

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Escuela Académico Profesional de Agronomía



TESIS

EFEECTO DE LA CITOCININA Y AUXINA EN LA ORGANOGÉNESIS DIRECTA

***IN VITRO* de *Ananas comosus* L. Merr, var. “ROJA TRUJILLANA”**

PRESENTADO POR:

Bachiller: Homero Ventura Chilón.

Asesores:

Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta.

M. Cs. Manuel Malpica Rodríguez.

Cajamarca-Perú

-2018-



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
Norte de la Universidad Peruana
Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, a los seis días del mes de Diciembre del Año dos mil dieciocho, se reunieron en el ambiente 2A-201 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los integrantes del Jurado designados por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 531-2018-FCA-UNC, Fecha 14 de noviembre de 2018, con el objeto de Evaluar la sustentación del Trabajo de Tesis titulada: **“EFECTO DE LA CITOCININA Y AUXINA EN LA ORGANOGÉNESIS DIRECTA IN VITRO de *Ananas comosus* L. Merr, Var. “ROJA TRUJILLANA”, del Bachiller: HOMERO VENTURA CHILÓN en Cajamarca, para optar el Título Profesional de INGENIERO AGRÓNOMO.**

A las 10 horas y 10 minutos y de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el acto. Después de la exposición del trabajo de Tesis, la formulación de preguntas y de la deliberación del Jurado, el Presidente anunció la **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD** con el calificativo de **DIECISÉIS (16)**

Por lo tanto, el graduando queda expedito para que se le expida el **Título Profesional** correspondiente.

A las 11 horas y 00 minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

Cajamarca, 06 de Diciembre de 2018.

Dr. Juan Francisco Seminario Cunya
PRESIDENTE

Ing. M.Sc. Víctor Eudelfio Torrel Pajares
SECRETARIO

M.Cs. David Ricardo Uriol Valverde
VOCAL

Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta
ASESOR

Mg. Manuel Malpica Rodríguez
ASESOR

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis profesores: Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta y al Mg. Manuel Malpica Rodríguez por su cooperación, paciencia, estímulo y disposición a renunciar a cualquier interés personal con el fin de que esta investigación fuera concluida.

EL AUTOR

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mis padres Víctor Ventura Arévalo y Edelmira Chilón Pompa, a quienes nunca tendré con que pagar todo lo que hicieron por mí, a ellos mi eterna gratitud.

A mi familia: Sarita Ventura, Hugo Ventura, Raúl Ventura, Jesica Ventura, Mariela Ventura, Manuel Ventura, Diego Efraín León Ventura y Carlos Figueroa Alfaro por su apoyo incondicional.

Gratitud especial al Ing. Teresita Moreno Huamán, por todo el apoyo y paciencia recibidos para el desarrollo de este trabajo. ¡Gracias!

EL AUTOR

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Antecedentes teóricos de la investigación.....	4
2.1.1. En la etapa de multiplicación de brotes.....	4
2.1.2. En la etapa de enraizamiento.....	4
2.2. Bases teóricas.....	5
1. Origen y distribución geográfica de la piña.....	5
2. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	6
3. Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	6
4. Desventajas del cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	7
5. Macro y micronutrientes.....	7
6. Vitaminas en el cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	7
7. Medio de cultivo Murashige y Skoog M.S. 1962.....	8
8. Fitorreguladores del crecimiento.....	8
a. Auxinas.....	9
b. Citocininas.....	10
c. Giberelinas.....	11
9. Preparación del medio de cultivo M.S. 1962.....	11
10. Etapas del cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	11
a. Desinfección.....	11

b. Establecimiento.....	12
c. Multiplicación de brotes.....	13
d. Enraizamiento.....	13
11. Definición de términos básicos.....	14
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODO.....	15
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Partes de la planta de la piña en un corte longitudinal.....	5
Figura 2. Ciclo del cultivo <i>in vitro</i> de la piña.....	17
Figura 3. Brotes de piña de un mes de siembra.....	19
Figura 4. Brotes de piña sin cortar y brotes cortados	19
Figura 5. Medida de la longitud de la raíz (l).....	21
Figura 6. Número de brotes obtenidos con por el efecto de KIN y BAP.....	24
Figura 7. Segmentos de tallo con el mayor brotamiento	24
Figura 8. Longitud de brotes obtenidos con la interacción de factores KIN x BAP.....	27
Figura 9. Plántulas de piña con la mayor longitud de brote.....	27
Figura 10. Número de raíces obtenidos con la interacción de factores ANA x AIB.....	30
Figura 11. Raíces con el mayor número.....	30
Figura 12. Longitud de raíces obtenidas con los niveles del factor ANA.....	32
Figura 13. Raíces obtenidas con el tratamiento T1.....	32
Figura 14. Longitud de raíces obtenidas con los niveles del factor AIB	33
Figura 15. Raíces con las mayores longitudes, obtenidas con el tratamiento T2.....	33
Figura 16. Efecto de la 6-benzylaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en los segmentos de piña de un mes de siembra.....	43
Figura 17. Efecto de la 6-benzylaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en los segmentos de piña, de cuatro meses de siembra.....	43
Figura 18. Efecto del medio de cultivo M.S. en el crecimiento longitudinal y en el enraizamiento de los brotes de piña, de seis meses de siembra.....	44
Figura 19. Efecto de la dosis de ácido α -naftalenacético α -ANA y ácido indol-3-butírico (AIB) en el enraizamiento de esquejes de dos meses de siembra.....	45
Figura 20. Efecto de la 6-benzylaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en los segmentos de piña de cuatro meses de siembra.....	46
Figura 21. Plántulas de piña sembradas en matraces y en magentas con aserrín de pino estéril, listas para salir a invernadero.....	46

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resultados de cultivo <i>in vitro</i> en <i>Ananas comosus</i> L. Merr.....	4
Tabla 2. Medio de cultivo M.S. 1962, para cultivo de tejidos vegetales.....	8
Tabla 3. Rangos de usos entre auxinas y citocininas.....	10
Tabla 4. Tratamientos en estudio para la multiplicación de brotes	18
Tabla 5. Tratamientos en estudio para el enraizamiento.....	20
Tabla 6. ANOVA para el efecto de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes	22
Tabla 7. ANOVA para los efectos simples de la dosis de 6-bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes.....	23
Tabla 8. ANOVA para el efecto de la dosis de 6-bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes.....	25
Tabla 9. ANOVA para los efectos simples de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes.....	26
Tabla 10. ANOVA para el efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3- butírico en el número de raíces.....	28
Tabla 11. ANOVA para los efectos simples, de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en el número de raíces.....	29
Tabla 12. ANOVA para el efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en la longitud de raíces.....	31
Tabla 13. Evaluaciones del número de brotes de un mes de siembra.....	40
Tabla 14. Evaluaciones de longitud de brotes de un mes, en centímetros (cm).....	40
Tabla 15. Evaluaciones del número de brotes de cuatro meses de siembra.....	41
Tabla 16. Evaluaciones de la longitud brotes de cuatro meses de siembra en centímetros (cm).....	41
Tabla 17. Evaluaciones del número de raíces de dos meses de siembra.....	42
Tabla 18. Evaluaciones de la longitud de raíces de dos meses en centímetros (cm).....	42

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca con el objetivo de determinar el efecto de la citocinina y auxina en la organogénesis directa in vitro de Ananas comosus L. Merr, var. "Roja Trujillana". Involucró dos fases: multiplicación de brotes y enraizamiento. Se utilizó el diseño completo al azar (DCA), bajo arreglo factorial 3x3, con nueve tratamientos, y siete repeticiones. Se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan al 5 % de probabilidad. En la multiplicación de brotes se utilizó el medio Murashige y Skoog (M.S.) 1962, con kinetina (KIN) 0, 8 y 16 mg·L⁻¹ y 6-benzylaminopurina (BAP) 0, 2 y 4 mg·L⁻¹. El tratamiento T5 (M.S. + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP), permitió obtener el mayor número promedio de brotes por plántula: 108. Con el tratamiento T1 (M.S. + 0 mg·L⁻¹ KIN + 0 mg·L⁻¹ BAP), se logró la mayor longitud promedio de brotes: 5 cm/plántula. En el enraizamiento, se usó: M.S. 1962 con ácido α -naftalenacético (ANA): 0, 2 y 4 mg·L⁻¹ y ácido indol-3-butírico (AIB): 0, 2 y 4 mg·L⁻¹. Con el tratamiento T9 (4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹ AIB), se obtuvo el mayor número promedio de raíces: 14 raíces/plántula. Con el tratamiento T2 (M.S. + 0 mg·L⁻¹ ANA + 2 mg·L⁻¹ AIB), se obtuvo la mayor longitud promedio de raíz: 2,49 cm/plántula.

Palabras clave: reguladores de crecimiento, 6-benzylaminopurina, kinetina, ácido indol-3-butírico, ácido α -naftalenacético, Murashige y Skoog 1962.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Laboratory of Plant Biotechnology of the Faculty of Agrarian Sciences of the National University of Cajamarca in order to determine the effect of cytokinin and auxin in the direct in vitro organogenesis of Ananas comosus L. Merr, var. "Red Trujillana". Involved two phases: multiplication of shoots and rooting. The complete randomized design (DCA) was used, under 3x3 factorial arrangement, with nine treatments, and seven repetitions. The Duncan multiple range test was used at 5 % probability. The Murashige and Skoog (M.S.) 1962 medium was used in the multiplication of shoots, with kinetin (KIN) 0, 8 and 16 mg·L⁻¹ and 6-benzylaminopurine (BAP) 0, 2 and 4 mg·L⁻¹. The treatment T5 (M.S. + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP), allowed to obtain the highest average number of shoots per seedling: 108. With the treatment T1 (M.S.+0 mg·L⁻¹ KIN + 0 mg·L⁻¹BAP), the highest average length of shoots was achieved: 5 cm/seedling. In the rooting, the following was used: M.S. 1962 with α -naphthaleneacetic acid (ANA): 0, 2 and 4 mg·L⁻¹ and indole-3-butyric acid (AIB): 0, 2 and 4 mg·L⁻¹. With the T9 treatment (4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹AIB), the highest average number of roots was obtained: 14 roots/seedling. With the treatment T2 (M.S. + 0 mg·L⁻¹ ANA + 2 mg·L⁻¹ AIB), the highest average root length was obtained: 2,49 cm/seedling.

Key words: growth regulators, 6-benzylaminopurine, kinetin, indole-3-butyric acid, 1-naphthaleneacetic acid, Murashige and Skoog.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La piña, *Ananas comosus* L. Merr., se propaga por métodos asexuales, sin embargo, la principal limitante para la ampliación de las áreas cultivadas no sólo está asociada con los defectos en la identidad genética y sanitaria de los hijuelos, sino principalmente al prolongado tiempo para producirlos, pues en promedio toma 24 meses contados a partir después del inicio del ciclo de vida de la planta (Uriza 2011). Es un cultivo comercial de elevada demanda en los mercados nacional e internacional por la calidad de sus frutos. En el Perú, las mayores áreas cosechadas se ubican en las regiones Junín, La libertad y Loreto, con 309 916; 25 475 y 17 472 t de fruta producida (Compendio Estadístico Perú 2014). A nivel nacional se cultivan 14 740 ha, y por lo tanto, existe una demanda aproximada de 737 millones de hijuelos por año, cuya procedencia no garantiza la calidad genética y sanitaria de los cultivos. En consecuencia, es necesario buscar nuevos métodos de propagación, que permitan acelerar la producción de propágulos para su posterior siembra en campo, entre los cuales, la técnica de cultivo *in vitro* que, si bien permite mejorar sustancialmente el proceso de multiplicación de genotipos previamente seleccionados en campo, aún tiene componentes que deben ser definidos para lograr mayor eficiencia en la producción de plántulas *in vitro* de piña.

Diversas investigaciones se han realizado para utilizar las ventajas del cultivo *in vitro* en el campo agrícola, particularmente para mejorar la eficiencia de los métodos de propagación de la piña. Majid *et al.* (2013) determinó que la fuente de explantas es importante en el proceso de multiplicación *in vitro* de piña, siendo los más calificados los segmentos de tallo, sobre todo si se los somete al efecto de la kinetina.

Haya (2004), destaca la importancia de la suplementación del medio de cultivo Murashige y Skoog (M.S.) 1962, con $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-benzylaminopurina (BAP) y $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido α -naftalenacético (ANA), para alcanzar un 90 % de diferenciación de yemas de piña.

Otros investigadores como Mogollón *et al.* (2004), lograron una multiplicación de brotes, en los cultivares: “Queen Australia” con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP y $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA; “Tabe Cana”, “Eruwa cana” y “Gobernadora” con $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina y pH 5,4; independientemente de las concentraciones utilizadas de auxina y citocinina.

La micropropagación *in vitro* de piña, se realiza en medio de cultivo semisólido y líquido (Etienne y Berthouly 2002). En medio semisólido se puede obtener 13,6 brotes en cinco meses, a partir de la siembra de yemas axilares (Majid *et al.* 2013), 31 brotes en cuatro semanas, a partir de la siembra de brotes (Zuraida *et al.* 2011), y 6 000 brotes en ocho semanas, a partir de la siembra de 120 brotes en un biorreactor de 10 L (Escalona *et al.* 1999).

