







Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) MD2 variety through axillary bud proliferation

Micropropagación de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad MD2 mediante proliferación de yemas axilares

Diego Salas-Valdivia , Laura Ahtziri Díaz-Godínez , José Juvencio Castañeda-Nava , José Manuel Rodríguez-Domínguez* 

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, C. P. 45019, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: mrodriguez@ciatej.mx (J. M. Rodríguez-Domínguez)

Article history:

Received: 31 March 2023 / Received in revised form: 20 June 2023 / Accepted: 21 June 2023 / Published online: 1 July 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.3.49>

ABSTRACT

The pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) is an economically important bromeliad plant due to the organoleptic characteristics of its fruit, being the MD2 variety one of the most cultivated. Pineapple culture is limited by its inefficient sucker production. Micropropagation represents a way of producing pineapple plantlets. The aim of this study was to obtain a micropropagation protocol for *A. comosus* MD2 variety using the axillary bud proliferation technique. Axillary buds from suckers were put into MS media where 17 treatments were tested: benzylaminopurine (BA) in combination with indolebutyric acid (IBA) (0, 0.5, 1 mg/L) or indoleacetic acid (IAA) (0, 0.5, 1 mg/L); as well as BA (2 mg/L) with naphthaleneacetic acid (NAA) (5 mg/L); and kinetin (KIN) (2 mg/L). The presence or absence of silver nanoparticles (34 mg/L) was tested as well. The percentage of sprouting, number of shoots, and length were measured. Percentage of sprouting was higher (73.3%) when kinetin and silver were present. Highest shoot number (2.5 ± 0.49) was observed on media containing BA 3 mg/L and IAA 0.5 mg/L. Also, organogenesis was observed on media with BA and ANA. Finally, acclimatization had a 100% success rate.

Keywords: axillary bud proliferation, 'super sweet' pineapple, tissue culture.

RESUMEN

La piña (*Ananas comosus* L. Merr) es una bromeliácea de importancia económica debido a las propiedades organolépticas de su fruto, siendo mayormente cultivada la variedad MD2 o piña miel. Su cultivo está limitado por la lenta producción de hijuelos. La micropropagación presenta una alternativa para la obtención de plántulas de piña. El objetivo de este estudio fue realizar un protocolo de micropropagación de *A. comosus* variedad MD2 mediante la proliferación de yemas axilares. Se aislaron yemas axilares de hijuelos en medio MS, se probaron 17 tratamientos: bencilaminopurina (BA) (0, 1, 3 mg/L) en combinación con ácido indolbutírico (AIB) (0, 0.5, 1 mg/L) o ácido indolacético (AIA) (0, 0.5, 1 mg/L); así como BA (2 mg/L) y ácido naftalenacético (ANA) (5 mg/L); y kinetina (KIN) (2 mg/L). Además de la presencia o ausencia de nanopartículas de plata (34 mg/L). Se evaluó el porcentaje de brotación, número de brotes, y longitud. Se encontró que el porcentaje de brotación fue mayor (73.3%) al utilizar KIN y plata. El mayor número de brotes (2.5 ± 0.49) se dio en el tratamiento con BA 3 mg/L + 0.5 AIA mg/L. Además, se observó organogénesis en el tratamiento con BA y ANA. Finalmente, la aclimatación fue exitosa (100%).

Palabras clave: cultivo de tejidos, piña miel, proliferación de yemas axilares.

1. INTRODUCCIÓN

La planta de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) se encuentra dentro de la familia de las bromeliáceas, es originaria de los territorios de Brasil y Paraguay (Hossain, 2016), sin embargo, en la actualidad se cultiva en distintos países con climas tropicales. México se encuentra dentro de los diez países con mayor producción de piña, cosechando más de un millón de toneladas anualmente (FAO, 2020). La variedad MD2, también conocida como piña miel, es una de las más apreciadas en el mercado por sus cualidades organolépticas (Thalip *et al.*, 2015). En México, los estados con mayor producción de piña son Veracruz y Oaxaca; y los que tienen un mayor rendimiento por hectárea son Oaxaca, Colima y Jalisco (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021). Los últimos dos estados son categorizados como zonas con potencial para aumentar su producción (SAGARPA, 2017).

