

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC**

“Regeneración *in vitro* y micropropagación de dos variedades comerciales de piña *Ananas comosus* (L.) MERR., en la región de la Cuenca del Papaloapan México”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

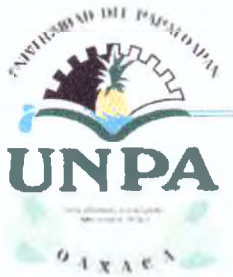
PRESENTA:

JUAN ALBERTO FRANCISCO RODRÍGUEZ

Director: Dr. Enrique Villalobos Amador

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA.

2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 27 de agosto de 2019 a las 10 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Regeneración *in vitro* y micropropagación de dos variedades comerciales de piña *Ananas comosus* (L.) MERR., en la región de la Cuenca del Papaloapan, México**" presentada por el alumno **Juan Alberto Francisco Rodríguez**, con número de matrícula 10090009, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 27 de agosto de 2019

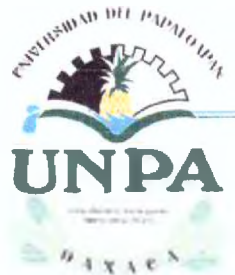
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dr. Paul Sánchez Ocampo
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Edgar Bardonar Sepúlveda García
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 28 de agosto de 2019
Oficio No. JCIB/004/08/2019

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Juan Alberto Francisco Rodríguez** titulado "**Regeneración *in vitro* y micropropagación de dos variedades comerciales de piña *Ananas comosus* (L.) MERR., en la región de la Cuenca del Papaloapan, México**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Sánchez Ocampo (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar García López (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



EFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú*



Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan
VICE-RECTORIA
ACADEMICA

c.c.p. Dr. Enrique Villalobos Amador, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Juan Alberto Francisco Rodríguez, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

DEDICATORIAS

A **dios** por darme la vida y permitir cumplir este logro en mi vida

A mi padre **Filiberto Francisco Rangel** por todo su esfuerzo para completar esta meta en mi vida, por su apoyo incondicional y por creer en mí, Te quiero mucho.

A mi madre **Nicefora Rodríguez Luria** por su apoyo incondicional, por alentarme a estudiar y hacerme creer que puedo lograr lo que me proponga.

A mi esposa **Esbeydi Huerta Andrade** por su apoyo incondicional y por darme animo en todo momento.

A mi bebe **Axel Gabriel Francisco Huerta** por llegar a mi vida y por ser mi pequeño motorcito que me impulsa a seguir a delante Te amo hijo.

A mis hermano **Carlos Erick Francisco Rodríguez** por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Enrique Villalobos Amador** por asesorarme en el transcurso de la realización de este trabajo, por su tiempo, dedicación y paciencia, por sus comentarios y observaciones que llevaron a la mejora y terminación de este trabajo.

A mi comité revisor por sus observaciones para la mejora de este trabajo: **Dra. Jacqueline Capataz Tafur Dr. Paul Sánchez Arellano, Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda, Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia** y Dr. Edgar García López.

A todos mis profesores, por la gran labor del día a día para pulir mis conocimientos, por su paciencia y dedicación a la enseñanza educativa, nunca cambien.

A todos mis compañeros de clases, por formar parte de esta meta en mi vida.

Al Apoyo a la incorporación de nuevos proyectos **PTC.PROMED/103.5/10/5489**.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Descripción botánica	3
2.2. El tallo.....	3
2.3. La hoja	4
2.4. La raíz	5
2.5. El péndulo y la inflorescencia.....	6
2.6. La flor.....	6
2.7. La fruta	7
2.8. Variedades de piña.....	8
2.9. Taxonomía.....	9
2.10. Origen y distribución de <i>A. comosus</i> (L.) Merr.....	10
2.11. Importancia económica de <i>A. comosus</i> (L.) Merr	10
2.12. Otros usos.....	13
2.13. Estatus genómico	13
2.14. Propagación vegetativa de <i>A. comosus</i> (L.) Merr.....	14
2.15. La biotecnología vegetal: el cultivo de tejidos y órganos vegetales	14
2.16. Tipos de respuesta morfogénicas en el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales	18
2.17. Tejido calloso, caulogénesis	18
2.18. Organogénesis.....	19
2.19. Embriogénesis somática.....	20
2.20. Rizogénesis	22
2.21. Aplicaciones del cultivo de células, tejidos y órganos vegetales CCTOV	22
2.22. La ingeniería genética: OMGs y proteínas recombinantes	23
2.23. Producción de metabolitos secundarios	23

2.24.	Micropropagación	24
2.24.1.	Etapa 0: selección de la planta madre	24
2.24.2.	Etapa 1: establecimiento del cultivo	24
2.24.3.	Etapa 2: multiplicación	25
2.24.4.	Etapa 3: enraizamiento	25
2.24.5.	Etapa 4: aclimatación	25
3.	ANTECEDENTES	26
4.	JUSTIFICACIÓN.....	28
5.	HIPÓTESIS	29
6.	OBJETIVOS	30
6.1.	Objetivo principal	30
6.2.	Objetivos secundarios	30
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1.	Diseño experimental	31
7.2.	Obtención del material vegetativo.....	31
7.3.	Manejo del material vegetativo	32
7.4.	Desinfección del explante	32
7.5.	Medio de cultivo.....	33
7.6.	Multiplicación a partir de yemas.....	33
7.7.	Regeneración <i>in vitro</i> a partir de hoja.....	35
7.8.	Enraizamiento	36
7.9.	Aclimatación.....	36
7.10.	Establecimiento en campo	37
7.11.	Floración.....	37
8.	RESULTADOS	38
8.1.	Etapa de establecimiento bajo condiciones <i>in vitro</i>	38
8.1.1.	Evaluación de la contaminación y supervivencia de yemas.....	38
8.1.2.	Evaluación del rompimiento de la dormancia apical	42
8.2.	Etapa de propagación	44
8.3.	Regeneración <i>in vitro</i> a partir de hoja.....	50
8.4.	Elongación y enraizamiento <i>in vitro</i>	56
8.5.	Aclimatación.....	58
8.6.	Fase de campo y floración.....	59
8.7.	Fructificación.....	60

9.	DISCUSIÓN.....	64
9.1.	Fase de establecimiento.....	64
9.2.	Fase de propagación de yemas.....	65
9.3.	Regeneración a partir de hoja.....	66
9.4.	Enraizamiento <i>in vitro</i>	68
9.6.	Establecimiento en campo, floración y fructificación.....	69
10.	CONCLUSIONES.....	72
11.	PERSPECTIVAS.....	73
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	74
13.	ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- La piña (<i>A. comosus</i>)	3
Figura 2.- Tallo de la planta de piña.....	4
Figura 3.- La hoja.....	5
Figura 4.- Raiz.....	6
Figura 5.- Flor de piña.	7
Figura 6.- Morfología de la fruta de piña.	7
Figura 7. Mayores productores de piña (<i>A. comosus</i>) en el mundo.....	11
Figura 8.- Distribución mundial de piña <i>A. comosus</i> (L.) Merr.....	11
Figura 9.- Productos derivados de la fruta de piña <i>A. comosus</i> (L.) Merr.....	12
Figura 10. Principales productores de piña en México.....	13
Figura 11.- Tipo de respuesta general al uso de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)	17
Figura 12.- Proceso general de la morfogénesis bajo condiciones in vitro.	18
Figura 13.- Etapas de la embriogénesis somática en zanahoria <i>Daucus carota</i>	21
Figura 14.- Segmentos de hoja para la inducción a morfogénesis	35
Figura 15.- Proceso de desinfección de la piña (<i>A. comosus</i>).	39
Figura 16. Efecto de los diferentes agentes desinfectantes en la variedad Cayena lisa.	40
Figura 17. Efecto de los diferentes agentes desinfectantes en la variedad MD-2.	42
Figura 18. Días de rompimiento de latencia.	43
Figura 19.- Rompimiento de latencia de piña (<i>A. comosus</i>)	44
Figura 20. Capacidad de formación de brotes (CFB) para la variedad Cayena lisa.....	45
Figura 21. No. de brotes a los 4 subcultivos para la variedad Cayena lisa	46
Figura 22. Capacidad de formación de brotes (CFB) a los 4 subcultivos para la variedad MD-2	48
Figura 23. No. de brotes a los 4 subcultivos para la variedad Cayena lisa	49
Figura 24.- Etapa de propagación de piña (<i>A. comosus</i>).....	50
Figura 25.- Respuestas morfogenéticas a partir de hoja en la variedad Cayena lisa.....	52
Figura 26. Porcentaje de respuesta de los diferentes tratamientos de la variedad Cayena lisa.....	53
Figura 27.- Respuesta morfogenéticas en la variedad MD-2.....	54
Figura 28.- Porcentaje de respuesta de los diferentes tratamientos de la variedad Cayena lisa.....	55
Figura 29. Porcentajes de rizogénesis de los diferentes tratamientos para la variedad A. Variedad Cayena lisa. B. Variedad MD-2.....	57
Figura 30.- Proceso de aclimatación de piña (<i>A. comosus</i>).....	58
Figura 31.- Inflorescencia de las variedades de piña (<i>A. comosus</i>).....	60
Figura 32.- Frutos de piña (<i>A. comosus</i>).....	61
Figura 33.- Extracto del jugo de piña de las dos variedades de piña (<i>A. comosus</i>)	62
Figura 34.- Propágulos obtenidos de manera natural en campo de las variedades de piña (<i>A. comosus</i>). A, Cayena lisa; B, MD-2.....	62
Figura 35.- Diagrama de regeneración y micropropagación de las variedades Cayena lisa y MD-2	71
Figura 36.- Respuesta de discos de cortes longitudinales de la corona de piña.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de los Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).....	16
Tabla 2.- Tratamientos usados para la desinfección de las dos variedades de piña (<i>A. comosus</i>).....	32
Tabla 3.- Tratamientos evaluados en la proliferación de yemas de las variedades de piña (<i>A. comosus</i>)..	33
Tabla 4.- Tratamientos para la evaluación de las respuestas morfogénicas de las variedades de piña (<i>A. comosus</i>).	35
Tabla 5.- Tratamientos para la inducción de la rizogénesis de las variedades de piña (<i>A. comosus</i>).....	36
Tabla 6. Capacidad de formación de brotes (CFB) y tasa geométrica de CFB para la variedad Cayena lisa.	44
Tabla 7. Número de brotes por subcultivo y tasa geométrica de propagación para la variedad Cayena lisa	46
Tabla 8.- Capacidad de formación de brotes (CFB) y tasa geométrica de CFB para la variedad MD-2	47
Tabla 9.- Número de brotes por subcultivo y tasa geométrica de propagación para la variedad Cayena lisa.	48
Tabla 10. Peso y °Brix de los frutos obtenidos de las plantas in vitro de las variedades de piña (<i>A. comosus</i>) Cayena lisa y MD-2	61

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4- Diclofenoxiacético
2,iP	6- (γ , γ - Dimetilalilo aminopurina)
6-KT	Cinetina
ABA	Ácido abscísico
AC	Carbón Activado
AG3	Ácido giberélico
AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido 3-indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
Cl _(g)	Cloro gaseoso
CaClO	Hipoclorito de Calcio
CCTOV	Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales
CFB	Capacidad de Formación de Brotes
CFB _f	CFB subsecuentes en el subcultivo
CFB _i	CFB en el subcultivo previo
Cm	Centimetro
FAOstat	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramo
Ha	Hectárea
HCl	Ácido clorhídrico
H	Horas
Kg	kilogramo
N	Normal
mg/L	Miligramo por litro
NaClO	Hipoclorito de Sodio

NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₄	Nitrato de Amonio
Picloram	Ácido 4-amino-3, 5,6-tricloropocolinico
P.s.i.	Libra por pulgada cuadrada
r	Tasa geométrica de propagación
rCFB	Tasa geométrica de CFB
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
t	Intervalo de tiempo entre los subcultivos
TDZ	Thidiazuron
TD	Tratamiento de Desinfección
TEE	Tratamiento de Elongación y Enraizamiento
TRH	Tratamiento de Regeneración de Hoja
TP	Tratamiento de Propagación
Ton	Tonelada
V _f	Número de brotes subsecuentes en el subcultivo
V _i	Número de brotes en el subcultivo previo
Z	Zeatina

RESUMEN

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr., es la especie más importante de la familia Bromeliaceae. En nuestro país la piña alcanza rendimientos muy bajos, además, la tasa de multiplicación es muy baja y se obtiene un número limitado de propágulos en forma natural en campo, lo cual restringe la plantación a gran escala o plantar nuevas áreas de cultivo, además, puede presentar un alto riesgo de propagar enfermedades virales, bacterianas y fúngicas de generación en generación. Por lo cual, es de gran importancia contar con un método de propagación que no dependa del material vegetativo que esté destinado a la producción en campo, que sea rápido y eficaz, aséptico, semi-automatizado y escalable. Por lo cual, el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales, representa una alternativa para la solución de este problema.

En el presente estudio tuvo como objetivo encontrar un protocolo para el establecimiento del cultivo in vitro de piña variedad Cayena lisa y MD-2 y su regeneración a partir de hojas, así como evaluar la fase de aclimatación, adaptación a campo y fructificación para la Cuenca del Papaloapan México. El mejor tratamiento de desinfección fue utilizando Cámara de gas de cloro por 2.5 para ambas variedades con una reducción del 94 % de contaminación. El Hipoclorito de calcio (CaClO) al 1 % el mejor tratamiento para ambas variedades con 11 y 14 días para la variedad Cayena lisa y MD-2, respectivamente para el rompimiento de latencia. Para la fase de propagación se utilizó BAP a una concentración de 3 mg/L en medio líquido y semi-sólido, donde se observó que para ambas variedades la CFB fue en aumento, no así su tasa geométrica. La tasa de propagación en ambas variedades fue en aumento así como su tasa geométrica de propagación. Para la regeneración a partir de hoja, se evaluaron diferentes RCV, donde se obtuvieron los tres tipos de respuesta morfogénicas; caulogénesis, organogénesis y rizogénesis en las dos variedades, obteniendo embriones somáticos directos e indirectos y organogénesis directa. La fase de enraizamiento los tratamientos mostraron un 100% de generación de raíz, para ambas variedades, así como la fase de aclimatación. Se midieron los °Brix y peso (kg) de los frutos obtenidos con 13.9 y 14.43 °Brix para la variedad Cayena lisa y MD-2 respectivamente y 1.41 y 1.27 kg para la variedad Cayena lisa y MD-2 respectivamente.

Palabras clave: Piña, Micropropagación, Regeneración a partir de hoja.

ABSTRACT

The pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. is the most important species of the Bromeliaceae family. In our country the pineapple reaches very low yields, in addition, the multiplication rate is very low and a limited number of propagules are obtained naturally in the field, which restricts large-scale planting or planting new cultivation areas. It can present a high risk of spreading viral, bacterial and fungal diseases from generation to generation. Therefore, it is of great importance to have a propagation method that does not depend on the vegetative material that is intended for field production, which is fast and efficient, aseptic, semi-automated and scalable. Therefore, the cultivation of cells, tissues and plant organs represents an alternative for the solution of this problem.

The objective of this study was to find a protocol for the establishment of in vitro cultivation of pineapple variety Cayenne Lisa and MD-2 and its regeneration from leaves, as well as to evaluate the phase of acclimatization, adaptation to field and fructification for the basin of the Papaloapan Mexico. The best disinfection treatment was using Chlorine Chlorine Gas Chamber for 2.5 for both varieties with a 94% reduction in contamination. Calcium Hypochlorite (CaClO) at 1% the best treatment for both varieties with 11 and 14 days for the variety Cayenne Lisa and MD-2, respectively for the latency break. For the propagation phase BAP was used at a concentration of 3 mg / L in liquid and semi-solid media, where it was observed that for both varieties the CFB was increasing, but not its geometric rate. The propagation rate in both varieties was increasing as well as its geometric rate of propagation. For leaf regeneration, different RCVs were evaluated, where the three morphogenic response types were obtained; caulogenesis, organogenesis and rhizogenesis in the two varieties, obtaining direct and indirect somatic embryos and direct organogenesis. The rooting phase treatments showed 100% root generation, for both varieties, as well as the acclimation phase. The ° Brix and weight (kg) of the fruits obtained were measured with 13.9 and 14.43 ° Brix for the variety Cayenne Lisa and MD-2 respectively and 1.41 and 1.27 kg for the variety Cayenne Lisa and MD-2 respectively.

Key words: Pineapple, Micro propagation, Regeneration from leaf.

1. INTRODUCCIÓN

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr., es la especie más importante de la familia Bromeliaceae (Chao *et al.*, 2007; Collins, 1951a). Esta especie es la tercera fruta tropical más importante en el mundo después del mango y el plátano, ya que se considera una de las más finas y exóticas. Debido a la creciente demanda internacional su producción sigue en aumento principalmente a los diferentes hábitos alimenticios de los consumidores tanto americanos como europeos, que aprecian a esta fruta tropical, destacando en ella su agradable sabor, aroma y su contenido de vitamina C (FAOstat, 2019).

La producción mundial de piña está dominada por el continente Asiático, en donde sobresalen Filipinas, Tailandia e Indonesia, dentro del continente Americano los principales productores son Costa Rica y Brasil. Estos cinco países en su conjunto aportaron en el 2017 el 43.43 % de los 27.4 millones de toneladas producidas, donde México ocupó el décimo lugar con una participación del 3.44 % esto en el año 2017. (FAOstat, 2019).

En México, el cultivo de la piña ocupa aproximadamente una superficie de 42,679 Ha. Las zonas productoras de piña en nuestro país se localizan principalmente en la zona sur, las cuales presentan las características de suelo, humedad y temperatura adecuadas para su óptimo crecimiento. Los principales estados en donde se concentra el 88.68 % de la producción son: Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Nayarit en el 2017 (SIAP, 2019). El estado de Veracruz es el principal productor de piña que contribuye con el 63.99 % de la producción nacional, del cual la principal región productora se ubica en zona del Bajo Papaloapan o Cuenca del Papaloapan y abarca los municipios de Villa Isla, Juan Rodríguez Clara y Villa Azueta (SIAP, 2019).

Con lo que respecta a Oaxaca cuenta con una superficie sembrada 2018 Ha, con una producción anual de 130,436 Ton, en las que el distrito de Tuxtepec aporta anualmente el 73.22 % de toda la producción en el 2017(SIAP, 2019).

En nuestro país la piña alcanza rendimientos de aproximadamente 4.2 Ton/Ha, sin embargo, en comparación con otros países como Panamá e Indonesia, es menor, los cuales superan las 5.2 Ton/Ha y 10.4 Ton/Ha respectivamente (FAOstat, 2019, SIAP, 2019).

La tasa de multiplicación de la piña es muy baja en forma natural (Griffith, 1998), y el tiempo requerido para la fructificación a partir de la siembra de propágulos es cercano a un año (Roostika

y Mariska, 2003). Con la propagación vegetativa en campo se obtiene un número limitado de propágulos, lo cual restringe la plantación a gran escala o de áreas nuevas de cultivo, sin tomar en cuenta que el productor debe destinar un porcentaje como material vegetativo en vez de manejarlo para la producción.

Además, la propagación vegetativa en campo presenta un alto riesgo de propagar enfermedades virales, bacterianas y fúngicas, así como de plagas, principalmente nematodos, de generación en generación debido a que las plantaciones pueden estar infestadas por dichos patógenos (Blanco *et al.*, 2011).

De esta forma, unos de los principales problemas con éste cultivo es el fitosanitario, observándose marchitamiento, pudrición de la base del tallo, como el causado por *Fusarium* spp., que perjudican el cultivo afectando negativamente la producción comercial del fruto (Blanco, 2011; Coppens *et al.*, 1997).

Por lo anterior mencionado, es de gran importancia contar con un método de propagación que no dependa o que sea autónomo al material vegetativo que esté destinado a la producción en campo, que sea rápido y eficaz, aséptico, altamente tecnificado, controlable, semi automatizado y escalable, para la producción a gran escala y de mejor calidad de plantas certificadas que cumplan con los parámetros fitosanitarios, con la finalidad de incrementar tanto el área de superficie plantada como los rendimientos en nuestro país.

En este contexto, la biotecnología vegetal, específicamente el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales, representa una alternativa que puede en algunos casos cumplir con todo lo anteriormente mencionado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Descripción botánica

La *Ananas comosus* es una planta monocotiledónea herbácea perenne cuya inflorescencia da origen a un fruto compuesto llamado "piña". La planta adulta mide de 1 a 2 m de altura y de diámetro. Las principales estructuras morfológicas son el tallo, las hojas, el péndulo, la fruta, la corona, los brotes (gallo, clavo, hijuelo) y las raíces (Figura 1).

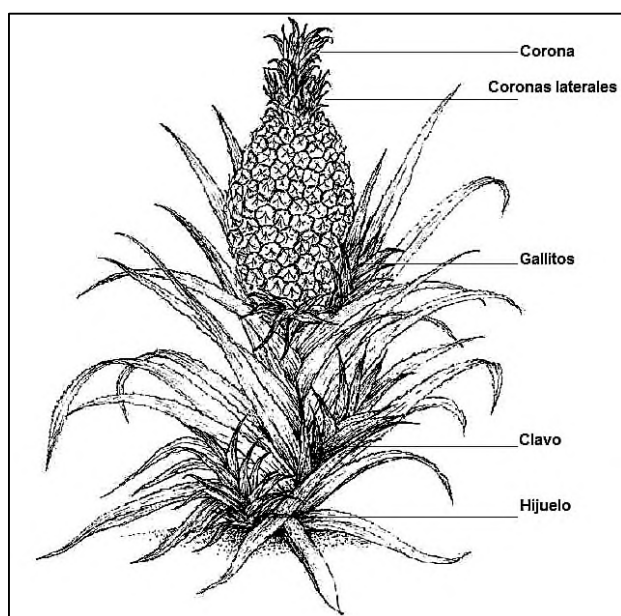


Figura 1.- La piña (*A. comosus*). Bartholomew *et al.*, 2003

2.2. El tallo

El tallo (Figura 2) de la piña tiene una longitud de 25 a 50 cm y un ancho de 2 a 5 cm en la parte de la base, y de 5 a 8 cm en la parte superior. La parte que sobresale del suelo crece en forma recta y firme, mientras que la parte del tallo que está por debajo del suelo, conserva la forma del material vegetativo con el que se inició la plantación (corona, gallo, clavo, hijuelo). Los nudos del tallo se pueden observar retirando las hojas, los entrenudos son muy cortos, 1 a 10 mm según su posición.

Una de las principales características del tallo de la piña es la presencia de raíces adventicias. El tallo está formado por un cilindro central, o estela, y una corteza, separadas por una capa delgada de haces vasculares producidos por el meristemo apical (Kerns *et al.*, 1936).

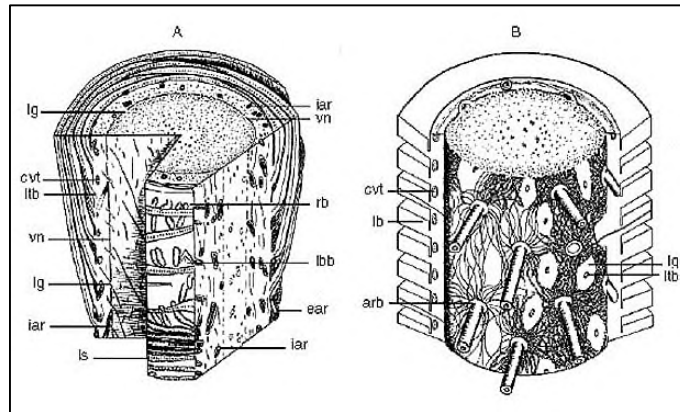


Figura 2.- Tallo de la planta de piña. A). Región central del tallo, con cortes transversales, radiales y tangenciales. Corte de sección tangencial en el límite entre la corteza y la estela. iar, partes internas y externas de raíces adventicias; cvt, banda circunferencial de tejido vascular; vn, red vascular en el límite entre la corteza y la estela; lg, espacio entre hojas; ltb, haz de rastreo de hoja; ls, cicatriz de la hoja; lbb, brote de rama lateral; rb, punta de raíz emergente, comúnmente llamada raíz 'bud'. B). Red vascular en el límite entre la corteza y la estela, y elementos del xilema de las raíces. Arb, base de raíz adventicia; cvt, banda circunferencial de tejido vascular; lb, base de hoja; lg, espacio entre hojas; ltb, paquete de hojas. Krauss, (1948). © The University of Chicago.

2.3. La hoja

Las hojas (Figura 3) de la planta de la piña encierran al tallo en dos tercios de su circunferencia en forma de roseta, el número de hojas depende de cada variedad con un aproximado de 40 a 80 hojas, las cuales pueden alcanzar un tamaño de 1.6 m de largo y 7 cm de ancho. El haz de la hoja es cóncavo de un color verde o un verde oscuro, y en algunas variedades de color rojo oscuro a violeta. El envés de la hoja es de forma convexa, con una superficie corrugada por surcos longitudinales. Las hojas tienen formas lanceoladas y, a excepción de las hojas apicales que son más anchas en la base, presentan una mancha no clorofílica alrededor del tallo (Kerns *et al.*, 1936).

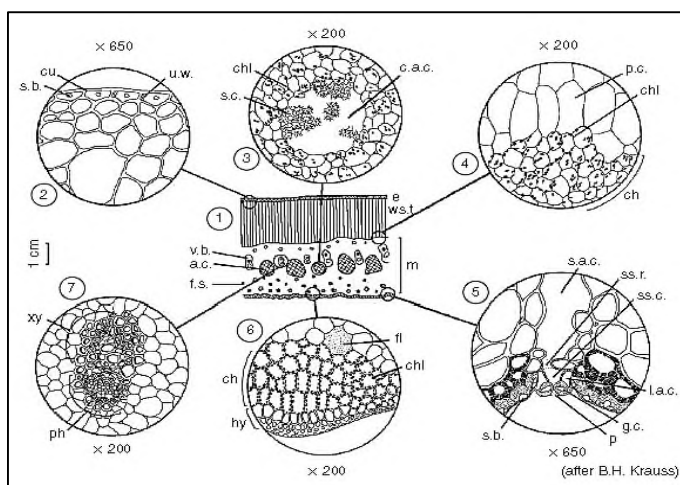


Figura 3.- La hoja. 1). Sección transversal de la hoja, a.c., canal de aireación; f.s., hilo de fibra; e, epidermis; v.b., haz vascular; m, mesófilo; ws.t., tejido de almacenamiento de agua. 2). Epidermis externa que muestra: cu, cutícula; s.b., cuerpo de sílice; u.w., pared ondulada. 3). Canal de aireación que muestra: c.a.c., canal de aireación central; s.c., célula estrellada; chl, cloroplasto. 4). Límite inferior del tejido de almacenamiento de agua que muestra: ch, clorénquima; chl, cloroplasto; p.c., células en empalizada de tejido de almacenamiento de agua. 5). La epidermis inferior muestra: ss.r., anillo subestomática; s.a., canal de aireación secundario; l.a.c., célula accesoria lateral; g.c., celda de guardia; ss.c., cámara subestomática; s.b., cuerpo de sílice; p, poro. 6). Hipodermis y mesófilo que muestran: ch, clorénquima; chl, cloroplasto; fi, fibras; hy, hipodermis. 7). Vaso vascular (mesófilo sin cloroplastos) que muestra: ph, floema; xy, xilema. Py *et al.*, 1987.

