

## Organogénesis directa en piña criolla inducida por 6-bencilaminopurina

José Rubén Torres Ruiz<sup>1</sup>  
Carlos Alberto Lecona Guzmán<sup>1,§</sup>  
María del Carmen Silverio Gómez<sup>2</sup>  
Federico Antonio Gutiérrez Miceli<sup>1</sup>  
Nancy Ruiz Lau<sup>3</sup>  
Nancy Santana Buzzy<sup>4</sup>

1 Laboratorio de Biotecnología Vegetal-Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez-Tecnológico Nacional de México. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. CP. 29050. (M09270418@tuxtla.tecnm.mx; fgmiceli@gmail.com).

2 Campo Experimental Huimanguillo-INIFAP. Tabasco, México. CP. 86400. (silverio.maria@inifap.gob.mx).

3 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez-Tecnológico Nacional de México. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. CP. 29050. (nancy.rl@tuxtla.tecnm.mx). nancy.rl@tuxtla.tecnm.mx

4 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas-Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. CP. 97205. (buzzy@cicy.mx).

Autor para correspondencia: leconaguzmancarlos@gmail.com.

### Resumen

La producción de piña (*Ananas comosus* L.) por métodos convencionales está limitada principalmente por la falta de disponibilidad de retoños de alto rendimiento. Sin embargo, se ha demostrado que por medio de metodologías de propagación *in vitro* como la embriogénesis somática y organogénesis, es posible obtener plantas de alto rendimiento de una manera más eficiente y controlable. El objetivo de este estudio consistió en generar un protocolo eficiente de micropropagación de piña criolla (*Ananas comosus* L.) para la multiplicación y conservación *in vitro* de esta especie, el estudio se llevó a cabo en 2021. Se evaluó la respuesta morfogénica de la piña criolla a partir de diferentes explantes (meristemo apical y hoja), cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con diversos reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) (0.5, 1 y 1.5 mg L<sup>-1</sup>), 6-bencilaminopurina (BAP) (1, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (1, 2 y 4.5 mg L<sup>-1</sup>), así como un tratamiento control libre de reguladores. Los resultados mostraron que de los explantes evaluados la mejor respuesta se observó en el meristemo apical, en el cuales se obtuvo la formación de brotes adventicios a los 60 días del tratamiento de inducción, cuando el medio de cultivo fue suplementado con BAP a una concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> obteniéndose ocho brotes/explante. El protocolo desarrollado es un estudio clave para la propagación masiva de piña criolla.

### Palabras clave:

6-bencilaminopurina, meristemo, morfogénesis *in vitro*.

## Introducción

La piña (*Ananas comosus* L.) es una de las especies tropicales más populares proveniente de América del Sur, particularmente al norte del río Amazonas y que a través de los años se ha ido expandiendo rápidamente por diversas regiones tropicales debido a su importancia agronómica (Torres-Ávila *et al.*, 2018). Es una especie monocotiledónea perteneciente a la familia Bromeliaceae, destacan por su valor económico las siguientes variedades: Cayena Lisa, Piña Miel (MD2), Cambray, Champaka F-153 (Sarkar *et al.*, 2018; Torres-Ávila *et al.*, 2018). En general, la variedad que ocupa la mayor área de producción es Cayena Lisa, mientras que MD2 no ha logrado en el país, encontrar el nicho apropiado para explotar todo su potencial productivo, probablemente debido al manejo y a las condiciones de suelo y clima (Rebolledo *et al.*, 2011). Esta constituye aún una limitante muy importante para ampliar el comercio de la piña en el mercado internacional.

En México existen 12 estados que se dedican al cultivo de la piña, tanto para el mercado nacional como internacional. De acuerdo con el SIAP (2021), México se ubica en el noveno lugar en el mundo en la producción de piña con 1 208 247 t producidas. Los datos más recientes indican que en el país se destinan 38 164.08 ha al cultivo de esta fruta, siendo el estado de Veracruz el que destina mayor superficie en México (31 993 ha) (SIAP, 2021). El estado de Chiapas ocupa el octavo lugar dentro de los diez estados principales productores de piña en el país, con una producción de 7 763 t (SIAP, 2021).

Tradicionalmente, se produce piña criolla en la región centro del estado de Chiapas desde hace más de 60 años, principalmente en los municipios de Ocozocoautla y Berriozábal. La importancia de la piña criolla radica en que su fruto al compararlo con el de otras variedades como la Cayena lisa, Perola, México y Manzana, resalta por contener una mayor cantidad de °Brix (14-17°), proteína, nitrógeno y fibra, así como una menor acidez, lo cual le confiere menor astringencia en comparación con el principal cultivar (Cayena lisa), lo que hace que esta variedad sea una excelente opción para su consumo en fresco y como insumo en la industria alimentaria, además de tratarse de un genotipo adaptado a las condiciones agroclimáticas de la región (Hernández-Barbosa, 2018).