La propagación de la piña en la agricultura se realiza por vía vegetativa o asexual. En diferentes partes de la planta crecen hijuelos, llamados comúnmente coronas, gallos o clavos, según su posición. Estos se cortan y se plantan para continuar con la producción. Es importante señalar que este método no siempre presenta la eficiencia suficiente para satisfacer la cantidad de plantas necesarias para grandes áreas de cultivos, especialmente en zonas en crecimiento (Reinhardt *et al.*, 2018). Una alternativa viable a la reproducción tradicional es la micropropagación, la cual consiste en la obtención de una gran cantidad de plantas a partir de un tejido vegetal

en condiciones *in vitro* y cultivado en un medio específico. La proliferación de yemas axilares es una técnica de micropropagación donde se induce la producción de brotes a partir de una planta, mediante el uso de reguladores de crecimiento en un medio de cultivo (Suárez, 2020).

Los reguladores de crecimiento son compuestos que se agregan al medio de cultivo para provocar algún efecto en la fisiología, crecimiento, y desarrollo de las plantas; al manipular las combinaciones y concentraciones de éstos, se busca el óptimo crecimiento y regeneración de las plantas o partes de estas. Por ejemplo, las auxinas estimulan la elongación celular y mantienen la dominancia apical, dentro de éstas se encuentran el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolacético (AIA), y el ácido indolbutírico (AIB). Por el contrario, las citocininas rompen este efecto de la dominancia apical, por lo que son ampliamente utilizadas en las técnicas de proliferación de yemas axilares. Dentro de este grupo se encuentran la bencilaminopurina (BA) y la kinetina (KIN) (Suárez, 2020). Existen otros compuestos que se pueden agregar al medio de cultivo para tener algún efecto benéfico en las plantas, como pueden ser las nanopartículas de plata. Éstas ayudan a reducir contaminación en los explantes y pueden promover el crecimiento de ellos (Chávez-García *et al.*, 2020; Bello-Bello & Spinoso-Castillo, 2023).

Existen distintas publicaciones sobre el uso de la técnica de proliferación de yemas axilares y otras técnicas de micropropagación en piña, sin embargo, en ellas se utilizan distintas variedades, o presentan información insuficiente para su replicación. En otros reportes se usan distintos explantes (Medina *et al.*, 2014; Abdul Halim *et al.*, 2018; Sulaiman *et al.*, 2020; Ayenew *et al.*, 2021), y ninguno con material vegetal proveniente de Jalisco. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar un protocolo de micropropagación de *A. comosus* variedad MD2, mediante la proliferación de yemas axilares, a partir de material vegetal proveniente de Tomatlán, Jalisco.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Se utilizaron explantes de piña (*A. comosus*), conocidos como “gallos”, provenientes del municipio de Tomatlán, Jalisco, México. Se seleccionaron plantas vigorosas y libres de enfermedades. Estas se lavaron, y se les retiraron las hojas de forma cuidadosa, siguiendo la filotaxia. Con ayuda de un bisturí, se cortaron las yemas axilares (1 cm aproximadamente) de forma individual.

2.2 Desinfección del material vegetal

Se aplicó un choque térmico a las yemas (65°C/5 min y 5°C/5 min), inmersión por 30 min en una solución de ácido cítrico ajustando el pH a 3.5 y una solución de fungicidas y bactericidas por 1 h. Después se hizo un lavado con hipoclorito de sodio al 0.3% por 7 min. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Finalmente se hizo un lavado en una solución de nanopartículas de plata (34 mg/L) por 10 min.

2.3 Proliferación de yemas axilares

Las yemas axilares se colocaron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 30 g/L de sacarosa, solidificado con 8 g/L de agar, ajustando el pH a 5.8 ± 0.03 , además, se le adicionaron 34 mg/L de nanopartículas de plata para evitar contaminación causada por microorganismos sistémicos (desinfección endógena). Se realizó un experimento completamente al azar con 16 tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento. Se probaron distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BA (0, 1, 3 mg/L) en combinación AIB (0, 0.5, 1 mg/L) o AIA (0, 0.5, 1 mg/L); así como BA 2 mg/L y ANA 5 mg/L; y KIN 2 mg/L. Se colocaron en incubación a 25°C, con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Después de dos semanas se contabilizó el número de yemas que brotaron; aquellas que brotaron se llevaron a recipientes con 5 mL de medio líquido, para evitar su inmersión total y sin agitación, utilizando los mismos 16 tratamientos de la etapa de brotación. Aproximadamente dos meses y medio después, se evaluó la longitud de las plantas y el número de brotes producidos. En un segundo experimento, se seleccionó el mejor tratamiento respecto al porcentaje de brotación de los explantes, y se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de las nanopartículas de plata (34 mg/L) en el medio de cultivo en este porcentaje de brotación. Con estas plantas, al alcanzar un tamaño de 3 cm aproximadamente, se realizó un nuevo experimento utilizando los tres mejores tratamientos del primer ensayo, en este se evaluó su longitud (cm) y el número de brotes formados por explante, después de 45 días de incubación.

