

Empleo de Giberelinas y fertilización foliar durante la aclimatización de vitroplantas de Piña Cayena Lisa c.v. "Serrana"

Ermis Yanes Paz*, Justo González Olmedo y Romelio Rodríguez Sánchez *Autor para correspondencia

Laboratorio Propagación de Plantas. Centro de Bioplantas, UNICA. Carretera a Morón km 9, CP 69450, Ciego de Avila, CUBA. e-mail: biogenet@bioca.unica.cu

RESUMEN

En los últimos años se ha producido un descenso en la producción de la piña. La carencia de material de plantación es uno de los factores responsables de tal disminución. Recientemente se han desarrollado dos protocolos de micropropagación; el descrito por Daquinta (1998), y el de Escalona (1999) que utilizan métodos de la micropropagación convencional y biorreactores de inmersión temporal, respectivamente. La etapa crítica de estos procedimientos es la fase de aclimatización, debido a la baja supervivencia y el lento crecimiento de las vitroplantas en esta etapa. El propósito del trabajo fue evaluar el efecto de las aplicaciones de giberelinas y fertilización foliar sobre el crecimiento de las vitroplantas. Se evaluaron las dosis de 0, 50, 100, 150 y 200 mg.l⁻¹ de AG₃ (BDH) así como tres frecuencias: cada 5, 10 y 15 días. En un segundo experimento se asperjaron cuatro dosis diferentes del fertilizante Combi II: 0 (agua destilada), 5, 10 y 15 ml.l⁻¹. Luego se evaluó el efecto de la aplicación combinada de AG₃ (BDH) y Combi II a 5 ml.l⁻¹, respecto a un tratamiento control (agua destilada). Finalmente se compararon los efectos del AG₃ (BDH) y las giberelinas producidas por el ICIDCA. Las aspersiones bimensuales de AG₃ (BDH) a 100 mg.l⁻¹ incrementaron el crecimiento de las vitroplantas; sin embargo, provocaron alteraciones morfológicas indeseables de las plantas. Su aplicación combinada con giberelinas (ICIDCA) a 100 mg.l⁻¹ produjo un incremento significativo y homogéneo del crecimiento.

Palabras clave: ácido giberélico, biotecnología, reguladores del crecimiento vegetal

ABSTRACT

In the last few years the productions levels of pineapple have decreased. The lack of planting material is one of the factors responsible for such a decrement. Two protocols for pineapple micropropagation have been recently developed: that described by Daquinta (1998), and the one of Escalona (1999). The first one uses conventional micropropagation methods, while the second one employs temporary immersion biorreactors. The critical step of these procedures is the acclimatization stage, because of the low survival and growth rates reaching the plants in this phase. The aim of this work was to evaluate the effect of gibberelins and fertilizer sprays on vitroplants growth. Doses of 0, 5, 100, 150 and 200 mg.l⁻¹ of GA₃ (BDH) were tested. Also three frequencies were evaluated: each 5, 10 and 15 days respectively. In a second experiment, four doses of the fertilizer Combi II were sprayed on the plants: 0 (distilled water), 5, 10 and 15 ml.l⁻¹. Later, the combined application of GA₃ and Combi II was measured compared to a control treatment (distilled water). Finally, the effects of GA₃ (BDH) and the gibberelins produced by ICIDCA were compared. The sprays of GA₃ (BDH) at 100 mg.l⁻¹ twice a month, increased vitroplants growth; however, they caused undesirable morphological abnormalities of the plants. The sprays with the fertilizer Combi II at 5 mg.l⁻¹ also improved plant growth. Its combined application with gibberelins (ICIDCA) at 100 mg.l⁻¹ provoked an homogeneous and significant increment of plant growth.

Key words: biotechnology, gibberelic acid, plant growth regulators

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es una de las frutas tropicales más apreciadas por sus cualidades para la dieta humana, su exquisito sabor, su alta digestibilidad y su incomparable belleza. La provincia Ciego de Avila es la que dedica mayor área a este cultivo en Cuba. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un importante descenso en la producción, siendo la carencia de material de plantación uno de los factores que ha influido sobre tal disminución.

