MICROPROPAGACION DE *Bromelia pinguin* LINDL. (PIÑA RATON)

A.R. Mesa y G. Lajonchere

Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba

Bromelia pinguin ha sido utilizada tradicionalmente por los campesinos para cercar los linderos en las fincas, formando los setos vivos, los cuales impiden la entrada o salida de los animales. Su propagación natural es lenta y engorrosa, por lo que el objetivo del trabajo consistió en buscar un método biotecnológico para propagarla. Para esto se utilizaron yemas apicales, las cuales fueron implantadas en un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con las vitaminas del B_5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968) suplementado con 2 mg/l de 6-BAP y 0,05 mg/l de PBZ (paclobutrazol). Este medio resultó el más adecuado para el establecimiento de las yemas. Como medio de multiplicación se empleó este mismo, pero sin la adición del PBZ. El enraizamiento se obtuvo añadiendo al medio basal 0,5 mg/l de ANA. Los subcultivos se efectuaron cada 28 días con un factor de multiplicación de 6,2, aunque en condiciones de biofábrica fue superior a 7. La adaptación al suelo y posteriormente a campo tuvo una supervivencia de aproximadamente el 100 %.

Palabras claves: ***Micropropagación, piña ratón, Bromelia pinguin***

Bromelia pinguin was traditionally used by farmers to enclose the limits of the farms, forming hedgerows which prevent the entrance or setting of animals. It's natural propagation is slow so, a study was carry out in order to look for a biotechnological method to propagate it. Apicals bud were used and these were introduced into a MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with vitamins of B5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968) supplemented with 2 mg/l of 6-BAP and 0,05 mg/l of PBZ (paclobutrazol). This medium was the most adequate for the establishment. This same was used as multiplication medium without PBZ addition. The rooting was obtained with addition of 0,5 mg/l of ANA to basal medium. The subcultures were each effected at 28 days with a multiplication factor of 6,2; though in commercial laboratory scale it was superior to 7. The adaptation of soil and later to the field had a survival rate of approximately 100 %.

Additional index words: ***Micropropagation, Bromelia pinguin***

Desde tiempos inmemoriales los campesinos cubanos han utilizado la piña ratón para cercar los linderos de sus fincas, formando los denominados setos vivos, generalmente junto a otras especies vegetales como las de los géneros *Gliricidia* y *Erythrina*, los cuales impiden la libre entrada y salida de los animales y representan un ahorro significativo de alambres destinados para estos usos.

Sin embargo, durante los últimos 30 años los setos vivos se han ido sustituyendo por cercas con alambres de púas y postes de hormigón, lo que trae por consecuencia el encarecimiento de los sistemas de producción.

En el contexto de la agricultura sostenible, este tipo de cercas con la inclusión de árboles forrajeros es una valiosa opción, máxime cuando se pueda manejar a la piñá ratón sin riesgos para el hombre, dada su morfología.

La piña ratón (*Bromelia pinguin* Lindl.) es una especie que pertenece a la familia de las Bromeliaceaes. Se caracteriza por tener sus hojas coráceas, cuyos bordes poseen espinas curvas y en el extremo apical un mucrón. Su forma natural de propagación es a través de los hijos basales.

Es por eso que la micropropagación como biotécnica cobra cada día mayor importancia en este tipo de cultivo (Novak, 1991), por lo que el objetivo de este trabajo fue buscar un método biotecnológico que permitiera producir un elevado número de plantas en un breve tiempo, para satisfacer las necesidades de los ganaderos en cuanto a las cercas de las áreas perimetrales.

MATERIALES Y METODOS

Procedimiento. Se tomaron plantas jóvenes de 20 cm de longitud aproximadamente, las cuales se lavaron con suficiente agua corriente. Con cuidado se les retiraron las hojas coráceas, quedando el ápice con bastantes hojas no expandidas, las cuales se introdujeron durante un minuto en etanol al 95 % y por último 20 minutos en hipoclorito de sodio al 2 %. Entre cada paso de la desinfección se enjuagó con agua destilada estéril.

En el flujo laminar se extrajeron los ápices, los cuales fueron nuevamente desinfestados con hipoclorito de sodio al 1 % y antes de implantarse se lavó con agua destilada estéril.

El medio de implantación tuvo diferentes combinaciones hormonales y se realizó en tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio (tabla 1).

Tratamientos. Se utilizó el medio basal formado por las sales orgánicas e inorgánicas del MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con las vitaminas del B_5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968) y las combinaciones hormonales que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Combinaciones hormonales empleadas para la implantación de los ápices de *B. pinguin*.