2.4 Aclimatización *ex vitro*

Una muestra de 20 plantas (de aproximadamente 7 cm de longitud), provenientes de medio de cultivo con 2 mg/L de KIN, se seleccionó para realizar aclimatización. Se colocaron en macetas con sustrato esterilizado en calor húmedo, compuesto por tierra y arena en una proporción 1:1. Las plantas fueron colocadas en un cuarto de aclimatización a 25°C, y un fotoperiodo 18 h luz / 6 h oscuridad, hasta que se desarrolló raíz. Posteriormente fueron llevadas a invernadero. En ambos casos se aplicó riego constante. Se calculó el porcentaje de supervivencia de las plantas después de dos meses.

2.5 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se trabajó con 15 repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rangos múltiples de Tukey. Se comprobó la homogeneidad de varianzas mediante una prueba de Bartlett. Se utilizó un alfa de 0.05 y un nivel de confianza de 95%. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.2.06.

3. RESULTADOS

3.1 Proliferación de yemas axilares

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la longitud de los explantes ($p=0.000$), y el número de brotes que estos generaron ($p=0.0003$), según las distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de brotación de yemas axilares aisladas, su longitud final y número de brotes generados por los explantes de *A. comosus*.

Table 1. Percentage of sprouting on inactive axillary buds, their final length and the number of shoots produced by explant from *A. comosus*.

Tratamiento (mg/L)	Porcentaje de brotación de explantes	Número de brotes por explante*	Longitud (cm) final del explante*
Control negativo	38.0%	1.5±0.87 abc	1.9±0.19 a
AIA 0.5	33.3%	0.0 a	3.2±0.65 ab
AIA 1	30.7%	0.3±0.33 abc	3.3±0.83 bc
AIB 0.5	42.8%	0.4±0.24 abc	2.5±0.52 a
AIB 1	53.8%	0.0 a	3±0.56 a
BA 1	62.5%	0.0 a	2.7±0.29 a
BA 1 + AIA 0.5	21.4%	0.3±0.33 abc	2.5±0.92 a
BA 1 + AIA 1	50.0%	5.0±0.71 bc	8.8±1.17 d
BA 1 + AIB 0.5	35.7%	3.0±2.8 abc	7.4±1.04 d
BA 1 + AIB 1	40.0%	0.0 a	2.5±0.31 a
BA 3	33.3%	0.8±0.48 abc	2.2±0.36 a
BA 3 + AIA 0.5	66.6%	4.9±0.67 c	7.8±0.63 d
BA 3 + AIA 1	61.5%	0.8±0.37 abc	3.2±0.58 a
BA 3 + AIB 0.5	35.7%	5.4±1.17 c	6.6±0.16 cd
BA 3 + AIB 1	27.3%	1.3±0.33 abc	2.5±0.48 a
BA 2 + ANA 5	47.4%	1.2±0.86 abc	3.9±0.77 ab
KIN 2	73.3%	0.0 a	2.3±0.51 a

AIA: ácido indolacético; AIB: ácido indolbutírico; ANA: ácido naftalenacético; BA: bencilaminopurina; KIN: kinetina. Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p=0.05$). *Promedio. Se indica el error estándar después del promedio.