El problema de los 24 meses que debe transcurrir para producir hijuelos de piña sin defectos de identidad genética, encontraría solución mediante la propagación *in vitro*, una tecnología que permite su rápida multiplicación de plantas. Sin embargo, el éxito de esta técnica a escala comercial depende de su adecuada implementación y obtención de una alta tasa de sobrevivencia de las plantas obtenidas, siendo por lo tanto necesario estudiar sus exigencias de manejo *in vitro*, nutricionales y hormonales a fin de establecer un protocolo para incrementar su multiplicación y enraizamiento. Lo expuesto anteriormente, evidencia que los métodos y técnicas de micropropagación *in vitro* deben ser ajustados a las exigencias de cada variedad de piña, tal es el caso de la variedad “Roja Trujillana”, razón por la cual se inició la presente investigación con los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la citocinina y auxina en la organogénesis directa *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merr, var. “Roja Trujillana”.

1.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la dosis de la 6-bencilaminopurina (0, 2 y 4 mg·L⁻¹) y kinetina (0, 8 y 16 mg·L⁻¹) en el número y longitud de brotes, a partir de la siembra de segmentos *in vitro* de tallo de 4 mm de longitud, en la etapa de multiplicación de brotes.
2. Determinar el efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético (0, 2 y 4 mg·L⁻¹) y ácido indol-3-butírico (0, 2 y 4 mg·L⁻¹) en el número y longitud de raíces, a partir de la siembra de esquejes *in vitro* de 5 cm a 6 cm de longitud, en la etapa de enraizamiento.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes teóricos de la investigación en piña

2.1.1. En la etapa de multiplicación de brotes

En la Tabla 1, observamos resultados de investigaciones en el cultivo *in vitro* de piña *Ananas comosus* L. Merr, en medio de cultivo semisólido y líquido, los cuales contienen M.S. 1962, suplementado con fitorreguladores: kinetina (KIN), 6-benzylaminopurina (BAP), α -naftalenacético (ANA) y pacrobutrazol (PBZ).

Tabla 1. Resultados de cultivo *in vitro* en *Ananas comosus* L. Merr.

Medio	Explanta inicial	Fitorreguladores ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Tiempo	Resultados	Autor
Semisólido	brote	2 BAP	2 meses	16,8 brotes	Haya 2004
	brote	1 KIN	2 meses	18,6 brotes	Majid <i>et al.</i> 2013
	yema axilar	1,5 BAP	5 meses	30,3 brotes	Velásquez <i>et al.</i> 1994
	yema axilar	2,5 BAP	5 meses	35,94 brotes	Velásquez <i>et al.</i> 1994
	plántulas <i>in vitro</i>	3,5 BAP	2 meses	12,13 brotes	Saucedo <i>et al.</i> 2008
Líquido	brote	1 BAP	1 mes	31 brotes	Zuraida <i>et al.</i> 2011
	brote	1 BAP	3 meses	204 brotes	Zuraida <i>et al.</i> 2011
	yema axilar	1 BAP + 0,01 ANA	8 meses	38,6 brotes	Mogollón <i>et al.</i> 2004
	brotes de 2 a 3 cm de longitud	2,1 BAP + 0,3 ANA + 1 PBZ	2 meses	6 000 brotes	Escalona <i>et al.</i> 1999**

** Escalona *et al.* (1999), usó medios de cultivo líquido en biorreactores.

2.1.2. En la etapa de enraizamiento

En piña variedad "Queen Australia" a las cuatro semanas se logra 28,4 raíces/explanta con M.S. + 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA. También se obtiene enraizamiento con M.S., sin hormonas (Mogollón *et al.* 2004). En el ecotipo "Santa Rosa" el mayor número y longitud de raíces se registraron al emplear M.S. + 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA y 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB, obteniendo 3,1 raíces/explanta y una longitud de 7,2 cm; en la sexta

semana (Millones s.f.). Estudiando el ecotipo “Tabë Känä”, con $M.S. + 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, se logró 5,54 raíces por explanta, a los siete meses (Pineda *et al.* 2012). El mejor enraizamiento *ex vitro* y aclimatación se dio en la var. “Hawaiana”, sin la adición de hormonas, con un promedio en número de raíces de 7,25 cm/explanta, y una longitud de 3,35 cm/explanta. También hay enraizamiento con $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA, en la var. Hawaiana, con una sobrevivencia de 93,75 % y 79,16 % para la var. “Champaka” (Saucedo *et al.* 2008).

2.2. Bases teóricas

1. Origen y distribución geográfica de la piña

La piña, *Ananas comosus* L. Merr, es originaria de América Tropical especialmente de Brasil y Paraguay (Montilla de Bravo *et al.* 1997), esta planta denominada ananás (fruta excelente), en guaraní; es originaria de América del Sur, en la región que abarca el Centro y Sureste de Brasil, Noreste de Argentina y Paraguay. Sin embargo, la mayoría de las especies del género *Ananas* se han encontrado en la región de la Guyana, la que se menciona como probable centro de origen. Pertenece a la familia de las Bromeliáceas (Baraona y Sancho 1991) y se propaga vegetativamente (Uriza 2011) a través de hijuelos del tallo, del pedúnculo y de la corona como se observa en la figura 1 (Munive 2015).

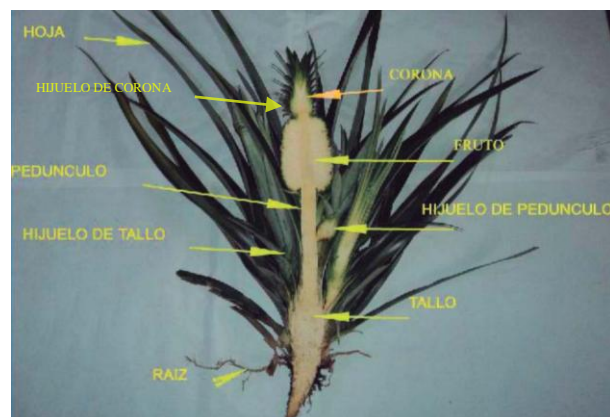


Figura 1. Tipos de hijuelo utilizados en la propagación de la piña.

La piña es un cultivo de importancia comercial, por la demanda de su fruto (Pineda *et al.* 2012). La variedad “Roja Trujillana” es cultivada en la región de La Libertad, y se caracteriza por presentar hojas lisas sin espinas, de color verde oscuro-rojizo, tiene fruto de forma cilíndrica, con muchos bulbillos en la base del fruto y pocos hijuelos; la piel del fruto (cáscara) a la madurez, presenta una coloración rojiza, la pulpa es de color blanco crema y de buena consistencia, brix alrededor de 12, ligeramente ácida; soporta bien el almacenamiento y el transporte, la duración de la piña en anaquel es bastante larga. La piña es susceptible al daño por “cochinilla harinosa” y “barrenador del fruto” (PEPP s.f.).

2. Cultivo *in vitro* de plantas

Los explantas grandes, en campo, generalmente llevan consigo virus, viroides, micoplasmas (Agrios 1998) hongos y bacterias (Bello *et al.* 2016, Kaneshiro *et al.* 2008), pero, gracias al cultivo de tejidos vegetales, se puede obtener millones de plantas sanas e idénticas, libre de bacterias, hongos y virus, en tan sólo unos meses, acelerando y ampliando los límites del fitomejoramiento (Agrios 1998).

3. Ventajas del cultivo *in vitro* de plantas

- a) Incrementa en el número de plantas (Agrios 1998).
- b) Permite obtener plantas difíciles de propagar en campo (Suarez y Quintero 2014).
- c) Se puede simular las condiciones ambientales del campo en el laboratorio, como: pH, temperatura, humedad, fotoperiodo (Mogollón *et al.* 2004).
- d) En espacios de 1 m² se puede obtener 6 000 brotes de piña, economizando tiempo y recursos (Escalona *et al.* 1999).
- e) Permite mejorar los protocolos de micropropagación (Escalona *et al.* 1999).
- f) Se puede obtener plantas en cualquier época del año, almacenándolas en poco espacio.
- g) Es una herramienta para el fitomejoramiento, permitiendo esta técnica, la propagación de plantas en vías de extinción, así como la clonación de individuos "élite" con desempeño agronómico destacado, también permite esta técnica, la

producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma: material de un conjunto de individuos que representa la variabilidad genética de una población vegetal, otra ventaja del cultivo *in vitro* es que se puede obtener metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejoramiento genético de plantas, germinación de semillas, producción de haploides y dobles haploides, y se puede realizar estudios fisiológicos de las plantas (Guadalupe 2016).

4. Desventajas del cultivo *in vitro* de plantas

- a) Requiere personal especializado (CIAT 1991).
- b) Las instalaciones y los reactivos de un laboratorio de cultivo de tejidos, son costosos (CIAT 1991).
- c) No todas las especies de plantas, son viables de propagar *in vitro*; algunas son recalcitrantes, y cada especie requiere de métodos específicos.
- d) La estandarización de protocolos resulta costosa (Guadalupe 2016).

5. Macro y micronutrientes

Las sales inorgánicas proporcionan los macronutrientes, que incluye carbono (C), hidrogeno (H), oxígeno (O), fósforo (P), potasio (K), nitrógeno (N), azufre (S), calcio (Ca), y magnesio (Mg) y los micronutrientes tales como el hierro (Fe), cloro (Cl), manganeso (Mn), boro (B), zinc (Zn), cobre (Cu), y molibdeno (Mo) (CIAT 1991).

6. Vitaminas en el cultivo *in vitro* de plantas

La tiamina, es la vitamina más importante en el cultivo *in vitro* de plantas (Hurtado y Merino 1991) y su uso varia de 0,1 a 0,5 mg·L⁻¹, también se utiliza ácido nicotínico (0,5 mg·L⁻¹), piridoxina (0,5 mg·L⁻¹), glicina (2 mg·L⁻¹), myo-inositol (100 mg·L⁻¹), entre otros (Hartmann y Kester 1995).

7. Medio de cultivo Murashige y Skoog (M.S.), 1962

En la Tabla 2, se aprecia los componentes del medio de cultivo M.S. 1962, para micropropagar plantas (Etienne y Berthouly 2002).

Tabla 2. Medio de cultivo M.S. 1962, para cultivo de tejidos vegetales.

Componentes	mg·L ⁻¹
Nitrato de amonio	1 650
Ácido bórico	6,20
Cloruro de calcio (anhidro)	332,2
Hexahidrato de cloruro de cobalto	0,025
Sulfato cúprico pentahidratado	0,025
Disodio EDTA dihidratado	37,26
Glicina	2,0
Sulfato de magnesio (anhidro)	180,7
Manganeso sulfato monohidratado	16,9
myo-Inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Yoduro de potasio	0,83
Nitrato de potasio	1 900
Fosfato de potasio monobásico	170
Clorhidrato de piridoxina	0,5
Molibdato de sodio dihidratado	0,25
Clorhidrato de tiamina	0,1
Sulfato de zinc heptahidrato	8,6

Fuente: Sigma-Aldrich (s.f.).

8. Fitorreguladores del crecimiento

Fichet (2017), menciona que los fitorreguladores permiten el funcionamiento normal de una planta regulando las diferentes actividades de sus células, tejidos y órganos desde la germinación hasta la senescencia de la planta. Las principales características de las fitohormonas son las siguientes:

- a) Facilitan la comunicación entre células y coordinan sus actividades.
- b) El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos.

- c) La regulación que ejercen debe contemplarse desde la perspectiva de una interacción hormonal.
- d) Una misma fitohormona puede sintetizarse en diferentes puntos de la planta.
- e) Actúan sobre células vecinas sin haber transporte a larga distancia.
- f) Una misma fitohormona actúa sobre varios procesos y sobre un proceso específico actúan muchas de ellas. Para ser considerada como hormona vegetal, la molécula debe cumplir tres condiciones:
 - Tener actividad en el crecimiento vegetativo.
 - Ser de pequeño tamaño molecular.
 - Conocerse su receptor: proteína a la cual se acopla la forma activa de una hormona vegetal y permite la activación de genes, en el núcleo de esa célula en respuesta a esa señal fitohormonal.

La actividad fisiológica de las plantas es regulada por fitohormonas, localizadas en meristemas apicales y hojas jóvenes. Entre otras fitohormonas, tenemos a las auxinas, citocininas, y giberelinas (Hartmann y Kester 1995).

a. Auxinas

Grupo de reguladores del crecimiento de plantas que estimulan la división celular, alargamiento, iniciación de floración (Zaid *et al.* 2004), diferenciación celular (por ejemplo, participan en la formación de haces vasculares), son la señal de dominancia apical e inhibición de la ramificación lateral, crecimiento del fruto, y en diversos tropismos: fototropismo y gravitropismo. Principal forma activa: ácido indolacético (AIA) (Fichet 2017). Participan durante todo el ciclo de vida de las plantas, se distribuyen dentro de los tejidos, lo que da lugar a procesos morfogenéticos. Los gradientes de auxinas se establecen, principalmente, por medio del transporte polar (Garay-Arroyo *et al.* 2014). La regulación de auxinas en la planta incluye: (1) La cantidad de auxina biológicamente activa dentro de los tejidos que está dada por la expresión diferencial de los genes, tanto en tiempo como en espacio, que codifican para receptores, transportadores y aquellos que participan en la síntesis de las auxinas; (2) La

capacidad de formar heterodímeros de las proteínas que participan en la vía de transducción de señales lo cual aumenta la combinatoria de las mismas y, por lo tanto, la regulación de la expresión genética en respuesta a auxinas; (3) La localización dinámica y polar dentro de la membrana plasmática de algunos de los transportadores de auxinas, lo cual permite que el flujo de las mismas se ajuste a diferentes condiciones de crecimiento; y (4) Finalmente, la cantidad libre de auxinas que se modifica por conjugación y por compartimentalización. La comprensión de cómo estos procesos se acoplan para dar una respuesta diferencial de células y tejidos es uno de los principales retos actuales en el desarrollo de las plantas (Garay-Arroyo *et al.* 2014).

Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos *in vitro* son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido 3-indoleacético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB) (CIAT 1991).

b. Citocininas

Son reguladores de crecimiento de las plantas caracterizadas como sustancias que inducen la división celular. Según su concentración estimulan el desarrollo del callo, y brotes debido a que inhiben la dominancia apical (Majid *et al.* 2013), siendo las más usadas: kinetina (KIN), bencilaminopurina (BAP), y zeatina (ZEA) (CIAT 1991).

Hartmann y Kester (1995), mencionan que el control del cultivo *in vitro* de plantas, se logra manipulando rangos de concentraciones entre auxinas y citocininas, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Rangos de usos entre auxinas y citocininas.

Auxinas	Citocininas
ANA: de 0,1 a 10 mg·L ⁻¹	KIN: de 0,1 a 10 mg·L ⁻¹
AIB: de 0,1 a 10 mg·L ⁻¹	BAP: de 0,1 a 10 mg·L ⁻¹
2,4-D: de 0,05 a 0,5 mg·L ⁻¹	
AIA: de 1 a 50 mg·L ⁻¹	

c. Giberelinas

Están involucradas en la división y elongación celular, crecimiento de frutos, desarrollo floral (inhibición de la floración en frutal, pero inducción de la floración en especies anuales), crecimiento en longitud de la raíz principal e inhibición de la ramificación radical, inhibición del desarrollo de pigmentos en fruta, fotomorfogénesis y promoción de la germinación de semillas. Principales formas activas: GA₁, GA₂, GA₃, GA₄, GA₇ (Fichet 2017).

9. Preparación del medio de cultivo M.S. 1962

Para preparar un litro de medio de cultivo, primero se agrega 250 mL de agua destilada, mientras se agita, se debe añadir el producto en polvo M.S., sacarosa, agar, auxinas y citocininas; disuelto los productos, se debe enrasar a un litro, ajustando el pH deseado, con NaOH y HCl, calentando la solución hasta la claridad el agar, por último, dispensar el medio de cultivo en recipientes, luego colocar en autoclave a una temperatura de 121 °C o 15 psi, durante al menos 15 minutos (Sigma-Aldrich s.f.).

10. Etapas del cultivo *in vitro* de plantas

Hartmann y Kester (1995), sugieren cuatro etapas del cultivo *in vitro* de plantas: desinfección, establecimiento, multiplicación de brotes y enraizamiento.

a. Desinfección

Hurtado y Merino (1991), recomiendan: (1) Lavar los explantas en la cámara de flujo laminar; (2) Sumergir los explantas, en alcohol al 70 % durante 30 segundos; (3) Pasar los explantas, a la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5 % por 20 minutos; (4) Enjuagar 3 a 4 veces con agua destilada estéril.

Garita y Gomes (2000), sugieren: (1) Lavar con agua y detergente las coronas de piña previamente deshojadas; (2) Sumergir y agitar dichas coronas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 5 minutos; (3) Enjuagar las coronas con agua destilada estéril tres veces; (4) Extraer yemas axilares bajo una cámara de flujo

laminar; (5) Sumergir las yemas axilares en la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 20 minutos; (6) Enjuagar las yemas con agua destilada estéril.

Hartmann y Kester (1995), mencionan que los explantas son colocados en placas de Petri, en la superficie de un medio de cultivo de agar, con sales básicas y azúcar, sin hormonas. Si los explantas, presentan fenoles se debe añadir antioxidantes: carbón activado, ácido ascórbico, ácido cítrico, los cuales también, se pueden utilizar en el lavado de los explantas. En las etapas iniciales del cultivo *in vitro* de plantas, es recomendable cambios frecuentes de medios de cultivo: líquido o sólido durante varios días, en las etapas iniciales del cultivo *in vitro* de plantas.

Majid *et al.* (2013), recomiendan remojar yemas axilares de piña en solución antioxidante de ácido cítrico ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido ascórbico ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), luego dejarlas en el refrigerador durante 24 horas para evitar la exudación de compuestos fenólicos, pasado este tiempo, retirar las yemas axilares del refrigerador, y esterilizarlas con hipoclorito de sodio al 1,05 %, más una gota de Tween 20, durante 15 minutos. Luego enjuagarlas con agua destilada estéril por 3 veces durante 15 minutos

Garita y Gomes (2000), obtuvo mayor sobrevivencia de brotes apicales de piña (80,69 % promedio) con tiempos de inmersión de 15 minutos en NaOCl al 1 % de concentración.

b. Establecimiento

En esta etapa, se instala el explanta en el medio de cultivo *in vitro* con el fin de inducir al desarrollo de brotes múltiples para la multiplicación posterior, lo cual implica estimular la formación de brotes axilares y la iniciación de formación de callo en superficies cortadas (Hartmann y Kester 1995).

En piña var. “Queen”, las yemas axilares rompen su latencia en un periodo de cuatro a cinco meses con M.S. + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP (Majid *et al.* 2013), en el ecotipo “Eruwã

Canã”, se obtiene un tamaño de brote de 4 mm de longitud, en cuatro semanas, con M.S. + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,5 mg·L⁻¹ ANA + 0,5 mg·L⁻¹ AIB (Blanco *et al.* 2011), en la variedad Champaka y Hawaiana el mejor medio de cultivo fue M.S. con 0,5 mg·L⁻¹ BAP + 1 mg·L⁻¹ AIB + 1 mg·L⁻¹ ANA (Saucedo 2008).

c. Multiplicación de brotes

En esta etapa, cada explanta desarrolla y forma un macollo de brotes, que salen de una masa basal común, expandida de tejido de tipo callo, esta estructura se divide en propágulos, que se trasplantan en un medio de cultivo fresco. Se recomienda usar el mismo medio de la etapa de establecimiento, pero a menudo se aumenta la concentración de citocinina. Es necesario, experimentar varias concentraciones de reguladores de crecimiento, a fin de optimizar la tasa de multiplicación y la producción de plántulas uniformes. El tamaño del explanta y la forma de cortarla y separarla, varía de acuerdo a la especie, existiendo una masa crítica de tejido que debe alcanzar.

La colocación de brotes alargados en posición horizontal sobre el agar, funciona como un tipo de acodamiento y a menudo estimula el desarrollo de brotes laterales (Hartmann y Kester 1995).

d. Enraizamiento

En esta etapa se incrementan las concentraciones de auxinas y se reducen sales inorgánicas y citocininas (Hartmann y Kester 1995). Las sales se reducen a la mitad de su concentración original, la sacarosa se reduce a una concentración final de 1 a 2 %. El uso de auxinas a elevadas concentraciones, inducen a la formación de callos en la base de las estacas, por lo cual es necesario optimizar los protocolos, impidiendo su formación. Puede realizarse en condiciones *in vitro*: medio de cultivo solidificado con agar, y *ex vitro*: usando perlita y/o vermiculita, humedecidas con medio nutritivo y agua (Olmos *et al.* 2010).

11. Definición de términos básicos

Agar: Polisacárido que, por sus propiedades gelificantes, se utiliza en la preparación de medios nutritivos para los cultivos. Se obtiene de la Rhodophyta: alga roja. Tanto el tipo de agar como su concentración pueden afectar al crecimiento y la apariencia de los explantas cultivados (Zaid *et al.* 2004).

Ápice: Parte de la raíz o tallo que contiene el meristemo apical o primario (Zaid *et al.* 2004).

Callo: Masas no organizadas de células diferenciadas y no diferenciadas que se dividen activamente a consecuencia de una herida o bien en un cultivo de tejido mantenido en un medio provisto de factores de crecimiento (Zaid *et al.* 2004).

Dominancia apical: Fenómeno por el que la presencia de una yema terminal (apical) en la rama de una planta inhibe el crecimiento de las yemas laterales (axilares) (Zaid *et al.* 2004).

pH óptimo: pH característico al que una enzima tiene actividad máxima (Nelson y Cox 2009).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Ubicación geográfica

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), la cual está ubicada a 2703 m.s.n.m. y 07° 8' LS y 78° 30' LW. Durante el periodo experimental (Noviembre 2016 – Agosto 2017) la temperatura promedio fue de 29 °C, con una máxima de 34° C y mínima de 24 °C. La humedad relativa promedio fue de 45 %, y el fotoperiodo fue regulado a 16/8 horas de iluminación y oscuridad, respectivamente.

3.2. Materiales y equipos de Laboratorio

Cámara de flujo laminar (Cabina FLOW 100 H).

Autoclave, (PEMALOR).

Balanza analítica (OHAUS).

Agitador magnético marca (CAT M6/1).

Destilador de agua (CAT).

Horno esterilizador (MEMMERT).

Cocina eléctrica (GEOVANA).

Medio Murashigue & Skoog (1962) (CAISON) el cual se compró.

Reguladores de crecimiento: Kinetina (KIN), bencilaminopurina (BAP), ácido indolbutírico (AIB), ácido α -naftalenacético (ANA).

Ácido clorhídrico (HCl) 1N.

Hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Hipoclorito de sodio (NaClO).

Alcohol etílico o etanol (C₂H₅OH) de 70 %.

Sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁).

Bacto-Agar (DIFCO).

Tubos de ensayo de ($\varnothing = 12$ mm) y 10 cm de altura, papel milimetrado.

3.3. Material experimental

1. En la etapa de multiplicación de brotes:

Material biológico: Segmentos de tallo de 4 mm de longitud.

Material químico: Citocininas: KIN: 0, 8 y 16 mg·L⁻¹ y BAP: 0, 2 y 4 mg·L⁻¹.

2. En la etapa de enraizamiento:

Material biológico: Esquejes *in vitro* de 5 cm a 6 cm de longitud.

Material químico: Auxinas: ANA: 0, 2 y 4 mg·L⁻¹ y AIB: 0, 2 y 4 mg·L⁻¹.

3.4. Metodología

a. Etapa de multiplicación de brotes de piña: En esta etapa se empleó el medio de cultivo M.S. 1962, hormonalmente enriquecido con citocininas: KIN y BAP. En el primer mes, se emplearon segmentos de la base del tallo de 4 mm de longitud, con un diámetro que varía de 2 a 6 mm, con tres a cuatro yemas axilares visibles, con y sin yemas apicales, los cuales procedieron de plántulas *in vitro* de nueve meses de edad, vigorosas y con una altura promedio de 12 cm. Los segmentos fueron sembrados en 3 mL de medio de cultivo, en tubos de ensayo de ($\varnothing = 12$ mm, h = 10 cm). Pasados los 30 días, cada segmento de tallo, fue sembrado en 30 mL de medio de cultivo, en matraces de 125 mL. En el cuarto mes se procedió a cortar y separar los segmentos de los tallos brotados, a fin de obtener esquejes, los cuales fueron sembrados en M.S. sin reguladores de crecimiento y se esperó dos meses adicionales, hasta que obtengan una altura aproximada de 5 a 6 cm. El medio de cultivo fue de consistencia semisólida (Agar 6g·L⁻¹, pH=5,7). Cada 30 días se renovó los medios de cultivo (Figura 2).

b. Etapa de enraizamiento: Se empleó M.S. hormonalmente enriquecido con auxinas (ANA y AIB). En el sexto mes, cada esqueje obtenido de la fase de multiplicación, fue sembrado en 50 mL de medio de cultivo, contenidos en matraces de 200 mL.

El medio de cultivo fue de consistencia semisólida (Agar 6 g·L⁻¹), con un valor de pH regulado a 5,7. Los explantas fueron asépticamente sembrados en los medios previamente esterilizados y renovados cada 30 días.