Sin embargo, en los últimos años se ha observado una disminución de dicho cultivo, misma que ha provocado un decremento en su producción y por lo tanto una afectación económica en los involucrados en la industria del cultivo de piña, lo que pone en riesgo que este cultivo desaparezca. Entre las causas de esta problemática podemos mencionar: la aplicación de tecnologías de bajos insumos, la falta de asesoría y capacitación a los productores, la ausencia de una estrategia varietal que permita optimizar el uso de las variedades en cada región; la necesidad de un programa de mejoramiento que genere clones y variedades más tolerantes y mejores adaptadas a las condiciones ambientales de la región, la falta de un banco de variedades y clones de piña disponible para desarrollar mejores estrategias de producción con miras a competir en el mercado internacional (Hernández-Barbosa, 2018).

Aunado a todo esto, la falta de una tecnología de manejo que incluye: nutrición, régimen hídrico, densidad de siembra, fecha de siembra y de cosecha, conducen a mantener bajos rendimientos y de calidad de la fruta, y como consecuencia, de frutos no aptos para el mercado de exportación (Hernández-Barbosa, 2018). Esta problemática se agrava debido a la forma de propagación del cultivo, que es de manera asexual, es decir, a través de la corona del fruto, hijuelos o vástagos (Hernández-Barbosa, 2018; Velez-Izquierdo *et al.*, 2020), ocasionando largos periodos de espera para obtener una planta viable para su trasplante a suelo, que van de los 6 hasta 24 meses.

La propagación por el método convencional (vegetativo) del cultivo produce un número muy limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para la plantación a gran escala, además los cultivos son atacados por insectos y hongos que producen marchitamiento, fusariosis y la pudrición de la base del tallo, enfermedades que afectan el cultivo negativamente principalmente en la producción comercial del fruto (Santos y Matos, 1995; Coppens *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002). La micropropagación *in vitro* se realiza a

partir de un explante colocado en un medio nutritivo, logrando una respuesta morfogénica en los explantes, obteniendo como resultado la formación de una nueva planta a partir de una célula, tejido u órgano vegetal, este fenómeno se debe a la totipotencia celular.

Ciertas células poseen la información genética necesaria para generar una planta semejante a la de origen, dando a conocer que las células diferenciadas de cualquier tejido vegetal pueden volver a iniciar el ciclo celular, regenerando tejidos y órganos hasta obtener la planta completa (Su *et al.*, 2021). Se han realizado estudios de totipotencia vegetal en diferentes especies de plantas, demostrando la capacidad de las células vegetales para la regeneración de plantas, dando paso a líneas de investigación como la micropropagación, conservación de germoplasma, modificación de plantas, y obtención de plantas transgénicas, entre otras (Ikeuchi *et al.*, 2019).

Por lo tanto, una de las alternativas para dar solución a los problemas de este cultivo de importancia económica, es el uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales para la conservación y micropropagación de esta especie, esta técnica ofrece la posibilidad de reproducir gran cantidad de plantas completas en periodos cortos y espacios pequeños, obteniendo así un cultivo más homogéneo, libre de enfermedades y virus, por las condiciones axénicas en las cuales se obtienen las plantas (Philips y Garda, 2019).

En este estudio se evaluó la respuesta morfogénica de diferentes explantes de piña criolla (hoja y meristemo apical) expuestos a diferentes reguladores de crecimiento vegetal ácido naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), para el desarrollo de un protocolo eficiente y reproducible de micropropagación de piña criolla.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Para la obtención de los explantes se utilizaron hijuelos de la base de frutos con tamaño entre los 4-8 cm de largo, obtenidos de plantas madre provenientes de una parcela demostrativa establecida en los campos experimentales de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGARPA) en el estado de Chiapas, las cuales tenían aproximadamente dos años, un promedio de altura entre 70-80 cm, buen vigor y libres de plagas, enfermedades o daños en las hojas. En promedio se obtuvieron aproximadamente entre cinco y siete hijuelos por planta. La recolección se realizó de forma manual.

### Desinfección

Los hijuelos seleccionados, fueron trasladados a un invernadero y permanecieron ahí durante seis días, esperando a que las condiciones de humedad del explante fueran adecuadas para ser utilizado en el cultivo *in vitro*. Posterior a este tiempo, los hijuelos fueron deshojados dejando únicamente un par de hojas centrales y la base de la corona, a la cual se le retiraron capas exteriores hasta obtener un explante de 2 cm<sup>2</sup> aproximadamente, se realizó una limpieza superficial con agua corriente y se dejaron sumergidos en 1 L de agua destilada con cinco gotas de Tween-20 durante 24 h. Posteriormente los explantes se lavaron con jabón Axión® y una solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex® al 2%) (modificado de Lecona *et al.*, 2017).

Se procedió a realizar un lavado con una solución de 0.5 g L<sup>-1</sup> agrimicin + 2 g L<sup>-1</sup> captan durante 30 min, posteriormente los explantes fueron lavados tres veces con agua destilada. En campana de flujo laminar, los explantes (hoja y meristemo apical) fueron colocados en una solución de alcohol al 70% durante 3 min y enjuagados tres veces con agua destilada estéril, para posteriormente sumergirlas en una solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex® al 10%) durante 15 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Para etapas posteriores fueron utilizados como explantes segmentos de hojas de 1 cm<sup>2</sup>.