La brotación de las yemas inactivas aisladas de la planta varió desde 21.4% hasta 73.3%, siendo el mejor tratamiento el de KIN 2 mg/L. Los mayores promedios de número de brotes y longitud se observaron en tratamientos con BA en combinación con cualquiera de las dos auxinas. Los explantes con mayor promedio de longitud se observaron en los tratamientos con BA 1 mg/L + AIA 1 mg/L (8.8 ± 1.17 cm), BA 1 mg/L + AIB 0.5 mg/L (7.4 ± 1.04 cm) y BA 3 mg/L + AIA 0.5 mg/L (7.8 ± 0.63 cm). Los dos tratamientos con mayor promedio de número de brotes fueron los que contenían BA 3 mg/L + AIA 0.5 mg/L (4.9 ± 0.67) y BA 3 mg/L + AIB 0.5 mg/L (5.4 ± 1.17) (Fig. 1). En el tratamiento con BA 2 mg/L + ANA 5 mg/L se observó una respuesta organogénica (Fig. 2), similar a experimentos previos (datos no mostrados).



Fig. 1. Proliferación de yemas axilares en medio MS adicionado con 3 mg/L de BA y 0.5 mg/L de AIA.

Fig. 1. Axillary bud proliferation on MS medium containing 3 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA.



Fig. 2. Organogénesis directa en medio MS adicionado con 2 mg/L de BA y 5 mg/L de ANA. Se observan los nuevos brotes (círculo) y la yema axilar original (flecha)
Fig. 2. Direct organogenesis on MS medium containing 2 mg/L BA and 5 mg/L NAA. Buds (circle) and the initial bud (arrow) can be observed.

En el siguiente experimento, se encontró que la brotación fue menor en ausencia de nanopartículas de plata (35%), comparado con la presencia de estas (75%), en medio con 2 mg/L de KIN. Se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos elegidos para proliferación de yemas, para ambas variables: los promedios de número de brotes ($p=0.0052$) y longitud del explante (cm) ($p=0.000$) (Fig. 3). Para la primera variable, el mejor tratamiento fue el que contenía BA 3 mg/L + AIA 0.5 mg/L (2.5 ± 0.49), mientras que para la longitud el mejor tratamiento fue el de BA 3 mg/L + AIB 0.5 mg/L (5.4 ± 0.22 cm).