2.4. La raíz

La raíz (Figura 4) principal presenta raíces primarias que solo se mantienen cuando la planta es muy joven, por lo que, son reemplazadas por raíces adventicias, las cuales forman un sistema radicular corto y compacto en la base del tallo, con numerosas raíces fuertes y con ramificaciones limitadas. Las raíces de crecimiento lateral pueden llegar a medir de 1 a 2 m y 85 cm de profundidad, las cuales se correlacionan con el peso de la planta. Su anatomía corresponde con las monocotiledóneas: la epidermis con células ciliadas; la corteza formada por la exodermis, la corteza externa, que presenta el esclerénquima y los canales de aireación, la corteza interna, que presenta el parénquima lagunar; la endodermis, el periciclo, los vasos y la médula (Kerns *et al.*, 1936).

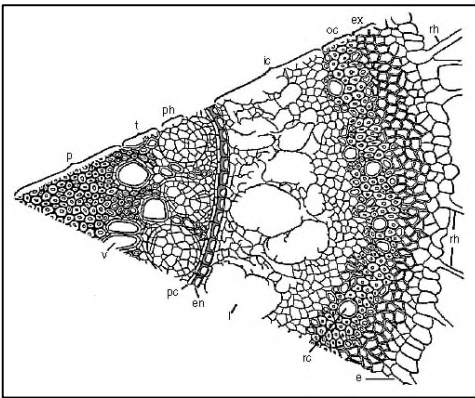


Figura 4.- Sección transversal raíz que muestra: e, epidermis; ex, exodermis; oc, corteza externa con células rafídicas (rc), cuyas paredes transversales se colapsan para formar pasajes aéreos; ic, porción externa de la corteza interna; t, traqueidas; ph, floema; p, médula; v, buque; pc, periciclo; en, endodermis; l, grandes lagunas formadas por el colapso de muchas células de la corteza interna; rh, pelos de raíz. Krauss, 1948. © The University of Chicago.

2.5. El péndulo y la inflorescencia

El péndulo y la inflorescencia se desarrollan a partir del meristemo apical, cuyo tamaño va aumentando hasta el inicio del péndulo, el órgano que sostiene a la inflorescencia. La etapa de inflorescencia se llama “corazón rojo” debido a presencia de las 5 o 7 brácteas rojizas en su base, especialmente en algunas de sus variedades. El péndulo se alarga después de la formación de la inflorescencia y su longitud varía según la variedad. La inflorescencia es continua con el péndulo y con el tallo corto de la corona, la cual consta de al menos 50 a más de 200 flores, y dura un aproximado de 10 a 15 días. Entre la flor superior y la corona hay una región de transición que presenta brácteas ya sin flores (Kerns *et al.*, 1936).

2.6. La flor

Las flores (Figura 5) son hermafroditas y tríferas, con tres sépalos, tres pétalos, seis estambres en dos verticilos de tres y un pistilo tricarpelado. Las anteras son bilobadas. El estilo hueco, trilobulado y trífido es casi tan largo como los pétalos e igual o más largo que los estambres, los pétalos son blancos en su base a violeta azul en su punta, los sépalos son deltoides y se parecen a las brácteas en color y textura.

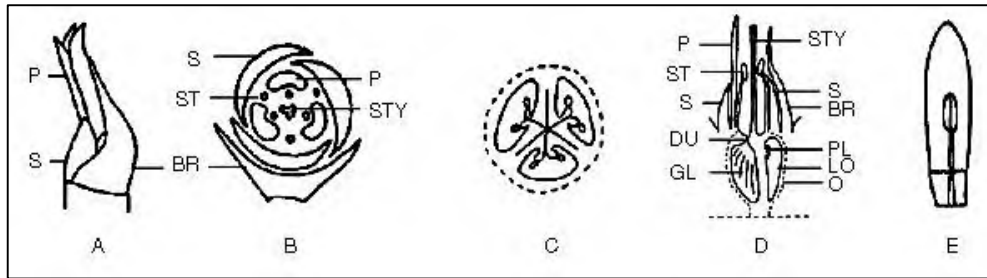


Figura 5.- Flor de piña. A). Diagrama floral. B). Flor y brácteas subyacentes. C). Corte transversal de ovario a nivel de placenta. D). Sección longitudinal. E). Pétalo con escamas y estamen opuesto. Donde se muestra; BR, bráctea subyacente; DU, conducto nectarario; GL, glándula septal; LO, lóculo; O, límite de ovario; P, pétalo; PL, placenta; S, sépalo; ST, estambre; STY, estilo. Okimoto, 1949. © The University of Chicago.

2.7. La fruta

La parte comestible es la fruta, (Figura 6) y consiste principalmente en el carpelo, las bases de sépalos y brácteas, y la corteza del eje de la inflorescencia. La cáscara de la fruta está compuesta principalmente de tejidos de sépalo y bráctea y los ápices de los ovarios (Bartholomew *et al.*, 2003).

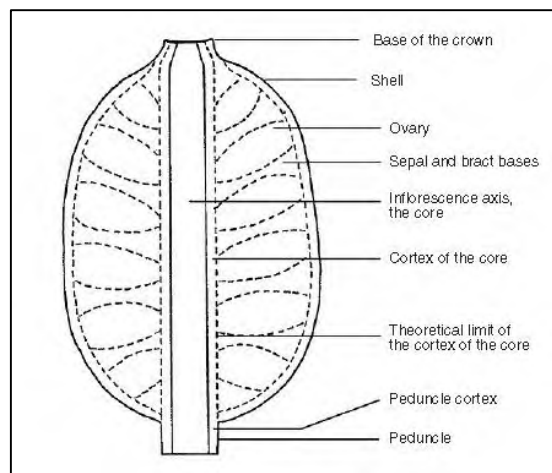


Figura 6.- Morfología de la fruta de piña. Okimoto, 1949. © The University of Chicago.

2.8. Variedades de piña

Las principales variedades de piña sembradas en el mundo son: a) Cayena lisa, b) Singapur español, c) queen, d) española roja, e) perola, f) MD-2 o Honey Golden y g) josapine y manzana (Bartholomew *et al.*, 2003).

a) Cayena Lisa: comúnmente conocida en diferentes países como: Esmeralda, Claire, San Michel, Typhoon y Kew. Su fruta de esta variedad es de forma ovoide con un peso aproximado de 1.5 a 2.5 kg, madura progresivamente, poniéndose amarillo desde la base del fruto hasta la parte superior. Su pulpa es de color amarillo pálido, suave y jugoso, con un contenido de azúcar entre los 13 a 19 °Brix. La planta es de un tamaño que oscila entre los 80 cm y 1 m de largo, con un total de 60 a 80 hojas de un color oscuro con pequeñas espinas que van desde la base hasta la punta. Es resistente a enfermedades tales como: marchitamiento por el piojo harinoso. Su propagación es mediante los hijuelos y gallitos (Figura 1).

b) Singapur española: comúnmente conocida en diferentes países como: Red pine, Nanas merah, Gandul, Betek. Su fruto es de forma cilíndrica de color púrpura oscuro en su fase inicial y volviéndose un color naranja cobrizo ya que madura. Las frutas tienen un peso aproximado de un kilogramo. Su contenido de azúcar es de 10 a 12 °Brix, de un sabor pobre. La planta es de un tamaño de 80 cm a 1 m, con total de hojas de 35 a 70 de un color verde oscuro, de un tamaño de 1.5 m y 5 cm de ancho. Es resistente a *Phytophthora sp.* Su propagación es mediante gallitos (Figura 1)

c) Queen: comúnmente conocida en diferentes países como: Red Ceylon, Victoria, Ripley Queen y Alexandra. Su fruto que oscila entre los 0.5 y 1 kg, con una cáscara amarilla. Su pulpa es de color amarillo dorado y crujiente. Su contenido de azúcar es de 14 a 18 °Brix, con un sabor agradable y larga vida de anaquel. La planta oscila entre los 60 a 80 cm, con hojas plateadas pequeñas y con grandes espinas que van desde la base hasta la punta. Su propagación es mediante gallitos y brotes, Figura 1.

d) Española roja: comúnmente conocida en diferentes países como: Negro Español, Key Largo, Havana, Bull Head, Cumanesa y Cowboy. Su fruta es de forma de barril de color naranja, su pulpa

es firme, pálida, aromática y dulce. Su peso aproximado es de 1.2 a 2 kg. Su contenido de azúcar es de 12 °Brix con baja acidez. La planta es de un tamaño mediano, con hojas espinosas de color verde oscuro. Es resistente a altas temperaturas, sequía, pudrición y *Phytophthora sp.* Su propagación es mediante hijuelos y gallitos (Figura 1).

e) Perola: su fruto es de forma ovoide a cónica, de color verde, con un poco de amarillo en el centro. Su pulpa es suave, blanca y jugosa. Su peso aproximado es de 0.9 a 1.6 kg. Su contenido de azúcar es de 13 a 16 °Brix. La planta es de tamaño mediano y vigoroso, con hojas verde oscuro con espinas a lo largo de ellas. Resistente a *Phytophthora sp.* Su propagación es mediante gallitos, Figura 1.

f) MD-2: comúnmente conocida en diferentes países como: Golden Ripe, Extra Sweet y CO-2. Su fruto es de forma cilíndrica de un color naranja-amarillo. Dicha variedad fue desarrollada por del Monte Fresh Produce Hawái Inc. Su pulpa es de color amarilla clara, es dulce, compacta y fibrosa. Su peso aproximado es de 1.3 a 2.5 kg, su contenido de azúcar es de 15 a 17 °Brix. Las hojas son de color verde amarillo con una punta rojiza y son en su mayoría sin espinas. Resistente al oscurecimiento interno. Su propagación es por gallitos y clavos, Figura 1.

2.9. Taxonomía

De acuerdo con el Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM) de la CONABIO (2013), la piña (*Ananas comosus*) se inscribe, taxonómicamente, como sigue:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Bromeliales*

Familia: *Bromeliaceae*

Género: *Ananas*

Especie: *comosus*

Nombre científico: *Ananas comosus* (L.) Merr

2.10. Origen y distribución de *A. comosus* (L.) Merr

Las bromelias (Bromeliaceae) son originarias principalmente de América subtropical y tropical, comprenden aproximadamente 56 géneros y 3000 especies (Luther, 2004). La piña *A. comosus* (L.) Merr es la especie más importante de la familia Bromeliaceae, originaria de un lugar no especificado de Sudamérica (Chao *et al.*, 2007; Collins, 1951b). Los estudios de diversidad sugieren que se originó entre Brasil, norte de Argentina y Paraguay en los bordes meridionales del Amazonas (es decir, la zona de nacimiento de la Cuenca del Plata), desde donde se difundió al curso superior del Amazonas, la zona de Venezuela y las Guayanas.

Su distribución a lo largo del mundo se fue originado debido los viajeros europeos desde la época de Colón, no obstante, fue hasta el año de 1819, cuando la variedad Cayena lisa fue introducida a todas las regiones tropicales y subtropicales por Perrotet (Perrotet, 1825).

2.11. Importancia económica de *A. comosus* (L.) Merr

La piña es el tercer cultivo más importante en el mundo seguido después de bananas y mango. Aunque se cultiva en todos los países tropicales y subtropicales, sobre todo entre 30°N y 30°S (Nakasone y Paull, 1998).

De acuerdo con las estadísticas (FAOstat, 2019) Organización para la Agricultura y la Alimentación (<http://apps.fao.org>), la producción de piña mundial aumentó de 3, 831,533 toneladas (Ton) en el año de 1961, a 27,402,956 Ton en el 2017. De los cuales los cinco países con mayor producción son: Costa rica (3,056,445 Ton), Filipinas (2,671,711 Ton), Brasil (2,253,897), Tailandia (2,123,177 Ton) y India (1,861,000 Ton) los que contribuyeron con aproximadamente la mitad de la producción mundial en dicho año (Figura 7).

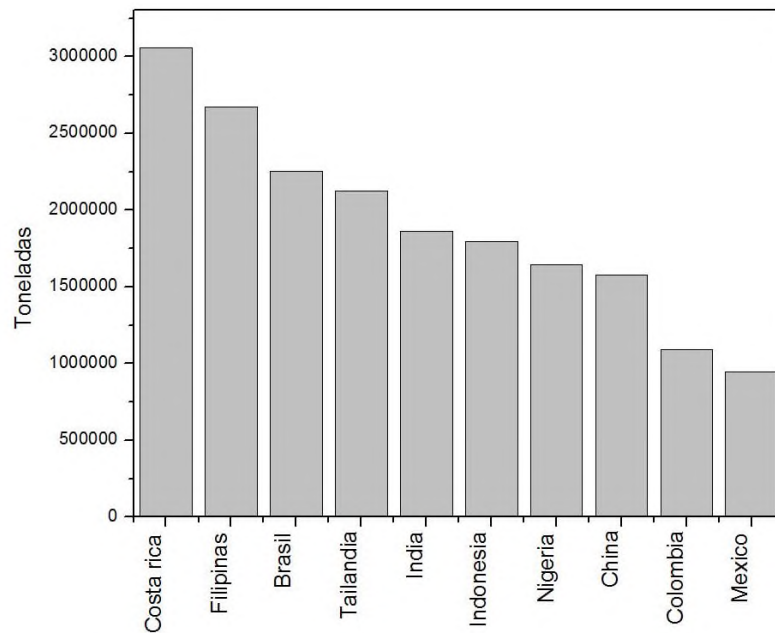


Figura 7. Mayores productores de piña (*A. comosus*) en el mundo. Faostat 2019

Un segundo grupo de productores significativos que incluye a países tales como Nigeria, México, China, Indonesia, Kenya, Colombia, Costa de Marfil, Venezuela, Vietnam, Malasia, Estados Unidos y Sudáfrica aportan aproximadamente un tercio de la producción mundial total (FAOstat, 2019). A continuación, se muestra el mapa de distribución mundial, (Figura. 8).

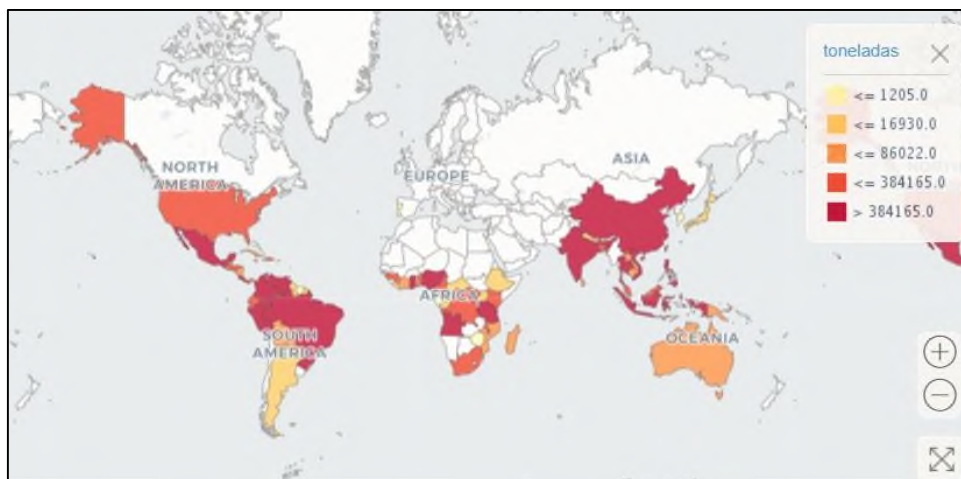


Figura 8.- Distribución mundial de piña *A. comosus* (L.) Merr. Faostat, 2019

Aproximadamente el 70 % de la piña producida es consumida como fruta fresca en el país donde se produce (Loeillet, 1997). El comercio mundial de piña se compone principalmente de productos procesados como rebanadas en lata, trozos frescos cortados, jugos y concentrados de zumos (Figura 9).

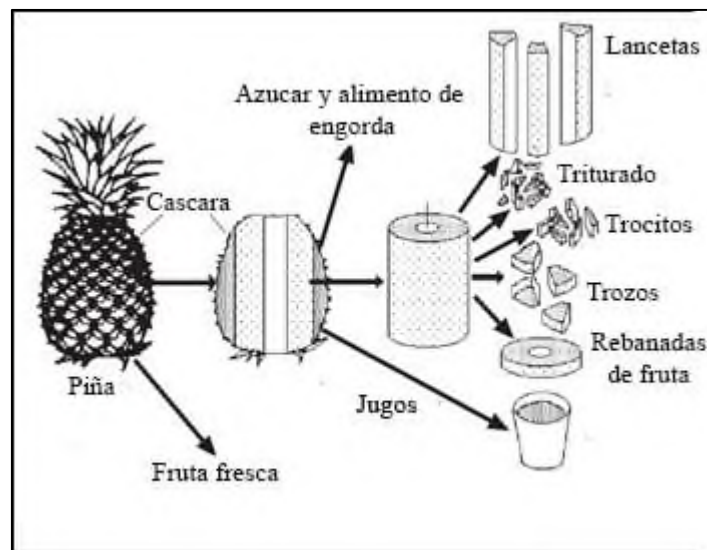


Figura 9.- Productos derivados de la fruta de piña *A. comosus* (L.) Merr. Bartholomew et al., 2003

De lo que respecta a México, el país ocupa el noveno lugar en la producción mundial de piña (FAOstat, 2019), en donde el 70 % es consumida localmente como fruta fresca y 25 % utilizada para la producción de jugos y zumos.

En México, en ése mismo año, se registró una superficie sembrada de 42,679 Ha con una producción de 945210 Ton, valuadas en 3, 965,741.62 de pesos (SIAP, 2019), de las cuales, los tres estados con mayor producción son: Veracruz (604,929 Ton), Oaxaca (130,436.59 Ton) y Tabasco (56,456 Ton), que contribuyeron con aproximadamente el 83% de la producción (SIAP, 2019) (Figura 10).

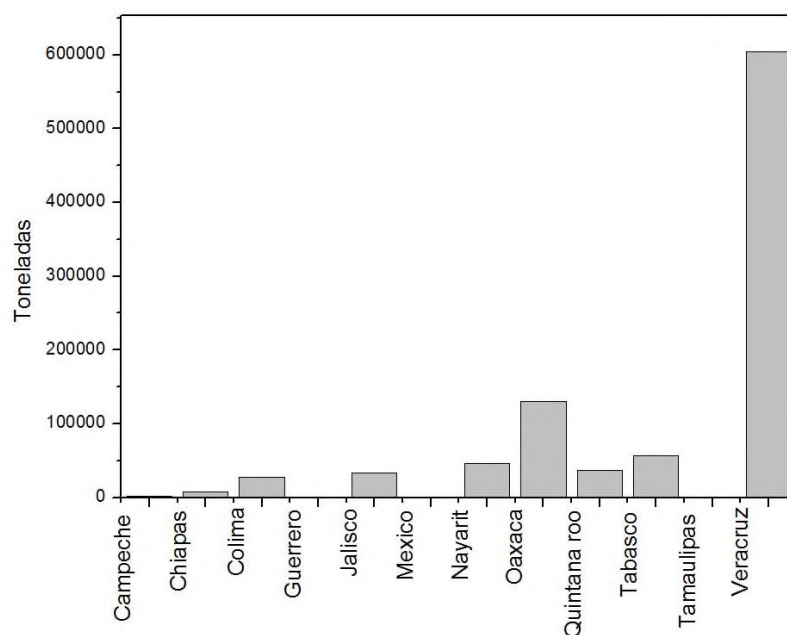


Figura 10. Principales productores de piña en México. Faostat 2019

2.12. Otros usos

Se ha ocupado el jugo de piña en la suplementación dietética, en el cual, se demostró que tenía un efecto en la disminución de la inflamación y neoplasia colónica en ratones (Laura, P. *et al.*, 2010), a partir de la hoja de piña desechada de las cosechas se ha desarrollado textiles naturales para la realización de diferentes productos como zapatos, carteras, blusas, etc.

La producción de metabolitos secundarios (Vilanova *et al.*, 2002) como la bromelina a partir de brotes *in vitro* y la producción de nuevas variedades con nuevas características como la alta producción de licopenos (Firoozabady *et al.*, 2013), son ejemplos de la importancia del cultivo de tejidos en esta planta.

2.13. Estatus genómico

Se han realizado estudios de caracterización funcional del transcriptoma de la fruta de piña (Ong *et al.*, 2012), se ha secuenciado el genoma de la piña de la variedad MD-2 y se han realizado estudios de la evolución fotosintética de dicha planta (Ming *et al.*, 2015), se tiene una base de

datos en línea a través de la NCBI, se ha realizado la secuenciación del genoma del cloroplasto (Nashima K. *et al.*, 2015).

2.14. Propagación vegetativa de *A. comosus* (L.) Merr

La piña tiene una propagación de tipo asexual y para establecer plantaciones nuevas se utilizan los brotes vegetativos que la planta madre emite en forma natural. Dado que la piña es una especie herbácea perenne, basta con proporcionar una sola vez el material vegetativo a un productor, para que él obtenga hijuelos para la siembra de manera indefinida, durante muchos ciclos.

Se clasifican de acuerdo a su posición en la planta. Los hijuelos aparecen en la parte de tierra del tallo. Los clavos aparecen en la parte aérea, son más frecuentes. Los gallitos aparecen en el pedúnculo. A menudo se agrupan cerca de la base de la fruta; como son numerosos en la mayoría de los cultivares, son útiles para la propagación rápida. La corona también se puede utilizar para la siembra cuando se procesa la fruta de la piña. Algunas plantas pueden carecer de una corona o, por el contrario, producir múltiples coronas. También, las coronas axilares pueden crecer en la base de la corona principal (Bartholomew *et al.*, 2003).

La misma planta puede dar una secuencia de varios ciclos de producción. En la mayoría de las plantaciones comerciales, a las plantas no se les permiten producir más de dos o tres cultivos, debido a una reducción en el tamaño del fruto y la uniformidad. Una nueva plantación se debe establecer con regularidad, esto se puede hacer con los mismos brotes laterales de la cosecha anterior, o con otros propágulos vegetativos, tales como la corona de la fruta (Bartholomew *et al.*, 2003).

2.15. La biotecnología vegetal: el cultivo de tejidos y órganos vegetales

Una de las ramas de la biotecnología vegetal de mayor impacto económico es el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales (CCTOV). El CCTOV puede ser enfocado a la propagación artificial de tipo asexual de plantas utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, y consiste en regenerar una planta a partir del cultivo de material vegetal, el cual, a su vez procede de tejido especializado o no

(meristemos). Esto se debe a la totipotencialidad de las células, es decir, la capacidad de diferenciarse/diferenciarse bajo condiciones controladas *in vitro*, regenerar una planta completa a partir de una célula aislada o un tejido vegetal. Todos los cultivos se inician a partir de un inóculo, el cual se denomina explante que puede ser desde una célula, un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta ya sea tallo, hoja, raíz, yemas, flores, anteras u otros (Castillo, 2001; Rojas *et al.*, 2004).

El CCTOV no es una técnica nueva, se originó a partir de los primeros intentos de cultivo *in vitro* hechos por el científico alemán Haberlandt a principios del siglo XX, quien colocó algunas células vegetales aisladas en un cultivo con diferentes azúcares, sales inorgánicas y aminoácidos (Castillo, 2001) y a partir de entonces se han podido desarrollar técnicas y procedimientos para la regeneración de plantas en el laboratorio. El cultivo *in vitro* se realiza de manera aséptica y bajo estrictas condiciones de los factores que intervienen en el desarrollo de la planta como disponibilidad de nutrientes, hormonas, fuentes de carbono y factores abióticos como temperatura, luz, entre otros (Castillo, 2001).

El cultivo *in vitro* da algunas ventajas, una de ellas es el hecho que esta técnica no sólo sirve para micropropagar un cultivo, sino que también proporciona el mantenimiento de plantas libre de patógenos; gracias a ello, comercialmente las plantas producidas mediante esta técnica incrementan su valor. Además, esta técnica es considerada como una técnica de clonación, es decir, se pueden propagar plantas élite con características específicas, las cuales al ser propagadas tradicionalmente por otro método de multiplicación vegetativa o cruces clásicas no permanecerán en la siguiente generación (Estopá, 2005). Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) juegan un papel importante en el desarrollo de la planta *in vitro*, ya que controlan procesos bioquímicos y fisiológicos de la planta, que pueden generar procesos de morfogénesis.

Es importante recalcar el uso de RCV, que son sustancias orgánicas que a bajas concentraciones influyen en los procesos fisiológicos de las plantas, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo de la planta, células o tejidos vegetales. En la Tabla 1 se muestran los principales reguladores de crecimiento vegetal.

Tabla 1.- Clasificación de los Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV). George F. E. *et al.*, 2008

	Nombre	Abreviatura	Actividad
Auxinas	Ácido 3-indolbutírico	AIB	Sintética
	Ácido α -naftalenacético	ANA	Sintética
	Ácido 4-amino-3, 5,6-tricloropocolinico	Picloram	Sintética herbicida
	Ácido 3-indolacético	AIA	Natural
	Ácido 2,4- Diclofenoxiacético	2,4-D	Sintética herbicida
Citocininas	Thidiazuron	TDZ	Sintético
	6-bencilaminopurina	BAP	Sintética
	Cinetina	6-KT	Natural
	Zeatina	Z	Natural
Giberelinas	Ácido giberélico	AG3	Natural
Ácido abscísico	Ácido abscísico	ABA	Natural
Etileno	Etileno	Etileno	

a) Auxinas: son compuestos derivados de triptófano, junto con las citocininas promueven la inducción y establecimiento de callo. Otras de sus funciones son el aumentar el crecimiento de tallos, promover la división celular en el cambium vascular y la diferenciación del xilema secundario, estimular la formación de raíces adventicias, inhibir la elongación de raíces y estimular el desarrollo de frutos y la floración de algunas especies.

b) Citocininas: son compuestos derivados de la adenina y junto con las auxinas promueven la división celular y crecimiento.

c) Giberelinas: el ácido giberélico participan en el rompimiento de la dormancia de semilla y brotes, estimula la elongación de hojas, incrementa el crecimiento de tallo y promueve el desarrollo de los frutos.

d) Ácido abscísico: Participa en procesos del desarrollo y crecimiento, así como en la respuesta adaptativa a estrés tanto de tipo biótico como abiótico

e) Etileno: involucrado en la maduración y abscisión de los frutos, así como la senescencia de hojas y flores.

El uso de RCV en el cultivo de tejidos vegetales, se remonta al año de 1939, cuando Gautheret, Nobecourt y White demostraron que la auxina ácido indolacético estimula la producción de callos indiferenciados en un cultivo y en la década de los 50's Miller y otros científicos descubrieron que el ingrediente activo en la leche de coco y en el extracto de levadura que promovía el crecimiento, a la cual denominaron citocinina. Con esta información se determinó la importancia del balance hormonal. Por lo tanto, Skoog y Miller, reportaron en 1957 que el balance auxina-citocinina era muy importante para el crecimiento de las células en el cultivo (Rojas *et al.*, 2004).