## Inducción *in vitro*

Los explantes fueron sembrados en medio MS (Murashige y Skoog, 1965), suplementado con tres diferentes reguladores de crecimiento en tres concentraciones distintas por cada uno. Ácido naftalenacético (ANA: 0.5, 1 y 1.5 mg L<sup>-1</sup>), 6-bencilaminopurina (1, 2 y 4 mg L<sup>-1</sup>) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 1, 2 y 4.5 mg L<sup>-1</sup>). Se colocaron cuatro explantes de hojas y meristemas apicales por unidad experimental (1 frasco) con cuatro repeticiones, el tratamiento control consistió en medio MS libre de reguladores de crecimiento. Los frascos fueron colocados en una cámara bioclimática a una temperatura de 25 °C ±2 con 16 h luz 8 h de oscuridad, las evaluaciones de la respuesta morfogénica como formación de callo, formación de embriones somáticos y brotes fueron a los 30, 45 y 60 días después de la inducción *in vitro*.

## Enraizamiento y aclimatización de brotes

Se seleccionaron brotes con un buen desarrollo y con un tamaño de aproximado de 3-4 cm. Estos brotes fueron separados y sembrados en medio MS suplementado con ácido indol butírico (AIB) a una concentración de 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> (Lecona *et al.*, 2017). Se registró el desarrollo de raíces a las cuatro semanas.

Las plántulas que mostraron un sistema radicular bien desarrollado fueron retiradas de los frascos, se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de medio en las raíces. Posteriormente se transfirieron a contenedores de plástico de poliestireno las cuales contenían una mezcla de Peat Moss-Agrolita (1:1), para su aclimatización bajo condiciones de malla sombra durante 30 días, las condiciones de temperatura fluctuaron entre 16 °C en su temperatura más baja durante la noche y 28 °C en su temperatura más elevada durante el día. Las plántulas fueron regadas cada tercer día sin fertilización.

## Diseño experimental

Para la evaluación de la respuesta morfogénica, se realizó un diseño experimental completamente al azar, un análisis de varianza y una comparación de medias de acuerdo con Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico de Stargraphic Centuryon XV.

## Resultados y discusión

Durante la inducción de los explantes evaluados, el meristemo apical fue el explante que mostró respuesta a la inducción de brotes, mientras que en hojas se observó fenolización y necrosis, este mismo comportamiento se observó en cada uno de los tratamientos evaluados (datos no mostrados). Cuando el meristemo apical se mantuvo en inducción en medio MS suplementado con ANA, únicamente se observó el desarrollo del meristemo central del explante a los 30 días de inducción en todas las concentraciones evaluadas, la mejor respuesta con este regulador de crecimiento se observó a los 45 días de inducción y a una concentración de 1.5 mg L<sup>-1</sup>, a la cual se obtuvieron 4.67 brotes/explante (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Optimización de la proliferación de brotes *in vitro* en piña criolla utilizando diferentes reguladores de crecimiento.**

Tratamiento	Núm. de brotes por explante (días)		
	30	45	60
Control	0.78 ±0.33 <sup>c</sup>	1.44 ±0 <sup>c</sup>	3.33 ±0 <sup>c</sup>
ANA (mg L <sup>-1</sup> )			
0.5	0.33 ±0.33 <sup>c</sup>	0.67 ±0.33 <sup>cd</sup>	3 ±0.0 <sup>cd</sup>
1	1 ±0 <sup>c</sup>	1 ±0 <sup>cd</sup>	3 ±0.58 <sup>cd</sup>
1.5	1 ±0 <sup>c</sup>	4.67 ±1 <sup>b</sup>	2 ±0.58 <sup>de</sup>
BAP (mg L <sup>-1</sup> )			

	1	6.33 ±0.29 <sup>a</sup>	6.33 ±0. 57 <sup>a</sup>	5.67 ±0.67 <sup>b</sup>
	2	4.67 ±0.66 <sup>b</sup>	6.33 ±0.33 <sup>a</sup>	8.67±0.67 <sup>a</sup>
	3	6.33 ±0.33 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.67 <sup>a</sup>	8.33 ±0.33 <sup>a</sup>
2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )				
	1	0.67 ±0.33 <sup>c</sup>	1.33 ±0.33 <sup>cd</sup>	5 ±0.58 <sup>b</sup>
	2	0.67 ±0.33 <sup>c</sup>	1.67 ±0.88 <sup>c</sup>	1.33 ±0.33 <sup>ef</sup>
	4.5	0 ±0 <sup>c</sup>	0 ±0 <sup>d</sup>	0.33 ±0.33 <sup>f</sup>
	DMS	0.97	1.23	1.4

DMS= diferencia mínima significativa. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre los valores para cada columna. Tukey *p*( 0.05).