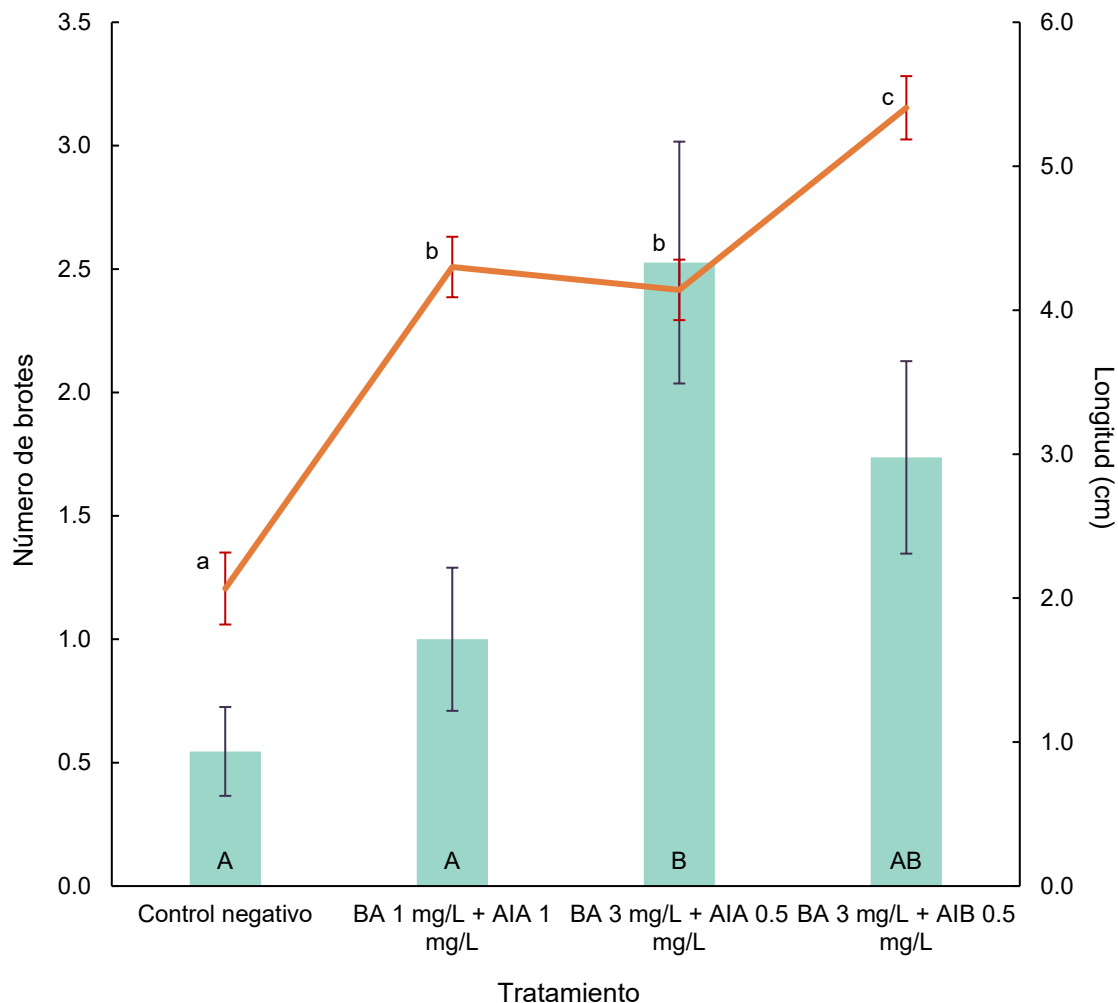


Fig 3. Efecto de las distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento en el promedio del número de brotes generados por los explantes (barras), y la longitud en centímetros (línea roja).

Fig 3. Effect of distinct concentrations of growth regulators on the mean of number of shoots produced by the explants (bars), and length in centimeters (red line).

AIA: ácido indolacético; AIB: ácido indolbutírico; BA: bencilaminopurina. Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p=0.05$). Mayúsculas para número de brotes, minúsculas para longitud. Las barras de error indican el error estándar.

3.2 Aclimatización *ex vitro*

Se obtuvo un 100% de supervivencia en las 20 plantas llevadas a aclimatización. Estas se mantuvieron vigorosas en las condiciones de la incubadora, así como en invernadero. Generaron raíces a las tres semanas.

4. DISCUSIÓN

Para romper la dormancia de las yemas axilares aisladas de la planta de piña, se han utilizado distintos reguladores, destacando el uso de citocininas, ya sea combinadas o no con auxinas. El presente estudio utilizó KIN, sin embargo, Harahap *et al.* (2019) obtuvieron callo organogénico en yemas de piña al agregar este regulador al medio en una concentración menor, 0.5 y 1 mg/L. En diversas publicaciones se utilizó BA en concentraciones que variaron de 0.01 mg/L a 8 mg/L, solo o en combinación con ANA, AIA o AIB (Khan *et al.*, 2004; Zuraida *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2015; Sulaiman *et al.*, 2020). En estas publicaciones este medio fue utilizado para la fase de inducción, es decir, los explantes fueron colocados directamente en esta fase de la micropropagación. En contraste, Medina *et al.* (2014) utilizaron un medio de inducción que contenía 0.5 mg/L de BA, 0.5 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de AIB para las yemas aisladas. De igual manera, Usman *et al.* (2013) utilizaron primero un medio adicionado con 5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA. Por otro lado, Sripaoraya *et al.* (2003) emplearon un medio para iniciación con 2 mg/L de AIB, 2 mg/L de ANA y 2 mg/L de KIN. En ninguno de los trabajos citados se reportó la efectividad de los medios de cultivo en la brotación de las yemas, mientras que en el presente estudio se registra este efecto. Ayenew *et al.* (2021) e Ibrahim *et al.* (2013) colocaron las yemas en medio sin ningún regulador de crecimiento, sin mencionar ningún porcentaje de brotación, pero con éxito aparente, ya que reportaron una media de 13.14 y 13.6 brotes respectivamente, en su etapa de multiplicación. De hecho, Reinhardt *et al.* (2017) en su revisión mencionaron que los primeros 45 días de inicio del cultivo de yemas, es conveniente no añadir ningún regulador en el medio, basado en su literatura consultada. Esto tiene sentido si se considera que en esta técnica se elimina el meristemo apical, acabando así con la dominancia de este.