La micropropagación brinda una alternativa para la propagación vegetativa de numerosos cultivos hortícolas, agrícolas y forestales y su empleo se ha extendido de forma vertiginosa (Kozai, 1991; Jeong *et al.*, 1995). Para la piña se han desarrollado varios protocolos, los más recientes son los de Daquinta (1998) y el de Escalona (1999) que utilizan la micropropagación y los sistemas de inmersión temporal, respectivamente. Sin embargo, el éxito de estos procedimientos se ha visto limitado por los bajos porcentajes de supervivencia que alcanzan las plantas

durante la aclimatización y la lentitud del crecimiento en esta etapa. La aplicación de medidas que aceleren el crecimiento de las vitroplantas pueden disminuir el tiempo de aclimatización. Esto permite utilizar el mismo espacio de las casas de cultivo más veces en el año. La aplicación de reguladores del crecimiento en combinación con aportes de nutrientes por la vía foliar pudieran jugar este papel. En el trabajo se evalúa el efecto de las aplicaciones de giberelinas y fertilización foliar sobre el crecimiento de las vitroplantas de piña durante la fase de aclimatización.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en las casas de cultivo del Centro de Bioplasmas, perteneciente a la Universidad de Ciego de Avila, Cuba. Se realizaron cuatro experimentos que a continuación se describen.

Experimento 1. Efecto de la dosis y la frecuencia de aplicación del AG₃ sobre el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas

Se tomaron plantas del cultivar Cayena Lisa Serrana cultivadas *in vitro* según el protocolo descrito por Daquinta (1998), que se encontraban en la fase de enraizamiento. Las vitroplantas poseían una altura entre seis y ocho centímetros desde la base hasta la última hoja y una masa fresca promedio de 1.5 g.

Luego de lavar bien el sistema radical con agua corriente, se plantaron en bandejas de 40 orificios ($V = 82 \text{ cm}^3$) en un sustrato compuesto por una mezcla de suelo rojo: cachaza (1:1, v:v) esterilizado en estufa a 100°C durante 2 h. La selección de las plantas para conformar los grupos experimentales fue al azar. Luego de la esterilización y antes de la plantación el sustrato se asperjó con una solución de *Trichoderma viride* (3×10^6 conidios ml^{-1}) disuelta en la proporción 1/10 a razón de 400 l.ha^{-1} (Borrás *et al.*, 1997) y se aplicó directamente al suelo *Azotobacter* (cepa SFR) a la dosis de $20 \text{ ml planta}^{-1}$ de una solución

diluida 1/10 obtenida a partir de otra de una concentración de 3×10^{10} células. ml^{-1} (González *et al.*, 1997).

Las bandejas donde se plantaron las vitroplantas se colocaron en una casa de cultivo con cubierta de zarán a una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (medida a las 12 M) en el primer mes, y luego se transfirieron a otra de $620 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hasta la conclusión del experimento.

El diseño estadístico consistió en un bifactorial donde el primer factor lo representaron cinco dosis de ácido giberélico (AG₃, BDH Chemicals Ltd. Poole England) por aspersión foliar: 0, 50, 100, 150 y 200 mg.l^{-1} . Se aplicaron aproximadamente 5 ml de la solución (o de agua destilada al control) por planta. El segundo factor correspondió a la frecuencia de aplicación con tres niveles: cada 5, 10 y 15 días respectivamente. Se emplearon 35 plantas por tratamiento que se plantaron según un diseño de bloque completamente aleatorizado. Se evaluó la masa seca, la longitud y ancho de la hoja "D" de las vitroplantas a los 98 días de la plantación.

Experimento 2. Efecto de la dosis de aplicación del fertilizante foliar Combi II sobre el crecimiento de las vitroplantas.

Se empleó material vegetal y una metodología similar al experimento anterior. Luego de un mes de la plantación, se seleccionaron aleatoriamente 40 plantas por tratamiento que se plantaron según un diseño de bloque completamente aleatorizado. Las vitroplantas se asperjaron con una solución del fertilizante Combi II (Carisombra) en tres ocasiones, con un intervalo entre aplicaciones sucesivas de 15 días. El tratamiento control se asperjó con agua destilada. En la tabla 1 se brinda la composición del fertilizante usado. Los tratamientos fueron cuatro: Control (agua destilada), 5, 10 y 15 ml.l^{-1} de Combi II. Se evaluó la masa fresca inicial y final (45 días después de la primera aplicación) y se calculó el incremento en masa.