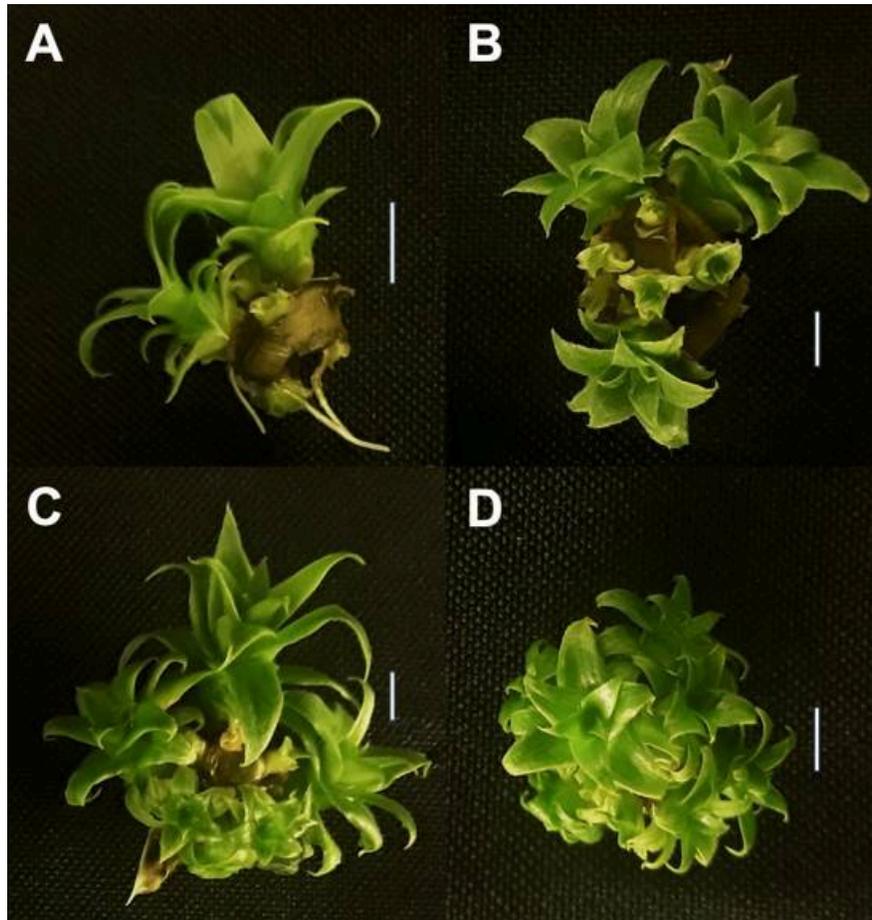
Estudios previos han reportado diferentes respuestas morfogénicas en otras especies de piña que van desde organogénesis directa (Kiss *et al.*, 1995; Escalona *et al.*, 1999; Al-Saif *et al.*, 2011; Medina-Rivas *et al.*, 2014; Atawia *et al.*, 2016), organogénesis indirecta (Rahman *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2014) así como embriogénesis somática (Daquinta *et al.*, 1997; Firoozabady *et al.*, 2004; Yapo *et al.*, 2011; Blanco-Flores *et al.*, 2017), en su mayoría estos protocolos utilizan medio MS para el establecimiento de los cultivos y estos medios son suplementados con reguladores de crecimiento como BAP y ANA solos o en combinación, el comportamiento de la respuesta morfogénica de piña criolla fue similar a lo reportado por diversos autores, al tratarse de un primer estudio en esta variedad poco estudiada y que puede ser aprovechada por sus características agronómicas en la industria, los resultados son importantes ya que se puede generar programas de mejoramiento genético, protocolos de regeneración a gran escala mediante sistemas de inmersión temporal y conservación de germoplasma.

Al evaluar la respuesta en explantes de hojas de piña criolla se observó fenolización y necrosis (datos no mostrados), la nula respuesta de este explante se puede deber al origen de este. Hu *et al.* (2017) indica que un factor determinante para que los explantes generen una respuesta morfogénica es el grado de diferenciación que tienen las células de los tejidos seleccionados y es distinta en dicotiledóneas y monocotiledóneas, las células de estas últimas muestran un grado de diferenciación mayor que las dicotiledóneas; es decir, adquieren una función específica debido al grado de diferenciación celular que tienen, lo cual les impide volver a adquirir la pluripotencia necesaria para la regeneración (Zeng *et al.*, 2016).

Lo que indica que los explantes de hoja en piña criolla, poseen células no competentes para la regeneración celular, perdiendo la capacidad de desdiferenciarse, al ser tejidos mayormente constituidos por células diferenciadas, estos son incapaces de reactivar el proceso de división celular. Cuando el meristemo apical fue inducido en medio MS suplementado con 2,4-D, no se observó formación de brotes adventicios durante los primeros 45 días, fue hasta los 60 días de inducción cuando se observó la formación de un promedio de cinco brotes/explante en el tratamiento suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de este regulador de crecimiento (Cuadro 1), se encontró diferencia estadística significativa en las concentraciones, así como en los tiempos evaluados, aunque los resultados con este regulador indican una baja proliferación de brotes.

Todos los tratamientos con BAP mostraron formación de brotes desde los 30 días de inducción, la mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes se obtuvo cuando el medio MS fue suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, tratamiento en el cual se observó la formación de 8.67 brotes/explantes a los 60 días de inducción, sin embargo no fue estadísticamente diferente a la concentración de 3 mg L<sup>-1</sup> (Cuadro 1, Figura 1), todos los brotes obtenidos mostraron una morfología normal y una longitud aproximada de 1-2 cm a los 60 días de inducción (Figura 1).