Con niveles relativamente altos de auxinas y niveles relativamente bajos de citocininas, ocurría el crecimiento indiferencial de callo. Por el contrario, niveles relativamente altos de citocinas respecto a auxinas inducían la aparición de ramas diferenciadas. En 1962, Murashige y Skoog publicaron los detalles de un medio distinto con altos niveles de NH_4 , medio que hasta la fecha ha sido utilizado con excelentes resultados en el cultivo de tejidos vegetales (Castillo, 2001; Rojas *et al.*, 2004, Murashige y Skoog, 1962). El uso de un RCV, su concentración y la combinación con otro, dan como resultado una respuesta en la morfología de la planta (Karam *et al.*, 2007). En la Figura 12, se muestra los tipos de respuesta morfogénicas en el balance general del uso de los RCV en cultivo *in vitro*.

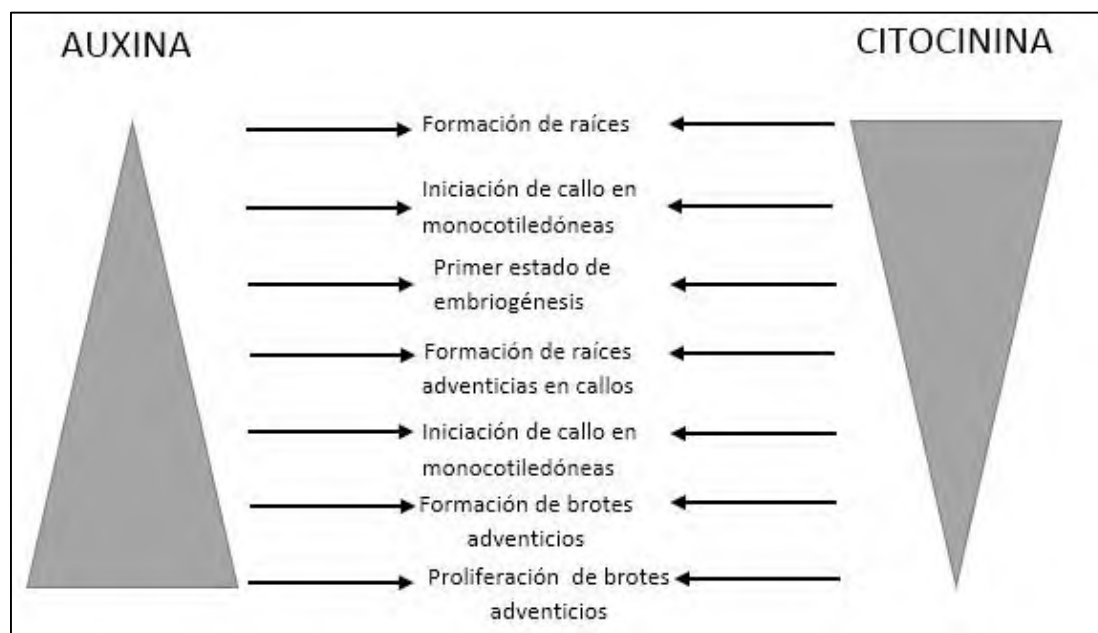


Figura 11.- Tipo de respuesta general al uso de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)
George F. E. *et al.*, 2008

2.16. Tipos de respuesta morfogénicas en el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales

La morfogénesis, *ex vitro* o *in vitro*, del griego morphe, forma y génesis, creación, se define como la formación de órganos y es un fenómeno fundamental de la biología del desarrollo. La morfogénesis puede ser directa a partir de células diferenciadas o indirecta a partir de células no diferenciadas. Sigue dos vías, la organogénesis y la embriogénesis.

La caulogénesis, es un fenómeno de división celular no organizada que genera tejido calloso el cual es un tipo de tejido especial, que se puede inducir bajo condiciones *in vitro*, puede o no sufrir procesos de morfogénesis. En la Figura 13, se muestran los procesos generales de morfogénesis bajo condiciones *in vitro*.

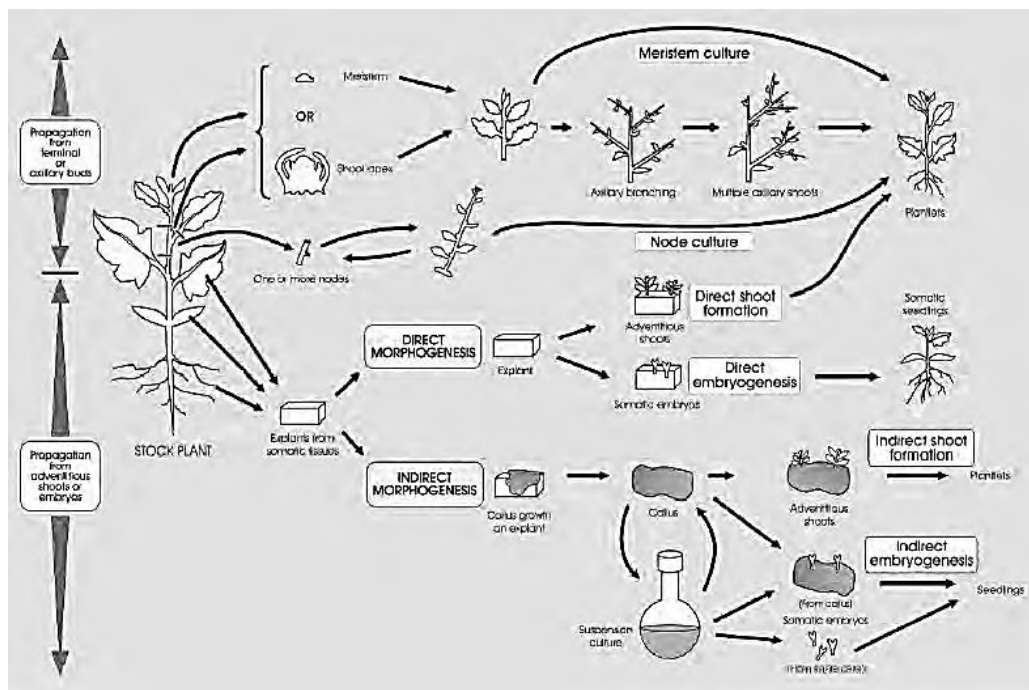


Figura 12.- Proceso general de la morfogénesis bajo condiciones *in vitro*. George F. E. *et al.*, 2008

2.17. Tejido calloso, caulogénesis

La caulogénesis es el tipo de respuesta al cultivo *in vitro* de plantas más generalizado, en la cual no depende de la luz y se obtiene una masa amorfa de células no diferenciadas y de rápida

proliferación a partir del parénquima, el cual es un tejido que mantiene su capacidad de división, se localiza en todos los órganos vegetales, cuyas células están poco especializadas. El parénquima es un tejido meristemático potencial, ya que, bajo ciertas condiciones, las células que lo componen, pueden diferenciarse y retomar su división celular, el cual se emplea para la formación de callos. En condiciones naturales este tejido aparece como un mecanismo de cicatrización cuando se presentan heridas o bien en tumores (agallas) inducidos por algunos organismos Fito patógenos, *Agrobacterium tumefaciens*. La aparición natural de tejido calloso se da como consecuencia de un cambio en los niveles endógenos de reguladores de crecimiento, básicamente auxinas y citocininas. El tejido calloso está compuesto por células que muestran características similares a las del parénquima. Las características del tejido calloso creciendo bajo condiciones *in vitro* dependen de los reguladores de crecimiento utilizados, de la especie y órgano de que fue tomado el explante inicial, el cual puede ser friable (que se disgrega fácilmente) o compacto. El callo friable es el que se utiliza para los procesos de escalamiento en medios de cultivo líquidos de matraz a biorreactores.

Una de las propiedades más importantes del tejido calloso es la llamada friabilidad. Por lo general altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo favorecen la friabilidad del tejido, mientras que la presencia de citocininas tiende a producir tejido que consistencia más dura. La friabilidad es una propiedad deseable cuando se pretende utilizar tejido calloso para iniciar cultivos de células en suspensión, los cuales son empleados principalmente para la obtención de metabolitos secundarios. El callo es muy útil por ejemplo para la obtención de protoplastos, el estudio de mecanismos celulares de respuesta a diferentes tipos de estrés, puede ser un paso intermedio para la regeneración de plantas por las vías de organogénesis y/o embriogénesis somática indirecta (Pérez, 2009). Además, de ser empleado en estudios de diferenciación cloroplástica a diferentes tiempos de exposición a la luz, ya que suelen iniciarse bajo condiciones de oscuridad, por ejemplo, en callo meristemático y embriogénico de maíz (Carvajal *et al.*, 2007).

2.18. Organogénesis

La organogénesis se refiere a la formación de novo de órganos partiendo de tejidos no meristemático cultivados bajo condiciones *in vitro*. Entre los órganos que se pueden formar están

las raíces o los llamados brotes adventicios, los cuales son estructuras muy similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse a formar raíces (Cardoza, 2005).

El fenómeno de la organogénesis se basa en la llamada toti potencialidad celular, es decir, cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa o desempeñar las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal (Cardoza, 2005). Sin embargo, aun cuando en teoría cualquier célula viva que posea núcleo es toti potente, se ha visto que en la realidad no todos los tipos celulares son capaces de desencadenar el proceso de organogénesis. Según Haperin, esta incapacidad para manifestar la toti potencialidad celular se debe a bloqueos que pueden actuar en tres niveles diferentes: a) bloqueo genético: no existe la toti potencialidad celular debido a que se carece de algún factor genético indispensable para que este se manifieste, b) bloqueo epigenético: existe un bloqueo estable, pero reversible, en la expresión de aquellos genes responsables del proceso de organogénesis. De esta forma, aun cuando las señales externas que desencadenan la organogénesis estén presentes, las células son incapaces de responder a ellas, c) bloqueo fisiológico: es el más sencillo de superar y se debe a la falta de las señales apropiadas (hormonas, luz, etc.) para desencadenar el proceso de organogénesis.

La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta cuando primeramente se origina tejido calloso y luego se originan órganos a partir de este (Pérez, 2009). Por ejemplo, la organogénesis directa a partir de explantes cotiledonares de embriones cigóticos de coníferas, de *Pinus maximartinezii* (Villalobos, 2002).

2.19. Embriogénesis somática

Una de las vías de morfogénesis más notables que tiene el CCTOV, es el fenómeno que se denomina embriogénesis somática, paralelo a la embriogénesis cigótica. Los embriones somáticos, estructuras bipolares, al igual que los cigóticos, tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual y por lo tanto clonal.

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa y la indirecta. En la embriogénesis somática directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original. Por otro lado, la embriogénesis somática indirecta, en un primer paso es indispensable obtener un tejido calloso o bien células en suspensión celular embriogénica a partir de la cual se obtendrán la diferenciación de los embriones somáticos. La embriogénesis somática presenta las siguientes etapas: a) Inducción: es el proceso de conversión de una célula somática a una célula pro embriogénica, b) diferenciación: en esta etapa las masas de células pro embriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular simultáneas. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación se requiere la eliminación de las auxinas exógenas. Uno de los fenómenos iniciales en esta etapa es el establecimiento de una polaridad en las masas de células pro embriogénicas. Durante esta etapa los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica, c) Maceración: en esta etapa ocurre la elongación celular, d) germinación: es el proceso de elongación y reactivación de un embrión somático maduro para convertirse en una plántula. Para que esto suceda se requieren estímulos como la luz, el ácido giberélico o citocininas (Pérez, 2009). A continuación, se muestran las etapas de la embriogénesis cigótica en paralelo a la embriogénesis somática, (Figura 14).

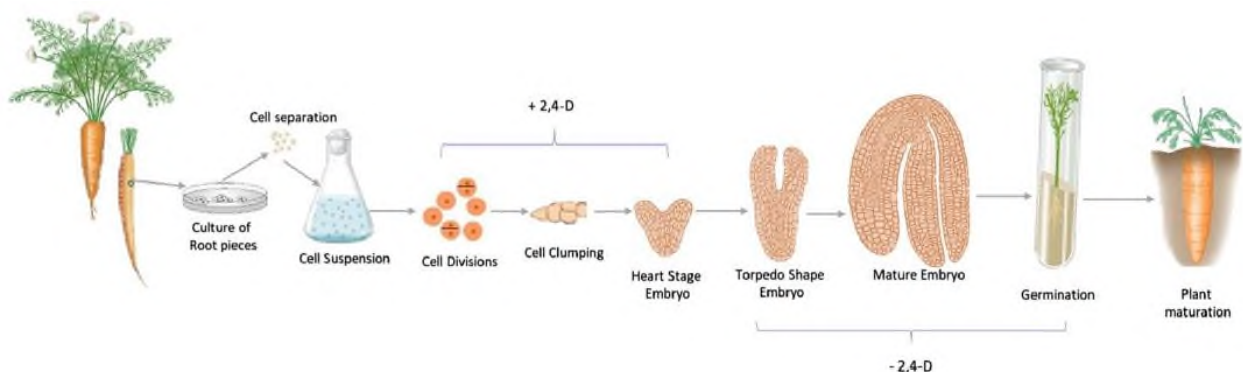


Figura 13.- Etapas de la embriogénesis somática en zanahoria *Daucus carota*. Reinert y Steward *et al.* (1958)

Un ejemplo exitoso de embriogénesis somática directa, es el que se presenta a partir de las hojas de café (Santana *et al.*, 2007), el cual se está llevando a escala comercial actualmente. Otro ejemplo que podría ser de gran impacto económico es la embriogénesis somática de cacao, la

cual se presenta a partir de los estambres estériles de la flor (estaminodios) (Li, 1998, Martínez, 2015).

2.20. Rizogénesis

La raíz es un órgano de sostén muy importante para la supervivencia de la planta, ya que realizarán funciones vitales como la absorción de agua y nutrientes minerales o el almacenamiento de nutrientes y metabolitos secundarios. La raíz, fue el primer órgano vegetal que se logró cultivar bajo condiciones *in vitro*, en chícharo y maíz (Hurtado y Merino, 1987). El cultivo *in vitro* de raíces es sumamente útil en los procesos de producción de metabolitos secundarios (Karuppusamy, 2009) de interés ya que la raíz es un órgano formado por células y tejidos diferenciados capaces de sintetizar o almacenar dichos compuestos, además de presentar tejidos meristemáticos capaces del crecimiento autónomo, las raíces pueden además, ser inducidas con la infección del Fito patógeno *Agrobacterium rhizogenes*, un ejemplo reciente de esto, es el reportado con el barbasco *Dioscorea spp.*, para la obtención de diosgenina (Sánchez, 2018).

Se tiene tres tipos de respuesta en el cultivo de raíces como respuesta a las auxinas: a) las raíces que pueden desarrollarse indefinidamente, requiriendo únicamente del subcultivo apropiado, b) las raíces que crecen y se desarrollan durante periodos variables de tiempo y c) las raíces que hasta el momento no se ha logrado que prosperen, ni siquiera por períodos de tiempo cortos (Pérez, 2009). Un ejemplo de cultivo de raíces con crecimiento autónomo, independiente a las auxinas exógenas, es la raíz pilosa inducida por *A. rhizogenes* en las cactáceas (Palomeque, 2015).

2.21. Aplicaciones del cultivo de células, tejidos y órganos vegetales CCTOV

El CCTOV es en la actualidad una herramienta en una gran cantidad de bioprocesos que van desde la obtención de vacunas (proteínas recombinantes), producción de metabolitos secundarios de interés en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria, la obtención de plantas

genéticamente modificadas, la investigación científica, la obtención de bancos de germoplasma y la micropropagación.

2.22. La ingeniería genética: OMGs y proteínas recombinantes

La ingeniería genética es una herramienta empleada para la introducción de genes foráneos en las plantas, que pueden proporcionarles ventajas como la resistencia a insectos como por ejemplo el maíz Bt que expresa la endotoxina cry de *Bacillus thuringiensis* (Van Rensburg, 2007), a enfermedades virales (Gutiérrez, 1999), fúngicas o bacterianas, tolerancia a herbicidas, a estrés abiótico como la alcalinidad, salinidad (D'Almeida, 2005), temperatura, sequía, inundación (Peña *et al.*, 2011). Además, para introducir nuevas rutas metabólicas, para controlar la maduración y la vida de anaquel de los frutos, o la producción de proteínas recombinantes como vacunas para animales, contra la rabia (Loza *et al.*, 2012).

2.23. Producción de metabolitos secundarios

La producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares es de interés para obtener compuestos difíciles de sintetizar o aislar, lo cual generalmente se relaciona con un alto valor económico, aunque también puede ser útil para ayudar a dilucidar las vías metabólicas involucradas en la síntesis de estos compuestos (Dörnenburg y Knorr, 1995). Uno de los grupos químicos de mayor importancia farmacéutica son los terpenoides, con más de 40 000 ejemplos, como el paclitaxel (taxol) el anticancerígeno descubierto en los años 60's en la corteza de *Taxus brevifolia*, el cual se encuentra en bajo rendimiento en su fuente natural. El cultivo de células vegetales representa una buena fuente de terpenos, ya que actualmente, el suministro del paclitaxel depende de esta tecnología (Vongpaseuth *et al.*, 2007). Otro ejemplo de producción de taxol en cultivo de células en suspensión, es el reportado en *Taxus baccata* (Malik *et al.*, 2011).

2.24. Micropropagación

Se le llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Es un proceso que emplea al fenómeno de morfogénesis en la obtención de plantas completas a partir de una célula, tejido u órgano, el cual se divide en cinco etapas principales, dependiendo del punto de partida o tipo de respuesta (Pérez, 2009). La micropropagación comienza con la selección de tejidos vegetales (explante) de una planta madre sana y vigorosa (Murashige, 1974). Cualquier parte de la planta (hoja, meristemo apical, brote y raíz) puede usarse como explante

2.24.1. Etapa 0: selección de la planta madre

Es una etapa preparativa, en la que se seleccionan y acondicionan las plantas madre de las cuales saldrán los explantes para el cultivo *in vitro*. Puede ser ventajoso tratar la planta (Debergh y Maene, 1981) etapa se suele llevar a cabo en un invernadero y las plantas se tratan con fungicidas de 1 a 4 meses para minimizar las posibilidades de contaminación microbianas (Cassells y Doyle, 2005). Otros tipos de pre tratamientos sirven para cambiar el estado fisiológico de la planta y así favorecer el establecimiento del cultivo *in vitro* como, por ejemplo, el más empleado es la poda para el rejuvenecimiento de los tejidos, los cambios en la temperatura, fotoperiodo, fertilización, aplicación de reguladores de crecimiento (Pérez, 2009).

2.24.2. Etapa 1: establecimiento del cultivo

En esta etapa se realiza la elección del explante y los procesos de asepsia en los tejidos vegetales que se van a cultivar. Para la elección del explante, en general, los órganos jóvenes tienen mejor respuesta *in vitro*. En cuanto a los procesos de asepsia del material vegetal los agentes desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (Tilkat *et al.*, 2009, Marana *et al.*, 2009), el hipoclorito de calcio (García *et al.*, 1999), el etanol (Singh y Gurung, 2009) y el cloruro de mercurio (HgCl₂) (Husain y Anis, 2005). Donde después de un corto periodo de incubación, se descarta cualquier explante o medio que este contaminado (George E. *et al.*, 2008).

2.24.3. Etapa 2: multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel importante sobre la multiplicación de los explantes (Pérez, 2009). Donde la multiplicación se puede realizar a partir de brotes adventicios, embriones somáticos u órganos (George E. *et al.*, 2008).

2.24.4. Etapa 3: enraizamiento

En esta etapa se toman medidas para hacer crecer individuos o grupos de plántulas, capaces de realizar fotosíntesis y la supervivencia sin suministro artificial de carbohidratos (George E. *et al.*, 2008). El enraizamiento se puede lograr separando los brotes y transfiriéndose a un medio de cultivo con mayor concentración de auxinas o carbón activado. Para evitar la oxidación de los cultivos también se puede probar la transferencia de los brotes generados directamente al sustrato con previa aplicación de enraizador comercial y manteniendo el ambiente con alta humedad relativa (Pérez, 2009).

2.24.5. Etapa 4: aclimatación

Consiste en transferir la plántula obtenida *in vitro*, a un nuevo ambiente, generalmente a un invernadero con condiciones adecuadas para superar las dificultades que las plántulas enfrentan al ser retiradas de su medio de cultivo en el laboratorio. Este proceso es crítico, ya que las plántulas que se han producido tienen altas condiciones de humedad y poca intensidad de luz, esto da como resultado que haya menos cera epicuticular o cera con una composición química alterada (Sutter y Langhans, 1979, 1980), además de pasar de un estado heterotrófico a un estado autótrofo (Marin y Gella, 1987).

3. ANTECEDENTES

A lo largo de los años varios autores han reportado diversos estudios para la obtención de cultivos axénicos de piña con fines de micropropagación vía organogénesis y embriogénesis somática. A partir del primer reporte del establecimiento de piña, Aghion y Beauchesne (1960), se presenta el estado del arte sobre la micropropagación y regeneración *in vitro*, así como en el mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades con propiedades especiales a partir de la ingeniería genética.

En la piña se han ocupado diversos tipos de explantes para estudiar el desarrollo y proliferación por vías de morfogénesis *in vitro* con el objetivo de encontrar un método efectivo de propagación rápida. Por ejemplo, se han ocupado como explantes meristemos apicales de brotes ocupando 1 mg/L ANA en la variedad Kew (Lakshmi et al., 1981), ápices de coronas del fruto (Rahman *et al.*, 2001; Atawia A. R. *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2017), discos a partir de tallo las cuales contienen yemas axilares (Poh y Khoon, 1975), yema axilares de las coronas ocupando 1.8 mg/L ANA + 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kn, AC al 25%, 2 mg/L ANA + 2 mg/L BAP, 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L AIA, 2 mg/L ANA + 2 mg/L AIB + 2 mg/L Kn (Soneji *et al.*, 2002^a; Zepeda y Sagawa, 1981; de Wald *et al.*, 1988; Cote *et al.*, 1991; Sriparaya *et al.*, 2003; Bienvenu *et al.*, 2017), hijuelos producidos por la planta (Parveen *et al.*, 2019), se han ocupado hojas obteniendo brotes de manera directa o indirecta mediante la formación de callos ocupando 2.5 mg/L dicamba + 0.5 mg/L BAP y 0.2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L Kn (Daquinta et al., 1994, 1996; García et al., 2000); los callos también se han obtenido a partir de diferentes explantes como sincárprios jóvenes, yemas axilares, coronas y clavos ocupando 10 mg/L ANA + 10 mg/L BAP (Wakasa *et al.*, 1978; Wakasa, 1989), brotes laterales 0.1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP (Liu *et al.*, 1989), de la región basal de brotes de tallos obtenidos *in vitro* ocupando 0.2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L 2iP (Soneji, 2001) y hojas ocupando 0.2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L 2iP (Soneji *et al.*, 2002^b). Se han desarrollado semillas sintéticas a partir de brotes *in vitro* (2-3 mm) (Soneji *et al.*, 2002^c, Gangopadhyay *et al.*, 2005). A partir de ápices, segmentos nodales y tocones inducidos en obscuridad ocupando 1 mg/L ANA + 1 mg/L AG₃ (Pereira *et al.*, 2008). A partir de segmentos nodales (Souza *et al.*, 2018). Se ha evaluado el efecto de la salinidad en la micropropagación (Gomez *et al.*, 2017). Se han realizado estudios

bromatológicos en la caracterización de frutos de plántulas propagadas *in vitro* (Carvajal, 2018). Se han realizados estudios de crio conservación de ápices (Villalobos y Martínez, 2018)

Para aumentar las tasas de propagación se han implementado los sistemas de inmersión temporal (SIT) a partir de callos (Espinosa *et al.*, 2002), secciones longitudinales de brotes, bases de hojas ocupando 0.5 mg/l + 1.5 mg/L BAP (Firazoobady *et al.*, 2003) y sistemas de doble fase (medio sólido-líquido) ocupando 2 mg/L BAP (Pereira *et al.*, 2012), se ha evaluado el uso del ácido giberélico para la multiplicación y el crecimiento ocupando 3.4 mg/L de AG3 (Scherer *et al.*, 2015), se ha evaluado la estabilidad genética de bancos de germoplasmas después de 10 años en conservación *in vitro* (da Silva *et al.*, 2016).

Por otra parte, existen reportes de que la regeneración *in vitro* en piña ha sido empleada con éxito para la obtención de plantas transgénicas, se han utilizado dos técnicas de transformación genética, mediante *A. tumefaciens* y por vía de bombardeo de microproyectiles para la obtención específicamente de plantas tolerantes a herbicidas (Firoozabady *et al.*, 1998, Sripaoraya *et al.*, 2006, Ko, *et al.*, 2006), resistencia a la putrefacción del corazón (Espinosa *et al.* 2002, Ko L. *et al.*, 2013), resistencia a nematodos (Sipes *et al.* 2002), resistencia a hongos (Mhatre *et al.*, 2014), control de la floración (Firoozabady *et al.*, 2006; Trusov y Botella, 2006) y resistencia al marchitamiento por cochinilla (Pérez *et al.*, 2006; Napoles, 2018), se han introducido genes que expresan ferretina de soja (Mhatre *et al.*, 2011).

Se han utilizado genes de piña que confieren altas tasas de expresión para la maduración de tomate y Arabidopsis (Moyle *et al.*, 2014).

En lo que respecta a México, solo existen 2 reportes de cultivos de tejidos en Piña (Hernández, 2003; Garcidueñas, 2013), por lo cual, es necesario el desarrollo de un protocolo biotecnológico adaptado a las condiciones de nuestro de país.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que actualmente en México y en particular en la región del Papaloapan, la propagación vegetativa de la piña se lleva a cabo por métodos convencionales, los cuales pueden no necesariamente garantizar cualquier contingencia ambiental, enfermedad o ataque de plaga, y que éste sea homogéneo, libre de plagas y enfermedades, así como el suministro constante de planta vegetativa durante todo el año, y al hecho de que existe sólo un antecedente en México y ninguno en la región del Papaloapan del establecimiento de cultivo *in vitro* de piña a partir de campo, y ninguno que reporte la aclimatación hasta su fase de campo y fructificación, resulta primordial desarrollar protocolos de micropropagación de las variedades de piña hasta su fase de campo en México adaptados a cada región. Además, los avances en biotecnología vegetal, en específico la generación de transgénicos con nuevas ventajas ante la respuesta a los factores adversos del entorno, en la necesidad de obtención de nuevas variedades de piña, como la "piña rosada" y en la más reciente edición del genoma de especies vegetales de importancia económica, requerirán de procesos eficientes, semi-automatizados y escalados de micropropagación de la piña para la región del Papaloapan México.