El uso de las nanopartículas de plata suele ser relacionado con la desinfección, no obstante, existen trabajos donde, al igual que en el presente, tienen un efecto benéfico en el crecimiento y desarrollo de explantes en condiciones *in vitro* al ser agregadas al medio de cultivo, aunado a la eliminación de contaminantes endógenos de las plantas y la inhibición de los efectos del etileno (Bello-Bello & Spinoso-Castillo, 2023). Chávez-García *et al.* (2020) encontraron que con la adición de hasta 50 mg/L de nanopartículas de plata, la longitud de los brotes obtenidos de yemas apicales de *Gladiolus spp* fue mayor que en la ausencia de éstas.

Distintos reguladores de crecimiento, en diferentes concentraciones, han sido utilizados para la técnica de proliferación de yemas axilares de *A. comosus*. Como mencionaron Reinhardt *et al.* (2017), en general la relación de citoquininas y auxinas debe ser 3:1 para la fase de multiplicación de la piña, esto coincide con Medina *et al.* (2014), quienes obtuvieron un promedio de entre 18 y 20 brotes por explante utilizando 3 mg/L de BA y 1 mg/L de ANA, después de cuatro semanas de cultivo. En nuestro estudio se obtuvieron un menor número de brotes utilizando la misma proporción de reguladores. De igual manera, otros estudios obtuvieron números más bajos de brotes, por ejemplo, Da Silva *et al.* (2016) utilizaron 0.5 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA, mencionaron haber obtenido un promedio de 10 brotes por planta, en

una proporción similar de citoquininas y auxinas. Otros autores utilizaron proporciones diferentes, tal es el caso de Mhatre *et al.* (2011), quienes utilizaron 1.8 mg/L de ANA, 2 mg/L de AIB y 2 mg/L de KIN, para multiplicación en la variedad Queen, siendo una de las pocas publicaciones que utilizan KIN para esta fase de micropropagación, aunque no mencionan cuántos brotes obtuvieron.

Por otra parte, distintos estudios encontraron mejores resultados, en proliferación de yemas, usando sólo citoquininas, por ejemplo, Zuraida *et al.* (2011) en medio con 5 mg/L de BA, reportaron el crecimiento de un promedio 6.98 brotes por explante en un mes, al igual que Nelson *et al.* (2015), en la variedad MD2, probaron medio con 6 mg/L BA y sacarosa a 50 g/L, y obtuvieron 7.5 brotes, después de cuatro meses. Contrario a esto, Harahap *et al.* (2019) obtuvieron callo utilizando solamente citocininas en bajas cantidades (BA 0.5-1 mg/L), siendo el único estudio con estos resultados. Finalmente, contrasta que los autores Sulaiman *et al.* (2020), utilizando la misma variedad MD2 que en este estudio, obtuvieron los mejores resultados en los promedios de número de brotes (2.8 ± 0.5) y su altura (4.4 ± 0.3 cm) en medio con 1 mg/L de la auxina ANA, mientras que en la presente investigación las auxinas por sí solas no dieron resultados favorables.

Es importante señalar que, aunque las plantas pertenezcan a la misma especie, e incluso variedad, pueden tener variaciones en su genotipo y en la expresión de los genes. Esto dando como resultado diferentes concentraciones endógenas de hormonas vegetales, que tendrán un efecto en el desarrollo de las plantas llevadas a condiciones *in vitro* (Reinhardt *et al.*, 2018; Suárez, 2020). De ahí la importancia de la investigación sobre qué reguladores de crecimiento, y en qué concentraciones, tienen el efecto deseado en cada especie, variedad o genotipo, según el propósito del trabajo de cultivo *in vitro*.

Con respecto a la caulogénesis, esta ha sido reportada en medios con los reguladores de crecimiento, y en las mismas concentraciones que se utilizaron en este trabajo, tanto para organogénesis directa (Blanco *et al.*, 2017) como indirecta (Pineda *et al.*, 2012), incluso se ha reportado un trabajo donde se utilizan concentraciones más bajas de ANA y BA (0.37 mg/L y 0.44 mg/L respectivamente) obteniéndose resultados similares (Scherer *et al.*, 2013). La rizogénesis o enraizamiento se ha llevado a cabo con AIB en las plantas de piña *in vitro* (Ayenew *et al.*, 2013; Hamad *et al.*, 2013), mientras que en el presente trabajo no tuvo ningún efecto relacionado con la rizogénesis, la elongación, o la proliferación de yemas.