Figura 1. Organogénesis directa en meristemos apicales de piña criolla. A) tratamiento control; B) medio MS suplementado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BAP; C) medio MS suplementado con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP; y D) medio MS suplementado con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, a los 60 días de inducción. La barra equivale a  $0.5 \text{ cm}$  de longitud.



Se han reportado trabajos en cuanto a la respuesta morfológica de diferentes explantes de piña, en donde los medios de cultivos son suplementados únicamente con un solo regulador de crecimiento. Al-Saif *et al.* (2011), reportaron una proliferación de brotes en explantes de la base de la corona de frutos de piña variedad Cayena lisa obteniendo 23 brotes por explante cuando el medio de cultivo MS fue suplementado con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP a los 60 días de incubación, mientras que cuando el medio de cultivo fue suplementado con ANA  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  obtuvieron 12 brotes por explante en el mismo periodo de incubación.

Aynew *et al.* (2013) quienes utilizando  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de benciladenina (BA) en medio MS obtuvieron 6.33 brotes por explante de piña en la variedad Cayena lisa. Usman *et al.* (2013) reportaron una respuesta similar, utilizando como explantes bases de coronas de frutos inducidos en medio MS, obteniendo 11 brotes por explante con  $2.25 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. Nuestros resultados en cuanto al número de brotes obtenidos en piña criolla son similares a lo reportado por diversos autores en otras variedades de piña, por lo que el método utilizado es favorable y adecuado para la micropropagación de esta especie, sin embargo, es necesario realizar estudios donde se utilice la combinación de reguladores de crecimiento para optimizar el protocolo de micropropagación en esta especie.

La combinación de diferentes reguladores de crecimiento también ha sido reportada para la regeneración *in vitro* de piña, en el ecotipo Tabë Känä Pineda *et al.* (2014) reportaron que

la combinación de 5 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BA en bases de hojas utilizadas como explantes se generan 3.43 brotes por explante a los tres meses de crecimiento. Nikumbhe *et al.* (2014) reportan una proliferación de 7.1 brotes por explante en cortes de meristemas cuando el medio MS fue suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Badou *et al.* (2018), evaluaron el efecto de ANA, BAP y AdS (adenina sulfato) en la proliferación de piña de la variedad Cayena lisa, realizando diferentes combinaciones sobre estos reguladores, el mejor tratamiento fue cuando se combinaron 2 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg L ANA + 40 mg L<sup>-1</sup> AdS donde obtuvieron un porcentaje de inducción de brotes de 98.33% y la proliferación de 13-15 brotes por explante en un tiempo aproximado de 60 días.

La regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis es el resultado de la formación de órganos a través de la dediferenciación de células diferenciadas y la reorganización de la división celular para crear órganos particulares, meristemas y primordios (Sugiyama *et al.*, 1999; Bidabadi *et al.*, 2020). Las citoquinas son reguladores de crecimiento con la capacidad de romper la dominancia apical y estimular la formación de brotes en los meristemas, sin embargo el implemento de este tipo de reguladores en el medio de cultivo genera diferentes respuestas en piña donde se ha observado que existen diferentes factores los cuales están involucrados en la respuesta morfogénica de esta especie, estos factores son: variedad, el tipo y edad del explante utilizado, balance endógeno y exógeno de reguladores de crecimiento así como las condiciones de cultivo (luz/oscuridad).

En este estudio se observó que el factor más determinante para la inducción de brotes en piña criolla es el tipo de explante utilizado, en este caso el meristemo apical fue el más adecuado en todos los tratamientos evaluados. Este comportamiento se ha observado en otras especies, Lecona-Guzmán *et al.* (2017), reportaron que la respuesta morfogénica en *Agave americana* L. está influenciada por el tipo de explante (meristemo apical), además que la concentración y tipo de regulador implementados en los medios de cultivo son factores determinantes para obtener un alto porcentaje de brotes en esta especie.

El meristemo apical es el principal órgano responsable del crecimiento de las plantas, encargado de la formación de raíces y hojas, dando paso también a la formación de brotes adventicios (Traas, 2018). El meristemo apical se caracteriza por ser un órgano que alberga una gran cantidad de células madre distribuidas entre sus diferentes capas, las cuales al ser estimuladas en presencia de diferentes reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas se inducen diferentes respuestas morfogénicas (Wang *et al.*, 2020.) Este tejido se divide en tres capas (L1, L2 y L3) y posee cuatro zonas que desempeñan diferentes funciones: la zona central (ZC) que alberga a las células madre, el centro organizador (CO) que se encarga del reclutamiento de células madre, la zona medular (ZM) encargada de generar células multipotentes y la zona periférica (ZP) encargada albergar células hijas, las células madre presentes en el meristemo apical son convertidas en células hijas a través del estímulo de diferentes reguladores vegetales respondiendo a la inducción de brotes (Lee *et al.*, 2019).