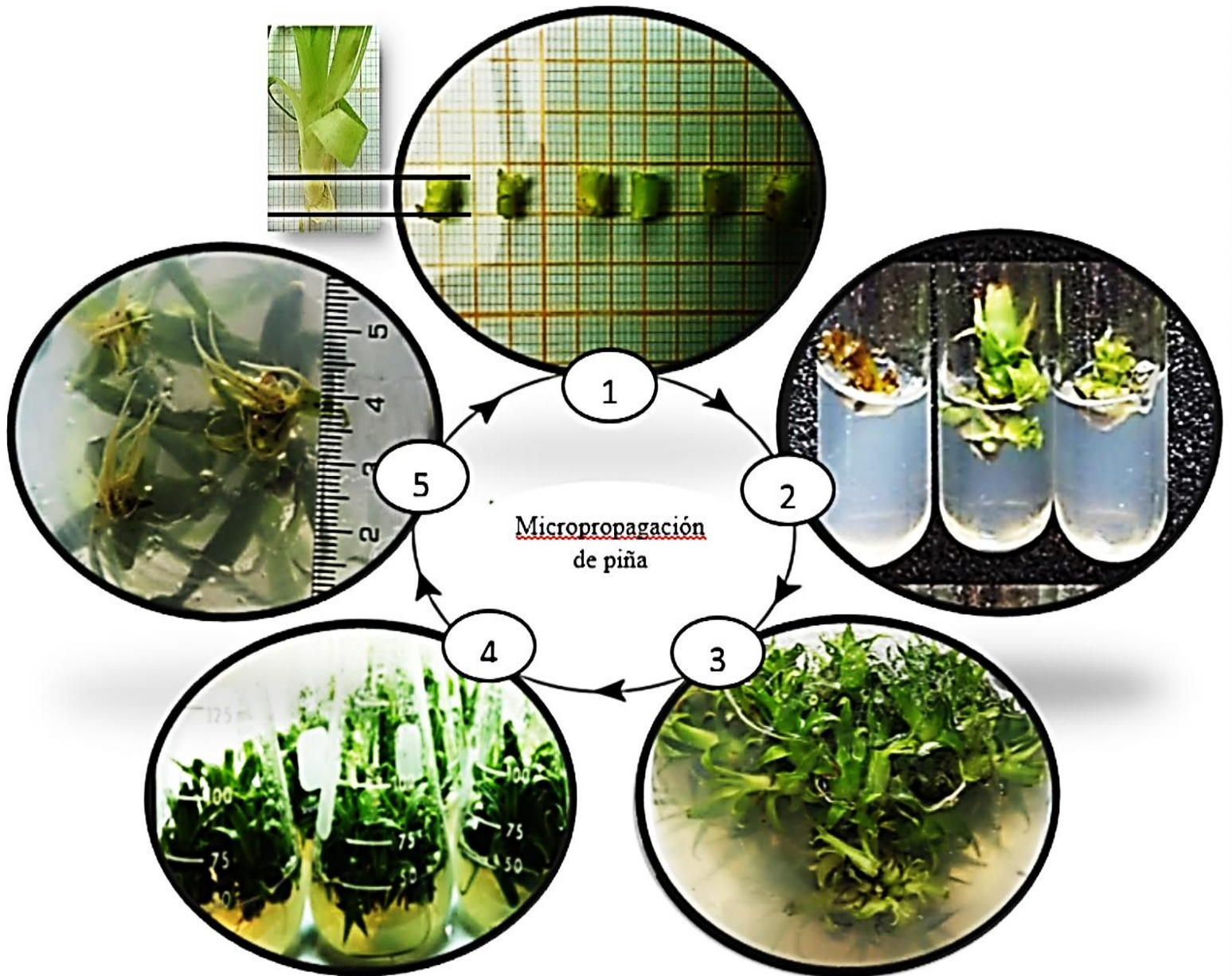


Figura 2. Ciclo del cultivo *in vitro* de la piña. 1: Segmentos de la base del tallo de 4 mm de longitud. 2: Brotes de un mes de siembra. 3: Brotes de cuatro meses de siembra. 4: Brotes de seis meses de siembra. 5: Esquejes enraizados de dos meses de siembra.

Factores, niveles y tratamientos en estudio de la etapa de multiplicación de brotes:

Factor K: Kinetina (KIN)

k_0 : 0 mg·L⁻¹

k_1 : 8 mg·L⁻¹

k_2 : 16 mg·L⁻¹

Factor B: 6-benzylaminopurina (BAP)

b_0 : 0 mg·L⁻¹

b_1 : 2 mg·L⁻¹

b_2 : 4 mg·L⁻¹

Tabla 4. Tratamientos en estudio para la multiplicación de brotes.

Número	Clave	Tratamientos
1	k0 b1	0 mg·L ⁻¹ KIN + 0 mg·L ⁻¹ BAP
2	K0 b2	0 mg·L ⁻¹ KIN + 2 mg·L ⁻¹ BAP
3	K0 b3	0 mg·L ⁻¹ KIN + 4 mg·L ⁻¹ BAP
4	K1 b1	8 mg·L ⁻¹ KIN + 0 mg·L ⁻¹ BAP
5	K2 b2	8 mg·L ⁻¹ KIN + 2 mg·L ⁻¹ BAP
6	K3 b3	8 mg·L ⁻¹ KIN + 4 mg·L ⁻¹ BAP
7	K2 b1	16 mg·L ⁻¹ KIN + 0 mg·L ⁻¹ BAP
8	K2 b2	16 mg·L ⁻¹ KIN + 2 mg·L ⁻¹ BAP
9	K3 e3	16 mg·L ⁻¹ KIN + 4 mg·L ⁻¹ BAP

Se utilizó el diseño experimental completamente randomizado, bajo arreglo factorial 3x3, con nueve tratamientos y siete repeticiones.

El número de brotes del primer mes de siembra, se evaluó mediante la observación directa en los tubos de ensayo. La longitud de brote se evaluó, sin extraerlos de los tubos de ensayo, y se procedió a medir desde la base del brote hasta la hoja más alta, con la ayuda de una regla milimetrada, tal como se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Brotes de piña de un mes de siembra. De izquierda a derecha: A y B: evaluación del número de brotes y longitud de brote.

En el cuarto mes de haber sido sembrado los segmentos de tallo, se cortó y se separó los brotes *in vitro* con un bisturí (Figura 4). Los brotes fueron contados mediante la observación directa, y para saber la longitud de brote, se procedió como en el caso anterior.

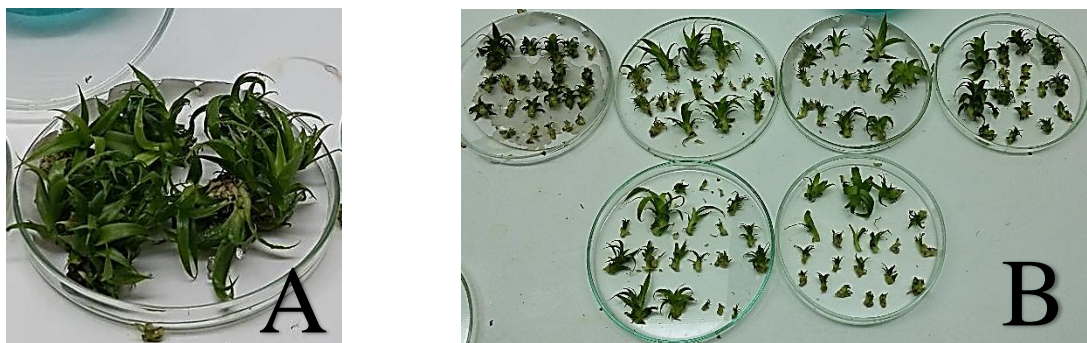


Figura 4. A: Brotes de piña sin cortar. B: Brotes cortados de A.

Factores, niveles y tratamientos en estudio de la etapa de enraizamiento

Factor A: Ácido α -naftalenacético (ANA)

a₀: 0 mg·L⁻¹

a₁: 2 mg·L⁻¹

a₂: 4 mg·L⁻¹

Factor B: Ácido indol-3-butírico (AIB)

b₀: 0 mg·L⁻¹

b₁: 2 mg·L⁻¹

b₂: 4 mg·L⁻¹

Tabla 5. Tratamientos en estudio para el enraizamiento.

Número	Clave	Tratamientos
1	a0 b1	0 mg·L ⁻¹ ANA + 0 mg·L ⁻¹ AIB
2	a0 b2	0 mg·L ⁻¹ ANA + 2 mg·L ⁻¹ AIB
3	a0 b3	0 mg·L ⁻¹ ANA + 4 mg·L ⁻¹ AIB
4	a1 b1	2 mg·L ⁻¹ ANA + 0 mg·L ⁻¹ AIB
5	a2 b2	2 mg·L ⁻¹ ANA + 2 mg·L ⁻¹ AIB
6	a3 b3	2 mg·L ⁻¹ ANA + 4 mg·L ⁻¹ AIB
7	a1 b1	4 mg·L ⁻¹ ANA + 0 mg·L ⁻¹ AIB
8	a2 b2	4 mg·L ⁻¹ ANA + 2 mg·L ⁻¹ AIB
9	a3 b3	4 mg·L ⁻¹ ANA + 4 mg·L ⁻¹ AIB

Se utilizó el diseño experimental completamente randomizado, bajo arreglo factorial 3x3, con nueve tratamientos y siete repeticiones.

En el segundo mes de siembra de los esquejes, las raíces fueron contadas mediante la observación directa en la base de los matraces. La longitud de raíz se midió con una regla milimetrada, desde la base del brote hasta el ápice de la raíz (Figura 5).

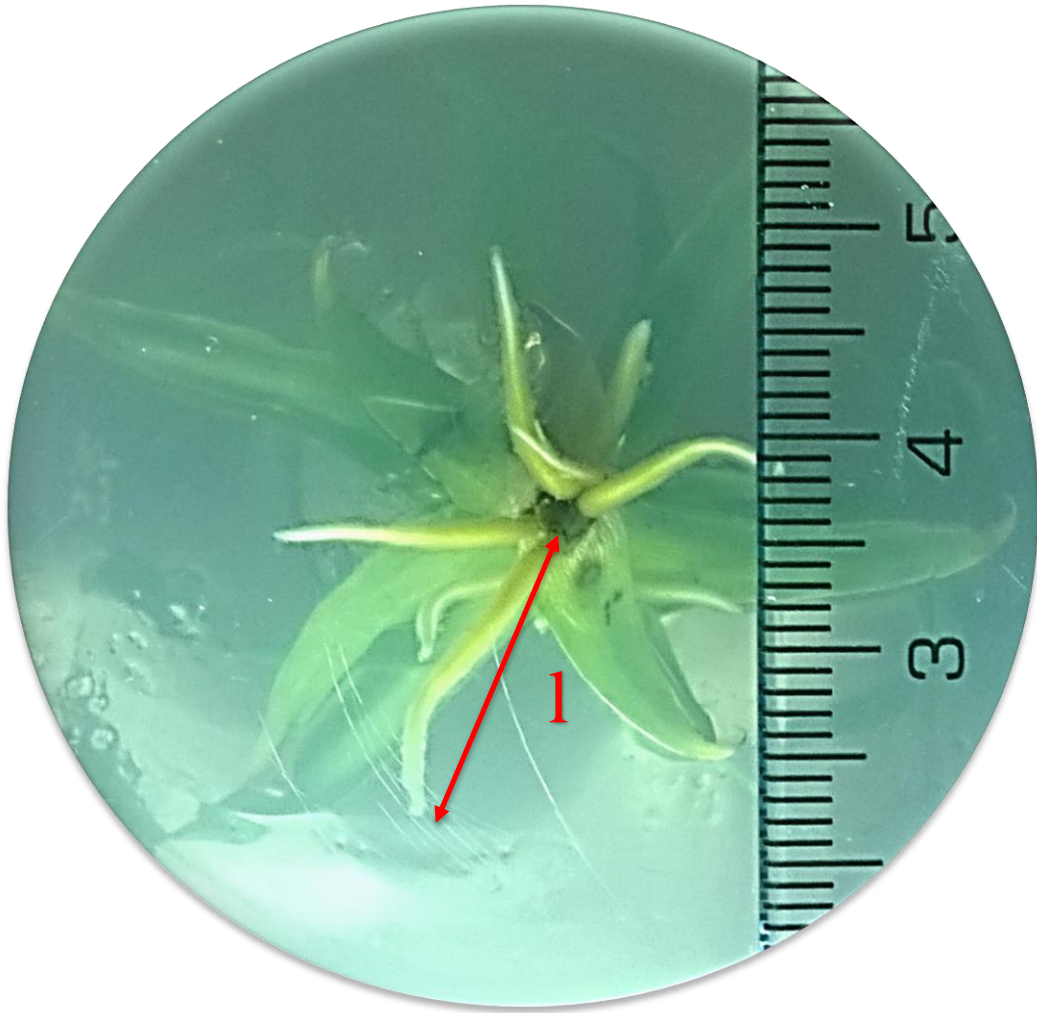


Figura 5. Medida de la longitud de la raíz (1).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Etapa de multiplicación de brotes

1. Efecto de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes

El análisis de varianza (ANOVA) de la Tabla 6, para el número de brotes; al 1 % de probabilidad, muestra que factor KIN es significativo; el factor BAP y la interacción KIN x BAP son altamente significativos. Esto indica que los factores actúan de forma conjunta, es decir que ambos producen un efecto significativo en el número de brotes.

El elevado valor del coeficiente de variación (CV = 39,04 %), indica la variabilidad del material experimental derivado de un comportamiento desuniforme de los tejidos y células que formaron parte de los explantas tras haber sido expuestos a diferentes medios de cultivo y balances hormonales durante el proceso de formación de brotes.

Tabla 6. ANOVA para el efecto de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
KIN (K)	2	9,35	4,67	3,981*	0,0448
BAP (B)	2	60,55	30,28	25,814**	0,0000
K*B	4	27,24	6,81	5,806**	0,0066
ERROR	13	15,25	1,173		
TOTAL	20	115,67			

*: significativo **: altamente significativo

$$CV = 39.04 \%$$

En la Tabla 7, al realizar el análisis de varianza para los efectos simples de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes, se encontró significación estadística para el factor KIN con BAP a $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y

altamente significativo a $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Estos resultados indican que el número de brotes está afectado significativamente por la interacción de los factores KIN*BAP, determinándose que las mejores combinaciones son: $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP y $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP (Figura 6).

Tabla 7. ANOVA para los efectos simples de la dosis de 6-bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
KIN CON 0 DE BAP	2	1,76	0,88	0,46 ns	0,6466
KIN CON 2 DE BAP	2	27,51	13,755	7,20 *	0,0163
KIN CON 4 DE BAP	2	3,47	1,735	0,91 ns	0,4411
BAP CON 0 DE KIN	2	28,45	14,225	7,45 *	0,0149
BAP CON 8 DE KIN	2	50,88	25,44	13,32 **	0,0028
BAP CON 16 DE KIN	2	8,47	4,235	2,22 ns	0,1713
ERROR	8		1,91		

*: significativo **: altamente significativo ns: no significativo

Al realizar la prueba del rango múltiple de Duncan al 5 % de probabilidad, se observa que con el tratamiento T5: $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, se encontró el mayor número de brotes: 108 (Figura 6), este resultado se esperaba, porque las citocininas según su concentración estimulan el desarrollo del callo y brotes, debido a que inhiben la dominancia apical (Majid *et al.* 2013). El T5 es estadísticamente superior al resto de los tratamientos: con el tratamiento T2 ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP) se encontró en promedio 36 brotes, este resultado es estadísticamente inferior al resultado obtenido con T5, y superior al resto de tratamientos. En los tratamientos T3 ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP); T6 ($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP) y T9 ($16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP) se presentaron callos friables con escasos brotes. El tratamiento con el cual no se encontró resultados fue el T4 ($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP).