Tratamientos	Combinaciones hormonales
1	MS + Vit B_5 + 1 mg/l de 6-BAP
2	MS + Vit B_5 + 1 mg/l de 6-BAP + 0,05 mg/l de PBZ
3	MS + Vit B_5 + 2 mg/l de 6-BAP
4	MS + Vit B_5 + 2 mg/l de 6-BAP + 0,05 mg/l de PBZ
5	MS + Vit B_5 + 3 mg/l de 6-BAP
6	MS + Vit B_5 + 3 mg/l de 6-BAP + 0,05 mg/l de PBZ
7	MS + Vit B_5 + 5 mg/l de 6-BAP
8	MS + Vit B_5 + 5 mg/l de 6-BAP + 0,05 mg/l de PBZ
9	MS + Vit B_5 + 0,05 mg/l de PBZ

Una vez implantados los ápices, se incubaron en una cámara de cultivo, con luz continua artificial y una temperatura de 27°C. Los subcultivos se realizaron cada 28-30 días.

Para el enraizamiento de las vitroplantas provenientes del tercer subcultivo se utilizaron las variantes que aparecen en la tabla 2.

La adaptación de las vitroplantas se realizó en naves con tejas translúcidas y en canteros a raíz desnuda. Como sustrato se utilizó cachaza totalmente descompuesta y arena de sílice. El riego se efectuó diariamente por microaspersión y nebulizadores durante 15 minutos.

Tabla 2. Variantes utilizadas para la inducción de raíces.

Variantes	Medio de cultivo
A	MS + Vit. B_5 + 0,5 mg/l de ANA
B	MS + Vit. B_5 + 0,5 mg/l de AIB
C	MS + Vit. B_5 + 0,5 mg/l de AIA
D	MS + Vit. B_5 + 0,5 mg/l de ANA

AIB = Acido indol butírico
AIA = Acido 3-indol acético
ANA = Acido naftalacético

A los 90 días se midió la altura de las vitroplantas en un diseño de bloques al azar con submuestreo y para medir la tasa de crecimiento (cm/día) se tomaron plantas que se agruparon en cuatro grupos según su tamaño inicial: Grupo I de 4,7 a 6,5 cm; Grupo II de 6,6 a 7,5 cm; Grupo III de 7,6 a 8,5 cm y Grupo IV mayores de 8,5 cm. La dinámica en altura fue medida a los 30, 60 y 90 días en ambos tipos de sustrato.

Para el escalado de esta tecnología, el cual se realizó en la biofábrica del Centro de Desarrollo y Producción Agrícola de Santo Domingo, provincia Villa Clara, los ápices se implantaron en el medio basal MS con las vitaminas del B_5 suplementado con 2 mg/l de 6-BAP más 0,05 mg/l de PBZ. A los 28-30 días se subcultivó en medio fresco y posteriormente los brotes se plantaron en el medio de multiplicación, reduciendo a 1 mg/l la citoquinina y eliminando el PBZ.

Este trabajo se desarrolló en pomos de cristal con 25 ml de medio de cultivo, 8 explantes/frasco y un fotoperíodo de luz natural.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados en cuanto a la desinfección permiten plantear que esta fue eficiente, ya que se logró más de un 90 % de explantes sanos, debido al encubrimiento foliar que presentaron los ápices.

A los 30 días se efectuó el primer subcultivo en medio fresco, donde la proliferación de brotes comenzó a los 10-15 días después de este. La producción total de vástagos en cada subcultivo se puede apreciar en la tabla 3.

Como se puede observar, las bajas concentraciones de citoquinina tuvieron un efecto benéfico sobre el ahijamiento, aspecto que ha sido planteado por varios autores (Villalobos, Leung y Thorpe, 1984; Mesa, Lajonchere y Prieto, 1995a), por lo cual es requerida por numerosos cultivos para este fin en concentraciones definidas.

Las concentraciones por encima de 3 mg/l de 6-BAP sola o en combinación con el PBZ no ejercieron influencia sobre la brotación y solo se observó un ligero incremento en la altura del ápice. Sin embargo, en otros cultivos se ha podido apreciar una proliferación, incluso con concentraciones superiores a la antes mencionada (Thoruan-Mathius, 1992; Mesa, Lajonchere y Prieto, 1995b), lo que demuestra la especificidad que tienen las diferentes especies vegetales en cuanto a los requerimientos hormonales.

El mejor tratamiento de implantación de los ápices fue el de 2 mg/l de 6-BAP + 0,05 mg/l de PBZ, ya que produjo una mayor cantidad de brotes, suficientes para comenzar la producción masiva de plantas. Se pudo observar que en dicho medio y en los sucesivos subcultivos este carácter prácticamente se inhibió, lo que indica que no es posible multiplicar con el mismo.

Nótese que con concentraciones menores que 1 mg/l de 6-BAP, la producción de brotes se mantuvo estable a partir del segundo subcultivo, con un factor de multiplicación de 6,2, el cual es satisfactorio para la micropropagación acelerada de cualquier especie.

Tabla 3. Producción de brotes con diferentes combinaciones hormonales utilizadas.