5. HIPÓTESIS

El material vegetativo empleado para la propagación convencional de la piña, de las variedades cultivadas en la región de la Cuenca del Papaloapan México, responderá al cultivo *in vitro* por al menos una vía de morfogénesis que conduzca a establecer un protocolo completo de micropropagación hasta su fase de adaptación a campo y fructificación.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo principal

Establecer al menos un protocolo para la micropropagación *in vitro* de brotes y la regeneración de plántulas a partir de hoja, de las variedades de piña Cayena lisa y piña miel MD2 cultivadas en la región de la Cuenca del Papaloapan México, hasta su fase de aclimatación, adaptación a campo y fructificación.

6.2. Objetivos secundarios

1. Establecer cultivos axénicos de tejidos y órganos a partir de las variedades de piña Cayena lisa y piña miel MD-2 cultivadas en la región de la Cuenca del Papaloapan México.
2. Evaluar la regeneración *in vitro* vía morfogénesis de las variedades de piña Cayena lisa y piña miel MD-2.
3. Realizar la micropropagación *in vitro* de las variedades de piña Cayena lisa y piña miel MD-2 hasta sus fases de aclimatación en vivero, fase de campo y fructificación.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, Oaxaca, ubicado geográficamente a una latitud 18°00'50.6"N y una longitud 96°10'12.6"W y en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, ubicado geográficamente a una latitud 21°54'40.6"N y una longitud 102°18'59.3"W.

7.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar analizando un factor a la vez, cuyo modelo es $Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$ (Montgomery, 2004). La unidad experimental fue el explante, donde se realizó 3 réplicas y sin discriminación de los datos. Se determinó si hubo diferencia entre los tratamientos por medio de un análisis de varianza con 95 % de confiabilidad. En el caso donde se presentó diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó la prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer con una confiabilidad del 95 % con el programa Minitab 16, con la finalidad de seleccionar el mejor tratamiento en cada etapa de la micropropagación.

7.2. Obtención del material vegetativo

Se utilizaron como explantes coronas de piña (yemas apicales) de la variedad Cayena lisa y MD-2 provenientes de los productores y comerciantes (vendedores de jugos) del municipio de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Se tomaron como explantes viables aquellas coronas que se cortaron del fruto al momento de la colecta y que no tuvieran algún indicio de pudrición o algún otro tipo de residuo.

7.3. Manejo del material vegetativo

Cada corona de piña se deshojó hasta que quedaron expuestas sus dos hojas más jóvenes, para después realizar la reducción con bisturí hasta quedar un explante de tamaño de 1x1 cm para poder realizar los tratamientos de desinfección.

7.4. Desinfección del explante

Se realizó un pre-tratamiento que consistió en un lavado con detergente (Tween 20) y un bactericida (Microdyn) 5 y 10 gotas por litro respectivamente en agitación constante durante 15 minutos, después se colocaron los explantes en etanol al 70 % por un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Se evaluaron los resultados de desinfección a los 15 días de realizado el inóculo, para después evaluar los diferentes tratamientos de desinfección que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Tratamientos usados para la desinfección de las dos variedades de piña (*A. comosus*).

Tratamiento	Agente desinfectante	Concentración y/o tiempo de exposición
TD1	Hipoclorito de sodio (CLORALEX®)	20 % (v/v) por 20 min
TD2	Hipoclorito de sodio (CLORALEX®)	25 % (v/v) por 20 min
TD3	Hipoclorito de sodio (CLORALEX®)	30 % (v/v) por 20 min
TD4	Hipoclorito de calcio (SIGMA®)	1 % (p/v) por 20 min
TD5	Hipoclorito de calcio (SIGMA®)	3 % (p/v) por 20 min
TD6	Hipoclorito de calcio (SIGMA®)	5 % (p/v) por 20 minutos
TD7	Hipoclorito de sodio (CLORALEX®) + HCl	Cloro gaseoso por 1:00 h
TD8	Hipoclorito de sodio (CLORALEX®) + HCl	Cloro gaseoso por 2:00 h
TD9	Hipoclorito de sodio (CLORALEX®) + HCl	Cloro gaseoso por 2:30 h

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 20 frascos que contenía un explante, cada uno de ellos representó la unidad experimental. Los factores a evaluar fueron: a) % de contaminación b) % de supervivencia c) días de rompimiento de latencia.

7.5. Medio de cultivo

En la campana de flujo laminar se procedió a sembrar cada explante en el medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100 %, adicionado con 30 g/L de sacarosa. El regulador de crecimiento vegetal RCV que se evaluó para el rompimiento de la latencia fue la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 3 mg/L, esto descrito por E. Firoozabady en el 2003, como gelificante se evaluó el Phytigel (SIGMA®) a una concentración de 3 g/L. Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7 con NaOH y/o HCl 1N, según lo requerido. Los recipientes de cultivo fueron frascos de cristal tipo gerber con tapa hermética de polímero. La esterilización de los recipientes de cultivo conteniendo 20 mL del medio se realizó en autoclave eléctrica a 121 °C (1.2 kg/cm²) por 18 min. Las condiciones de incubación para los cultivos fueron de 26 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad.

7.6. Multiplicación a partir de yemas

Se utilizaron como explantes, los brotes apicales que rompieron la dormancia previamente durante la etapa de establecimiento. Se evaluó el efecto del RCV BAP y de la consistencia del medio de cultivo en la tasa de proliferación de yemas, (Tabla 3).

Tabla 3.- Tratamientos evaluados en la proliferación de yemas de las variedades de piña (*A. comosus*)

Tratamiento	RCV	Concentración	Consistencia
TP1	-	-	Sólido
TP2	BAP	3 mg/L	Sólido
TP3	-	-	Líquido
TP4	BAP	3 mg/L	Líquido

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 20 frascos que contenían un explante cada uno, representó la unidad experimental.

Los factores a evaluar fue: a) CFB (Capacidad de Formación de Brotes) b) tasa geométrica de CFB, c) tasa geométrica de propagación (Pulido et al, 1992).

La CFB se determinó mediante la fórmula:

$$CFB = \frac{(\text{Promedio de brotes por explante})(\% \text{ de explantes con brotes})}{100}$$

La tasa geométrica de la CFB se determinó mediante la siguiente formula:

$$r_{CFB} = \left(\sqrt[t]{\left(\frac{CFB_f}{CFB_i} \right)} - 1 \right) \times 100$$

donde:

rCFB: tasa geométrica de CFB

CFB_f: CFB subsecuentes en el subcultivo

CFB_i: CFB en el subcultivo previo

t: intervalo de tiempo entre los subcultivos

LA tasa geométrica de propagación se determinó mediante la siguiente formula:

$$r = \left(\sqrt[t]{\left(\frac{V_f}{V_i} \right)} - 1 \right) \times 100$$

donde:

r: tasa geométrica de propagación

V_f: número de brotes subsecuentes en el subcultivo

V_i: número de brotes en el subcultivo previo

t: intervalo de tiempo entre los subcultivos

7.7. Regeneración *in vitro* a partir de hoja

Para la evaluación de la morfogénesis *in vitro*, se utilizaron como explantes las hojas jóvenes que se originaron durante la etapa de proliferación de las yemas apicales, sembrando segmentos de hoja de 1.5 a 2.0 cm de longitud (el segmento basal, el segmento medio y el segmento terminal). Los segmentos de hoja a evaluar fueron: a) la punta b) medio c) base (Figura. 15), los cuales se sembraron superficialmente en contacto con el medio de cultivo contenido en placas de Petri estériles. El medio basal evaluado fue el MS al 100 % suplementado con diferentes RCV: Picloram, TDZ, 2ip, BAP y 2,4-D, (Tabla 4) Suneerat Sripaoraya *et al.*, (2003). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl 1N, adicionando 3 g/L de Phytigel, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C por 18 min.

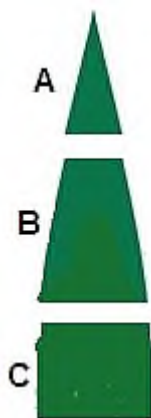


Figura 14.- Segmentos de hoja para la inducción a morfogénesis, A. punta, B medio y C base. (Francisco J., 2019)

Tabla 4.- Tratamientos para la evaluación de las respuestas morfogénicas de las variedades de piña (*A. comosus*).

tratamiento	RCV	concentración	consistencia
TR1	Picloram	3 mg/L	Semisólido
TR2	TDZ	1 mg/L	Semisólido
TR3	2iP + 2,4-D	2 mg/L + 2 mg/L	Semisólido
TR4	BAP + 2,4-D	2 mg/L + 0.5 mg/L	Semisólido
TR5	-	-	Semisólido

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 5 cajas Petri que contenían 4 segmentos de hoja, cada una de ellas representó la unidad experimental. Las variables respuesta evaluar fueron: a) % de caulogénesis b) % de organogénesis c) % de rizogénesis

7.8. Enraizamiento

De los brotes obtenidos de la etapa de multiplicación se procedió a la evaluación de la inducción de la rizogénesis en medio basal MS al 100 % donde se evaluó el efecto del RCV, tipo de gelificante y el carbón activo (AC), se evaluaron los siguientes tratamientos que se muestran en la Tabla 5. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl 1N, adicionando Phytigel a razón de 3 g/l o Agar a razón de 8 g/l, posteriormente se esterilizó en autoclave eléctrica a 121 °C por 18 min.

Tabla 5.- Tratamientos para la inducción de la rizogénesis de las variedades de piña (*A. comosus*)

tratamiento	agente inductor	concentración	consistencia	gelificante
TE1	AC	3 g/L	Semisólido	Phytigel
TE2	AC	3 g/L	Semisólido	Agar
TE3	IBA	1 mg/L	Semisólido	Phytigel
TE4	IBA	1 mg/L	Semisólido	Agar
TE5	-	-	Semisólido	Phytigel

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 20 frascos que contenía un explante cada uno, el cual representó la unidad experimental. El factor a evaluar fue: % de inducción de raíces.

7.9. Aclimatación

A los 30 días después de la inducción de raíces se procedió a la aclimatación de las plantas de piña, considerando plantas viables aquellas que contaran con raíces y una talla de aproximadamente 5 cm. Las plantas se sembraron en almácigos de 50 pocillos con una dimensión de 5 x 5 cm, evaluando el sustrato comercial marca SUNSHINE® Mezcla No. 3 (compuesto por una mezcla de Peat Moss, vermiculita, cal dolomítica, fertilizantes y agentes humectantes). El vivero cuenta con una malla sombra al 70 % de luz. Una vez sembradas las plantas en el almácigo con el sustrato se le realizó una aplicación de riego con agua corriente y un RCV (AIB) a una concentración de 1 mg/L, donde se evaluó el porcentaje de supervivencia.

7.10. Establecimiento en campo

Las plantas que lograron aclimatarse en el vivero, se sembraron en una parcela experimental, de un suelo arcilloso, donde primeramente se realizó el aflojamiento de la tierra realizando surcos dobles en un sistema de 3 bolillos de 80 cm de ancho x 2.5 m de largo, con separación de 40 cm entre cada planta. Previo a la siembra se le aplicó un riego a los surcos con fungicida (alleato® a una concentración de 0.8 g/L). Ya sembradas las plantas se le aplicó fertilizante foliar triple 20 Solucat® a una concentración de 10 g/L, enraizador Raizal® 400 a una concentración de 10 ml/L y micro elementos Folicomplement® a una concentración de 0.1 g/L esto vía foliar, cada 15 días por 2 meses. Pasados los 2 meses se mantuvo aplicando el fungicida cada mes para prevenir una enfermedad causada por hongos.

7.11. Floración

Se esperó un mes antes de la temporada de fríos para aplicar mezcla física triple 17 en la base del tallo cada 15 días por 2 meses, con el objetivo de que la planta estuviera con los nutrientes necesarios para la inducción a la floración de manera natural (Bartholomew *et al.*, 2002).

7.12. Fructificación

A los 12 meses se recolectaron los frutos ya maduros, tomando en cuenta aquellos que no tenían ningún tipo de daño (quemadura por sol, heridas causadas por animales etc.), determinando el peso del fruto y los °Brix.

En la etapa de fructificación se observó la aparición de los diferentes tipos brotes (gallitos, hijuelos y clavos), en el cual se evaluó la cantidad de los diferentes tipos de brotes que tuvo cada planta.

8. RESULTADOS

8.1. Etapa de establecimiento bajo condiciones *in vitro*

8.1.1. Evaluación de la contaminación y supervivencia de yemas

La fase de establecimiento del cultivo bajo condiciones *in vitro* de piña de las variedades comerciales consistió en evaluar una serie de tratamientos centrados en el uso de agentes desinfectantes partiendo de yemas apicales de coronas del fruto.

Se evaluaron 3 agentes desinfectantes hipoclorito de sodio (NaClO) marca Cloralex®, hipoclorito de calcio (CaClO) marca Sigma® y cloro gaseoso. En la Figura 15 se muestra el proceso general del establecimiento del cultivo *in vitro* a partir de las coronas de piña utilizadas como explantes. En la Figura 16 se muestra el efecto de los agentes desinfectantes en la variedad Cayena Lisa, en donde se observó que al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO), disminuye el porcentaje de contaminación de un 80 % a un 23 % (TD1 al TD3), mientras que el porcentaje supervivencia también disminuye, siendo el cambio de un 93 % a un 60 %. En los tratamientos que se utilizaron hipoclorito de calcio (CaClO) (TD4 al TD6) no se observó dicho efecto al incrementar la concentración del desinfectante ya que los porcentajes de contaminación se mantuvieron alrededor del 83 %, sin embargo, la tasa de supervivencia si disminuye de un 90 % a un 73 %. Al aplicar cloro gaseoso (TD7 al TD9) se presentó el menor porcentaje de contaminación, disminuyendo del 38 % al 6 %, al incrementar los tiempos de exposición, afectando el porcentaje de supervivencia de un 20 % al 8 %. Al analizar los resultados estadísticamente, corrobora que los tratamientos TD9, TD3 y TD8 respectivamente, fueron los más eficientes para la desinfección de los explantes, mientras que los tratamientos TD1, TD4, TD2 y TD5 respectivamente, fueron los que presentan mayor tasa de supervivencia para la variedad Cayena Lisa.

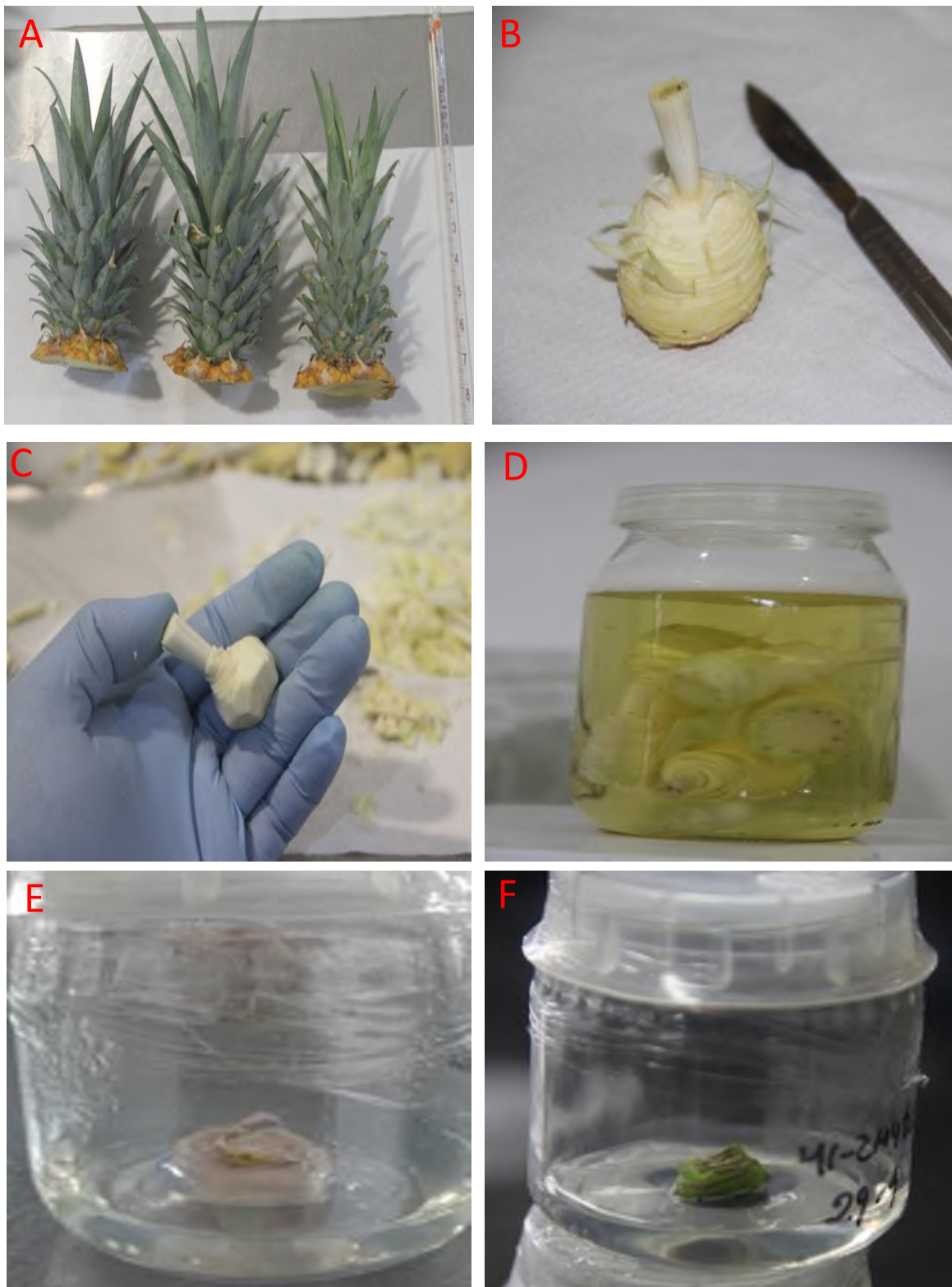


Figura 15.- Proceso de establecimiento del cultivo in vitro de piña (*A. comosus*). A, Coronas de piña (explante); B, deshoje del explante; C, disección del explante; D, desinfección con bactericida; E, aspecto del explante desinfectado; f, aspecto del explante no sobreviviente; G, aspecto del explante sobreviviente.

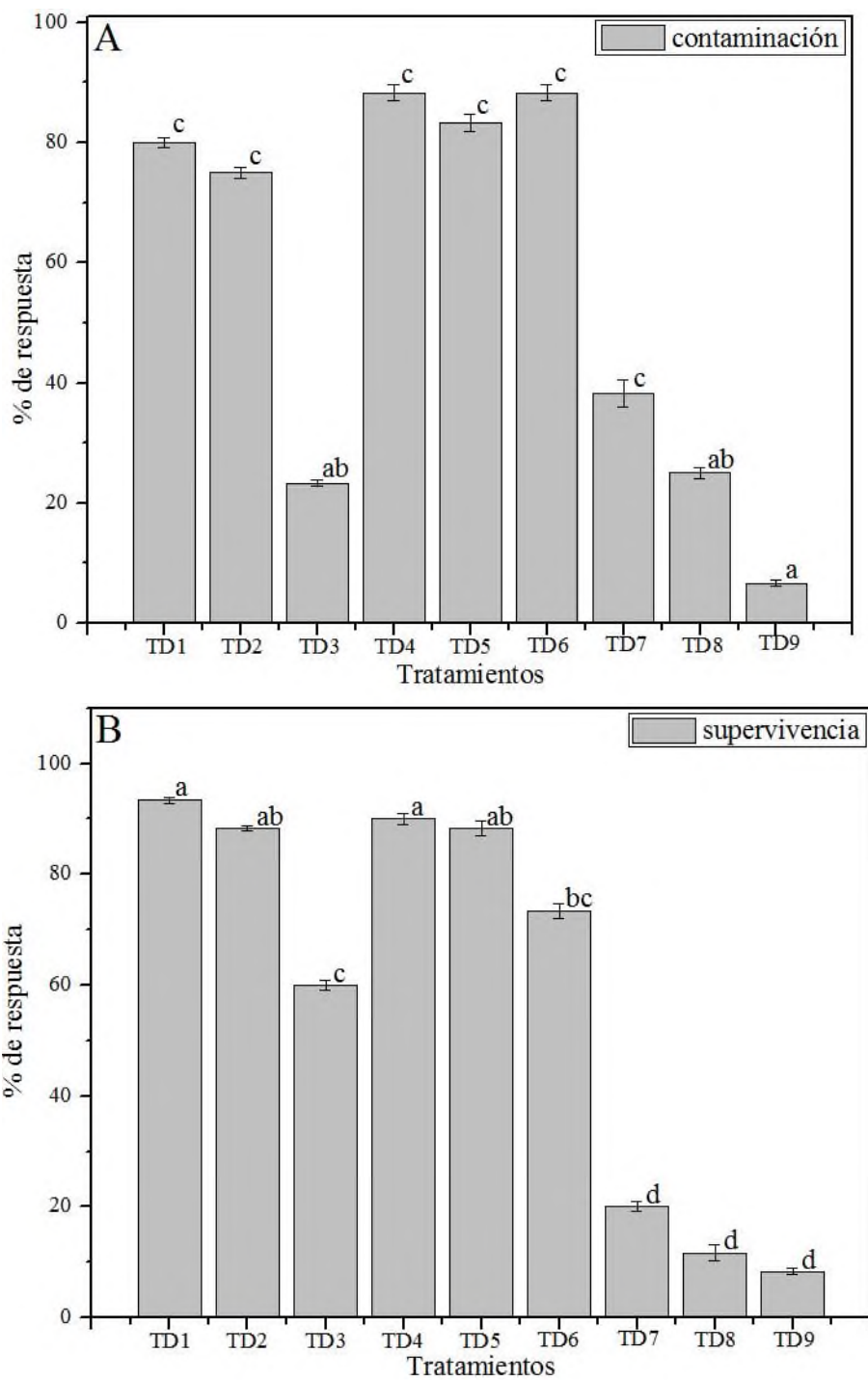
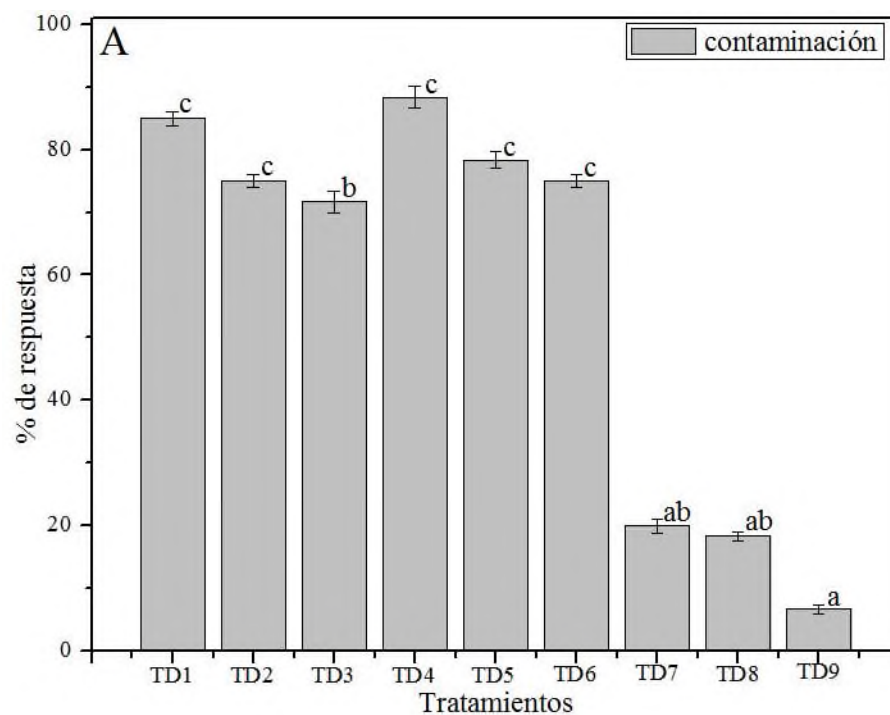


Figura 16. Efecto de los diferentes tratamientos con agentes desinfectantes en la variedad Cayena Lisa. A. Porcentaje de contaminación. B. Porcentaje de supervivencia. TD1, NaClO 20%; TD2, NaClO 25%; TD3, NaClO 30%; TD4, CaClO 1%; TD5, CaClO 3%; TD6, CaClO 5%; TD7, Cl_(g) 1h; TD8, Cl_(g) h; TD9, Cl_(g) 2.5 h

Se observó que para la variedad MD-2 al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO), disminuyeron los porcentajes de contaminación de un 85 % a un 71 %, y de supervivencia de un 33 a 23% (TD1 al TD3). En los tratamientos que se utilizó hipoclorito de calcio (CaClO) (TD4 al TD6) los porcentajes de contaminación y de supervivencia disminuyeron de un 83 % a un 75%, y de un 93 a un 73 %, respectivamente. Al aplicar cloro gaseoso (TD7 al TD9) se presentaron el menor porcentaje de contaminación, disminuyendo progresivamente al incrementar los tiempos de exposición, del 20 % a 6 %, afectando dramáticamente el porcentaje de supervivencia que fue del 20 % al 8 %. Al analizar los resultados estadísticamente, arrojó que los tratamientos TD9, TD8 y TD7, fueron los más eficientes para la desinfección de los explantes. Sin embargo, los tratamientos TD4 y TD5, fueron los tratamientos más viables por presentar el mayor porcentaje de supervivencia. En la Figura 17 se muestra el efecto de los agentes desinfectantes en la variedad MD-2.