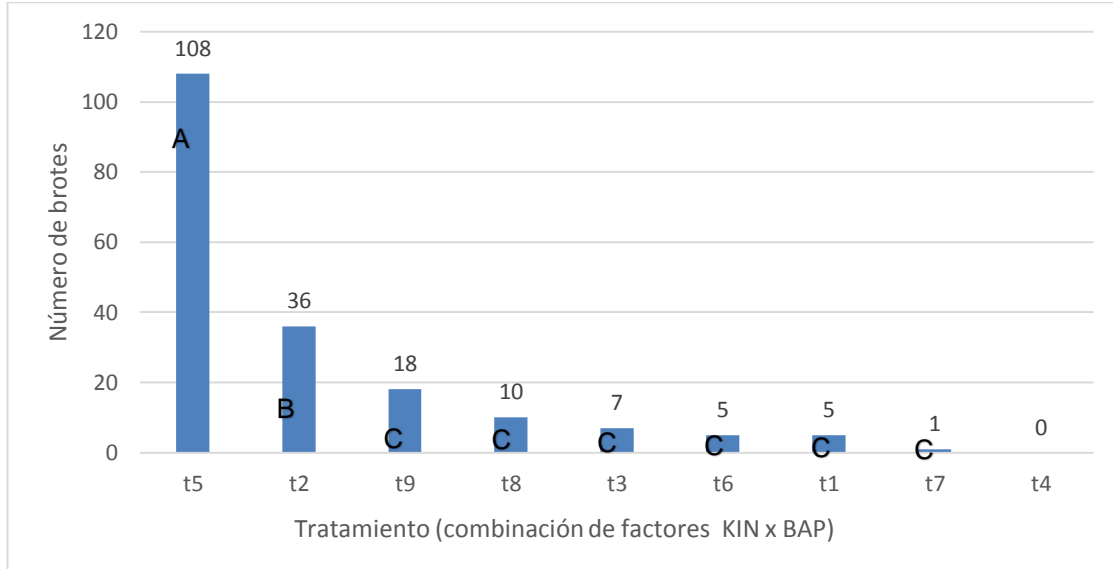


Figura 6. Número de brotes obtenidos con por el efecto de KIN y BAP.

El tratamiento T5 (Figura 7) es inferior al obtenido por Zuraida *et al.* (2011), quien obtuvo: 204 brotes. Pero es superior a los resultados obtenidos por Saucedo *et al.* (2008) con 12,13 brotes, Haya (2004) con 16,8 brotes, Majid *et al.* (2013) con 18,6 brotes, Velásquez *et al.* (1994) con 30,3 brotes, y Mogollón *et al.* (2004) con 38,6 brotes.

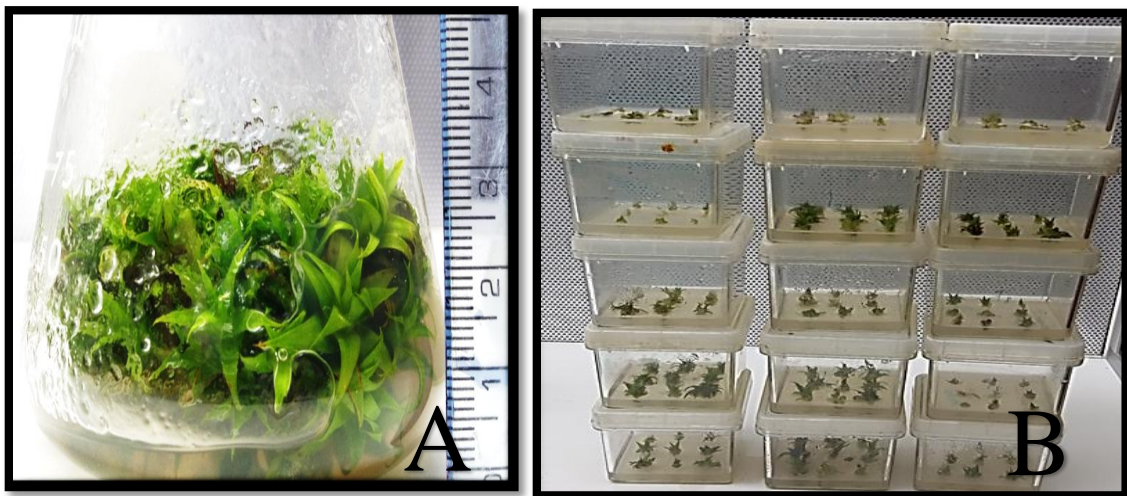


Figura 7. Segmento de tallo con el mayor brotamiento. A: Brotes del cuarto mes de siembra, obtenidos con el tratamiento T5: $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN + $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP. B: Brotes separados de A.

2. Efecto de la dosis de 6-bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes.

En los resultados del análisis de varianza para el número de brotes (Tabla 8), se encontró al 1 % de probabilidad, alta significación estadística para los efectos independientes de KIN y BAP, pero baja significación para la interacción de los factores KIN x BAP. Esto indica que los factores producen un efecto significativo en la longitud de brote.

El alto valor del coeficiente de variación ($CV = 43,95 \%$), indica una marcada diferencia en la respuesta de los explantas aún al mismo tipo de medio de cultivo o tratamientos en estudio; y esto evidencia que a pesar que se realice una adecuada selección y clasificación de explantas en base a características externas, son las células que en base a sus variaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas las que de un modo determinante responden a los tratamientos aplicados y definen las variaciones de la longitud del brote. En tanto que los tejidos y células de los explantas son muchos y diversos, es justificable una respuesta desuniforme aún dentro de los explantas sujetos al mismo tratamiento.

Tabla 8. ANOVA para el efecto de la dosis de 6-bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
KIN	2	25,47	12,74	13,05**	0,0008
BAP	2	24,26	12,13	12,43**	0,0010
KIN*BAP	4	14,45	3,6125	3,53*	0,0343
Error	13	12,69	0,98		
Total	20	76,87			

*: significativo **: altamente significativo

$CV = 43,95 \%$

En la Tabla 9, al realizar el análisis de varianza para los efectos simples de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes, se encontró alta significación estadísticas para el factor KIN con BAP a 0 mg·L⁻¹, y baja significación con 2 mg·L⁻¹. De igual forma, se encontró alta significación estadística entre el factor BAP con el factor KIN, a 0 mg·L⁻¹, pero baja significación con 8 mg·L⁻¹. Lo cual indican que la longitud de brote, está afectada significativamente por el efecto de la interacción de los factores: KIN*BAP (Figura 8).

Tabla 9. ANOVA para los efectos simples de la dosis de la 6-bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
KIN CON 0 DE BAP	2	31,47	15,735	98,34**	0,000
KIN CON 2 DE BAP	2	1,53	0,765	4,78 *	0,043
KIN CON 4 DE BAP	2	0,86	0,43	2,69 ns	0,128
BAP CON 0 DE KIN	2	36,38	18,19	113,69**	0,000
BAP CON 8 DE KIN	2	1,69	0,845	5,28*	0,034
BAP CON 16 DE KIN	2	0,65	0,325	2,03 ns	0,193
Error	8		0,16		

*: significativo **: altamente significativo ns: no significativo

Al realizar la prueba del rango múltiple de Duncan al 5 % de probabilidad, se observa que con el tratamiento T1 (0 mg·L⁻¹ KIN + 0 mg·L⁻¹ BAP) se encontró la mayor longitud de brotes: 5 cm (Figura 8), los cuales presentaron raíces. Este resultado se esperaba porque al no haber presencia de citocininas en concentraciones inhibitorias de la dominancia apical, la planta tiende incrementar su longitud, inhibiendo el desarrollo de las yemas axilares. El T1 es estadísticamente superior al resto de los tratamientos. Con el tratamiento T2 (0 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP) y T5 (8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP) se encontraron en promedio de longitud de brote 3 cm y 2 cm, respectivamente, siendo estos resultados estadísticamente iguales, pero inferior al T1 y superior al resto de tratamientos.

El tratamiento con el cual no se encontró resultados fue el T₄ (8 mg·L⁻¹ KIN + 0 mg·L⁻¹ BAP).

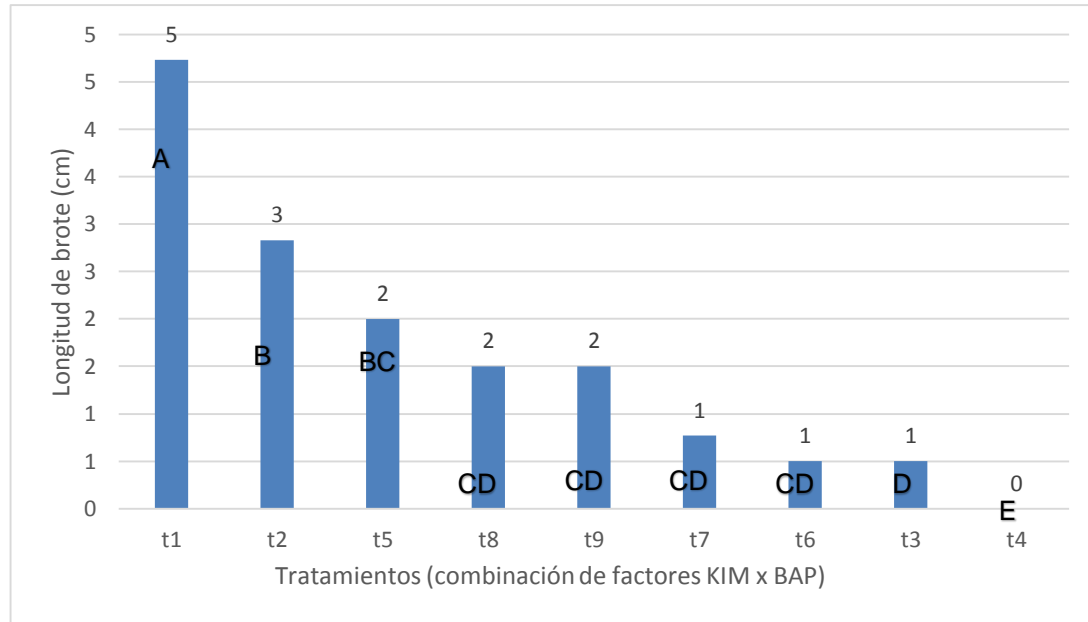


Figura 8. Longitud de brotes obtenidos con la interacción de factores KIN x BAP.

El tratamiento T1 (Figura 9) es superior al obtenido por Blanco *et al.* (2011) quien obtiene un tamaño de brote, de 4 mm de longitud, a partir de la siembra de yemas axilares de piña ecotipo “Eruwã Canã”, después de permanecer cuatro semanas en medios de cultivo semisólido y líquido, los cuales contenían la mezcla de: M.S. con 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,5 mg·L⁻¹ ANA + 0,5 mg·L⁻¹ AIB.



Figura 9. Plántulas de piña, con la mayor longitud de brote, obtenidas con el tratamiento T1: 0 mg·L⁻¹ KIN + 0 mg·L⁻¹ BAP.

4.2. Fase de enraizamiento

1. Efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en el número de raíces.

Los resultados del análisis de varianza para el número de raíces de la Tabla 10, muestran alta significación, al 1 % de probabilidad, para los efectos independientes de ANA y AIB, y baja significación estadística al 5 % de probabilidad, para la interacción de los factores ANA x AIB. Este resultado indica que los factores actúan de forma conjunta, en el proceso rizogénico expresado como número de raíces.

El elevado valor del coeficiente de variación ($CV = 36,37\%$), refleja el grado de heterogeneidad de las células involucradas en el proceso rizogénico de cada explanta, evento que no ha sido posible controlar a través de los criterios de selección de los explantas considerados en la presente investigación.

Tabla 10. ANOVA para el efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en el número de raíces.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
ANA	2	175,27	87,63	7,4**	0,0014
AIB	2	112,89	56,44	4,77**	0,0124
ANA*AIB	4	126,06	31,52	2,66*	0,0423
Error	54	639,43	11,84		
Total	62	1053,65			

*: significativo **: altamente significativo

$$CV = 36,37\%$$

En la Tabla 11, al realizar el análisis de varianza para los efectos simples en la interacción de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en el número de raíces, se encontró alta significación estadística, para el factor ANA con AIB, a $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. De igual forma, se encontró alta significación estadística entre el factor AIB con el factor ANA, a $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Este resultado indica que el

número de raíces, está afectada significativamente por el efecto de la interacción de los factores ANA x AIB.