Tabla 1. Composición del fertilizante Combi II (Carisombra)

Componentes	Composición
Nitrógeno (N)	62 g.l^{-1}
Fósforo (P_2O_5)	34 g.l^{-1}
Potasio (K_2O)	118 g.l^{-1}
Magnesio (Mg)	6 g.l^{-1}
Hierro (Fe)	160 mg.l^{-1}
Boro (B)	84 mg.l^{-1}
Manganeso (Mn)	160 mg.l^{-1}
Zinc(Zn)	117 mg.l^{-1}
Cobre (Cu)	84 mg.l^{-1}
Molibdeno (Mo)	50 mg.l^{-1}
Cobalto (Co)	20 mg.l^{-1}

Experimento 3. Efecto de la aplicación combinada de fertilización foliar y AG_3 sobre el crecimiento de las vitroplantas

Se empleó material vegetal y metodología similar al experimento 1. Existieron dos grupos experimentales: Control (agua destilada) y Combi II + AG_3 . Las plantas del segundo tratamiento después de un mes de aclimatizadas se asperjaron cada 15 días con Combi II y a los dos días siguientes se asperjaron con AG_3 , al tiempo que el tratamiento control se asperjaba sólo con agua destilada. Se emplearon 40 plantas por tratamientos plantadas según un diseño de bloque completamente aleatorizado.

Experimento 4. Efecto de la procedencia de la giberelina sobre el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas

Se utilizó material vegetal y metodología similares a los experimentos anteriores. Se emplearon 40 plantas por tratamiento, plantadas según un diseño de bloque completamente aleatorizado. Luego de un mes de aclimatización, las vitroplantas se asperjaron quincenalmente con el fertilizante Combi II. Dos días después de la aplicación del fertilizante se aplicó por aspersión uno de los siguientes tratamientos a cada grupo de plantas: Testigo (agua destilada), AG_3 (BDH) a 100 mg.l^{-1} o Giberelinas (ICIDCA) a 100 mg.l^{-1} . Luego de 90 días de aclimatización, se evaluó la masa fresca, longitud y ancho de la hoja "D" de las vitroplantas. Las concentraciones de giberelinas se expresan en términos de sustancia activa.

Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó el paquete SPSS (versión 8.0 para Windows). En el experimento uno se realizó un análisis de

varianza factorial (ANOVA) y las medias se separaron finalmente con el empleo de la prueba de rangos múltiples de Duncan. En el experimento tres se realizó una prueba "t" para separar las medias. En los restantes experimentos se llevó a cabo un análisis de varianza unidireccional y las medias se separaron con el empleo de la prueba de Duncan. Siempre se usó un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cualquier tecnología de aclimatización debe garantizar altos porcentajes de supervivencia y un crecimiento rápido de las vitroplantas. Precisamente, el lento crecimiento de las plántulas de piña durante esta fase es uno de los problemas fundamentales que enfrentan los productores.

Actualmente existe una tendencia al empleo de nuevos compuestos estimulantes del crecimiento como los brasinoesteroides en diversos cultivos agrícolas (Nuñez, 1999). En la aclimatización de vitroplantas también se han usado. Sin embargo, han quedado a un lado compuestos más conocidos como las giberelinas, cuyo uso potencial no ha sido explotado en muchos cultivos.

Como se aprecia en la tabla 2 el incremento en la dosis de AG_3 produjo aumentos en la longitud de la hoja "D"; sin embargo, éstos estuvieron acompañados de disminuciones en el ancho de la hoja. Los resultados del análisis de varianza reflejaron una influencia significativa ($p < 0.05$) del factor dosis, mientras la frecuencia no ejerció efecto significativo sobre las variables de crecimiento evaluadas. Asimismo existió ausencia de interacción entre ambos factores.

Tabla 2. Influencia de la dosis y frecuencia de aplicación de AG_3 sobre varias variables de crecimiento de vitroplantas de piña en la fase de aclimatización.

Factores	Longitud hoja "D" (cm)	Ancho hoja "D" (cm)	Masa seca (g)
Dosis de $AG_3 \text{ mg.l}^{-1}$			
0	6.5 c	1.5 a	0.45 c
50	12.5 b	0.9 b	0.50 bc
100	13.1 b	0.8 b	0.65 ab
150	14.0 b	0.8 b	0.53 ab
200	16.2 a	0.7 b	0.70 a
Error estándar	0.30	0.04	0.02
Análisis de varianza			
Dosis	*	*	*
Frecuencia	NS	NS	NS
Dosis x Frec.	NS	NS	NS

(*), (NS): Significativo con $p < 0.05$ o no significativo, respectivamente. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Grzesik (1989) planteó que en varios estudios realizados con especies forestales, siempre el incremento en la elongación y el bajo desarrollo simultáneo de los brotes laterales y baja ramificación después de la aplicación de giberelinas, sugiere que la elongación apical fue realizada a costa del crecimiento de los brotes laterales. En este caso se puede plantear que el incremento en la longitud de las hojas se produjo a costa de una disminución en el ancho de las mismas.