La aclimatización se logró fácilmente en diversos estudios, como ejemplo podemos citar el trabajo de Medina *et al.* (2014), quienes lograron aclimatar vitroplantas de piña, que aún pasadas 12 semanas se mantuvieron vigorosas, utilizando un sustrato de tierra, arena y musgo (1:1:1). De igual manera, Ayenew *et al.* (2021) mencionaron que sus plantas de piña en la fase de aclimatación, usando un sustrato de tierra, arena y composta (2:1:1), obtuvieron una buena respuesta. De forma similar, Zuraida *et al.* (2013) reportaron una adaptación *ex vitro* de casi 100% de supervivencia, al igual que Lakho *et al.* (2023), quienes también alcanzaron porcentajes elevados de supervivencia en la aclimatación (86-100%) con diferentes

sustratos. La piña tiene una fisiología adaptable, ya que puede pasar de metabolismo C3 a CAM en condiciones de estrés, como puede ser la etapa de aclimatación; esta adaptación podría facilitar la supervivencia de plantas de piña llevadas a condiciones *ex vitro* (Aragón *et al.*, 2012).

Finalmente, la proliferación de yemas axilares en *A. comosus* variedad MD2, o piña miel, se pudo llevar a cabo a partir de yemas inactivas aisladas. El mejor medio de cultivo para obtener un mayor porcentaje de brotación (75%) fue el que contenía una concentración de 2 mg/L de KIN, y 34 mg/L de nanopartículas de plata. El tratamiento que presentó mejores resultados en el promedio de la longitud de los explantes (5.4 ± 0.89 cm) fue el de 3 mg/L de BA + 0.5 mg/L de AIB, mientras que el promedio mayor de número de brotes (2.5 ± 2.09) se observó en el medio con 3 mg/L de BA y 0.5 mg/L de AIA. Cabe mencionar que el medio adicionado con 2 mg/L de BA y 5 mg/L de ANA también se observó organogénesis directa. La aclimatación de las plantas llevadas a condiciones de invernadero fue exitosa, con 100% de supervivencia. Este trabajo ofrece una alternativa a la propagación tradicional, siendo una técnica detallada de propagación masiva para *A. comosus* de Tomatlán, Jalisco.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca de posgrado otorgada al primer autor, al Laboratorio Nacional PlanTECC, y al “Programa de Capacitación y Extensionismo Rural 2021” de la Secretaría de Desarrollo Rural (SADER) por el apoyo otorgado para realizar la presente investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abdul Halim N., Ramasamy S., Tan B. C., Khalid, N. & Yaacob, J. S. 2018. *In vitro* shoot regeneration and analysis of biochemical, antioxidant and anticancer properties of *Ananas comosus* var. MD2. Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences. 14(2): 263-268. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v14n2.900>

Aragón C., Carvalho L., González, J., Escalona M. & Amancio S. 2012. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. Plant Cell Reports. 31: 757-769. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1195-7>

Aynew B., Tadesse T., Gebremariam E., Mengesha A. & Tefera W. 2021. Efficient use of temporary immersion bioreactor (TIB) on pineapple (*Ananas comosus* L.) multiplication and rooting ability. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2(4): 2456-2465.

Bello-Bello J. J. & Spinoso-Castillo J. L. 2023. Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*. 16(30): 1e-14e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>

Blanco F. H. A., Vargas Cedeño T. E. & De García E. C. 2017. Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 19(1): 7–20. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65561>

Chávez-García J. A., Andrade-Rodríguez M., Bello-Bello J. J., Rueda-Barrientos M. C., Guillén-Sánchez D. & Sainz-Aispuro M. D. J. 2020. Nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro* de ápices de gladiolo. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 43(4-A): 557-557. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4-A.557>

Da Silva R. L., Ferreira C. F., Da Silva Ledo C. A., De Souza E. H., Da Silva P. H., De Carvalho Costa M. A. P. & Souza F. V. D. 2016. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 127(1): 123-133. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1035-0>

FAO. 2020. Análisis del mercado de las principales frutas tropicales de 2019. Italia. <http://www.fao.org/3/cb0834es/CB0834ES.pdf>. (consultado Febrero 17, 2023).