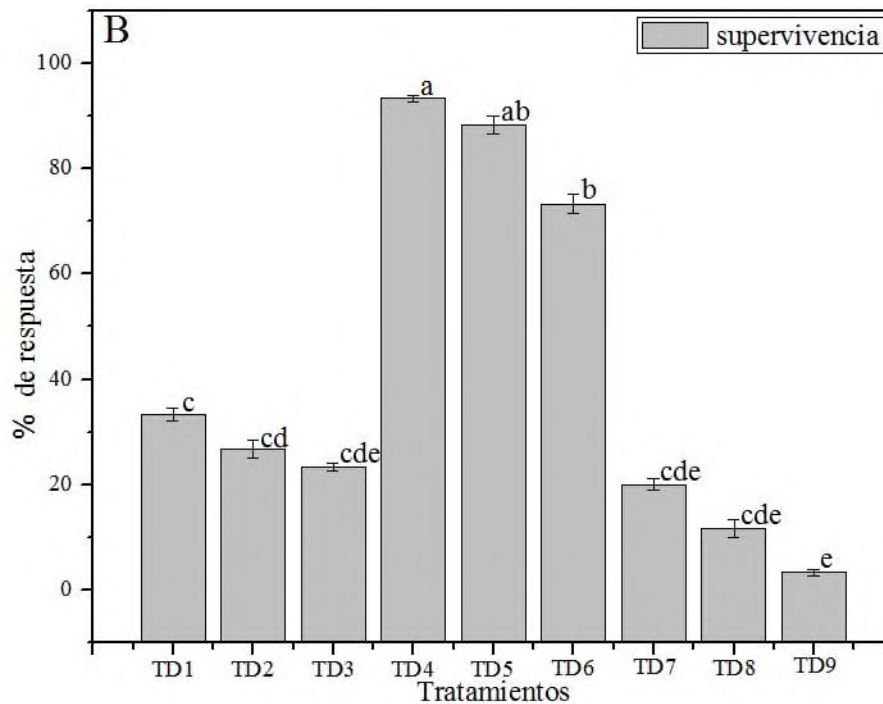


Figura 17. Efecto de los diferentes tratamientos con agentes desinfectantes en la variedad MD-2. A. Porcentaje de contaminación. B. Porcentaje de supervivencia. TD1, NaClO 20%; TD2, NaClO 25%; TD3, NaClO 30%; TD4, CaClO 1%; TD5, CaClO 3%; TD6, CaClO 5%; TD7, Cl_(g) 1h; TD8, Cl_(g) h; TD9, Cl_(g) 2.5 h

8.1.2. Evaluación del rompimiento de la dormancia apical

Con respecto al tiempo observado para el rompimiento de la dormancia de las yemas apicales de las coronas de la piña, éstos variaron según el tratamiento de desinfección (Figuras 18 y 19A). Para la variedad Cayena Lisa, el tiempo observado para el rompimiento de dormancia varió de los 11 días hasta los 42 días, el NaClO presentó un rango de 18 a 30 días, el CaClO de 11 a 20 días y el cloro gaseoso de 22 a 42 días. Al analizar los datos, el tratamiento TL4 (CaClO al 1 %) fue el mejor tratamiento para el rompimiento de la dormancia con 11 días, mientras que el tratamiento TL9 (cloro gaseoso por 2.5 h) fue el que requirió de mayor tiempo para el rompimiento de la dormancia de las yemas, con 42 días. La variedad MD-2 reveló un mayor tiempo para el rompimiento de la dormancia, siendo que el tratamiento TL4 mostró el menor tiempo con 14 días y el tratamiento TL9 requirió de 44 días.

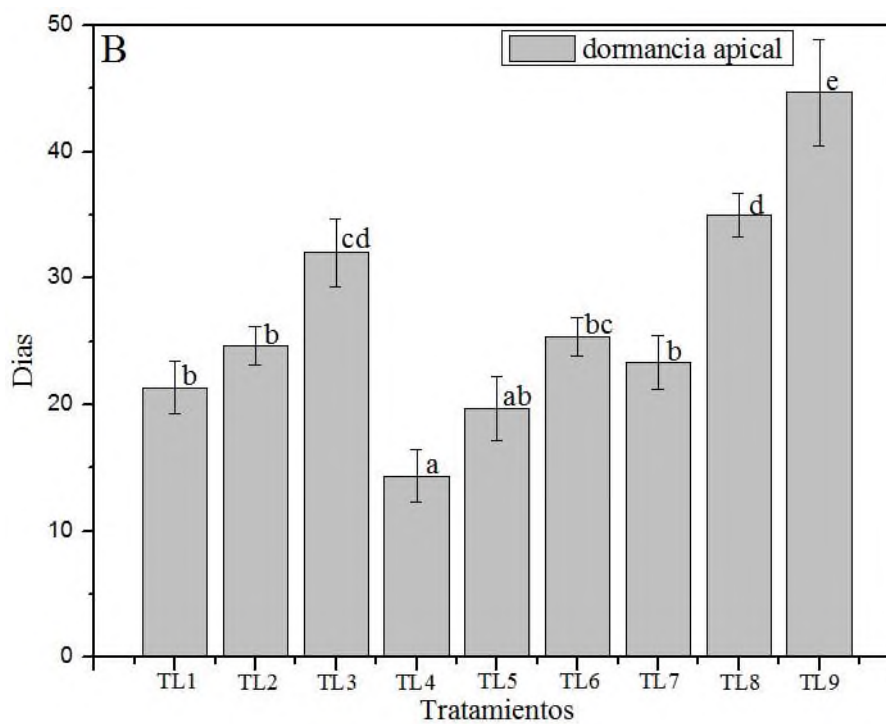
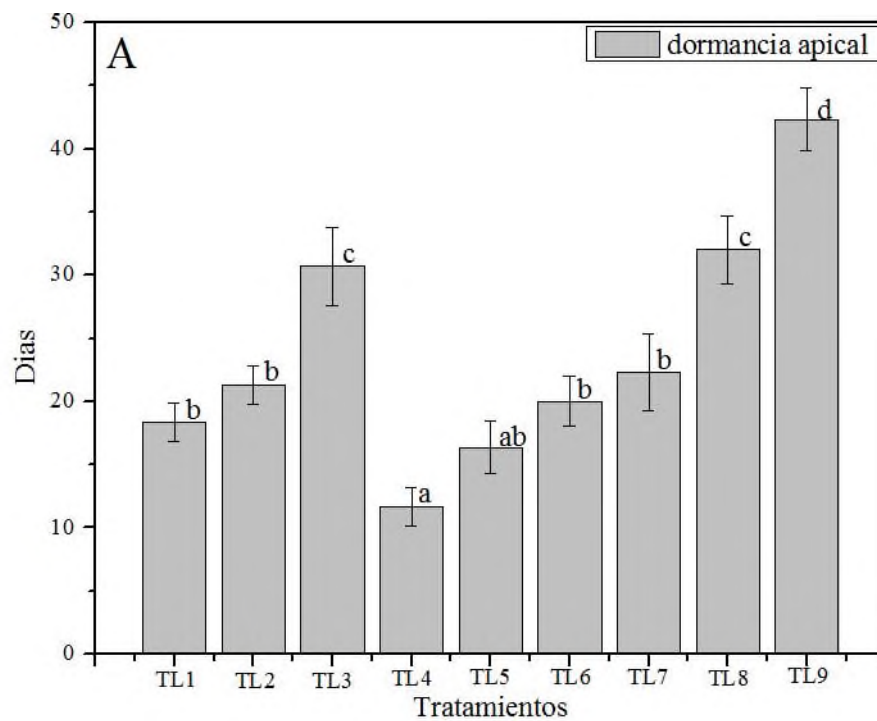


Figura 18. Días de rompimiento de latencia. A. Variedad Cayena Lisa B. Variedad MD-2. TL1, NaClO 20%; TL2, NaClO 25%; TL3, NaClO 30%; TL4, CaClO 1%; TL5, CaClO 3%; TL6, CaClO 5%; TL7, Cl_(g) 1h; TL8, Cl_(g) h; TL9, Cl_(g) 2.5 h

En la Figura 19A se observa un detalle del rompimiento de la dormancia apical de los explantes establecidos de piña.

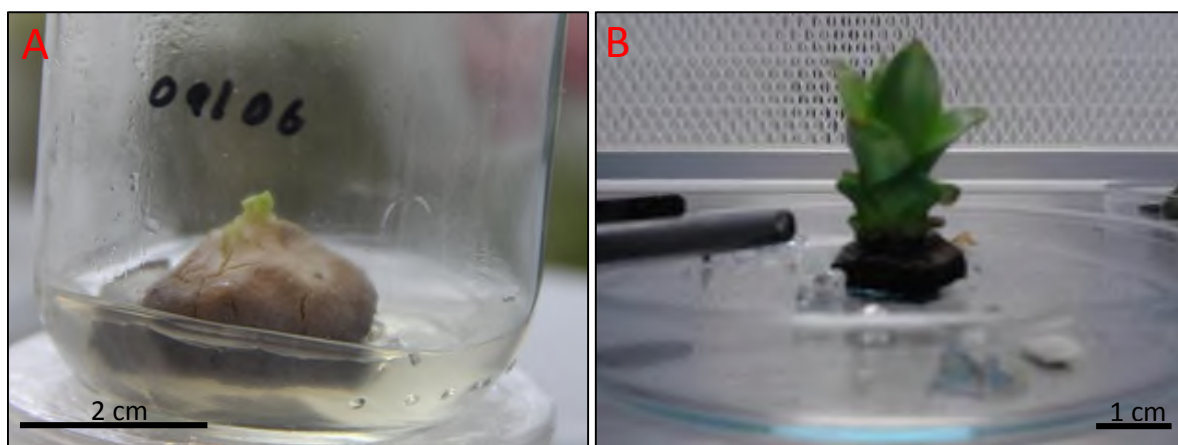


Figura 19.- Aspecto de la supervivencia de los explantes en la etapa del establecimiento *in vitro* de yemas apicales de piña. A. Rompimiento de la dormancia de la yema de piña (*A. comosus*). B. Aspecto del desarrollo inicial *in vitro* de la yema apical.

8.2. Etapa de propagación

En la etapa de propagación se evaluó el efecto de la BAP a una concentración de 3.0 mg/L en medio semi-sólido y líquido para ambas variedades de piña.

En la variedad Cayena Lisa la CFB promedio a los 4 subcultivos fue mayor en medio líquido en comparación al medio de consistencia semi-sólida, mostrando un aumento del 113 % empleando la BAP y del 31 % en medio libre del regulador de crecimiento vegetal RCV. Comparando el efecto del RCV, hubo un aumento del 103 % en la fase sólida y un 231 % en la fase líquida (Tabla 6).

Tabla 6. Capacidad de formación de brotes (CFB) y tasa geométrica de CFB para la variedad Cayena Lisa.

VARIEDAD	CFB POR SUBCULTIVO				TASA GEOMÉTRICA DE CFB		
	S1	S2	S3	S4	S1-S2	S2-S3	S3-S4
Cayena c/RCV – Sol	3.67	4.33	5.33	6.33	0.41	0.52	0.43
Cayena s/ RCV – Sol	1.33	2.33	2.67	3.33	1.41	0.34	0.55
Cayena c/ RCV – Liq	6.67	9.67	12.33	13.33	0.93	0.61	0.20
Cayena s/ RCV – Liq	2.33	2.67	3.67	4.00	0.34	0.80	0.22

c/RCV-sol: con regulador de crecimiento sólido; s/RCV-sol: sin regulador de crecimiento sólido; c/RCV-liq: con regulador de crecimiento líquido; s/RCV-liq: sin regulador de crecimiento líquido

Por otro lado, se aplicó un modelo de regresión (polinómica, logarítmica y lineal) según las curvas obtenidas por cada tratamiento evaluando la CFB (Figura 20).

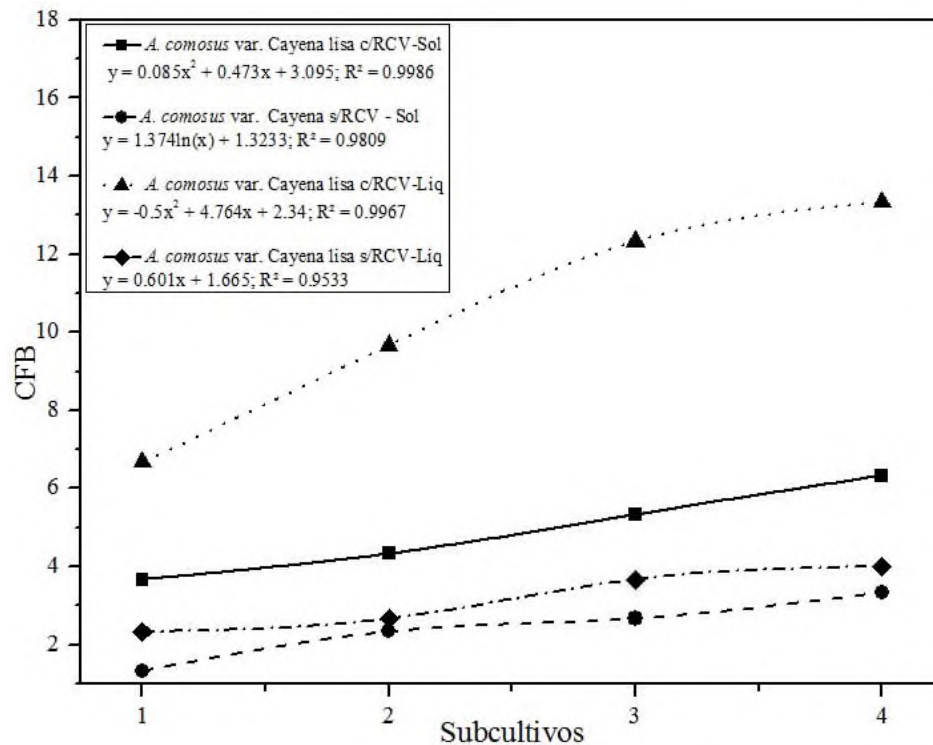


Figura 20. Capacidad de formación de brotes (CFB) para la variedad Cayena Lisa

Los tratamientos para la variedad Cayena Lisa en fase semi-sólida se ajustaron a un modelo potencial y logarítmico, teniendo como resultados la ecuación $y = 0.085x^2 + 0.473x + 3.095$ para el tratamiento con RCV, y $y = 1.374\ln(x) + 1.3233$ para el tratamiento sin RCV. Los tratamientos en fase líquida se ajustaron a un modelo potencial y lineal, teniendo como resultados las siguientes ecuaciones $y = -0.5x^2 + 4.764x + 2.34$ para el tratamiento con RCV y $y = 0.601x + 1.665$ para el tratamiento sin RCV.

Se realizó la estimación del número de plantas por su diferente CFB en los diferentes tratamientos para obtener el número de plantas obtenidas a los 4 subcultivos (Tabla 7), para la variedad Cayena Lisa en medio semi-sólido con RCV a partir de un explante se estima producir hasta 536 brotes, y sin RCV se estimó tan sólo 27 brotes, mientras tanto, en medio líquido empleando RCV se estiman 10, 600 brotes y sin RCV tan sólo 91 brotes.

Tabla 7. Número de brotes por subcultivo y tasa geométrica de propagación para la variedad Cayena Lisa

VARIEDAD	BROTOS POR SUBCULTIVO				TASA GEOMÉTRICA DE PROPAGACIÓN		
	S1	S2	S3	S4	S1-S2	S2-S3	S3-S4
Cayena c/RCV – Sol	3.67	15.89	84.69	536.14	3.73	4.27	4.72
Cayena s/ RCV – Sol	1.33	3.09	8.27	27.55	2.14	2.49	3.05
Cayena c/ RCV – Liq	6.67	64.49	795.27	10600.96	5.84	6.48	6.69
Cayena s/ RCV – Liq	2.33	6.22	22.83	91.32	2.49	3.30	3.53

c/RCV-sol: con regulador de crecimiento sólido; s/RCV-sol: sin regulador de crecimiento sólido; c/RCV-liq: con regulador de crecimiento líquido; s/RCV-liq: sin regulador de crecimiento líquido

Aplicando modelos de regresión a las diferentes curvas obtenidas por el número de brotes (Figura 21), se ajustaron a un modelo polinómico teniendo las diferentes ecuaciones, para la fase semi-sólida con RCV $y = 109.81x^2 - 382.41x + 292.58$ y $y = 4.3774x^2 - 13.503x + 10.99$ sin RCV, para la fase líquida con RCV $y = 2437x^2 - 8933.5x + 6923.3$ y $y = 16.151x^2 - 52.394x + 40.532$ sin RCV.

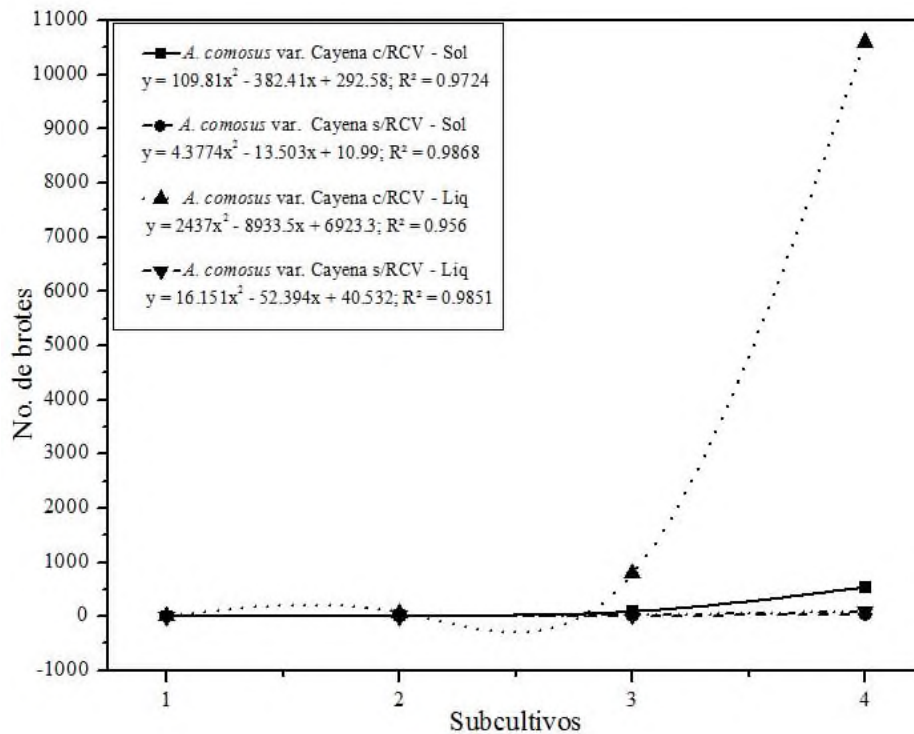


Figura 21. Número de brotes a los 4 subcultivos para la variedad Cayena Lisa

La variedad de piña MD-2 mostró un comportamiento similar que la piña Cayena Lisa, la fase líquida mostró un valor mayor de CFB en comparación con la fase semi-sólida. El incremento se presentó en un 89 % para el control sin RCV, y del 110 % para el tratamiento con RCV. Comparando el efecto del RCV, hay un aumento 139 % en la fase sólida y 165 % en la fase líquida (Tabla 8).

Tabla 8.- Capacidad de formación de brotes (CFB) y tasa geométrica de CFB para la variedad MD-2

VARIEDAD	CFB POR SUBCULTIVO				TASA GEOMÉTRICA DE BROTACIÓN		
	S1	S2	S3	S4	S1-S2	S2-S3	S3-S4
MD-2 c/ RCV – Sol	3.00	3.67	4	5.33	0.51	0.22	0.72
MD-2 s/ RCV – Sol	1.33	1.67	1.67	2	0.57	0.00	0.45
MD-2 c/ RCV – Liq	4.67	7.33	10.33	11.33	1.13	0.86	0.23
MD-2 s/ RCV – Liq	2.67	3	3.33	3.67	0.29	0.26	0.24

c/RCV-sol: con regulador de crecimiento sólido; s/RCV-sol: sin regulador de crecimiento sólido; c/RCV-liq: con regulador de crecimiento líquido; s/RCV-liq: sin regulador de crecimiento líquido

Los modelos de regresión que se ajustaron fueron al potencial y polinómica, cabe mencionar que para cada ajuste se tomó aquel que el factor de correlación (R^2) fuera más cercano a 1.

Los tratamientos para la variedad MD-2 en fase semi-sólida se ajustaron a un modelo polinómico y potencial, teniendo como resultado la ecuación $y = 0.165x^2 - 0.093x + 2.995$ para el tratamiento con RCV, y $y = 1.3368x^{0.2652}$ para el tratamiento sin RCV. La fase líquida se ajustó a un modelo polinómico teniendo como resultado las siguientes ecuaciones $y = -0.415x^2 + 4.373x + 0.595$ para el tratamiento con RCV y $y = 0.0025x^2 + 0.3205x + 2.3475$ para el tratamiento sin RCV (Figura 22).

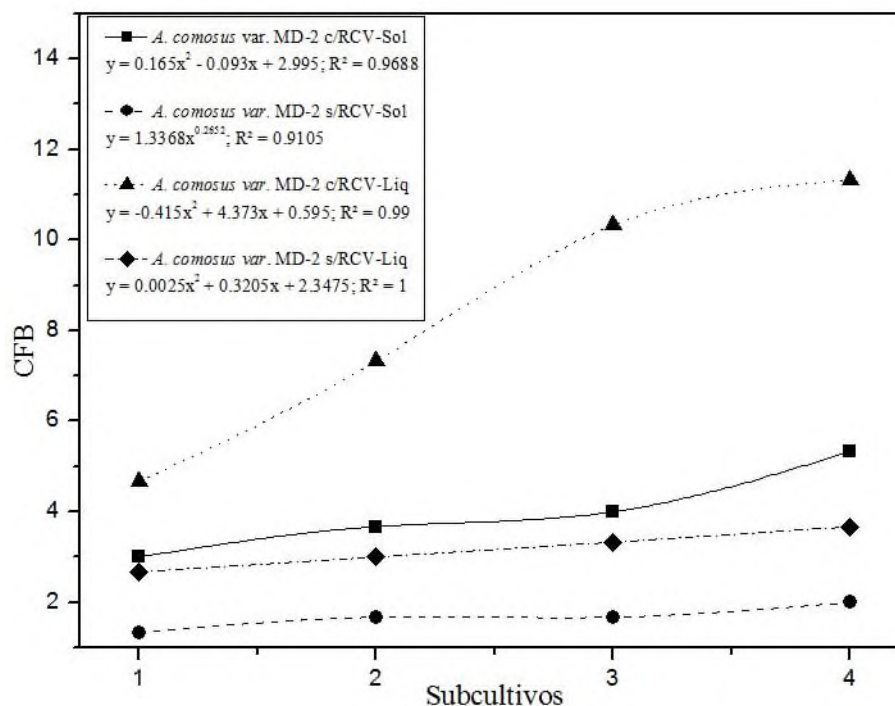


Figura 22. Capacidad de formación de brotes (CFB) a los 4 subcultivos para la variedad MD-2

Se realizó la estimación del número de plantas para los diferentes tratamientos de acuerdo a su CFB a los 4 subcultivos (Tabla 9). En la variedad MD-2, en el medio semi-sólido con RCV a partir de un explante se estiman hasta 234 brotes y sin RCV tan sólo 7 brotes, mientras tanto, en el medio líquido con RCV se estimaron 4006 brotes y sin RCV 97 brotes.

Tabla 9.- Número de brotes por subcultivo y tasa geométrica de propagación para la variedad Cayena lisa.

VARIEDAD	BROTOS POR SUBCULTIVO				TASA GEOMÉTRICA DE MULTIPLICACIÓN		
	S1	S2	S3	S4	S1-S2	S2-S3	S3-S4
Cayena c/RCV – Sol	3.00	11.01	44.04	234.73	3.30	3.53	4.27
Cayena s/ RCV – Sol	1.33	2.22	3.71	7.42	1.29	1.29	1.75
Cayena c/ RCV – Liq	4.67	34.23	353.61	4006.37	5.11	6.01	6.26
Cayena s/ RCV – Liq	2.67	8.01	26.67	97.89	2.78	3.05	3.30

c/RCV-sol: con regulador de crecimiento sólido; s/RCV-sol: sin regulador de crecimiento sólido; c/RCV-liq: con regulador de crecimiento líquido; s/RCV-liq: sin regulador de crecimiento líquido

Aplicando modelos de regresión a las diferentes curvas obtenidas por el No. de brotes (Figura 23), se ajustaron a un modelo polinómico teniendo las diferentes ecuaciones, para la fase semi-sólida con RCV $y = 45.671x^2 - 155.53x + 119.49$ y $y = 0.7045x^2 - 1.5473x + 2.254$ sin RCV, para la fase líquida con RCV $y = 905x^2 - 3296.6x + 2547.6$ y $y = 16.469x^2 - 52.915x + 40.077$ sin RCV.

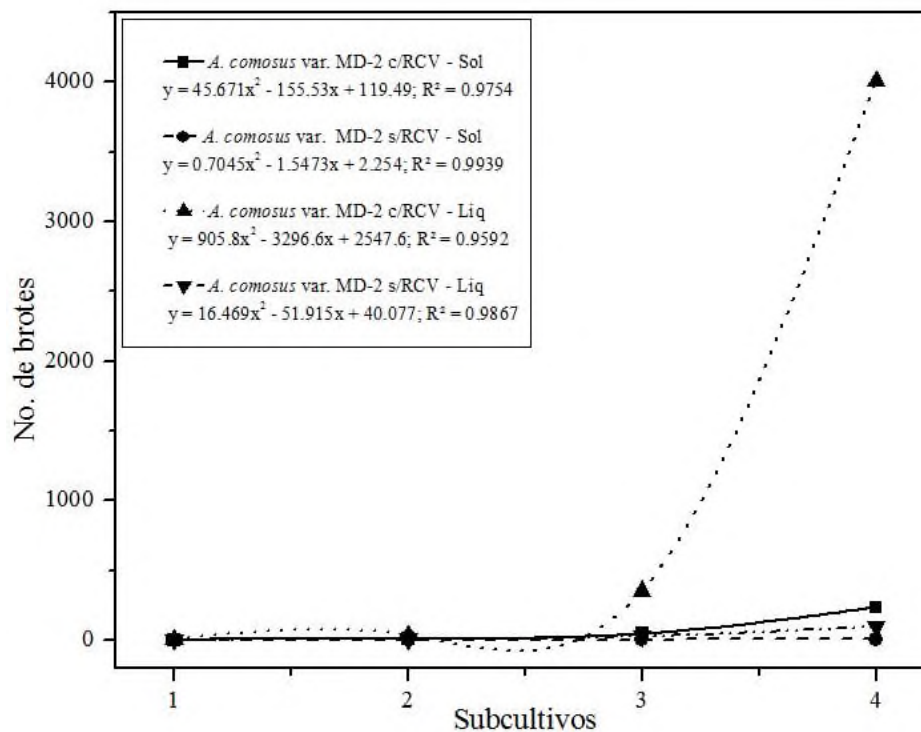


Figura 23. No. de brotes a los 4 subcultivos para la variedad Cayena lisa

Comparando ambas variedades de piña, en la Cayena Lisa se observó un aumento del 22 % de respuesta con respecto a la variedad MD-2 en la fase semi-sólida empleando RCV, y del 44 % sin RCV. Un aumento del 24 % en la Cayena Lisa en fase líquida con respecto a la variedad MD-2 empleando RCV, manteniéndose sin cambios en el medio sin RCV.

En la Figura 24 se observa que las plantas propagadas en medio semi-sólido (Figura 24 A y C) fueron de menor tamaño, con mayor vigor, hojas más anchas y en menor número en comparación al medio de cultivo de consistencia líquida (Figura 24 B y D).