Tratamiento	Subcultivos		
	1ero.	2do.	3ero.
1	7,33	5,72	5,68
2	0	1.60	1,53
3	11,50	2,71	2,12
4	16,00	2,92	2,40
5	4,00	1,60	1,42
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0

El PBZ ha sido poco utilizado en el cultivo in vitro; sin embargo, se pudo observar que con la mejor concentración de citoquinina para implantar los ápices, esta sustancia tuvo un efecto estimulador, resultados que coinciden con los de Daquinta, Castillo, Rodríguez, Martínez y Benegas (1991) cuando lo emplearon en dos variedades de *Ananas comosus*.

Esta sustancia, según Torres Villegas y Lozoya Saldaña (1991), es absorbida por cualquier órgano de la planta, la cual se transloca hasta los puntos de crecimiento e inhibe la síntesis de ácido giberélico, lo que trae consigo una disminución en la tasa de división y expansión celular y reduce el crecimiento en altura, por lo que hay una mayor estimulación de las yemas basales para producir brotes.

En este trabajo la afección en altura no fue significativa, pero sí la brotación, como se puede apreciar en la tabla 3, fundamentalmente entre los tratamientos 2 y 4 con respecto al 1 y 3, los cuales tenían la misma concentración de citoquinina.

El factor de multiplicación fue de 6,2 brotes/explante, lo que permite obtener potencialmente por cada yema implantada aproximadamente un cuarto de millón de vitroplantas en seis subcultivos, suficientes para plantar 93 km de cerca a una distancia de 30 cm entre plantas.

En cuanto al enraizamiento, en todas las variantes utilizadas se hizo evidente este proceso, aunque con 0,5 mg/l de ANA fue más vigoroso y se manifestó en los primeros 7 días de implantados los brotes en dicho medio de cultivo.

Una vez que los brotes enraizaron, fueron trasladados al área de adaptación. La supervivencia fue de 100 %. El proceso de endurecimiento de la cutícula demoró 3 meses.

El crecimiento en altura a los 90 días se expresa en la tabla 4. Se pudo observar que tanto en la arena de sílice como en la cachaza las vitroplantas crecieron normalmente, pero este fue superior en la cachaza, cuestión que es lógica dados los nutrimentos que aporta la misma.

En la arena, aunque el crecimiento fue menor, se observó que al final de los 90 días las vitroplantas presentaron síntomas de deficiencia mineral, fundamentalmente de N, dada la clorosis tan acentuada que tuvieron. No obstante, en cuanto se sembraron en el campo hubo una total recuperación.

Tabla 4. Crecimiento en altura (cm) de las vitroplantas.

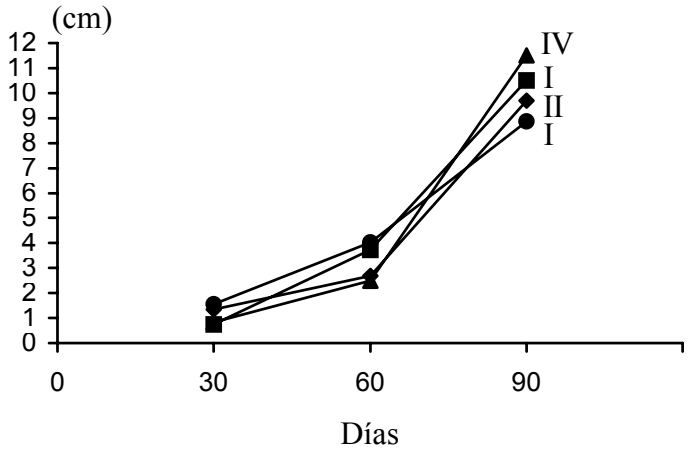
Sustrato	Media
Arena	16,0150[b]
Cachaza	21,8000[a]
ES±	2,05**

a,b Valores con superíndices no comunes difieren a P<0,05 (Duncan, 1955)

