatomía foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesq. Agrop.* 41: 185-194.
  20. Sinha, P. y S.K. Roy. 2002. Plant regeneration through *in vitro* cormel formation from callus culture of *Gladiolus primulinus* Baker. *Plant Tissue Cult.* 12(2): 139-145.
  21. Soneji, J.R., P.S. Rao y M. Mhatre. 2002. *In vitro* regeneration from leaf explants of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *J. Plant Biochemistry & Biotechnology* 11: 117-119.
  22. Sripaoraya, S., R. Marchant, P. Brian y M. Davey. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 450-454.
  23. Vidoz, M., H. Rey y L. Mroginski. 2004. Regeneración *in vitro* de plantas de *Arachis correntina* (Leguminosae) mediante organogénesis a partir de hojas inmaduras. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.* pp. 1-3.
  24. Villa, P., A. Riera, N. Mota, A. Belandria, D. Camacho, I. Sánchez, J. Infante, G. Oliveros, L. Delgado y J. García. 2012. Agricultura Piara en la cuenca del río Cataniapo, estado Amazonas: Un enfoque agroecológico. Fundación Probiobiodiversa, INIA. Caracas. 46 p.