Hamad A. H. M., Taha R. M. & Mohajer S. 2013. *In vitro* induction and proliferation of adventitious roots in pineapple (*Ananas comosus* L.) cultivars of Smooth Cayenne and Morris. *Australian Journal of Crop Science*. 7(7): 1038-1045.

Harahap F., Diningrat D. S., Poerwanto R., Nasution N. E. A. & Hasibuan R. F. M. 2019. *In vitro* callus induction on Sipahutar pineapple (*Ananas comosus* L.) from North Sumatra Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22(11), 518-526. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.518.526>

Hossain F. 2016. World pineapple production: An overview. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 16(4): 11443–11456. <https://doi.org/10.18697/ajfand.76.15620>

Ibrahim M. A., Al-Taha H. & Seheem, A. A. 2013. Effect of cytokinin type and concentration, and source of explant on shoot multiplication of pineapple plant (*Ananas comosus* 'Queen') *in vitro*. *Acta Agriculturae Slovenica*. 101(1): 15.

Khan S., Nasib A. & Bushra A. S. 2004. Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pakistan Journal of Botany*. 36: 611-615.

Lakho M. A., Jatoi M. A., Solangi N., Abul-Soad A. A., Qazi M. A. & Abdi G. 2023. Optimizing *in vitro* nutrient and *ex vitro* soil mediums-driven responses for

multiplication, rooting, and acclimatization of pineapple. *Scientific Reports*. 13(1): 1275. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28359-9>

Medina R. A. M., Mosquera H. R. & Aguilar M. C. L. 2014. Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de tres cultivares de piña *Ananas comosus* (L. Merr.) del Chocó, Colombia. *Revista Biodiversidad Neotropical*. 4(2): 133-140.

Mhatre M., Srinivas L. & Ganapathi T. R. 2011. Enhanced iron and zinc accumulation in genetically engineered pineapple plants using soybean ferritin gene. *Biological Trace Element Research*. 144: 1219-1228. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9092-z>

Murashige T. & Skoog F. 1962. A Revised Medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nelson B. J., Asare P. A. & Junior R. A. 2015. *In vitro* growth and multiplication of pineapple under different duration of sterilization and different concentrations of benzylaminopurine and sucrose. *Biotechnology*. 14(1): 35-40. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28359-9>

Pineda A., Vargas T. E., Escala M. & De García, E. 2012. Organogénesis *in vitro* en piña española roja y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro*. 24(3): 175-186. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612012000300003&lng=es&tlng=es.

Reinhardt D. H. R., Bartholomew D. P., Souza F. V. D., Pinto de Carvalho A. C. P., Pereira de Pádua T. R., Junghans D. T. & Pires de Matos A. 2018. Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 40: 6. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018302>

SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017 – 2030, Piña. México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257084/Potencial-Pi_a.pdf. (consultado Febrero 20, 2023).

Scherer R. F., Garcia A. C., De Freitas Fraga H. P., Dal Vesco L. L., Steinmacher D. A., & Guerra M. P. 2013. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*. 151: 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.027>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (Versión 2021), Cierre de la Producción Agropecuaria. México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (consultado Febrero 20, 2023).

Sripaoraya S., Marchant R., Power J. B. & Davey M. R. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 39: 450-454. <https://doi.org/10.1079/IVP2003445>

Sulaiman S., Yusuf N.A. & Asmah A. 2020. Effect of plant growth regulators on *in vitro* culture of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) MD2 variety. *Food Research*. 4: 110-114. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(S5\).017](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(S5).017)

Suárez P. I. E. 2020. Cultivo de Tejidos Vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp 47-49, 57-70. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>

Thalip A. A., Tong P. S. & Ng C. 2015. The MD2 'super sweet' pineapple (*Ananas comosus*). *UTAR Agriculture Science Journal (UASJ)*. 1(4): 14-17.

Usman I. S., Abdulmalik M. M., Sani L. A. & Muhammad A. N. 2013. Development of an efficient protocol for micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. smooth cayenne). *African Journal of Agricultural Research*. 8(18): 2053-2056. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1763>

Zuraida A. R., Shahnadz A. N., Harteeni A., Roowi S., Radziah C. C. & Sreeramanan S. 2011. A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. *African Journal of Biotechnology*. 10(19): 3859-3866. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1349>