Otra de las variables evaluadas, la masa seca, mostró una tendencia ascendente con el aumento de la dosis de AG_3 . Las dosis más altas (100, 150 y 200 $mg.l^{-1}$) provocaron los mayores incrementos en esta variable sin diferir significativamente entre ellas. En este caso el factor frecuencia tampoco tuvo una influencia notable, pues no existieron diferencias significativas entre los distintos niveles.

En sentido general se puede plantear que las mayores dosis produjeron también los mayores valores en cuanto a la longitud de las hojas y masa

seca de las plantas no así en el caso del ancho, en que se observó que las hojas más estrechas estuvieron asociadas con las dosis más altas. Esto obliga a aplicar dosis que produzcan un crecimiento balanceado en la planta, pues las plantas con hojas muy finas y largas son rechazadas por los productores.

Grzesik y Joustra (1991), señalaron que las plantas tratadas con AG_3 consumen más macroelementos que las no tratadas. Por ello sugieren la necesidad de combinar las aplicaciones de AG_3 con fertilización de fondo o foliar. La carencia de nutrientes puede ser la causa de la amarillez observada en las plantas tratadas con el producto.

En la tabla 3 se aprecia el incremento en masa producido por las diferentes dosis del fertilizante; como se observa las mejores dosis resultaron ser las de 5 y 10 $ml.l^{-1}$, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Tabla 3. Influencia de la dosis de aplicación del fertilizante foliar Combi II sobre el incremento en masa de vitroplantas de piña en la fase de aclimatización.

Tratamientos $ml.l^{-1}$	Masa fresca inicial (g)	Incremento en masa (g)
Control	6.02 a	7.63 b
5	5.90 a	10.2 a
10	5.97 a	9.65 a
15	5.93 a	8.24 b
Error estándar	0.10	0.23

Medias con letras diferentes difieren significativamente según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$)

El fertilizante Combi II posee una relación internutriente que lo hace favorable para el cultivo de la piña si se tiene en cuenta que este cultivo consume en primer lugar potasio, en segundo lugar nitrógeno y por último fósforo (Peña *et al.*, 1996). Por otra parte posee adecuadas cantidades de hierro, elemento al cual la piña es muy exigente (Broadley *et al.*, 1993). La disminución de los incrementos que se observó en la dosis más alta puede deberse al efecto de la acumulación de algún microelemento. Este fertilizante se recomienda además para fertirriego, por lo que su empleo en instalaciones que cuenten con esa posibilidad puede ser beneficioso.

Como se aprecia en la tabla 4 la aplicación combinada de Combi II y AG_3 produjo un incremento significativo en la longitud de la hoja

similar a cuando se aplicó AG_3 solo; sin embargo, en esta ocasión no existieron diferencias estadísticas en el ancho de la hoja. Esto corroboró la importancia de aplicar el AG_3 combinado con fertilización foliar.

Por otra parte se debe señalar que las plantas de ambos tratamientos presentaban un color verde que comparado con el color amarillento que exhibían las plantas tratadas sólo con giberelinas (experimento1) demostró el buen estado nutricional de las primeras. La aplicación combinada de ambos productos también elevó significativamente la masa fresca. A pesar de ello, el fenotipo de estas plantas aún no goza de total aceptación por los productores, debido a que la relación largo/ancho de la hoja es todavía grande. Ello hace que a la vista la planta tenga una apariencia alargada.

Tabla 4. Influencia de la aplicación combinada de Combi II y AG₃ sobre la longitud y ancho del a hoja "D" de vitroplantas de piña en la fase de aclimatización.

Tratamiento	Longitud de la hoja "D" (cm)	Ancho de la hoja "D" (cm)
Control	6.5 b	1.40 a
Combi II + AG ₃	10.0 a	1.20 a
Error estándar	0.21	0.12

Medias con letras diferentes difieren significativamente, según prueba "t" ($p < 0.05$)

Los efectos combinados de las aplicaciones del producto del Instituto Cubano de Derivados de la Caña de azúcar (ICIDCA) con actividad de giberelinas en comparación con el producido por BDH, se muestran a continuación (Tabla 5).