Tabla 11. ANOVA para los efectos simples, de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en el número de raíces.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
ANA CON 0 DE AIB	2	3,32	1,66	5,35 **	0,008
ANA CON 2 DE AIB	2	1,02	0,51	1,65	0,204
ANA CON 4 DE AIB	2	4,48	2,24	7,23**	0,002
IBA CON 0 DE ANA	2	0,64	0,32	1,03	0,364
IBA CON 2 DE ANA	2	0,07	0,03	0,10	0,908
IBA CON 4 DE ANA	2	6,33	3,17	10,23**	0,000
Error	48		0,31		

*: significativo **: altamente significativo

Al realizar la prueba del rango múltiple de Duncan al 5 % de probabilidad, observamos que se han formado cuatro grupos (A, B, C, D). El grupo “A” formado por los tratamientos T₉, T₅, T₆, T₄ y T₈, el número de raíces obtenidos con estos tratamientos oscila entre 10 y 14. El grupo “B” formado por los tratamientos T₅, T₆, T₄, T₈, T₂ y T₃ el promedio del número de raíces obtenidos con estos tratamientos oscila entre 7 y 11 raíces. El grupo “C” formado por los tratamientos T₆, T₄, T₈ T₂ y T₃ el promedio del número de raíces obtenidos con estos tratamientos oscila entre 7 y 11 raíces. Finalmente el grupo “D” formado por los T₂, T₃, T₁ y T₇ el promedio del número de raíces obtenidos con estos tratamientos oscila entre 6 y 8 raíces (Figura 10).

Considerando el análisis de los efectos simples y la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad, se concluye que la mejor combinación de los factores es 4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹ AIB, con los cuales se obtuvo el mayor número de raíces (14).

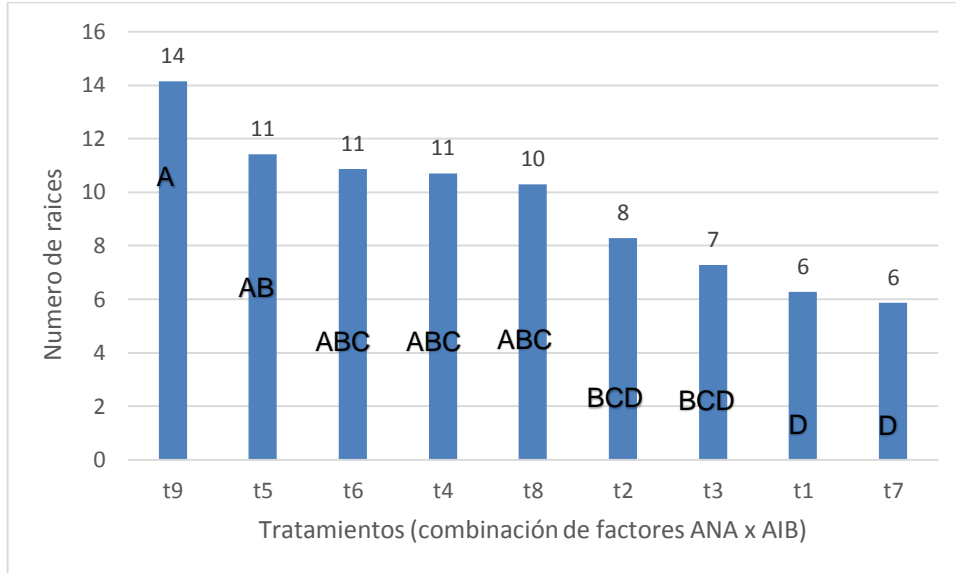


Figura 10. Número de raíces obtenidos con la interacción de factores ANA x AIB.

El tratamiento T9 (Figura 11) arroja resultados superiores a los obtenidos por Pineda *et al.* (2012) con 5,54 raíces/explanta, Saucedo *et al.* (2008) con 7,25 raíces/explanta, pero inferiores a los obtenido por Mogollón *et al.* (2004) con 28,4 raíces/explanta.

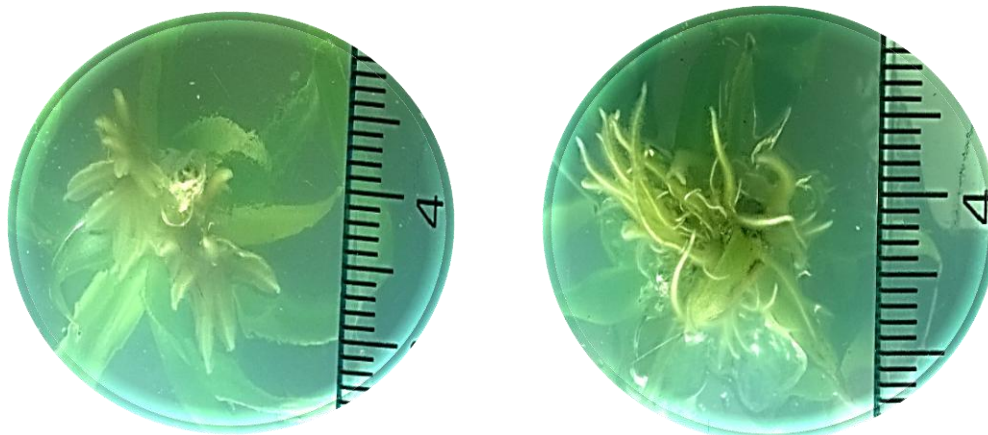


Figura 11. Raíces con el mayor número, obtenidos con tratamiento T9:

4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹ AIB.

2. Efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en la longitud de raíces

En los resultados del análisis de varianza de la Tabla 12, para la longitud de raíz, se encontró alta significación estadística al 1 % de probabilidad para los efectos independientes de ANA y AIB, mas no para la interacción de los factores ANA x AIB. Este resultado indica que los factores actúan de forma independiente, es decir, que los factores por separado producen un efecto significativo en la longitud de raíces.

El alto valor del coeficiente de variación (CV = 28,82 %), indica que los criterios de selección y uniformización de explantas utilizados, no han sido suficientes para controlar los eventos celulares involucrados en el proceso rizogénico de los explantas.

Tabla 12. ANOVA para el efecto de la dosis del ácido α -naftalenoacético y ácido indol-3-butírico en la longitud de raíces.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
ANA	2	10,73	5,37	16,52**	0,0001
AIB	2	16,72	8,36	25,74**	0,0001
ANA*AIB	4	2,99	0,75	2,3 ns	0,0701
ERROR	54	17,54	0,32		
TOTAL	62	47,99			

*: significativo **: altamente significativo ns: no significativo

$$CV = 28,82 \%$$

Al realizar la prueba del rango múltiple de Duncan al 5 % de probabilidad para los niveles del factor ANA (Figura 12), se observa que con el tratamiento T1: $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB se encontró la mayor longitud de raíz: 2,45 cm (Figura 13), siendo este resultado estadísticamente superior al resto. Con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se encontró la una longitud de raíz de 2,04 cm, este resultado es estadísticamente inferior al encontrado con $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pero superior al encontrado con $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1,44 cm).

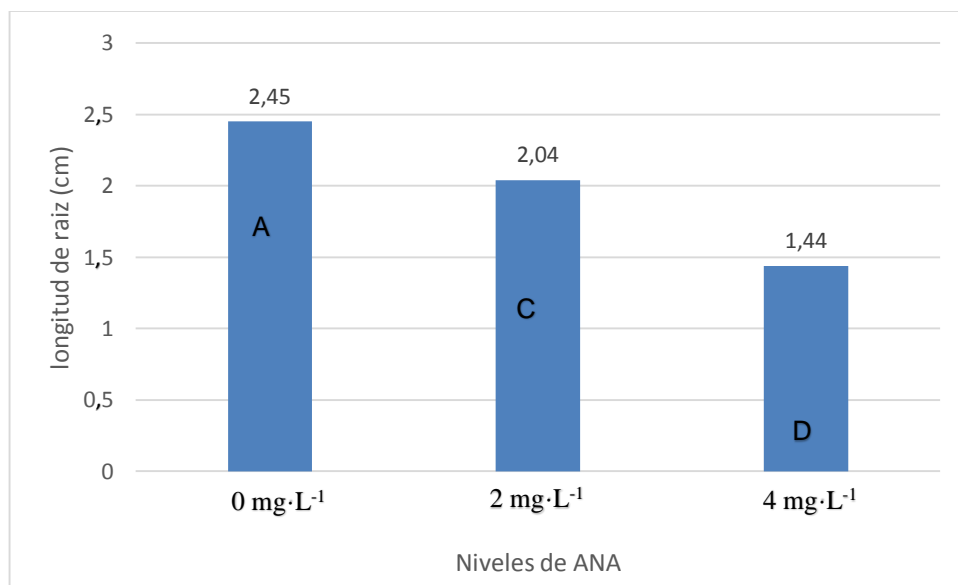


Figura 12. Longitud de raíces obtenidas con los niveles del factor ANA.

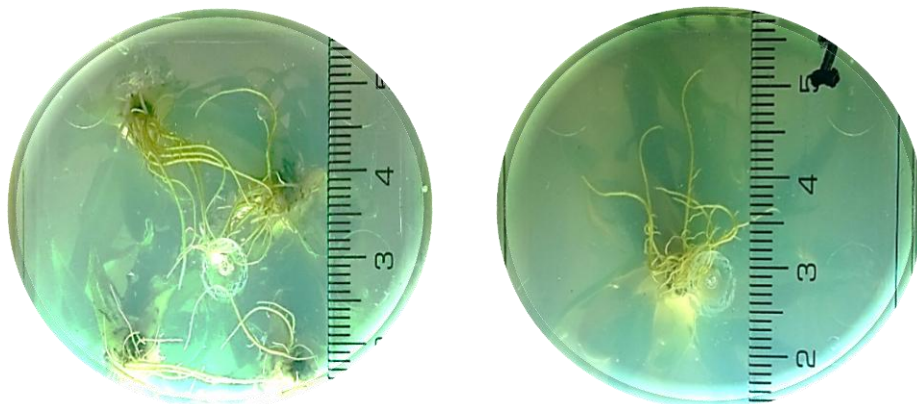


Figura 13. Raíces obtenidas con el tratamiento T1:

$0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB.

Al realizar la prueba del rango múltiple de Duncan al 5 % de probabilidad para los niveles del factor AIB (Figura 14) se observa que con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB se encontraron 2,49 y 2,18 cm de longitud de raíz, respectivamente, estos resultados son estadísticamente superiores a la longitud de raíz obtenida con $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB, con el cual se obtuvo 1,27 cm.

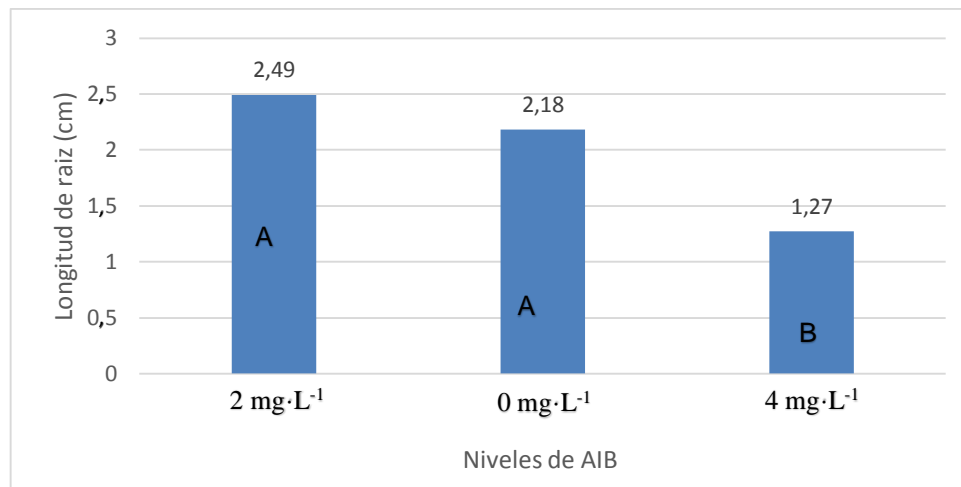


Figura 14. Longitud de raíces obtenidas con los niveles del factor AIB.

Con el tratamiento dos (T_2): $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB, se obtuvo la mayor longitud de raíz: 2,49 cm (Figura 15). Este resultado es inferior al obtenido por Millones (s.f.), quien obtiene en la sexta semana 3,1 raíces/ explanta y una longitud de 7,2 cm, al emplear M.S. + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA y $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB.