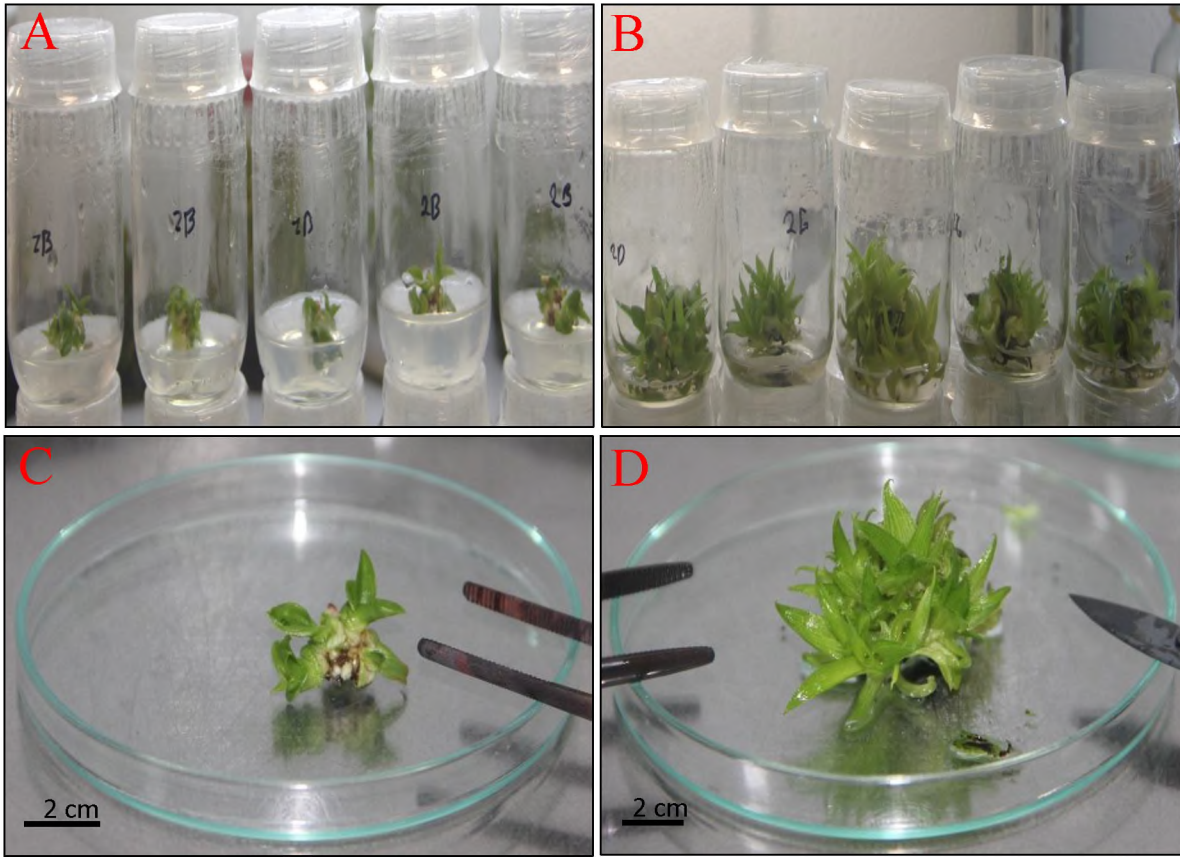


Figura 24.- Etapa de propagación de piña (*A. comosus*). A y C plantas propagadas en medio semi-sólido; B y D, plantas propagadas medio líquido

8.3. Regeneración *in vitro* a partir de hoja

Este estudio consistió en evaluar la regeneración por las vías de morfogénesis a partir de hojas de los brotes elongados obtenidos bajo condiciones *in vitro*.

Las respuestas morfológicas en la variedad Cayena Lisa se obtuvieron a los 2 meses del cultivo (Figura 25). El tratamiento 1 correspondiente al uso del Picloram (Figura 25A) indujo tres tipos de respuestas, caulogénesis, organogénesis y rizogénesis, con porcentajes de 75, 2 y 4 % respectivamente. El callo obtenido por este RCV fue de color marrón cristalino friable. El tratamiento 2 correspondiente al uso del TDZ (Figura 25B) indujo dos tipos de respuestas, caulogénesis y organogénesis, con porcentajes de 33 y 55 % respectivamente. El callo obtenido con este tratamiento fue de un color verde amarillento translúcido y compacto, la respuesta

organogénica fue de manera directa e indirecta, donde se puede apreciar los brotes generados a partir de la base de la hoja y a partir del tejido calloso. El tratamiento 3, correspondientes al uso de la combinación del 2iP y el 2,4-D (Figura 25C) indujo tres tipos de respuestas, caulogenesis, organogénesis y rizogénesis, con porcentajes de 68, 48 y 35 % respectivamente. El callo obtenido fue de un color verde translúcido donde además se pudo apreciar la formación de estructuras nodulares semejantes a embriones somáticos en sus primeras etapas de desarrollo. La organogénesis que se presentó fue indirecta, y se pudo apreciar la formación de raíces. El tratamiento 4, correspondientes al uso de la combinación de BAP y 2,4-D (Figura 25D) indujo sólo un tipo de respuesta, la organogénesis con un porcentaje del 46 %. Y, por último, el tratamiento 5 (Figura 25E), correspondiente al testigo sin RCV, se obtuvo un tipo de respuesta, la organogénesis directa, con un porcentaje de respuesta del 2 %, donde observó la formación de brotes procedentes de la base de la hoja.



Figura 25.- Respuestas morfogénicas a partir de hoja en la variedad Cayena Lisa. A, TR1, 3 mg/L Picloram; B, TR2, 1 mg/L TDZ; C, TR3, 2mg/L 2ip + 2 mg/L 2,4-D; D, TR4, 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D; E, TR5, Sin RCV.

Al analizar los resultados estadísticamente, se arrojó que los tratamientos con Picloram y 2ip + 2,4-D respectivamente, fueron los más eficientes para la respuesta a caulogénesis, el uso del TDZ, 2ip + 2,4-D y BAP + 2,4-D fueron los más eficientes para la inducción de la organogénesis, y por último el uso del 2ip + 2,4-D, fue el más eficiente para la respuesta a rizogénica (Figura 26).

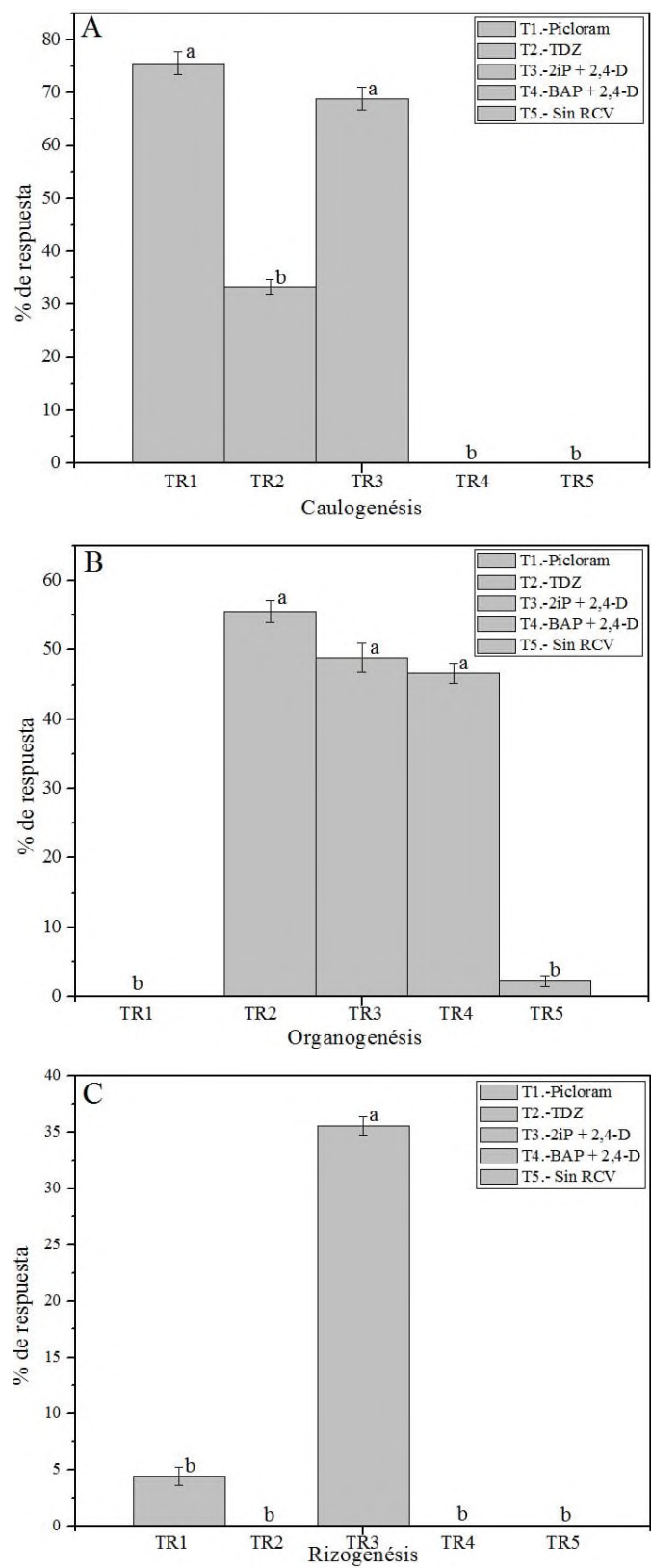


Figura 26. Porcentaje de respuesta de los diferentes tratamientos de la variedad Cayena Lisa. TRH1, 3 mg/L Picloram; TRH2, 1 mg/L TDZ; TRH3, 2mg/L 2ip + 2 mg/L 2,4-D; TRH4, 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D; TRH5, Sin RCV

Con la variedad de piña MD-2, se evaluaron los mismos tratamientos excepto el uso del Picloram. Se observó que el uso del TDZ indujo dos tipos de respuestas, caulogénesis y organogénesis, con porcentajes de 22 y 44 % respectivamente. El tratamiento 3, correspondiente a la combinación del 2iP + 2,4-D se indujo tres tipos de respuestas, caulogénesis, organogénesis y rizogénesis, con porcentajes de 75, 55 y 46 % respectivamente. El tratamiento 4, correspondientes al uso de la combinación del BAP + 2,4-D se obtuvo solo un tipo de respuesta, la organogénesis con un porcentaje del 55 %. Y por último, el tratamiento 5 control, no indujo ningún tipo de respuesta en ésta variedad (Figura 27).

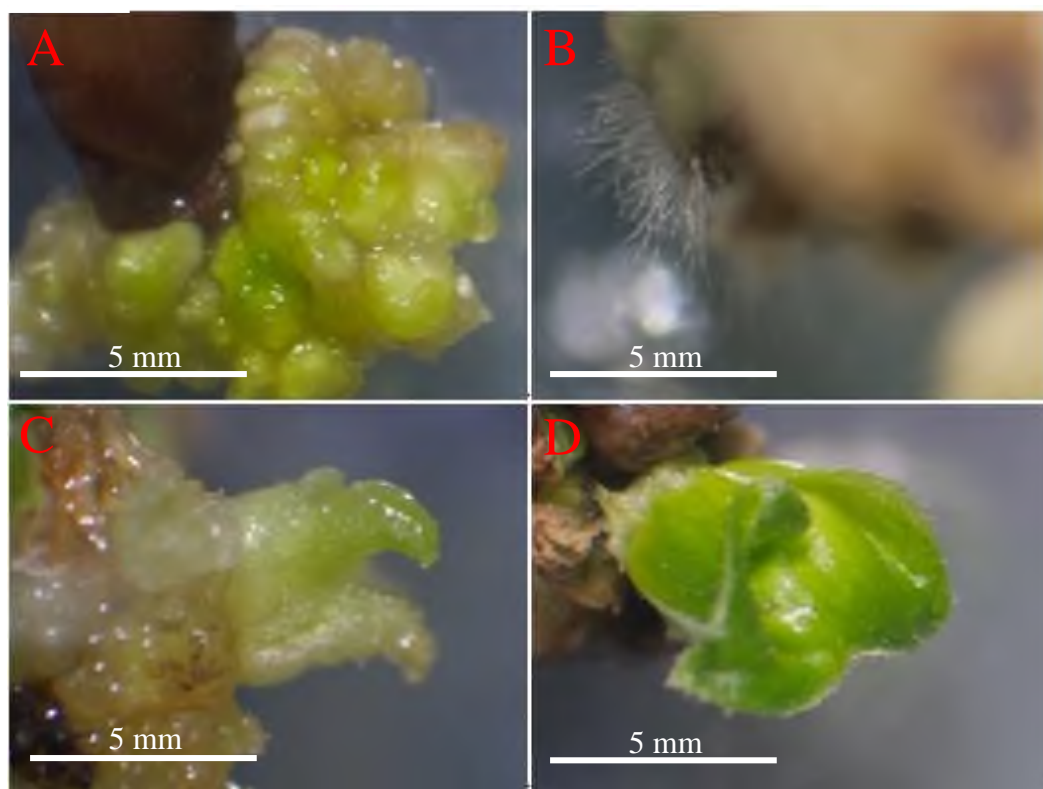


Figura 27.- Respuesta morfológicas en la variedad MD-2. A, Estructuras nodulares globulares en fase de multiplicación; B, rizogénesis; C, maduración de embriones; D, organogénesis

El análisis estadístico de los resultados empleando el programa estadístico MiniTab 16, arrojó que el tratamiento TR3, es decir, la combinación del 2iP + 2,4-D, fue el más eficiente para la respuesta a caulogénesis y a la rizogénesis, mientras que la respuesta a organogénesis no se observó diferencia significativa entre los tratamientos evaluados (Figura 28).

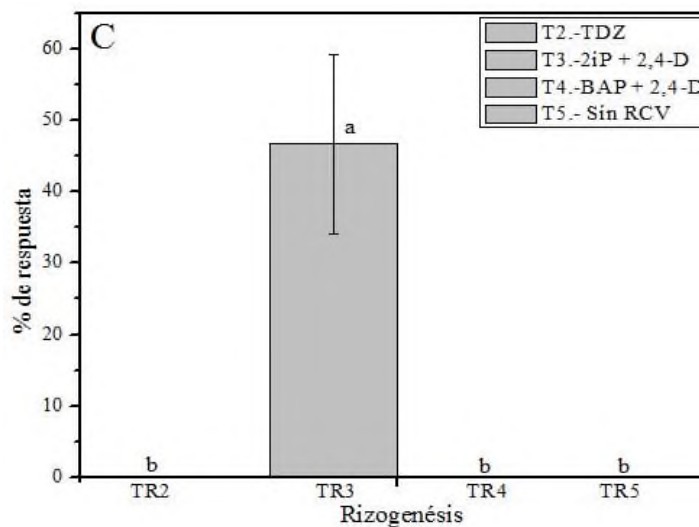
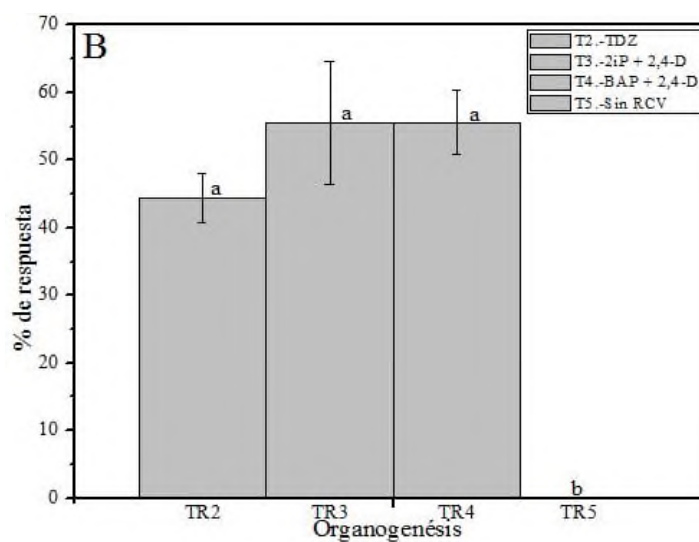
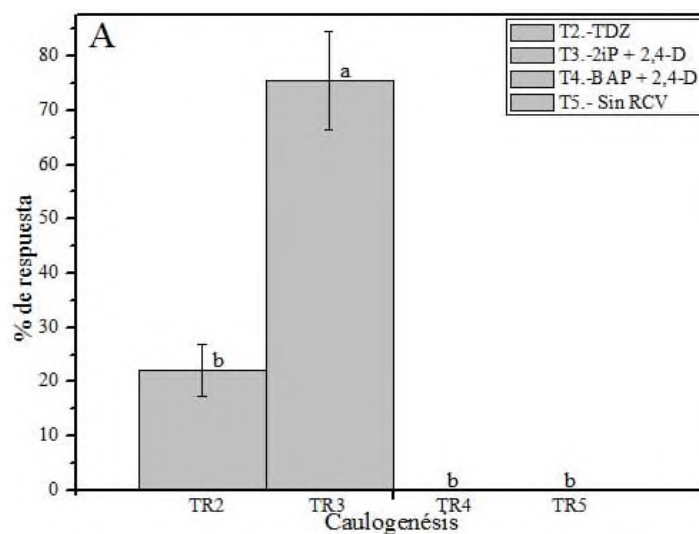


Figura 28.- Porcentaje de respuesta de los diferentes tratamientos de la variedad Cayena Lisa. TRH1, 3 mg/L Picloram; TRH2, 1 mg/L TDZ; TRH3, 2mg/L 2ip + 2 mg/L 2,4-D; TRH4, 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D; TRH5, Sin RCV

Comparando ambas variedades entre sí por cada tratamiento y sus respuestas obtenidas, la variedad Cayena Lisa para el tratamiento 2 (TDZ) obtuvo mayor respuesta tanto en caulogénesis como organogénesis con un aumento de respuesta del 50 y 25 % respectivamente. En el tratamiento 3 (2iP + 2,4-D) la variedad MD-2, obtuvo mayor respuesta tanto para caulogénesis, organogénesis y rizogénesis con un aumento del 9, 13 y 31 % respectivamente. En el tratamiento 4 (BAP + 2,4-D) la variedad MD-2 obtuvo mayor respuesta a organogénesis con un aumento del 19 % y finalmente para el tratamiento 5 (sin RCV) la variedad MD-2 tuvo mayor respuesta a organogénesis con un aumento del 120 %.

8.4. Elongación y enraizamiento *in vitro*

La elongación de los brotes obtenidos se presentó de forma espontánea al liberarlos de las citocininas o combinaciones de auxinas y citocininas durante los subsiguientes subcultivos. Se evaluó la capacidad de enraizamiento para ambas variedades con diferentes tratamientos, los cuales, consistieron en el uso de diferentes tipos de gelificante, el uso de carbón activado CA y el uso de la auxina IBA. Para ambas variedades los tratamientos del TE1 y TE2 (CA), y TE3 (IBA) y TE4 (IBA) mostraron un 100% de enraizamiento, no mostrando diferencia estadística significativa. El tratamiento 5 control carente de agentes enraizantes o CA mostró un menor porcentaje de respuesta rizogénica (Figura 29 A y B).

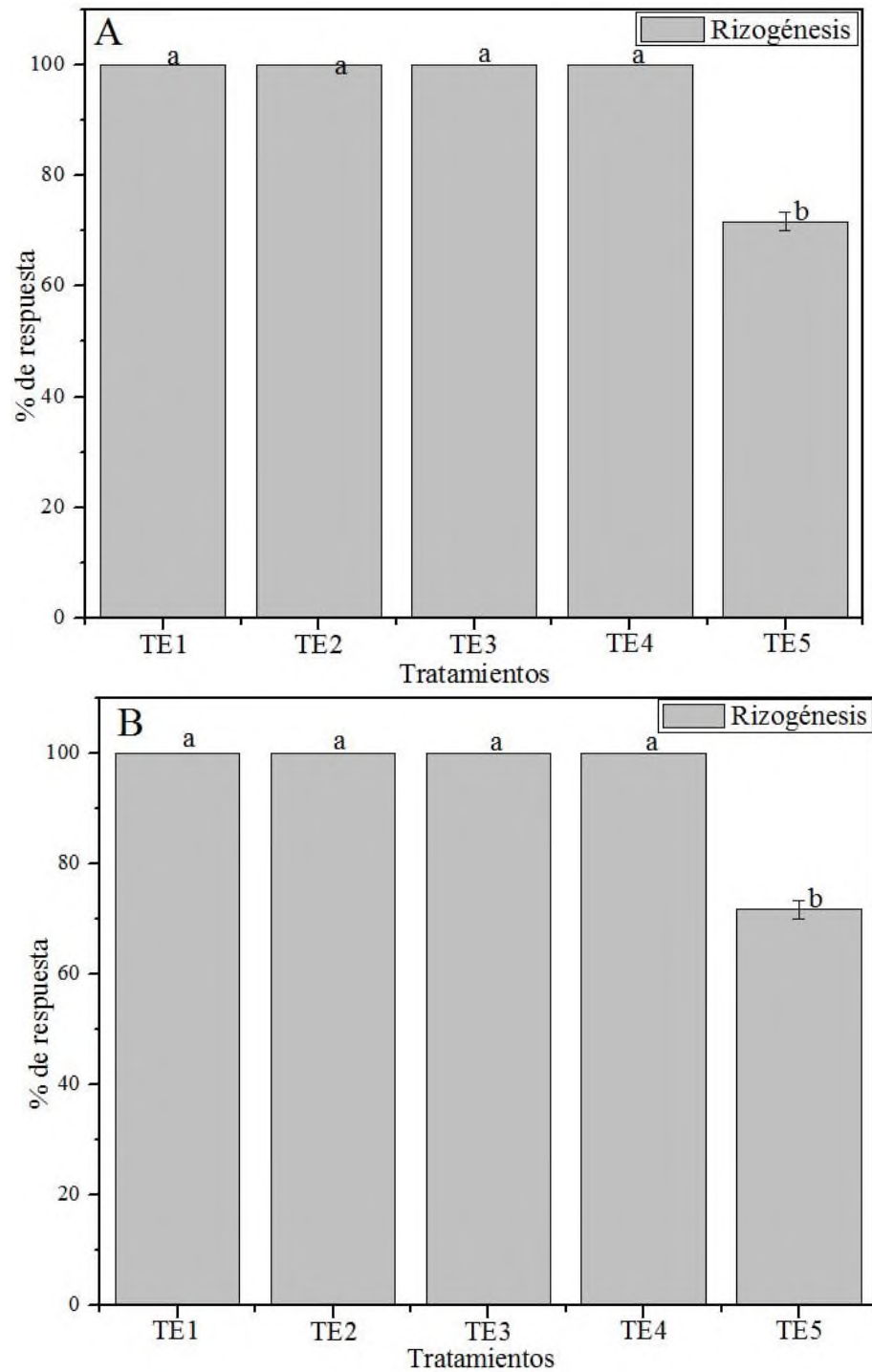


Figura 29. Porcentajes de rizogénesis de los diferentes tratamientos para la variedad A. Variedad Cayena Lisa. B. Variedad MD-2. TE1, CA 3mg/L + Phytigel; TE2, CA 3mg/L + Agar; TE3, IBA 3mg/L + Phytigel; TE4, IBA 3mg/L + Agar; TE5, control.

8.5. Aclimatación

La supervivencia de las plántulas enraizadas *in vitro* y transferidas al vivero casa sombra fue del 100 %, utilizando como sustrato SUNSHINE® Mezcla No. 3. En la Figura 30, se muestra las diferentes etapas del proceso de aclimatación, desde el criterio de salida bajo condiciones *ex vitro* Figura 30A, la siembra a almácigo y su seguimiento hasta la salida de la primera hoja bajo condiciones *ex vitro* Figura 30B, su traspaso a bolsa Figura 30C y su seguimiento hasta la etapa previa a campo Figura 30D. En esta fase temprana del desarrollo, fueron prácticamente indistinguibles las plántulas entre ambas variedades.

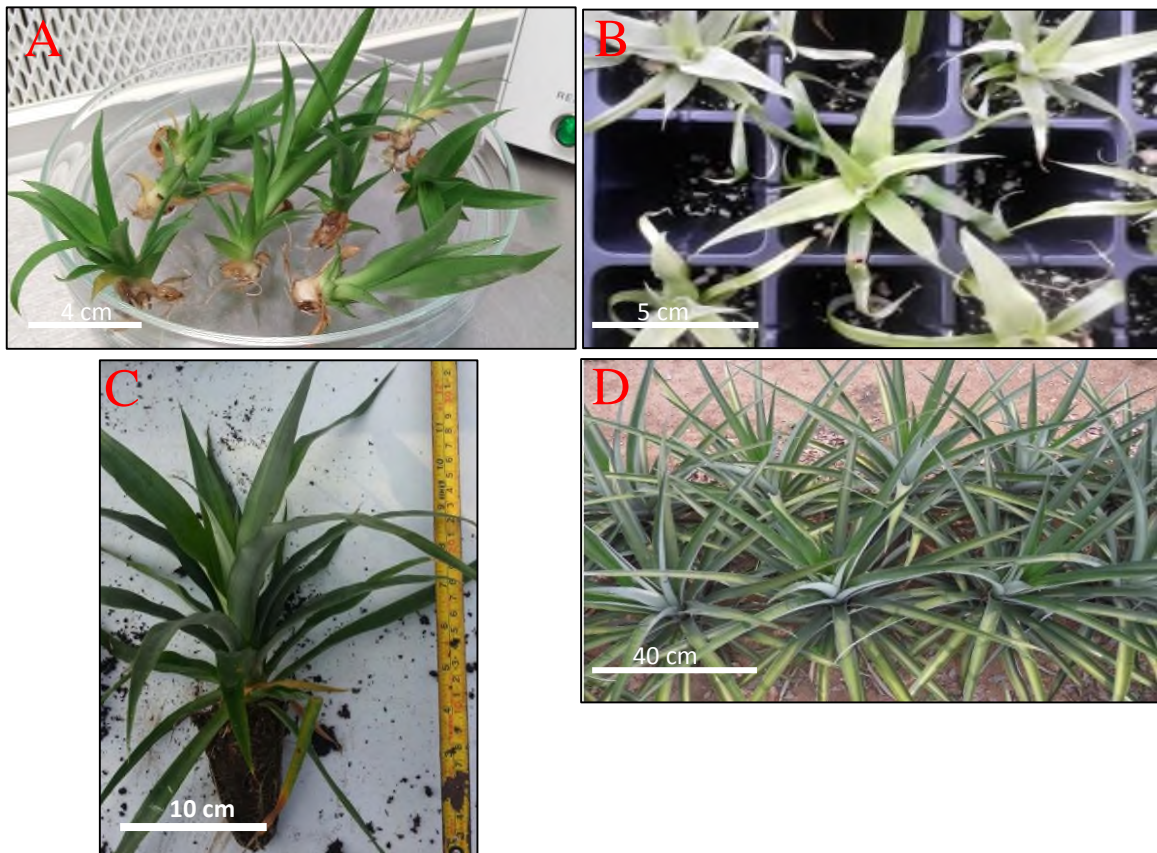


Figura 30.- Proceso de aclimatación de piña (*A. comosus*). A, plántulas enraizadas *in vitro*; B, plantas en aclimatación en almácigo; C, plantas en desarrollo para siembra a campo; D, plantas listas para su siembra a campo.

8.6. Fase de campo y floración

Durante la fase de campo aparecieron las características morfológicas propias de cada variedad, altura y diámetro, siendo la hoja la que presenta las características más distintivas entre una y otra variedad con tonos rojizos en la Cayena Lisa, y de color verde intenso para la MD-2, presentando algunos individuos su característico borde dentado.