Las citoquininas promueven la expresión de los genes como: Wuschel (WUS), Clavata (CLV1-3), Dornröschen (DRN), arabidopsis response regulator (ARR7 y ARR15), que median el control de la expresión de WUS quien a su vez regula la proliferación de células madre, cuando el gen WUS se encuentra estimulado por las citoquininas estas promueven su sobreexpresión promoviendo la división celular de estas células aumentando la población de células madre, generándose nuevas células hijas obteniendo finalmente mayor cantidad de brotes (Lee *et al.*, 2019), este efecto se observó# en todos los tratamientos con BAP a una concentración de 2 mg L<sup>-1</sup>, el tratamiento que generó la mayor formación brotes en el tiempo evaluado.

Los efectos morfogénicos de las auxinas sintéticas como 2,4-D y ANA se deben a que su estructura química es muy similar a la del ácido indol acético (AIA), el cual es una fitohormona natural encontrada en muchas de las plantas, dado que comparten esta característica, las células vegetales pueden ingresar a las auxinas sintéticas a través de la membrana celular y transportarse al interior de la célula vegetal estimulando la expresión de genes y generar

diversas respuestas morfogénicas entre ellas la proliferación de brotes en algunas especies (Kulus *et al.*, 2020).

El AIB estimuló la formación de raíces con respecto al tratamiento control, la concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB, la cual fue estadísticamente significativa en cuanto al número de raíces, formación de raíces adventicias formadas, así como en la longitud de la raíz en los brotes de piña criolla (Cuadro 2, Figura 2). En cuanto al porcentaje de supervivencia no se registró diferencia estadística durante el proceso de aclimatización, obteniéndose 100% de supervivencia en todos los tratamientos evaluados.

**Cuadro 2. Efecto del AIB en el enraizamiento de plántulas de piña criolla sembradas en medio MS.**

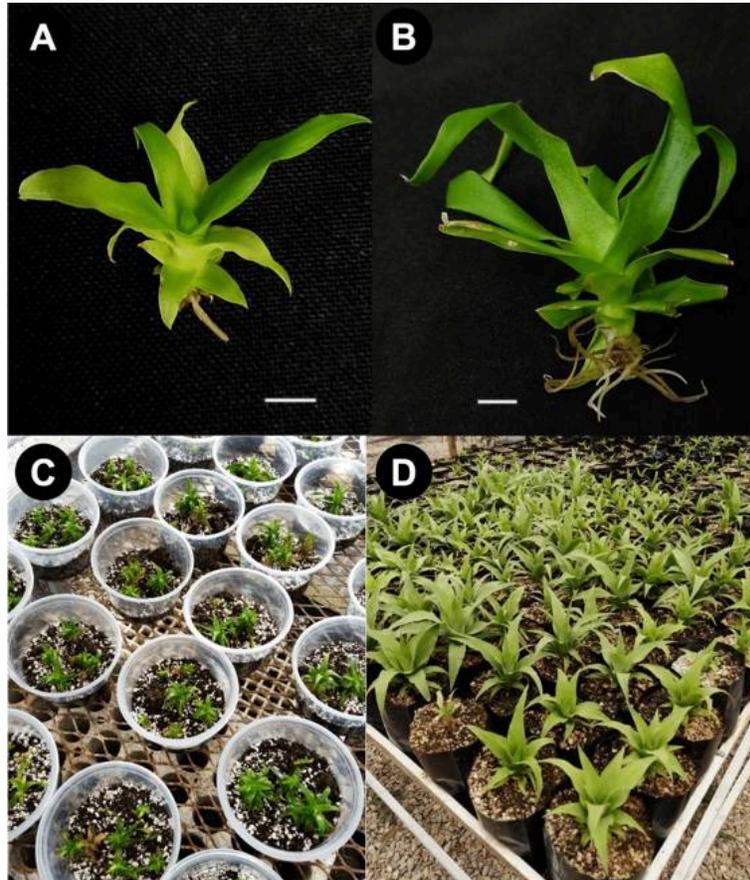
AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Núm. de raíces	Núm. de raíces adventicias	Longitud de raíz (cm)	Sobrevivencia (%)
0	2 ±0.58 <sup>b</sup>	0 ±0 <sup>c</sup>	0.5 ±0 <sup>c</sup>	100
1	4 ±0.72 <sup>b</sup>	6 ±0.97 <sup>b</sup>	1.5 ±0.12 <sup>b</sup>	100
2	8 ±0.63 <sup>a</sup>	10 ±0.57 <sup>a</sup>	3 ±0.1 <sup>a</sup>	100
DMS (0.05)	0.81	0.47	0.13	

DMS= diferencia mínima significativa. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre los valores para cada columna. Tukey *p*( 0.05).

La formación de raíces y raíces adventicias en brotes de piña criolla fue con 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB a los 30 días de cultivo, estos resultados coinciden con lo reportado por Atawia *et al.* (2016) quienes evaluaron el efecto del AIA y AIB en la formación de raíces en brotes obtenidos de piña variedad Cayena lisa obteniendo que AIB a una concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> estimula la formación de raíces (4.333 raíces/brote); sin embargo, en la mayoría de los trabajos reportados para diversas variedades de piña no se reporta el uso este regulador de crecimiento para enraizar brotes, probablemente esto se deba a que no es necesario estimular la formación de raíces en los brotes y estas se desarrollan en su gran mayoría en medios libres de reguladores de crecimiento, esto también se ha observado en otras especies como agave, Reyes-Zambrano *et al.* (2016) reporta que AIB no afecta la formación de raíces en brotes en comparación con plantas que son sembradas en medios libre de este regulador