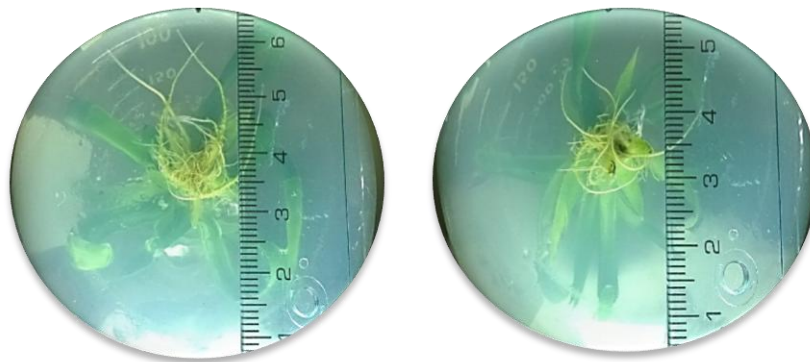


Figura 15. Raíces con las mayores longitudes, obtenidas con el tratamiento T_2 :

$0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. En la etapa de multiplicación de brotes, al cuarto mes de siembra de bases de tallos de 4 mm de longitud, con el tratamiento T5 (M.S. + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP), se encontró el mayor número de brotes: 108 brotes/segmento de tallo. Con el tratamiento T1 (M.S. + 0 mg·L⁻¹ KIN + 0 mg·L⁻¹ BAP), se obtuvo la mayor longitud: 5 cm/brote.
2. En la etapa de enraizamiento, al segundo mes de siembra, los esquejes de 5 a 6 cm de longitud, con el tratamiento T9 (4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹ AIB) se obtiene el mayor número de raíces: 14 raíces/plántula. Mientras que, con el tratamiento T2 (M.S. + 0 mg·L⁻¹ ANA + 2 mg·L⁻¹ AIB), se logró la mayor longitud de raíz: 2,49 cm/plántula.
3. Se recomienda investigar la propagación de piña con nuevas tecnologías.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azcón-Bieto, J. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal (en línea). 2 ed. Valencia, ES. McGraw-Hill. 13 dic. 2018. Pdf. Disponible en http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/fundamentosdefisiologiavegeta12008azcon..pdf?fbclid=iwar3mdplvoydgdxcq2afkj3zi1wa3ekzxobrs_e k_tjjvaawn3bmjvqz6yw
- Baraona, M; Sancho, E. 1991. Fruticultura especial: fruticultura II (en línea). Editorial universidad estatal a distancia. Consultado 6 ene. 1997. Pdf. Disponible en https://books.google.com/books?id=tnd2yw7lcnmc&pg=pa18&lpg=pa18&dq=ananas+comosus++caracter%c3%adsticas+botanicas&source=bl&ots=v5-vp04yfw&sig=ndwp_intg8ingqwwpaiujyoc4y&hl=es&sa=x&ved=0cc8q6aewa2ovchmi9cn69-ubyaivbkwech2axaxg#v=onepage&q=ananas%20comosus%20%20caracter%c3%adsticas%20botanicas&f=false
- Bello S; Vergara C; Arellano G. 2016. Plagas entomológicas y otros artrópodos en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr., Coppens & Leal) (en línea). Junín, PE. 14(2): 175-189. Consultado 10 de Set. 2016. Disponible en: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=34143179010>.
- Blanco, H; Vargas, T; de García, E. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales (en línea). Caracas, VE. 36(6): 437-443. Consultado 5 de ago. 2015. Pdf. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oas.d.id=33919418007>
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical CO). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Roca, WM; Mroginski, LA. Cali, Co. P. 32.
- Compendio Estadístico Perú 2014. Instituto Nacional de Estadística e informática (INEI). Consultado 5 de ago. 2015. Pdf. Disponible en https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf
- Escalona, M; Lorenzo, J; Gonzales, B; Daquinta, M; González, J; Desjardins, Y; Boroto, C. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary inmersión systems. (en línea). s.l., Pdf. Consultado 8 ago. 2015. Disponible: http://www.academia.edu/213786/Pineapple_micropropagation_in_temporary_immersion_systems.

- Etienne, H; Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (en línea). Pdf. 69(3), 215-231. Consultado 8 ago. 2015. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015668610465>
- Fichet, L. 2017. Biosíntesis de las Fitohormonas y Modo de Acción de los Reguladores de Crecimiento (en línea). Guanajuato, MX. No. 92. Consultado 02 dic. 2018. Disponible en <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/biosintesis-de-las-fitohormonas-y-reguladores-de-crecimiento>
- Garay-Arroyo, A; Paz, MS de la; García-Ponce, B; Álvarez-Buylla, E; Gutiérrez, C. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (en línea). México Distrito Federal MX. *Revista de educación bioquímica*. 33(1): 13-22. Consultado 19 de julio de 2018. Pdf. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1665-19952014000100003&lng=es&tlng=es
- Garita H; Gomes L. 2000. Micropropagación de la variedad de piña Champaka F-153 (en línea). San José, CR. 24(1): 63-73. Consultado 11 jun. 2015. Pdf. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43624107>
- Guadalupe, R. 2016. Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetal (en línea). Guanajuato, MX. No. 59. Consultado 06 jul. 2018. Disponible en <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>
- Haya, D. 2004. Propagación *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merr. (bromeliácea). Utilizando yemas axilares (en línea). San Martín, PE. Pdf. Consultado 11 jun. 2015. Disponible en https://f721dad5-a-62cb3a1a-sites.googlegroups.com/site/inibico/publicaciones/tesis/tesishdhfinal.pdf?attachauth=a_noy7crdy5pxyrqbmtqycqyqec2spxnzi3ies2xxtkfbzn0mk0yciwpwys2av7bmj_eni_arwhl-dskagowkow-caauk-ct7sabkzqqtq7n3foingy_r3gkdtduyhwwvubta_11-mm_uabj3y5lkk0lv7eeshddojrbopohluee8lds76vmuqmuio282agdakqirerfp_2ygmf2_dust8vraq9u5__3wk1yiscul-tcnr9xr6ac%3d&attredirects=0
- Hartmann, H; Kester, D. 1995. Propagación de plantas: principios y prácticas. México. Continental. 760 p.
- Hurtado, M; Merino, M. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. 232 p.

- Majid, I; Huda, Al-Taha; Aqeel, S. 2013. Effect of cytokinin type and concentration, and source of explant on shoot multiplication of pineapple plant (*Ananas comosus* 'Queen') *in vitro* (en línea). Basrah, IQ. COBISS. mar. 20(13):15-20. Consultado 17 set. 2015. Pdf. Disponible en <http://aas.bf.uni-lj.si/marec2013/02Ibrahim.pdf>
- Millones, C. s.f. Desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para la micropropagación de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) ecotipo "Santa Rosa" provenientes de la Provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas (en línea). PE. 3(1): 7-11. Consultado 27 set. 2015. Pdf. Disponible en <http://repebis.upch.edu.pe/articulos/invest.amazon/v3n1/a1.pdf>
- Mogollón, N; Díaz, J; Hernández, N. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas Comosus* L. "Queen Australia"(en línea). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 21(24):15-21. Consultado 2 set. 2015. Pdf. Disponible en <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/12077/12066>
- Montilla, I; Fernández, S; Alcalá de Marcano, D; Gallardo, M. 1997. El cultivo de la piña en Venezuela (en línea). Maracay, VE. Fondo Nacional de investigación Agropecuarias. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. P.17. Consultado 6 ene. 2018. Disponible en https://books.google.com.pe/books?id=osmqaaaayaaj&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Munive, S. 2015. Producción del cultivo de piña cv. Golden en la Selva Central Mazamari - Satipo (Junín) (en línea). Lima, PE. Consultado 13 dic. 2018. Pdf. Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/unalm/2078/f01-m855-t.pdf?sequence=1&isallowed=y>
- Nelson, D; Cox, M. 2009. Principios de bioquímica (en línea). 5 ed. Wisconsin, US. Omega. Consultado 13 nov. 2018. Pdf. Disponible en <http://propanona.blogspot.com/2014/06/principios-de-bioquimica-lehninger-5.html>
- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma en: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA. Segunda Edición. Argentina. 353 – 357 p.
- PEPP (Proyecto Especial Pichis-Palcazu PE). s.f. Mejoramiento de la producción del cultivo de la piña, mediante sistemas agroforestales (en línea). Chanchamayo, PE. Consultado 12 jun. 2015. Pdf. Disponible en http://www.pepp.gob.pe/manuales/manual_de_la_pina.pdf

- Pineda, A; Vargas, TE; Escala, M; De García, E. 2012. Organogénesis *in vitro* en piña ‘española roja’ y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso (en línea). Consultado 11 jun. 2015. Pdf. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/pdf/ba/v24n3/art03.pdf>
- Salisbury, F. 2000. Fisiología de las plantas: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Madrid, ES. Paraninfo. p. 594.
- Saucedo, G; Ramos G, LE; Varas G, E. Carmigniani C, F. 2008. Propagación clonal *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merr), variedades Champaka y Hawaiana (en línea). Los Ríos, EC. no.1: 49-54. Consultado 27 jul. 2015. Pdf. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4045256>
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria PE). 2017. Calidad irregular de la piña limita su potencial de exportación. Consultado 16 de ago. 2018. Disponible en <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/minagri-calidad-irregular-de-la-pina-peruana-limita-su-potencial-de-exportacion/>
- Sigma-Aldrich (s.f.). Murashigue & Skogg (en línea). Misuri, US. Consultado 17 set. 2015. Pdf. Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i5125?lang=en®ion=PE&gclid=CJfp7oP87csCFVVZhgodISAFsg>.
- Suarez, I; Quintero I. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemos pre-existentes (en línea). Bogotá, CO. Consultado 17 set. 2015. Pdf. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/776/77631180003.pdf>
- Taiz, L; Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal (en línea). 3 ed. California, US. Universitat. Pdf. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FisiologiaVegetalVolumenII%20espanhol.pdf>
- Uriza, D. 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región Sur-Sureste de México: Trópico húmedo. Paquete Tecnológico Piña MD2 (*Ananas comosus* var. *comosus* (en línea). Veracruz, MX. Consultado 17 set. 2015. Pdf. Disponible en www.inifap.gob.mx/Documents/inicio/paquetes/pina.pdf.
- Velásquez, F; Múnera, J; Jaramillo, S; Gomez, H. 1994. Evaluación de sistemas de desinfección y medios para la micropropagación de la piña *Ananas comosus* L. Merr. (en línea). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 47(1-2):9-29. Consultado 2 set. 2015. Pdf. Disponible en <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/28541/28891>

Zaid, A; Hughes, H; Porceddu, E; Nicholas, F. 2004. Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación (en línea). Roma, IT. Consultado 20 jun. 2015. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/004/y2775s/y2775s04.htm#bm04>

Zuraida, A; Shahnadz, A; Harteeni, A; Roowi, S; Radziah, C; Sreeramanan, S. 2011. A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system (en línea). African Journal of Biotechnology 10(19): 3859-3866. 2016. Consultado 10 de Set. 2016. Disponible en <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93541>

ANEXOS

ANEXO 1. DATOS OBTENIDOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS BROTES

Tabla 13. Evaluaciones del número de brotes de un mes de siembra.

KIN	0			8			16		
BAP	0	2	4	0	2	4	0	2	4
I	3	7	5	2	0	9	1	0	1
II	1	5	2	2	3	10	3	1	0
III	4	5	4	1	1	11	1	0	0
IV	1	0	0	0	0	0	1	0	0
V	1	0	0	2	0	0	0	0	0
VI	1	0	1	0	0	0	0	0	0
VII	4	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 14. Evaluaciones de longitud de brotes de un mes de siembra, en centímetros (cm).

KIN	0			8			16		
BAP	0	2	4	0	2	4	0	2	4
I	0,5	0,8	0,8	0,2	0	0,8	0,5	0	0,5
II	1	0,7	0,7	0,4	0,8	1	0,4	0,5	0
III	0,5	0,7	0,7	0,4	0,5	0,8	0,7	0	0
IV	0,5	0	0	0	0	0	0,3	0	0
V	0,8	0	0	0,4	0	0	0	0	0
VI	0,8	0	0,5	0	0	0	0	0	0
VII	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 15. Evaluaciones del número de brotes de cuatro meses de siembra.

KIN	0			8			16		
	0	2	4	0	2	4	0	2	4
BAP	0	2	4	0	2	4	0	2	4
I	4	22	1	0	0	9	1	0	18
II	3	71	5	0	108	3	2	10	0
III	7	16	14	0	0	3	1	0	0
IV	5	0	0	0	0	0	0	0	0
V	8	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	1	0	0	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 16. Evaluaciones de la longitud brotes de cuatro meses de siembra, en centímetros (cm).

KIN	0			8			16		
	0	2	4	0	2	4	0	2	4
BAP	0	2	4	0	2	4	0	2	4
I	5	3,5	0,5	0	0	0,5	0,7	0	1,5
II	5	3	0,5	0	2	0,5	1	1,5	0
III	5,5	2	0,5	0	0	0,5	0,6	0	0
IV	3	0	0	0	0	0	0	0	0
V	3	0	0	0	0	0	0	0	0
VI	6,9	0	0	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 17. Evaluaciones del número de raíces de dos meses de siembra.

ANA	0			2			4		
AIB	0	2	4	0	2	4	0	2	4
I	7	4	5	13	11	11	4	10	9
II	5	6	6	13	12	12	8	12	12
III	6	12	8	7	13	12	5	16	16
IV	6	11	6	11	10	11	4	8	17
V	7	8	17	6	12	10	2	3	11
VI	4	10	6	12	11	12	16	18	19
VII	6	7	3	13	11	8	5	5	15

Tabla 18. Evaluaciones de la longitud de raíces de dos meses en centímetros (cm).