** P<0,01

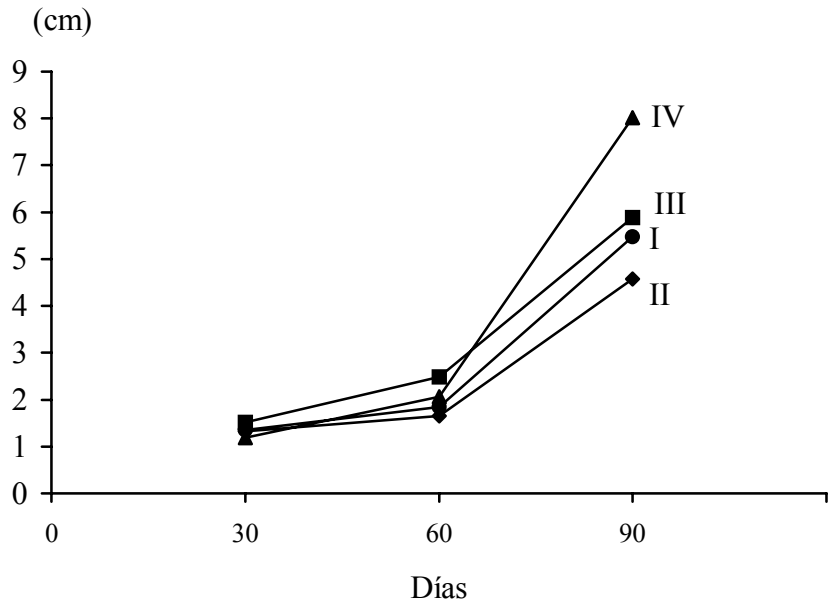
En las figuras 1 y 2 se puede observar la tasa de crecimiento diario, donde el sustrato con cachaza tuvo la mayor pendiente, y que independientemente del tamaño hubo crecimiento apreciable de las vitroplantas.

Con respecto al escalado, se pudo observar que el factor de multiplicación se incrementó a 7, motivado quizás por el fotoperíodo de luz natural, el cual beneficia la multiplicación en muchos cultivos de importancia agrícola comercial, según lo planteado por Pérez Ponce, J.J. (comunicación personal); en ello también pudo influir la sustitución de los tubos de ensayo por frascos de cristal, donde los brotes disponían de un área vital mayor para la absorción de los nutrimentos a través de sus tejidos. Scocchi, Galdeano, Rey y Mroginski (1995) plantean al respecto que el tamaño del frasco tiene una gran importancia, ya que es posible que un factor relacionado con la fase gaseosa del cultivo influya en este comportamiento.



I = 4,7 a 6,5 cm
II = 6,6 a 7,5 cm
III = 7,6 a 8,5 cm
IV = Mayor de 8,5 cm

Fig. 1. Tasa de crecimiento de vitroplantas de *Bromelia pinguin* en fase de adaptación, según el tamaño inicial. Sustrato de cachaza.



I = 4,7 a 6,5 cm
II = 6,6 a 7,5 cm
III = 7,6 a 8,5 cm
IV = Mayor de 8,5 cm

Fig. 2. Tasa de crecimiento de vitroplantas de *Bromelia pinguin* en fase de adaptación, según el tamaño inicial. Sustrato de arena de sílice.

Se puede concluir que esta especie es muy dócil a la micropropagación a partir de ápices, con un factor de multiplicación tal que permite obtener un gran número de plantas en un breve período de tiempo.

REFERENCIAS

DAQUINTA, M.A.; CASTILLO, R.; RODRIGUEZ, J.L.; MARTINEZ, TERESA & BENEGAS, R. 1991. Estimulación del ahijamiento "in vitro" de plantas de piña con paclobutrazol. Resúmenes. 2do. Coloquio de Biotecnología de las Plantas y IV Simposio Internacional de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical. Universidad Central de Las Villas. Villa Clara, Cuba. p. 23

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures os soybean roat cells. ***Exp. Cell Res.*** 50:151

MESA, A.R.; LAJONCHERE, G. & PRIETO, MARLENIS. 1995a. Nota técnica: Micropropagación acelerada de *Helianthus tuberosus* L. (Topinambur). ***Pastos y Forrajes.*** 18:103

MESA, A.R.; LAJONCHERE, G. & PRIETO, MARLENIS. 1995b. Micropropagación de la *Leucaena leucocephala* a partir de nodos cotiledonales. Resúmenes. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal en Pastos, Cítricos y Caña de Azúcar. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. ***Physiol. Plant.*** 15:473

NOVAK, F.J. 1991. Micropropagation and plant tissue culture in developing countries of Africa. In: Micropropagation. (Eds. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H.). Kluwer Academic Publisher, Netherlands. p. 205

SCOCCHI, A.M.; GALDEANO, E.; REY, H.Y. & MROGINSKI, L.A. 1995. Efecto del tamaño del recipiente sobre la micropropagación de la mandioca (*Manihot esculenta*). Resúmenes Redbio'95. Segundo Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Puerto Iguazu, Argentina. p. 119

TORRES VILLEGAS, O. & LOZOYA SALDAÑA, H. 1991. Efecto del paclobutrazol sobre nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) cultivar Gutbier V-10, bajo condiciones de invernadero en Chapingo, México. ***Rev. Chapingo.*** 73:77

TORUAN-MATHIUS, NURITA. 1992. Micropropagation of *Leucaena* species by tissue culture techniques. ***Leucaena Research Reports.*** 13:49

VILLALOBOS, V.M.; LEUNG, D.W.A. & THORPE, T.A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in culture cotyledon explants of radiata pine***. Physiol. Plant.*** 61:497

Recibido el 8 de diciembre de 1995