La inflorescencia se presentó en ambas variedades de manera espontánea o natural al año, en el mes de diciembre, cuando baja la temperatura en esta región del país. Se pudo apreciar claramente la diferencia entre ambas variedades, la variedad Cayena Lisa adquiere una coloración rojo intenso (Figura 31A y B), en tanto la variedad MD-2, de un color verde-amarillento, sobresaliendo posteriormente las flores de color lila (Figura 31C y D).



Figura 31.- Inflorescencia de las variedades de piña (*A. comosus*). A y B, Inflorescencia variedad Cayena Lisa; C y D, Inflorescencia variedad MD-2

8.7. Fructificación

La flor polinizada naturalmente fructificó en tiempo y forma, en la Figura 32 se muestra el aspecto del fruto de la planta in vitro de ambas variedades, y se cosechó para la medición del peso y los grados de azúcar °Brix, cuyos se muestran en la Tabla 10. El análisis de los datos reveló que no existe diferencia significativa entre el peso y los °Brix para ambos productos de piña in vitro. Sin embargo, si se observa diferencias en las propiedades organolépticas de color y olor del jugo al

momento de su extracción (Figura 33). Además, se realizó la comparación de las frutas adquiridas en el mercado, cuyo material vegetativo fue el de partida para el establecimiento en el laboratorio (Tabla 10), al realizar el análisis estadístico mostró que hubo diferencia significativa, donde el fruto proveniente de la variedad Cayena Lisa *in vitro* fue mejor y en el caso la variedad MD-2 el fruto de campo fue mejor.

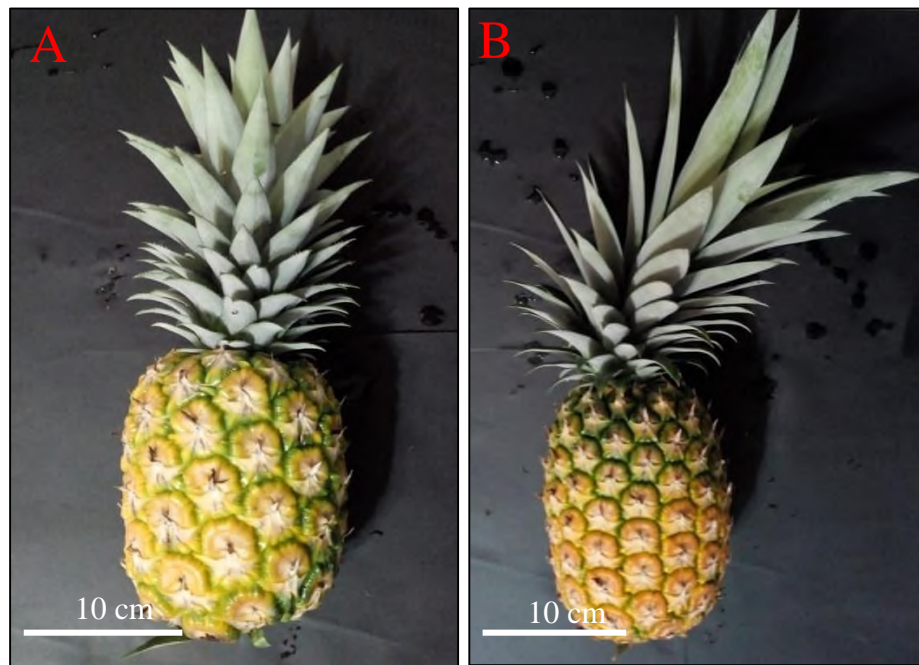


Figura 32.- Frutos de piña (*A. comosus*). A, Fruto variedad Cayena Lisa; B, Fruto variedad MD-2

Tabla 10. Peso y °Brix de los frutos obtenidos de las plantas *in vitro* de las variedades de piña (*A. comosus*) Cayena Lisa y MD-2

VARIEDAD	PESO (KG)	°BRIX
CAYENA LISA	1.461± 0.091	13.9 ± 0.091 ^a
CAYENA LISA MERCADO	-	11.5 ± 0.29 ^b
MD-2	1.275 ± 0.089	14.43 ± 0.24 ^b
MD-2 MERCADO	-	15.52 ± 0.14 ^a

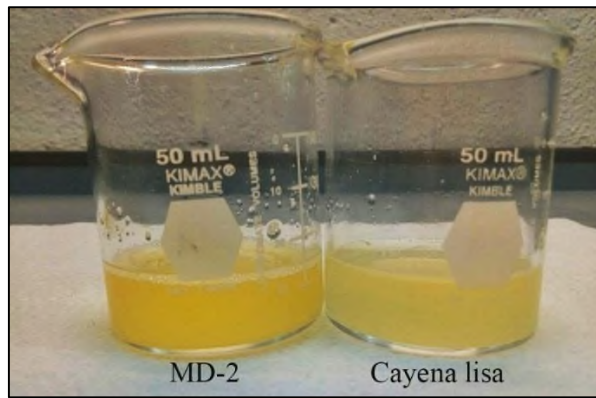


Figura 33.- Extracto del jugo de piña de las dos variedades de piña (*A. comosus*)

En la etapa de fructificación se desarrollaron de forma natural los diferentes tipos de propágulos característicos en el ciclo vegetativo de esta especie de bromeliácea, los denominados "hijuelo", "clavo" y "gallito", Figura 34.



Figura 34.- Propágulos obtenidos de manera natural en campo de las variedades de piña (*A. comosus*). A, Cayena lisa; B, MD-2

Para la variedad Cayena Lisa, se presentaron dos tipos de propágulos, el "clavo" y el "gallito", con un promedio de 0.5 y 10.5 para respectivamente. En cambio, con la variedad MD-2 se presentaron los "hijuelos" y lo "clavos", con un promedio de 1 y 1.9 respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11.- No. de propágulos obtenidos de piña (*A. comosus*) en campo para las variedades de piña Cayena lisa y MD-2

VARIEDAD	HIJUELO	CLAVO	GALLITO
Cayena lisa	0	0.5 ± 0.29 ^b	10.5 ± 0.88 ^a
MD-2	1 ± 0.24 ^a	1.9 ± 0.17 ^a	0

Media aritmética de las réplicas ± error estándar. Letras similares en la misma columna indican que no hubo diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95%.

9. DISCUSIÓN

La parte crucial de este trabajo fue el establecimiento de los cultivos axénicos debido a las elevadas tasas de contaminación que se obtuvieron por bacterias y hongos, así como el establecimiento en campo de la planta *in vitro* hasta su fructificación.

9.1. Fase de establecimiento

La contaminación puede ser de origen externo o interno, por lo cual se ocuparon diversos tipos de desinfectantes desde lo más utilizado en el cultivo de tejidos como el NaClO y CaClO, hasta otros más agresivos como el uso de la oxidación del NaClO con el HCl. Algunos otros factores que pueden afectar las elevadas tasas de contaminación es el tipo de explante manejado, ya que por la forma en que están dispuestas las hojas al tallo forman pequeñas rendijas donde pudiera no entrar en contacto el agente desinfectante con el tejido, por el cual, se recomienda en estos casos ocupar ciclos de vacío. Otro factor importante es la procedencia del material, ya que en este trabajo se ocuparon las coronas que los vendedores de jugo de la región generan como desecho, por lo que se recomienda previamente aislar dichos explantes en un invernadero y darle un pre tratamiento con fungicidas y bactericidas, con el objetivo de que los explantes entren a los tratamientos de desinfección con una cantidad menor de microorganismos (Pérez 2009).

Los comportamientos obtenidos en los porcentajes de contaminación y supervivencia se mantuvieron de la misma manera en ambas variedades, al aumentar las concentraciones de los agentes desinfectantes la tasa de contaminación disminuyó, Garita y Gómez (2000), reportaron un comportamiento similar en la variedad Champaka F-153, del mismo modo Garcidueñas en el 2013 en la variedad MD-2. Los explantes soportaron concentraciones de NaClO hasta del 30 % esto es superior a lo reportado por Garita y Gómez (2000), y Garcidueñas (2013) mostrando más resistencia la variedad Cayena lisa. Por otro lado, los porcentajes de supervivencia se mantuvieron similares del 80 % por ambos autores y el presente trabajo.

El rompimiento de la dormancia apical se comportó de la misma manera en ambas variedades, al aumentar las concentraciones de los agentes desinfectantes o el tiempo de exposición, este fue

en aumento, esto posiblemente debido al daño que sufrió el explante al momento de la desinfección, ya que se observaron diferentes tipos de coloraciones como respuestas a los diferentes agentes desinfectantes; con el NaClO se observó un color amarillento, con el CaClO un color cremoso y con el cloro gaseoso un color blanco opaco. Caso contrario fue lo reportado por Garita y Gómez (2000), donde el tiempo de rompimiento de la dormancia fue disminuyendo al aumentar las concentraciones del agente desinfectante.

9.2. Fase de propagación de yemas

La fase de multiplicación se realizó en medio líquido y medio semi-sólido teniendo como constante el BAP 3 mg/L, con el objetivo de observar si el medio líquido aumenta las tasas de multiplicación en las variedades, Marchal y Alvard (1998) señalaron que el medio líquido estimula un mayor crecimiento y multiplicación de los explantes de piña que en medio sólido, debido a que los medios semi-sólidos permiten una buena aireación pero no proporciona un contacto completo con los nutrientes del medio y mientras que el medio líquido permite una absorción eficiente de nutrientes, pero a menudo hay vitrificación (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos utilizando BAP a una concentración de 3 mg/L para la variedad Cayena lisa hay aumento en la tasa de multiplicación del 1800 % y del 1600 % en la variedad MD-2; Escalona (1998) compara el mismo efecto del medio sólido vs medio líquido, donde obtuvo un aumento del 42 % en la multiplicación en la variedad Cayena lisa. Se ha reportado que la adición de RCV favorece la tasa de multiplicación. Al respecto, Soneji y Mhatre (2002) reporta el uso de ANA + agua de coco + caseína hidrolizada, teniendo un aumento del 540 %. Por otro lado, Danso *et al.*, (2008) reportan que el uso de la combinación de 5 mg/L BAP + 2 mg/L de ANA, donde aumentó la tasa de multiplicación un 295 % en medio líquido. Zuraida *et al.*, (2011), reporta que el BAP a 1 mg/L aumentó un 328 % la brotación.

La CFB en todos los tratamientos fue aumentando conforme se realizaron los subcultivos tanto en los medios sólidos como en los líquidos, con o sin el RCV, lo que sugiere que cada subcultivo habrá un aumento de brotación, sin embargo se observó un patrón diferente en la tasa geométrica de crecimiento para cada uno de los tratamientos, lo cual podría indicarnos una

reducción del potencial de brotación en algunos de ellos, comportamiento similar ocurre en lo reportado por da Silva (2016), el cual sugiere que dicha reducción en la brotación puede ser debido a las tasas de contaminación que se generan por cada subcultivo debido a una posible contaminación endógena.

Por otra parte, se realizaron modelos de regresión para cada tratamiento con el objetivo de obtener ecuaciones que describen el comportamiento de su CFB y su tasa de multiplicación, para así poder calcular la CFB en tiempos determinados y el número de plantas. De acuerdo las ecuaciones obtenidas, a partir de una corona de piña se pueden llegar a producir aproximadamente 123,000 plantas para la variedad Cayena lisa y 46,000 plantas para la variedad MD-2 en un año; Sripaoraya *et al.*, (2003), reportan que bajos sus protocolos producirían aproximadamente 100,000 plantas en un año; Zepeda y Sagawa (1981), produjeron aproximadamente 5000 plantas en un año, a partir de una corona de piña y aproximadamente 30,000 plantas a partir de brotes de hojas mediante embriogénesis somática.

9.3. Regeneración a partir de hoja

Se desarrollaron diferentes métodos de regeneración de plantas de piña a partir de la base de la hoja, donde fue que se observó que tuvo respuesta a los diferentes RCV, las otras secciones de hoja se mantuvieron verdes pero sin respuesta (datos no mostrados). Respuestas similares utilizando la base foliar ha sido reportada por Firoozabady y Gutterson (2003) debido a que esta sección de la hoja se cercanas a los meristemos axilares, estos pueden contener regiones meristemáticas o poseer tejido recientemente desarrollado con células que se dividen rápidamente y que son susceptibles a tener morfogénesis.

Se obtuvieron diferentes tipos de tejidos con apariencia embriogénica: tejidos embriogénicos derivados de callos, tejidos embriogénicos compactos y tejidos embriogénicos friables. Se obtuvieron dos sistemas de organogénesis, una donde se logró la obtención de brotes a partir de la base de la hoja y otra donde se formaron estructuras globulares nodulares seguidas de su brotación.

El uso del Picloram a 3 mg/L tuvo como respuesta la obtención de tejido con apariencia embriogénica con un porcentaje del 70 % en la variedad Cayena lisa, dicha respuesta concuerdan con lo reportado por Daquinta *et al.*, (1996), donde tuvieron porcentajes de tejidos embriogénicos del 41 % en la variedad Cayena lisa; un 58% en la variedad Phuket (Sripaoraya *et al.*, 2003), Bukhori *et al.* (2013) reportan el uso del Picloram con la misma concentración hormonal donde se observó la aparición de tejido embriogénico con un 77 % de respuesta.

El uso del 2,4-D en combinación con BAP, tuvo como respuesta la obtención de brotes adventicios, Sripaoraya *et al.*, en el 2004 reportan que el uso del 2,4-D es crítico para la obtención de brotes. Otros reportes han descrito que el 2,4-D es indispensable para que diferentes RCV como ANA y BAP faciliten la regeneración de brotes a partir de hojas derivadas de plántulas de, por ejemplo, *Neoregelia cruenta* (Carneiro *et al.*, 1999), varios miembros de la familia Bromeliaceae endémicas de Brasil como *Vriesea fosteriana*, *Dyckia macedoi* (Mercer y Kerbauy, 1992) y de piña ornamental *Aechmea fasciata* (Vinterhalter y Vinterhalter, 1994; Carneiro *et al.*, 1999). El porcentaje de respuesta obtenido fue del 46 y 55 % para la variedad Cayena lisa y MD-2 respectivamente con 0.5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP; un 83 % de respuesta utilizando las mismas concentraciones hormonales en la variedad Phuket (Sripaoraya *et al.*, 2004); mientras que Liu *et al.*, (1979) en combinaciones de 2,4-D + BAP, obtiene proliferación de brotes para estudios de variabilidad somaclonal.

El uso del 2ip en combinación con 2,4-D, tuvo como respuesta la obtención de las 3 respuestas morfogenéticas, el cual la formación de brotes fue de manera indirecta con un porcentaje de respuesta del 48 %, raíz con un porcentaje del 35 %. Se han reportado el uso de los mismos RCV, a diferente concentración hormonal generó diferentes respuestas morfogenéticas, sólo obteniéndose un número de brotes que fue de 34 (Soneji *et al.*, 2002).

El uso del TDZ, tuvo como respuesta la obtención de organogénesis indirecta y la aparición de tejido calloso Al respecto Hamid *et al.*, (2013) reportan el uso del TDZ a diferentes concentraciones siendo la concentración de 3 mg/L, la que generó tejido calloso, pero no reportan la aparición de brotes ya sea de manera directa o indirecta. Por otro lado, Oliveira *et al.*, (1999), reportan el uso del TDZ a concentraciones de 0.1 mg/L obteniendo brotes, en las variedades Primavera y Skay.

9.4. Enraizamiento *in vitro*

El uso de diferentes tipos de gelificante no tuvo diferencia significativa en el enraizamiento mostrando una viabilidad para enraizar del 100 %. Respuesta similar ha sido reportada por Saifullah *et al.*, (2004) utilizando 1 mg/L de IBA y 10 g/L agar; Devi *et al.*, (1997), reportan el uso del IBA a una concentración de 2 mg/L con eficiencias del 100 %; mientras que un 71.4% de enraizamiento fue obtenido a en diferentes concentraciones de AIB y ANA en la variedad Cayena lisa (Hamad *et al.*, 2013) y Mathew y Regan en 1981 reportan el enraizamiento utilizando carbón activado. Otros trabajos reportan el uso de ANA como sustituto del IBA (Hamad y Taha, 2008; Fitchet, 1990), a su vez Bhatia y Ashwath (2002) reportan el enraizamiento de brotes de piña variedad Cayena lisa sin el uso de RCV.

Bhatia y Ashwath en el 2002, observaron que el enraizamiento se puede obtener en medio de multiplicación si se realizan más de 6 subcultivos, lo que concuerda con Hamad en el 2013 el cual menciona que la edad del cultivo es un factor muy importante en el enraizamiento de las plantas *in vitro* de piña.

En el presente trabajo no se pudo observar dicho comportamiento de enraizamiento debido a que solo se realizaron 4 subcultivos.

9.5. Aclimatación

La supervivencia de la transferencia de las plántulas ya enraizadas *in vitro* al vivero fue del 100 %, utilizando sustrato SUNSHINE® Mezcla No. 3, Mengesha *et al.*, en el 2013 reporta el uso de mezcla de sólida, cáscara de café y arena, en proporciones 1:2:1 y el uso de Jiffy-7, teniendo porcentajes de supervivencia del 90 % y 98 % respectivamente; Abebe *et al.*, en el 2003 reporta porcentajes del 85 % en mezcla sólida; Saifullah *et al.*, en el 2004 reportan eficiencias del 100 % utilizando suelo común.

Cabe mencionar que al momento de la aclimatación se le aplicó un riego con AIB a una concentración de 1 mg/L, el cual, estimuló la pronta generación de nuevas raíces en el sustrato,

dicho procedimiento, es el primer reporte del uso del AIB como riego en campo como molécula pura.

9.6. Establecimiento en campo, floración y fructificación

Las plantas ya aclimatadas y endurecidas con raíces y con la talla adecuada, se procedieron a sembrar en la parcela demostrativa, donde después de 12 meses se observó la aparición de la flor apical característica de la piña, esto se dio en la época de invierno que es cuando los días son más cortos y las noches son frescas, Pinto du Cunha en el 2005, menciona que la floración en la piña es un proceso único e integrado, de naturaleza muy compleja y control multifactorial, que se ha estudiado ampliamente, desde aspectos de ecofisiología a biofísica. La mayoría de las plantas tienden a tener comportamientos a las diferentes señales ambientales las cuales regulan la floración básicamente el inicio de la floración en la piña depende del estado fisiológico y de la reserva nutricional de la planta, la duración del día y la temperatura (Bartolomé y Malezieux, 1994). Según estos autores, es necesaria una diferencia mínima entre las temperaturas diurnas y nocturnas para provocar la floración natural, además del efecto de los días cortos.

El desarrollo del fruto de la piña se vio marcado por el tipo de color en la parte del ápice para cada variedad de piña, en la variedad Cayena lisa se mostró de un color marrón a rojizo, en la variedad MD-2 se mostró un color verde-amarillento.

El fruto ya desarrollado después de un meses, se empezó a tornar de un color verde a un color oro, donde se observó que la maduración se dio de manera ascendente, el fruto ya maduro se le tomó peso y se realizó la medición de los grados °Brix, en el cual se mostró que la variedad Cayena lisa y MD-2 no hubo diferencia significativa, con aproximadamente de 15 °Brix, Bartholomew *et al.*, 2002, describe que los rango de °Brix van 13 a 19 y 15 a 17 para la variedad Cayena lisa y MD-2 respectivamente, dichos rangos coinciden con los reportados en este trabajo, el cual, este es primer reporte de la medición de los °Brix en frutos de piña de plantas propagadas *in vitro*, comparando los °Brix obtenidos de piñas de plantas *in vitro* en la variedad Cayena lisa hubo un aumento de los °Brix del 20 % y en la variedad MD-2 hubo un descenso en los °Brix de 8%. En lo que respecta al peso los rangos van de 1.5 a 2.5 y 1.3 a 2.5 kg para la variedad Cayena lisa y MD-

2 respectivamente, donde nuestros resultados están por debajo del peso mínimo para cada ambas variedades.

Como resultado de este trabajo se obtuvo el siguiente protocolo de regeneración micropropagación (Figura 36), en donde se muestran los tiempos obtenidos en el proceso, cabe mencionar que el objetivo principal de este trabajo fue la obtención de al menos un protocolo de micropropagación y regeneración, por lo cual, no se buscó la optimización del tiempo en el proceso.

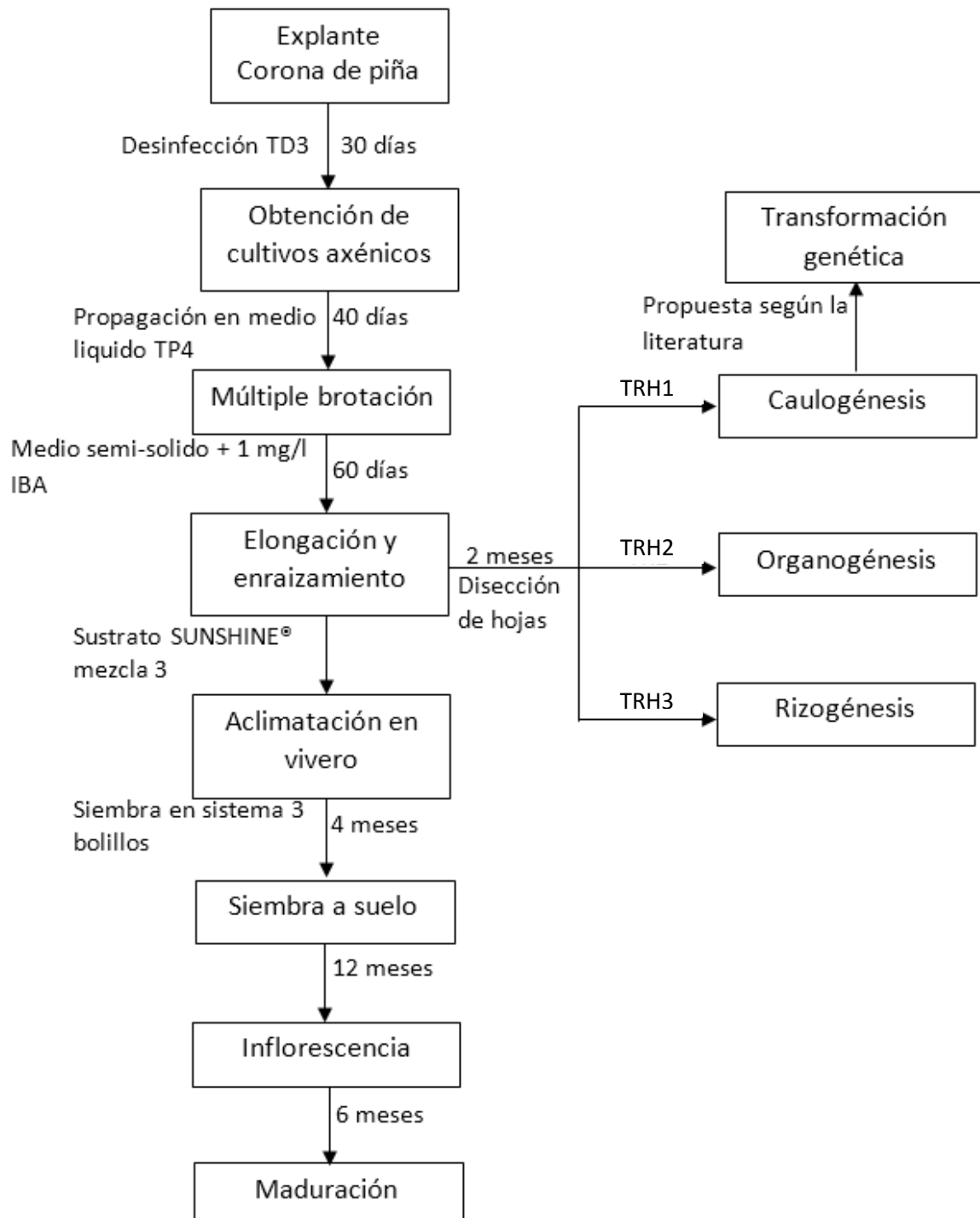


Figura 35.- Diagrama de regeneración y micropropagación de las variedades Cayena lisa y MD-2

10. CONCLUSIONES

1. Se logró establecer y evaluar un sistema para el establecimiento de cultivos axénicos de variedades de piña comercial Cayena lisa y MD-2, cultivadas en la región de la Cuenca del Papaloapan, mediante el uso de diferentes agentes desinfectantes, siendo el cloro gaseoso el más efectivo para la desinfección de los explantes y el CaClO el que hizo menor daño a la planta.
2. Se logró establecer y evaluar un sistema para la regeneración *in vitro* vía morfogénesis de las variedades de piña Cayena lisa y MD-2, a partir de hoja, obteniendo diferentes tipos de respuesta morfogénicas (Caulogénesis, Organogénesis y Rizogénesis), utilizando auxinas y citocininas así como sistemas de Embriogénesis somática.
3. Se logró establecer y evaluar un sistema de micropropagación *in vitro* de las variedades de piña Cayena lisa y MD-2, hasta la fase de aclimatación y fructificación, obteniendo el primer reporte de la medición de los °Brix en plantas provenientes de la técnica de CCTOV.

11. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería interesante evaluar el comportamiento de las plantas *in vitro*, en las condiciones de campo de las zonas productoras de la región de la Cuenca del Papaloapan, México, así como, buscar la optimización del protocolo de micropropagación, evaluando diferentes RCV e implementar el uso de los Bioreactores de Inmersión Temporal.

Otro punto sería acoplar el método de transformación genética al proceso de micropropagación, para la obtención de nuevas variedades de interés comercial.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abebe, Z., Tefera, W., Felipe, M., Teresa, A. y Mengesha, A. (2003). *In Vitro* Multiplication of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) and Cardamom (*Elletaria cardamomum*) in Ethiopia. *Proceeding of the Second Biennial Conference of Ethiopian Horticultural Science Society*, 9-18.
2. Aitken, J., Kozai, T. y Smith, M. (1995). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. New Zealand, Kluwer Academic Publishers.
3. Bhatia, P. y Ashwath, N. (2002). Development of a Rapid Method for Micropropagation of a New Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Murr.] Clone, 'Yeppoon Gold'. *Proc. IS on Trop. & Subtrop. Fruits Ed. R. Drew Acta Hart*, 575, 125-131.
4. Bartholomew, D., Paull, R. y Rohrbach, K. (2002). *The Pineapple: botany, production and uses*. *CABI Publishing*. University of Hawaii at Manoa Honolulu. USA.
5. Bartholomew, D. y Malézieux, E. (1994). Pineapple. In: Schaffer, B. and Anderson, P. *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops*, 2, 243-291.
6. Benegas, R., Martinez, J., Daquinta, M., Arias, E., Hidalgo, M., Gonzalez, M. y Isidron, M. (2000). Efecto del thidiazuron sobre la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras en piña. *Cultivos Tropicales*, 21 (3), 47-50.
7. Blanco, F., Vargas, T. y García, E. (2011). Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. *Interciencia*, 36 (6), 437-443.
8. Bukhori, M., Mohamad, N. y Ch'ng, L. (2013). Potential embryogenic callus induction protocol through cell suspension Culture for high frequency plant regeneration Of Maspine pineapple (*Ananas comosus* L.). *Borneo Journal of Resource Science and Technology*, 3 (2), 40-45.
9. Carneiro, L., Araujo, R., Brito, G., Fonseca, M., Costa, A., Crocomo, O. y Mansur, E. (1999). In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenla* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organo Culture*, 55, 79-83.
10. Carvajal, P., Campos, A., Fuentes, P., Villalobos, E., Almeida, A., Barberá, E., Torné, M. y Santos, M. (2007). Purification and *in vitro* refolding of maize chloroplast transglutaminase over-expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 29, 1255-1262.