ANA	0			2			4		
AIB	0	2	4	0	2	4	0	2	4
I	3	3,1	1,3	1,3	3	1	0,5	1,4	1,3
II	3	2	2,7	2,5	3	1	2,3	2	0,8
III	2,5	3	2	2	2,5	1	1	1	0,7
IV	2,5	2,5	1,5	2,5	2,5	0,8	0,7	3	0,5
V	2,8	3	2	2,3	2	1	0,5	3	1,8
VI	3	2,5	1,5	3,5	2,2	1,5	2	2	0,8
VII	3,5	3,5	0,5	2,8	2,5	2	1,5	2,5	1

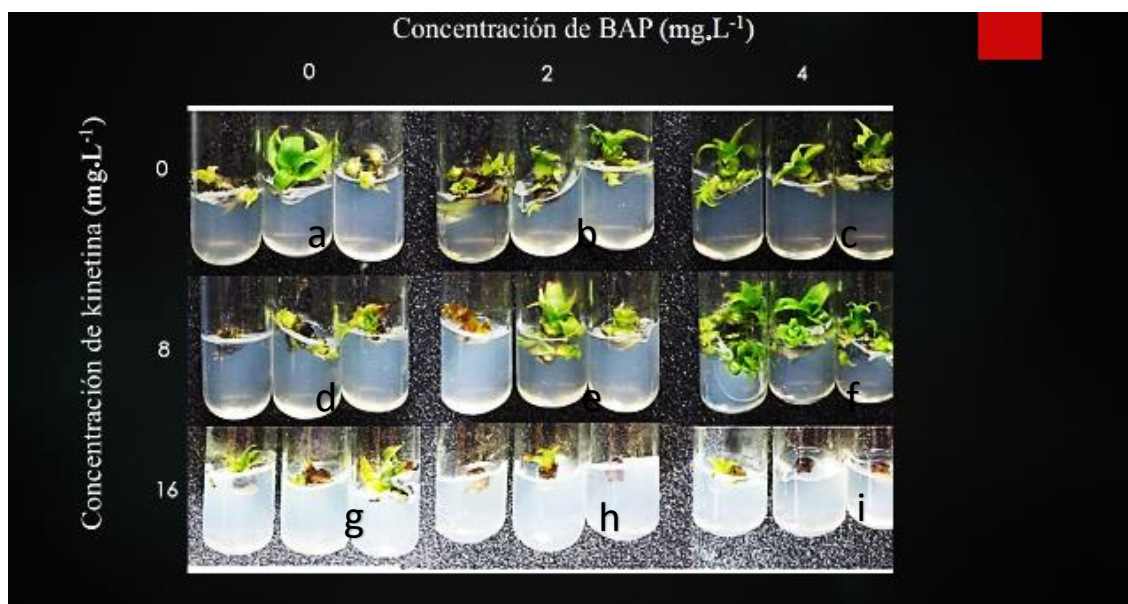


Figura 16. Efecto de la 6-benzylaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en los segmentos de piña de un mes de siembra.

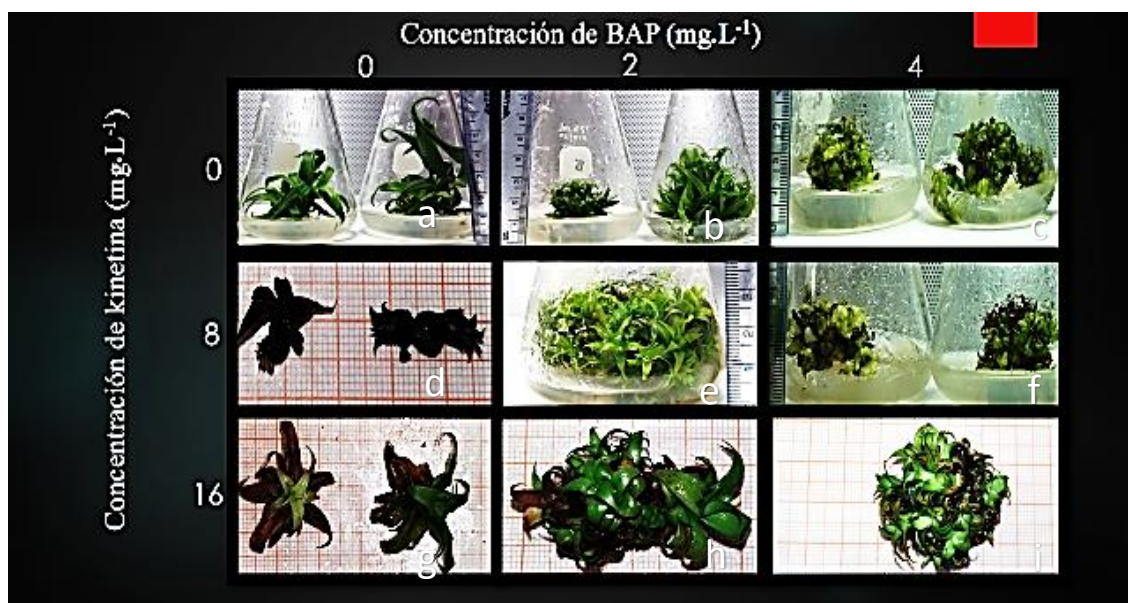


Figura 17. Efecto de la 6-benzylaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en los segmentos de piña, de cuatro meses de siembra.



Figura 18. Efecto del medio de cultivo M.S. en el crecimiento longitudinal y en el enraizamiento de los brotes de piña, de seis meses de siembra. En esta foto se puede apreciar brotes enraizados, estas raíces al momento de entrar en la etapa de enraizamiento, tuvieron que ser cortadas y eliminadas, con el fin de estandarizar el material.

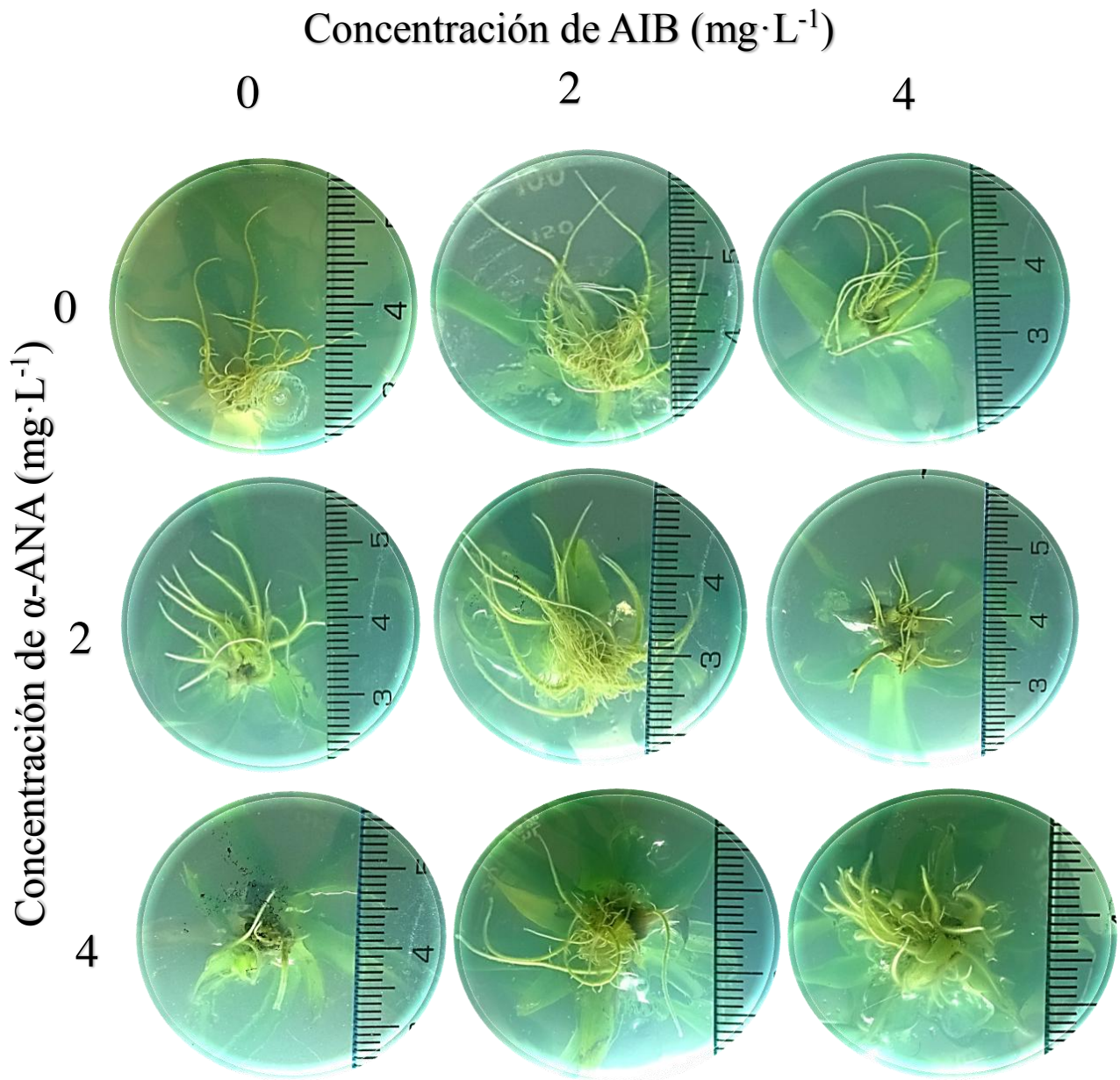


Figura 19. Efecto de la dosis de ácido α -naftalenacético (α -ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) en el enraizamiento de esquejes de dos meses de siembra. Las fotos fueron tomadas en la base de los matraces.



Figura 20. Efecto de la 6-benzylaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) en los segmentos de piña de cuatro meses de siembra para obtener callos friables. El medio de cultivo estuvo compuesto por la mezcla del tratamiento T3: M.S. + 0 mg·L⁻¹ KIN + 4 mg·L⁻¹ BAP.



Figura 21. Plántulas de piña listas para salir a invernadero.

FOTOS ADICIONALES COMO RESULTADO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



Figura 22. Material necesario para la iniciación en el cultivo *in vitro* de plantas: A: Murashige y Skoog 1962, marca “CAISON”. B: Autoclave. C: Cámara de flujo laminar.



Figura 23. Orden en la preparación de los medios de cultivo. A: Magentas marcadas, conteniendo tubos de ensayo, antes de la esterilización. B: Jeringas de 10 mL, las cuales servirán para la distribución de los medios de cultivo en los tubos de ensayo de cada tratamiento. C: Jeringas de 1 mL y una de 10 mL para la distribución de las vitaminas y hormonas, las cuales están señaladas a fin de evitar la alteración de los tratamientos.



Figura 24. Las botellas de vidrio que contienen las vitaminas y fitohormonas, tienen que estar escritas en ellas su nombre y su concentración. Las botellas que contienen las fitohormonas tienen que ser de color ámbar para protegerlas de la luz.



Figura 25. Para preparar un litro de medio de cultivo, primero se agrega 250 mL de agua destilada, mientras se agita, añadir el producto en polvo M.S.: 4,33 g·L⁻¹, sacarosa: 30 g·L⁻¹, agar: 6 g·L⁻¹, auxinas y citocininas de acuerdo los tratamientos; disuelto los productos, se debe enraazar a un litro, ajustando el pH a 5,7 con NaOH y HCl antes de agregar el agar. Luego se calienta la solución hasta la claridad el agar, por último, dispensar el medio de cultivo en recipientes, luego colocar en autoclave a una temperatura de 121 °C o 15 psi, durante al menos 15 minutos.



Figura 26. Magentas conteniendo tubos de ensayo de los tratamientos. Las tapas de aluminio que se encuentran en la parte inferior izquierda de la foto, tienen que estar pre fabricadas, para ahorrar tiempo en el trabajo y guardadas en un envase.



Figura 27. Autoclave, el cual sirve para la esterilización de materiales y de los medios de cultivo.



Figura 28. Cámara de flujo laminar en donde se realiza el trabajo de cortar y sembrar los explantas de piña, en condiciones estériles.



Figura 29. Vidrios estériles para poder colocar los explantas, en reemplazo de las placas de Petri. Cada vidrio esta superpuesto uno encima del otro, separados por una hoja de papel estéril.



Figura 30. Vidrio estéril sobre un papel milimetrado, el cual sirvió para obtener las medidas de los explantas de piña. Este trabajo se realizó dentro de una cámara de flujo laminar.

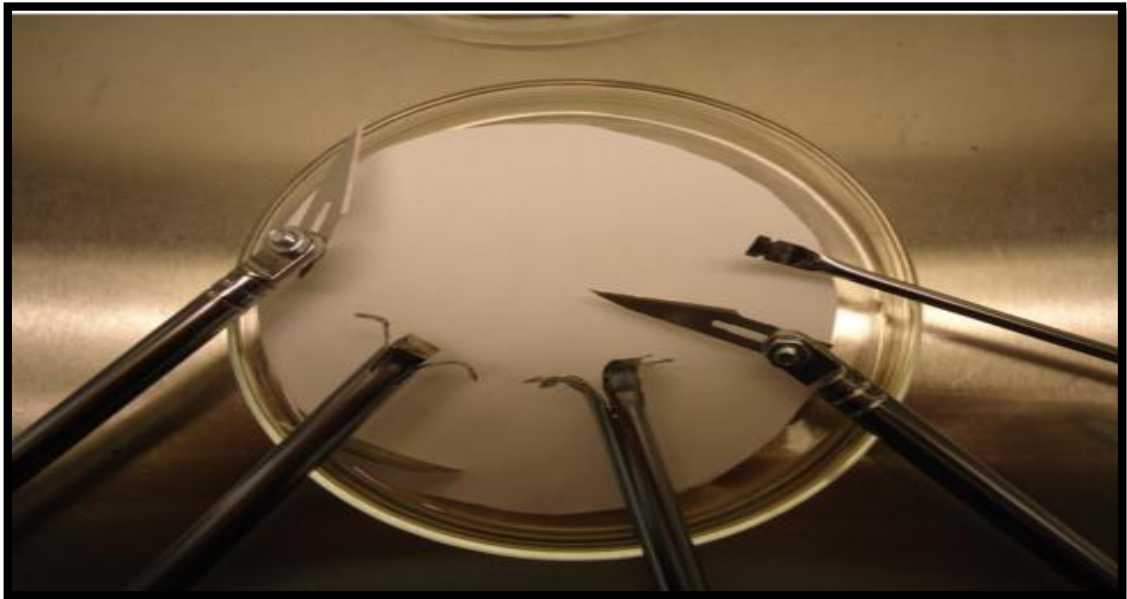


Figura 31. Mangos y bisturís hechos con antenas, los cuales sirvieron para cortar los explantas de piña, y ubicarlos en posición vertical.