Figura 1. Enraizamiento y aclimatación de brotes de piña criolla obtenidas *in vitro*. A) formación de raíces en brotes de piña criolla sin AIB a los 30 días de inducción; B) efecto de 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB en la formación de raíces en brotes de piña criolla a los 30 días de inducción; C) aclimatación de brotes de piña criolla obtenidos *in vitro* con 90 días de formación; y D) Plántulas de piña criolla de 6 meses de edad provenientes del cultivo *in vitro* aclimatizadas. Barra blanca equivale a 0.5 cm de longitud



## Conclusiones

En piña criolla el factor determinante para la inducción de brotes es la fuente de explante, para la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa es necesario suplementar el medio de cultivo con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP durante 60 días de inducción, la formación de raíces se estimula con 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB a los 30 días. En este estudio fue posible establecer un protocolo completo de regeneración de piña criolla, el cual puede ser utilizado en trabajos de propagación a gran escala mediante la implementación de sistemas de inmersión temporal, así como programas futuros de mejoramiento genético para esta especie.

## Bibliografía

- 1 Al-Saif, A. M.; Hossain, A. B. M. S. and Taha, R. M. 2011. Effects of benzylaminopurine Aminand naphthalene acetic acid on proliferation and shoot growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) *in vitro*. Afr. J. Biotechnol. 10(27):5291-5295.

- 2 Atawia, A. A.; El-Latif, F. M.; El-Gioushy, S. F.; Sherif, S. S. and Kotb, O. M. 2016. Studies on micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). Middle East J. Agriculture. 5(2):224-232.
- 3 Ayenew, B.; Tadesse, T.; Gebremariam, E.; Mengesha, A. and Tefera, W. 2013. Efficient use of temporary immersion bioreactor (TIB) on pineapple (*Ananas comosus* L.) multiplication and rooting ability. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2(4):2456-2465.
- 4 Badou, B. T.; Agbidinokoun, A.; Cacaï, G. T.; Dossoukpèvi, R. C. and Ahanhanzo, C. 2018. Effects of system benzylaminopurine-adenine sulphate in combination with naphthalene acetic on *in vitro* regeneration and proliferation of pineapple (*Ananas comosus*) (L.) Mill var. *comosus*). Amer. J. Biotech. Biosci. 2(9):0001-0015.
- 5 Bidabadi, S. S. and Jain, S. M. 2020. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. Plants. 9(6):702-721.
- 6 Blanco-Flores, H.; Vargas-Cedeño, T. E. and García-García, E. C. 2017. *In vitro* regeneration of Amazonian pineapple (*Ananas comosus*) plants ecotype Gobernadora. Rev. Colombiana de Biotecnología. 19(1):7-20.
- 7 Coppens, G.; Leal, F. and Duval, M. F. 1997. Germplasm resources of pineapples. In: Horticultural Reviews. John Wiley & Sons, Inc. New York. 133-175 pp.
- 8 Daquinta, M. A.; Cisneros, A.; Rodríguez, Y.; Escalona, M.; Pérez, M. C.; Luna, I. and Borroto, C. G. 1997. Somatic embryogenesis in pineapple (*Ananas comosus* L.) Merr.). Acta Hort. 425(25):1-7.
- 9 Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; González, B.; Daquinta, M. A.; González, J. L.; Desjardins, Y. and Borroto, C. G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports. 18(9):743-748.
- 10 Firoozabady, E. and Moy, Y. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 40(1):67-74.
- 11 Hernández-Barbosa, G. 2018. Caracterización social y técnica del cultivo de la piña criolla (*Ananas comosus*). AgroProductividad. 4(1):3-11.
- 12 Hu, B.; Zhang, G.; Liu, W.; Shi, J.; Wang, H.; Qi, M. and Xu, L. 2017. Divergent regeneration#competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. Regeneration. 4(3):132-139.
- 13 Ikeuchi, M.; Favero, D. S.; Sakamoto, Y.; Iwase, A.; Coleman, D.; Ryman, B. and Sugimoto, K. 2019. Molecular mechanisms of plant regeneration. Annual Review of Plant Biology. 70(1):377-406.
- 14 Kiss, E.; Kiss, J.; Gyuali, G. and Heszky, L. E. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. HortScience. 30(1):127-129.
- 15 Kulus, D. and Tymoszek, A. 2020. Induction of callogenesis, organogenesis, and embryogenesis in non-meristematic explants of bleeding heart and evaluation of chemical diversity of key metabolites from callus. Inter. J. Mol. Sci. 21(16):5826.
- 16 Lecona-Guzmán, C. A.; Reyes-Zambrano, S.; Barredo-Pool, F. A.; Abud-Archila, M.; Montes-Molina, J. A.; Rincón-Rosales, R. and Gutiérrez-Miceli F. A. 2017. *In vitro* propagation of *Agave americana* by indirect organogénesis. HortSci. 52(7):996-999.
- 17 Lee, Z. H.; Hirakawa, T.; Yamaguchi, N. and Ito, T. 2019. The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity. Inter. J. Mol. Sci. 20(16):4065.
- 18 Medina-Rivas, M.; Mosquera, H. R. y Aguilar-Medina, C. 2014. Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de tres cultivares de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) del Chocó, Colombia. Rev. Biodiversidad Neotropical. 4(2):133-40.