11. Coppens, D. y Duval, M. (1997). Germplasm resources of pineapple. *Horticultural Reviews*, 21, 133-175.
12. Chao, M., Sheng, X., Zhen, L., Wei, W. y Li, D. (2007). Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1165, 39-44.
13. Castillo, A. (2001). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología, 04-19.
14. Cassells, A.C. y Doyle, B.M. (2005) Pathogen and biological contamination management: the road ahead. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F, editors. *Plant Cell Culture Protocols*, Humana Press. New York, USA, 35-50.
15. Collins, J. (1951a). Antiquity of the pineapple in America. *Southwestern Journal of Anthropology*, 7, 145-155.
16. Collins, J. (1951b). Notes on the origin, history, and genetic nature of the Cayenne pineapple. *Pacific Science*, 5, 3-17.
17. Cote, F., Domergue, R., Folliot, M., Bouffin, J. y Marie, F. (1991.) Micropropagation *in vitro* de l'ananas. *Fruits*, 46, 359-366.
18. D'Almeida, D., Andrade, E., Meireles, A. y Ness, R. (2005). Importância relativa dos íons na salinidade de um Cambissolo na Chapada do Apodi, Ceará. *Engenharia Agrícola Journal*, 25 (3), 615-621.
19. de Wald, M., Moore, G., Sherman, W. y Evans, M. (1988). Production of pineapple plants *in vitro*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 637-643.
20. Danso, K., Ayeh, K., Oduro, V., Amiteye, S. y Amoatey, H. (2008). Effect of 6-benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials Ghana. *World Applied Sciences Journal*, 3 (4), 614-619.
21. Daquinta, M., Castillo, R., Lorenzo, J., Cobo, I., Escalona, M., Trujillo, R. y Borroto, C. (1994). Formación de callos en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 16, 83-89.
22. Daquinta, M., Cisneros, A., Rodriguez, Y., Escalona, M., Perez, C., Luna, I. y Borroto, C. (1996). Somatic embryogenesis in pineapple (*Ananas comosus* L., Merr). *Pineapple News*, 3, 5-6.

23. da Silva, R., Ferreira, C., da Silva, L., de Souza, E., da Silva, P., de Carvalho, Costa. y M. Souza. (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.
24. Devi, Y., Mujib, A. y Kundu, S. (1997). Efficient regenerative potential from long term culture of pineapple. *Phytomorphology*, 47, 255–259.
25. Dornenburg, H. y Knorr, D. (1995). *Enzyme and Microbial Technology*, 17,674.
26. Escalona, M., Lorenzo, J., Gonzalez, B., Daquinta, M., González, L., Desjardins, Y. y Borroto, J. (1999). Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748.
27. Espinosa, P., Lorenzo, J., Iglesias, A., Yabor, L., Menéndez, E., Borroto, J., Hernández, L. y Arencibia, A. (2002). Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. *Plant Cell Reports*, 21, 136-140.
28. Estopà, M. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista Extra*, 50-56.
29. FAOstat (2019). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/faostat/en/>
30. Firoozabady, E. y Gutterson, N. (1998). Genetically transformed pineapple plants and methods for their production. International Patent Application number PCT/US98/03681.
31. Firoozabady, E. y Gutterson, N. (2003). Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Reports*, 21, 844-850.
32. Firoozabady, E., Heckert, M. y Gutterson, N. (2006). Transformation and regeneration of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 1-16.
33. Firoozabady, E. y Young, T. (2013). Pineapple plant named Rose. International Patent Application number US 2013/0326768 P1.
34. Fitchet, M. (1989). Observations on pineapple improvement in Taiwan, Republic of China. *Subtropical*, 10, 10-12.
35. Gangopadhyay, G., Bandyopadhyay, T., Poddar, R., Gangopadhyay, S. y Mukherjee, K. (2005). Encapsulation of pineapple microshoots in alginate beads for temporary storage. *Current Science*, 88 (6), 972-977.

36. Garcia, G., Perez, M. y Benega, R. (2000). Analysis of somaclonal variation in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) plants regenerated from callus in the field. *Pineapple News*, 7, 8-10.
37. Garcia, R., Morán, R., Somonte, D., Zaldúa, Z., López, A. y Mena, C.J (1999) Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) biotechnology: perspectives and progress. In: Altman, A. Ziv, M. New Frontiers in Plant In Vitro Culture Shamay I, editors. *Plant biotechnology and in vitro biology in 21st century*. The Netherlands, 143-146.
38. Garcidueñas, P. (2013). Caracterización morfológica y molecular de piña *Ananas Comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento *in vitro*. Tesis de para obtención grado de maestría. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Fitotecnia, 146-152.
39. Garita, H. y Gómez, I. (2000). Micropropagación de la variedad de piña champaka f-153. *Agronomía costarricense*, 24 (1), 63-73.
40. Griffith, L. (1998). *Tropical Foliage Plants. A Grower's Guide*. Ball Publishing Batavia, Illinois. USA.
41. Gutierrez, R., Torres, J., Saucedo, L. y Gomez, M. (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology*, 17 (12), 1223-1226.
42. Hamad, A. y Taha, M. (2008). The effect of different hormones and incubation periods on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* L.) Merr cv. Smoothr Cayenne shoot-tip culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (3), 386-391.
43. Hamad, A., Taha, M. y 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.
44. Hamid, N., Bukhori, M. y Jalil, M. (2013). Direct and indirect plant regenerations of pineapple var. md2 (*Ananas comosus* L.). *Malaysian Applied Biology*, 42 (1), 61-66.
45. Hernández, R. P. (2003). Micropropagación de piña (*Ananas comosus* (L.)(Merr)). Tesis para obtencio de titulo de Ingeniero en agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Division de agronomía.
46. Hossain S. A. y Uddin M. M. (2017). Callus cell, shoot and stem proliferation data from pineapple crown and banana inflorescence In Vitro: Biochemical and antioxidant properties. *Data in Brief*.
47. Husain, M.K. y Anis, M. (2009) Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(4), 765-772.

48. Hurtado, D. y Merino M. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial. Trillas.
49. Karam, L., Dutra, J., Dias, D. y Benevenga, M. (2007). Micropropagacao de violeta africana (*Saintpaulia ionantha Wendl.*): Efeito de benzilaminopurina na multiplicacao. *Ciência e agrotecnologia*, 31, 1380-1385.
50. Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *In Vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (13), 1222-1239.
51. Ko, L., Hardy, V., Jobin, M., Campbell, P., Eccleston, K., Graham, M. y Smith, M. (2005). The introduction of transgenes to control blackheart in pineapple: biolistics vs *Agrobacterium* transformation. *Proceedings of the Australian Branch of the IAPTC&B*, 195-202.
52. Lakshmi, G., Singh, R. y Layer, C. (1974). Plantlets through shoot tip cultures in pineapple. *Current Science*, 43, 724-725.
53. Laura, P., Chichlowski, M., Chau, T., Trinh, B. y Paula, K. (2010). Dietary Supplementation with Fresh Pineapple Juice Decreases Inflammation and Colonic Neoplasia in IL-10-deficient Mice with Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16 (12), 2012–2021.
54. Li, Z., Traore, A., Maximova, S. y Guiltinan, M. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 34, 293–299.
55. Liu, L., Rosa, E. y Lizareli, E. (1989). Smooth leaf (spineless) Red Spanish pineapple (*Ananas comosus*) propagated *in vitro*. *Journal. Agricultural University. Puerto Rico*, 73, 301–311.
56. Loeillet, D. (1997). The world pineapple market: the importance of Europe. *Acta Horticulturae*, 425 (3), 7–48.
57. Loza, E., Rojas, E., López, J., Olivera, M., Gómez, M. y Tapia, G. (2012). Induction of a protective immune response to rabies in sheep after oral immunization with transgenic maize. *Vaccine*, 30, 5551-5556.
58. Luther, H. (2004). *An Alphabetical List of Bromeliad Binomials*. The Bromeliad Society International. Inc. Orlando. FL. USA.
59. Malik, S., Cusido, R., Mirjalili, M., Moyano, E., Palazon, J. y Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochemistry*, 46, 23-34.
60. Nashima ,K., Terakami, S., Nishitani, C., Kuniyama, M., Shoda, M., Takeuchi, M., Urasaki, N., Tarora, K., Yamamoto, T. y Katayama, H. (2015). Complete chloroplast genome sequence of pineapple. *Tree Genetics & Genomes*, 11, 60.

61. Mathews, H. y Rangan, T. (1981). Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. *Scientia Horticulturae*, 14, 227-234.
62. Marana, J.P., Miglioranza, E. y De Faria, R.T. (2009) *In vitro* establishment of *Jacaratia spinosa* (Aubl.) ADC. *Semina-Ciencias Agrarias*. 30(2), 271-274.
63. Martínez, N., Dávila, C. y Villalobos, E. Ponencia. Respuestas morfogénicas *in vitro* de genotipos mexicanos de *Theobroma cacao* L y *Theobroma bicolor* Bonpl.(2015). X Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. Ciego de Ávila, Cuba.
64. Mercer, H. y Kerbauy, G. (1992). *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 247–249.
65. Mercer, H. y Kerbauy, G. (1993). Micropropagation of *Dyckia macedoi* an endangered endemic Brazilian bromeliad. *Botanic Gardens Micropropagation News*, 1, 70–72.
66. Mhatre, M., Nagi, L. y Ganapathi, T. (2014). Agrobacterium mediated Transformation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) leaf bases with MSI-99, a magainin analogue. *International Journal of Fruit Science*, 106-114.
67. Mhatre, M., Srinivas, L. y Ganapathi, T. (2011). Enhanced Iron and Zinc Accumulation in Genetically Engineered Pineapple Plants Using Soybean *Ferritin* Gene. *Biological Trace Element Research*, 144, 1219–1228.
68. Ming, R. *et al.* (2015). The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis, *Nature genetics*, 47 (12), 1435-1445.
69. Moyle, R., Koia, J., Vrebalov, J., Giovannoni, J. y Botella, J. (2014). The pineapple AcMADS1 promoter confers high level expression in tomato and Arabidopsis flowering and fruiting tissues, but AcMADS1 does not complement the tomato LeMADS-RIN (rin) mutant. *Plant Molecular Biology*, 86, 395-407.
70. Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25,135.
71. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 437-497.
72. Nakasone, H. y Paull, R. (1998). *Tropical Fruits*. CABI Publishing, Wallingford, UK, New York, USA.
73. Oliveira, P., del Ben, M., lasue, K., Pascual, M. y Paiva, R. (1999). Efeito de BAP, thidiazaron e sulfato de adenina na propagacao *in vitro* de abacaxi. *Universidade federal de vicosa*, 46 (265), 231- 237.

74. Ong, W., Voo, L. y Kumar, V. (2012). De Novo Assembly, Characterization and Functional Annotation of Pineapple Fruit Transcriptome through Massively Parallel Sequencing. *PLoS ONE*, 7 (10), 1-11.
75. Páez, M. (1998). Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas spp.* *Proceeding of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, 42, 128-132.
76. Pereira, F., Jose, B., Pinto, J., Rosado, L., Rodrigues, H., Bertolucci, S. y Laimeira, O. (2008). Micropropagation of the Fiber-rich Amazonian Species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae). *Horticulture Science*, 3 (7), 2134–2137.
77. Pereira, J., Lima, E., da Silva, T., Mesquita, A., Maciel, S. y da Silva, F. (2011). Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109 (2), 263-269.
78. Palomeque, A. (2015) Desarrollo in vitro y capacidad biosintética de raíces de Cactáceas transformadas con los genes silvestres de *A. rhizogenes*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
79. Peña, J., van Zanten, M., Lee, S., Patel, M., Voeselek, L., Fukao, T. y Bailey, J. (2011). Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in Arabidopsis uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. *The Plant Journal*, 67 (3), 434-446.
80. Perez, E., Ma, H., Melzer, M., Sether, D., Borth, W., Cheah, K., Nagai, C. y Hu, J. (2006). Development of transgenic pineapple plant with resistance to PMWaV-2, *Pineapple News*, 13, 41-42.
81. Pérez, E., Ramírez, R., Núñez, H. y Ochoa, N. 1999. *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México.
82. Perrotet, S. (1825). Catalogue raisonné des plantes introduites dans les colonies francaises de Mascareigne et de Cayenne, et de celles rapports“ees vivantes des mers d“Asie et de la Guyane, au Jardin des Plantes de Paris. *Memoires Society Linneas*, 3, 89–151.
83. Pinto, G. (2005). Applied aspects of pineapple flowering. *Bragantia*, 64 (4), 499–516.
84. Poh, T. y Khoo, C. (1975). *Tissue culture of pineapple*. In: Proceedings of the National Plant Tissue Culture Symposium, Kuala Lumpur, Malaysia, 51-58.
85. Raya, Y., Villegas, A. y Arellano, G. (2009). Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32,111-117.

86. Rojas, S., García, J. y Alarcon, M. (2004). Propagación asexual de plantas. CORPOICA, Ministerio de agricultura y Desarrollo rural de Colombia, PRONATTA, 1-30.
87. Roostika, I. y Mariska, I. (2003). *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. *Buletín AgroBio*, 6, 34-40.
88. Saifullah, K., Asma, N. y Bushra, A. (2004). Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pakistan Journal of Botanic*, 36 (3), 611-615.
89. Saini, R. y Jaiwal, P.K. (2002) Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science*. 163(1), 101-109.
90. Sánchez, G. (2018). Cultivo de tejidos para la producción de diosgenina en *Dioscorea* spp, de la Cuenca del Papaloapan México". Tesis Licenciatura. Universidad del Papaloapan. México.
91. Santana, M., Zambolim, E., Oliveira, L., Caixeta, E. y Zambolim, L. (2007). Análise molecular do rDNA de *Hemileia vastatrix*. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5 Águas de Lindóia.
92. Scherer, R., Ferreira, D., Corrrêa, A., Almeida, D., André, D. y Pedro, M. (2015). Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15, 66-71.
93. SIAP. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción Agrícola, México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
94. Singh, K.K. y Gurung, B. (2009) *In vitro* propagation of *R. maddenii* Hook. f. an endangered *Rhododendron* species of Sikkim Himalaya. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 37(1), 79-83.
95. Sipes, B., Nagai, C., McPherson, M., Atkinson, H., Christopher, D., Hu, J., Paull, R., Rohrbach, K., Moore, P., Oda, C., Wood, P. y Conway, M. (2002). Pineapple genetically modified for resistance to plant-parasitic nematodes. *Phytopathology*, 92, 76.
96. Soneji, J., Rao, P. y Mhatre, M. (2002a). Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77 (1), 28-32.

97. Soneji, J., Rao, P. y Mhatre, M. (2002b). Plantlet regeneration from leaf explants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 11 (2), 117-119.
98. Soneji, J., Rao, P. y Mhatre, M. (2002c). Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Reports*, 20, 891-894.
99. Soneji, J. (2001). Tissue culture studies in pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.) and molecular characterization of variants. PhD thesis, University of Mumbai, India, 129.
100. Smith, R. (2000). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. Academic Press. San Diego. USA.
101. Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, J. y Davey, M. (2001). Herbicide tolerant transgenic pineapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment. *Annals of Botany*, 88, 597–603.
102. Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, J. y Davey, M. (2003). Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cellular y Developmental Biology Plant*, 39, 450–454.
103. Sripaoraya, S., Keawsompong, S., Insupa, P., Davey, M., Power, J. y Srinives, P. (2006). Evaluation of transgene stability, gene expression and herbicide tolerance of genetically modified pineapple under field conditions. *Acta Horticulture*, 702, 37–40.
104. Tilkat, E., Onay, A., Yildirim, H. y Ayaz, E. (2009) Direct plant regeneration from mature leafexplants of pistachio, *Pistacia vera* L. *Scientia Horticulturae*, 121(3), 361-365.
105. Trusov, Y. y Botella, J. (2006). Silencing of the ACC synthase gene ACACS2 causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3953-3960.
106. Van Rensburg, J. (2007). First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal Plant and Soil*, 24, 147-151.
107. Vilanova, J., da Silva, A., Bonfim, J., Souza, N., Santos, D., Pereira, D. y Rodrigues, R.(2002). Bromelian enzyme from pineapple: In *in vitro* activity study under different micropropagation conditions. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 168, 234-246.
108. Villalobos, E., Rodriguez, G. y Perez, E. (2002). Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting in *Pinus maximartinezii*. Rzedowski and *P. pinceana* Gordon. *Plant Cell Report* , 20, 779-785.

109. Vinterhalter, B. y Vinterhalter, D. (1994). True to the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata*. *Baker Scientia Horticulturae*, 57, 253–263.
110. Vongpaseuth, K. y Roberts, S. (2007). Advancements in the Understanding of Paclitaxel Metabolism in Tissue Culture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8, 219-236.
111. Wakasa, K. (1989). Pineapple. In: Bajaj YPS (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees* (Vol 5), Springer, Berlin, 13-29.
112. Wakasa, K., Koga, Y. y Kudo, M. (1978) Differentiation from *in vitro* culture of *Ananas comosus*. *Japanese Journal of Breeding*, 28 (2), 113-121.
113. Zepeda, C. y Sagawa, Y. (1981). *In vitro* propagation of pineapple. *Horticulture Science*, 16, 495.
114. Zuraida, A., Shahnadz, N., Harteeni, A., Roowi, S., Radziah, C. y Sreeramanan, S. (2013). 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.

13. ANEXOS

ANOVA Contaminación Cayena lisa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	8	25640.7	3205.1	67.87	0.000
Error	18	850.0	47.2		
Total	26	26490.7			

S = 6.872 R-cuad. = 96.79% R-cuad. (ajustado) = 95.37%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TD9	3	6.66	A
TD8	3	25.00	AB
TD3	3	23.33	AB
TD7	3	38.33	C
TD2	3	75.00	C
TD1	3	80.00	C
TD5	3	83.33	C
TD4	3	88.33	C
TD6	3	88.33	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Supervivencia Cayena lisa

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	8	31185.2	3898.1	127.58	0.000
Error	18	550.0	30.6		
Total	26	31735.2			

S = 5.528 R-cuad. = 98.27% R-cuad.(ajustado) = 97.50%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TD1	3	93.33	A
TD4	3	90.00	A
TD5	3	88.33	A B
TD2	3	88.33	A B
TD6	3	73.33	B C
TD3	3	60.00	C
TD7	3	20.00	D
TD8	3	11.67	D
TD9	3	8.33	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Contaminación MD-2

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	9	25439.4	2826.6	90.81	0.000
Error	17	529.2	31.1		
Total	26	25968.5			

S = 5.579 R-cuad. = 97.96% R-cuad.(ajustado) = 96.88%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TD9	3	6.66	A
TD8	3	25.00	AB
TD7	3	23.33	AB
TD3	3	38.33	B
TD2	3	75.00	C
TD6	3	80.00	C
TD5	3	83.33	C
TD4	3	88.33	C
TD1	3	88.33	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Supervivencia MD-2

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	9	27974.1	3108.2	85.69	0.000
Error	17	616.7	36.3		
Total	26	28590.7			

S = 6.023 R-cuad. = 97.84% R-cuad.(ajustado) = 96.70

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T4	3	93.33	A
T5	3	88.33	A B
T6	3	73.33	B
T1	3	33.33	C
T2	3	26.67	C D
T3	3	23.33	C D E
T7	3	20.00	C D E
T8	3	11.67	D E
T9	2	8.33	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Caulogénesis Cayena lisa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	4	15733.3	3933.3	78.09	0.000
Error	10	503.7	50.4		
Total	14	16237.0			

S = 7.097 R-Sq = 96.90% R-Sq(adj) = 95.66%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T1	3	75.56	A
T3	3	68.89	A
T2	3	33.33	B
T5	3	0.00	C
T4	3	0.00	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Organogénesis Cayena lisa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	4	8871.1	2217.8	49.90	0.000
Error	10	444.4	44.4		
Total	14	9315.6			

S = 6.667 R-Sq = 95.23% R-Sq(adj) = 93.32%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupacion
T2	3	55.556	A
T3	3	48.889	A
T4	3	46.667	A
T1	3	2.222	B
T5	3	0.000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Rizogénesis Cayena lisa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	4	2891.85	722.96	122.00	0.000
Error	10	59.26	5.93		
Total	14	2951.11			

S = 2.434 R-cuad. = 97.99% R-cuad.(ajustado) = 97.19%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T3	3	35.556	A
T1	3	4.444	B
T5	3	0.000	B
T4	3	0.000	B
T2	3	0.000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Caulogénesis MD-2

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	3	11437	3812	32.17	0.000
Error	8	948	119		
Total	11	12385			

S = 10.89 R-Sq = 92.34% R-Sq(adj) = 89.47%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T3	3	75.56	A
T2	3	22.22	B
T5	3	0.00	B
T4	3	0.00	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Organogénesis MD-2

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	3	5789	1930	14.08	0.001
Error	8	1096	137		
Total	11	6886			

S = 11.71 R-Sq = 84.08% R-Sq(adj) = 78.11%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T3	3	55.56	A
T4	3	55.56	A
T2	3	44.44	A
T5	3	2.22	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Rizogénesis MD-2

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	3	4900	1633	9.19	0.006
Error	8	1422	178		
Total	11	6322			

S = 13.33 R-Sq = 77.50% R-Sq(adj) = 69.07%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T3	3	46.67	A
T5	3	0.00	B
T4	3	0.00	B
T2	3	0.00	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Enraizamiento Cayena lisa

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	4	1926.67	481.67	289.00	0.000
Error	10	16.67	1.67		
Total	14	1943.33			

S = 1.291 R-Sq = 99.14% R-Sq(adj) = 98.80%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T4	3	100.000	A
T3	3	100.000	A
T2	3	100.000	A
T1	3	100.000	A
T5	3	71.667	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Enraizamiento MD-2

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	4	2406.67	601.67	123.63	0.000
Error	10	48.67	4.87		
Total	14	2455.33			

S = 2.206 R-Sq = 98.02% R-Sq(adj) = 97.23%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T4	3	100.000	A
T3	3	100.000	A
T2	3	100.000	A
T1	3	100.000	A
T5	3	68.333	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA °Brix

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	0.968	0.968	1.27	0.274
Error	18	13.684	0.760		
Total	19	14.652			

S = 0.8719 R-Sq = 6.61% R-Sq(adj) = 1.42%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
MD-2	10	14.3400	A
Cayena lisa	10	13.9000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA Peso

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	0.1730	0.1730	2.11	0.164
Error	18	1.4767	0.0820		
Total	19	1.6497			

S = 0.2864 R-Sq = 10.49% R-Sq(adj) = 5.51%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T1	10	1.4610	A
T2	10	1.2750	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA No. de Hijuelos

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	5.000	5.000	15.00	0.001
Error	18	6.000	0.333		
Total	19	11.000			

S = 0.5774 R-Sq = 45.45% R-Sq(adj) = 42.42%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T2	10	1.0000	A
T1	10	0.0000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA No. de Clavos

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	9.800	9.800	15.47	0.001
Error	18	11.400	0.633		
Total	19	21.200			

S = 0.7958 R-Sq = 46.23% R-Sq(adj) = 43.24%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T2	10	1.9000	A
T1	10	0.5000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA No. de Gallitos

Source	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	551.25	551.25	126.40	0.000
Error	18	78.50	4.36		
Total	19	629.75			

S = 2.088 R-Sq = 87.53% R-Sq(adj) = 86.84%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T1	10	10.500	A
T2	10	0.000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Respuesta de discos de cortes longitudinales de la corona de piña

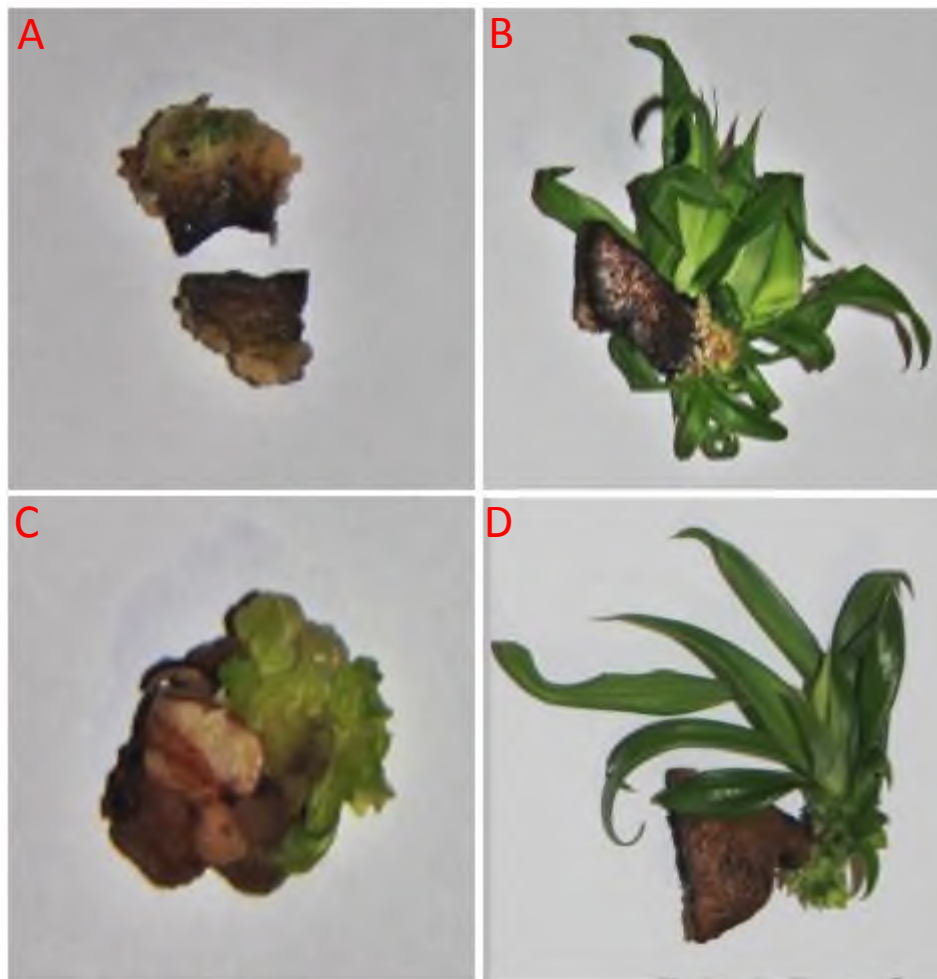


Figura 36.- Respuesta de discos de cortes longitudinales de la corona de piña. A, Picloram 3 mg/ml; B, TDZ 1 mg/ml; C, 2 mg/ml 2ip + 2 mg/ml 2,4-D; D, 0.5 2,4-D + 2 mg/ml BAP