En sentido general las giberelinas producidas por el ICIDCA tuvieron el mejor comportamiento, ya que elevaron la masa fresca, el ancho y longitud de las hojas, sin llegar a valores muy altos que provoquen alteraciones morfológicas de las plántulas como lo

hace el AG₃ de la firma BDH. El mejor comportamiento de las giberelinas producidas por el ICIDCA es posible que se deba al hecho de que, al constituir una mezcla de varias giberelinas, cada una tenga efectos diferentes sobre la promoción del crecimiento que en conjunto provocan un efecto más balanceado sobre éste. Salisbury y Ross (1991) plantearon que diferentes cultivos tienen también distintas respuestas al tipo de giberelina. De hecho hay algunos que no responden a la aplicación de AG₃.

Tabla 5. Influencia del tipo de giberelina sobre varias variables de crecimiento de vitroplantas de piña en la fase de aclimatización.

Tratamiento	Longitud hoja "D"(cm)	Ancho hoja "D"(cm)	Masa fresca (g)
Control	5.8 c	1.5 b	3.2 b
AG ICIDCA	7.8 b	2.0 a	4.4 a
AG ₃ BDH	9.1 a	1.1 c	4.3 a
Error estándar	0.21	0.03	0.17

Medias con letras diferentes difieren significativamente, según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

El manejo de los elementos tratados en el presente trabajo, unido a otros como la intensidad de la luz, la humedad relativa y el tipo de sustrato, contribuirán a alcanzar mayores tasas de crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. También la supervivencia de las plántulas se verá favorecida.

CONCLUSIONES

Las aspersiones de AG₃ (BDH) a 100 mg.l⁻¹ con frecuencia quincenal, produjeron incrementos significativos del crecimiento de las vitroplantas; sin embargo provocaron alteraciones morfológicas indeseables que limitan su empleo.

La aplicación del fertilizante foliar Combi II a 5 ml.l⁻¹ con frecuencia quincenal por aspersión foliar, incrementó el crecimiento de las vitroplantas. Su aplicación combinada con giberelinas (ICIDCA) a 100 mg.l⁻¹ produjo un incremento significativo y homogéneo del crecimiento.

REFERENCIAS

- Borrás, O, Pérez MC, Nogueira J, Felix E, Martín A, Rodríguez Y, Mosqueda M (1997) Empleo de *Thichoderma sp.* en el control de la pudrición de la piña causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en segmentos de tallos. Cuadernos de Fitopatología 54:148-149
- Broadley, R, Wassman RC, Sinclair E (1993) Pineapple Pest and Disorders. Department of Primary Industries. pp. 88-89
- Daquinta, MA (1998) Propagación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Tesis presentada en opción al grado de doctor en ciencias agrícolas. Universidad de Ciego de Avila
- De la Fé, CF, Ortiz R, Jiménez M (1998) Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. Cultivos tropicales, 19(3):45-48
- Escalona, M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González J, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion system. Plant Cell Report, 18(9): 743-748

- González, R, Domínguez Q, Expósito LA, González JL, Hidalgo M (1997) Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* en la adaptación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cv Cayena Lisa. *Acta Horticulturae* 425 :277-281
- Grzesik, M (1989) Factors influencing the effectiveness of growth regulators in nursery production. *Acta Horticulturae* 251: 371-375
- Grzesik, M, Joustra M (1991) Effects of gibberelic acid and different levels of nitrogen and potassium on growth of *Juniperus communis* 'Suecica'. *Folia Horticulturae* 3: 61-66
- Kozai, T (1991) Acclimatization of micropropagated plants. En: Bajaj, PS (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 17: High-Tech and Micropropagation I*, pp. 127-141
- Jeong, BR, Fujiwara K, Kozai T (1995) Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Reviews* 17: 123-170
- Núñez, M (1999) Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Cultivos tropicales*, 20(3): 63-72
- Peña, H, Díaz JA, Martínez T (1996) *Fruticultura Tropical*. Primera Parte. pp. 13 Editorial ICFES
- Salisbury, FB, Ross CW (1992) *Fisiología vegetal*, pp 396. Editorial Wadsworth Publishing