- 19 Nikumbhe, P. H.; Sonavane, P. N. and Sable, P. A. 2014. *In vitro* technology for propagation of pineapple (*Ananas comosus*) cv. KEW. *Inter. J. Mol. Sci.* 10(1):172-174.
- 20 Pineda, A.; Vargas, T. E. and García, G. E. 2014. Regeneración de *Ananas comosus* (L.) Merr, ecotipo Tabè Känä, mediante organogénesis indirecta. *Bioagro.* 26(3):135-142.
- 21 Philips, G. C. and Garda, M. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant.* 55(3):242-257.
- 22 Rahman, K. W.; Ahmed, M. B.; Rahman, M. M.; Amin, M. N.; Hossain, M. S. and Ahmed, R. 2005. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Giant Kew]. *Int. J. Bot.* 1(2):128-32.
- 23 Rebolledo, M. A.; Uriza, Á. D. E. y Ángel, P. A. L. 2011. La piña y su cultivo en México: Cayena Lisa y MD2. Libro técnico núm. 27. SAGARPA-INIFAP-CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla. Medellín, Veracruz, México. 309 p.
- 24 Reyes-Zambrano, S. J.; Lecona-Guzmán, C. A.; Ambrosio-Calderón, J. D.; Abud-Archila, M.; Rincón-Rosales, R.; Ruíz-Valdiviezo, V. M. and Gutiérrez-Miceli F. A. 2016. Plant growth regulators optimization for maximize shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana Botanica.* 73(1):124-131.
- 25 Rodríguez, Y.; Mosqueda, M.; Companioni, B.; Arzola, M.; Borrás, O.; Pérez, M. C.; Lorenzo, J. C. and Santos, R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of cultivar pineapples resistance levels to Heart Rot disease. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38(6):613-616.
- 26 Santos, J. R. and Matos, A. P. 1995. Pine- apple breeding for resistance to Fusariosis in Brazil. *Rev. Fac. Agron. (Maracay).* 21:137-145.
- 27 Sarkar, T.; Nayak, P. and Chakraborty, R. 2018. Pineapple [*Ananas comosus* (L.)] product processing techniques and packaging: a Review. *IIOAB Journal.* 9(4):6-12.
- 28 SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Panorama Agroalimentario Ed. 2021. México. 121-122 pp.
- 29 Su, Y. H.; Tang, L. P.; Zhao, X. Y. and Zhang, X. S. 2021. Plant cell totipotency: insights into cellular reprogramming. *J. Integrative Plant Biol.* 63(1):228-243.
- 30 Sugiyama, M. 1999. Organogénesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology* 2(1):61-64.
- 31 Torres-Ávila, A.; Aguilar-Ávila, J.; Santoyo-Cortés, V. H.; Uriza-Ávila, D. E.; Zetina-Lezama, R. y Rebolledo-Martínez, A. 2018. La piña mexicana frente al reto de la innovación. Avances y retos en la gestión de la innovación. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). 25 p.
- 32 Traas, J. 2018. Organogenesis at the shoot apical meristem. *Plants* . 8(1):1-9.
- 33 Usman, I. S.; Abdulmalik, M. M.; Sani, A. L. A. and Muhammad, A. S. 2013. Development of an efficient protocol for micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne). *Afr. J. Agric Res. Nairobi.* 8(18):2053-2056.
- 34 Vélez-Izquierdo, A.; Espinoza-García, J. A.; Uresti-Gil, J.; Jolalpa-Barrera, J. L.; Rangel-Quintos, J. and Uresti-Durán, D. 2020. Estudio técnico-económico para identificar áreas con potencial para producir piña en el trópico húmedo de México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 11(7):1619-1632.
- 35 Wang, J.; Su, Y.; Kong, X.; Ding, Z. and Zhang, X. S. 2020. Initiation and maintenance of plant stem cells in root and shoot apical meristems. *Abiotech.* 1(3)1-11 pp.
- 36 Yapo, E. S.; Kouakou, T. H.; Kone, M.; Kouadio, J. Y.; Kouame, P. and Merillon, J. M. 2011. Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20(2):196-204.

- 37 Zeng, M.; Hu, B.; Li, J.; Zhang, G.; Ruan, Y.; Huang, H. and Xu, L. 2016. Stem cell lineage in body layer specialization and vascular patterning of rice root and leaf. Science Bulletin. 61(11):847-858.

## Organogénesis directa en piña criolla inducida por 6-bencilaminopurina

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 June 2023
Date accepted: 01 August 2023
Publication date: 18 August 2023
Publication date: August 2023
Volume: 14
Issue: 6
Electronic Location Identifier: e3159
DOI: 10.29312/remexca.v14i6.3159

### Categories

Subject: Artículo

### Palabras clave:

**Palabras clave:**

6-bencilaminopurina  
meristemo  
morfogénesis *in vitro*.

### Counts

Figures: 2  
Tables: 2  
Equations: 0  
References: 37  
Pages: 0