

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS:

**EFFECTO DE LA MEZCLA DE DOS CINETINAS EN EL NÚMERO Y
LONGITUD DE BROTES DE PIÑA *Ananas comosus* L. Merr,
VARIEDAD “GOLDEN”, EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL

Presentada por:

Bachiller: HOMERO VENTURA CHILÓN

Asesor:

Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

Cajamarca – Perú

2021

COPYRIGHT © 2021 by
HOMERO VENTURA CHILÓN
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS APROBADA:

**EFFECTO DE LA MEZCLA DE DOS CINETINAS EN EL NÚMERO Y
LONGITUD DE BROTES DE PIÑA *Ananas Comosus* L. Merr,
VARIEDAD “GOLDEN”, EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL

Presentada por:

Bachiller: HOMERO VENTURA CHILÓN

JURADO EVALUADOR

Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto
Asesor

Dr. Juan Edmundo Chávez Rabanal
Jurado evaluador

Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado
Jurado evaluador

Dr. Juan Francisco Seminario Cunya
Jurado evaluador

Cajamarca – Perú

2021



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS

Siendo las 5.00 p.m. del día 02 de Junio de dos mil veintiuno, reunidos a través de meet.google.com/fxy-xqvb-mkf, creado por la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. JUAN EDMUNDO CHÁVEZ RABANAL**, **Dr. JUAN FRANCISCO SEMINARIO CUNYA**, **Dra: CONSUELO BELANIA PLASENCIA ALVARADO**, y en calidad de Asesor el **Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca y la Directiva para la Sustentación de Proyectos de Tesis, Seminarios de Tesis, Sustentación de Tesis y Actualización de Marco Teórico de los Programas de Maestría y Doctorado, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada: **EFFECTO DE LA MEZCLA DE DOS CINETINAS EN EL NÚMERO Y LONGITUD DE BROTES DE PIÑA *Ananas comosus* L. merr, variedad "Golden", EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**, presentada por el **Bachiller en Agronomía HOMERO VENTURA CHILÓN**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó **APROBAR** por Unanimidad con la calificación de **DIECIOCHO (18)** la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Bachiller en Agronomía HOMERO VENTURA CHILÓN**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, con Mención en **GESTIÓN AMBIENTAL**.

Siendo las 19 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....
Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto
Asesor

.....
Dr. Juan Edmundo Chávez Rabanal
Jurado Evaluador

.....
Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado
Jurado Evaluador

.....
Dr. Juan Francisco Seminario Cunya
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres, por sus sabios y oportunos consejos que han propiciado en mí el deseo de superación, el anhelo de triunfo en la vida y porque creyeron en mí, dándome ejemplos dignos de superación.

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Edelmira Chilón Pompa y Víctor Ventura Arévalo quienes siempre confiaron en mí, soportando mis errores, ayudándome en mis fracasos y guiándome en el camino de la vida.

A mis hermanos, Lcda. Sarita Leonor Ventura Chilón. Dr. Hugo Ventura Chilón; Abg. Víctor Raúl Ventura Chilón; Dra. Jessica Janeth Ventura Chilón; Obstetr. Mariela Ventura Rodríguez; Ing. Manuel Ventura Miranda por su confianza en mí.

A mi asesor de tesis Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto por sus aportes y sus sabios consejos en el asesoramiento, orientaciones y sugerencias en la culminación del presente trabajo y su apoyo brindado con los equipos necesarios para la realización del presente trabajo de investigación.

M. Cs. Manuel Gregorio Malpica Rodríguez; M.Cs. David Ricardo Uriol Valverde; Ing. Teresita Moreno Huamán y al Dr. Pedro Luis Ortiz Oblitas; por sus recomendaciones y sugerencias.

Al Sr. Brett Jackman, Gerente de la empresa “Caisson Laboratories” de los Estados Unidos, por haber proporcionado los medios de cultivo, para la realización del presente trabajo.

A mis profesores por su tiempo y paciencia empleados en mi formación.

A mi Alma Máter, Universidad Nacional de Cajamarca, por los conocimientos brindados.

Si ayudo a una sola persona a tener esperanza, no habré vivido en vano.

Martin Luther King

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Antecedentes teóricos de la investigación.....	5
2.2. Bases teóricas	7
2.3. Condiciones agroclimáticas de la piña.....	14
2.4. Micropropagación de plantas	15
2.5. Ingredientes del medio de cultivo	21
2.6. Reguladores del crecimiento	22
2.7. Efecto de los reguladores del crecimiento en plantas.....	23
2.9. Preparación de un litro de medio Murashige y Skoog	45
2.10. Importancia del agar.....	46

2.11. Preparación para el establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de piña.....	47
2.12. Desinfección de explantes.....	51
2.13. Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	56
2.14. Definición de términos básicos	60
CAPÍTULO III.....	61
MATERIALES Y MÉTODO	61
3.1. Ubicación geográfica.....	61
3.2 Materiales	61
3.3. Procedimiento.....	63
3.4. Prototipo del sistema de inmersión temporal	65
3.5. Preparación de las soluciones reguladoras del pH	68
3.6. Preparación de los reguladores del crecimiento.....	68
3.7. Factores, niveles y tratamientos	69
3.8. Preparación del medio de cultivo	70
3.9. Vaciado de medios de cultivo en sistema de inmersión temporal.....	71
3.10. Evaluación del número y la longitud de brote en piña.....	73
CAPÍTULO IV	74
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
4.1. Efecto de la dosis de la bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes en piña	87
4.3. Sistema de inmersión temporal	101

CAPÍTULO V.....	104
CONCLUSIONES	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificación de hoja la hoja D en la planta de piña.....	9
Figura 2. Hijuelos de piña.....	10
Figura 3. Estados del desarrollo del “frutillo” de piña.....	11
Figura 4. Estados de desarrollo de la fruta de piña	12
Figura 5. Anatomía del fruto de la piña	13
Figura 6. Sistema de inmersión temporal.....	20
Figura 7. Fruta de la piña “Golden:”	21
Figura 8. Organogénesis directa <i>in vitro</i> de piña	23
Figura 9. Callos basales en hoja <i>in vitro</i> de piña	24
Figura 10. Yemas adventicias en segmentos <i>in vitro</i> de piña	24
Figura 11. Efecto del BAP y KIN en explantes <i>in vitro</i> de piña.....	25
Figura 12. Reguladores de crecimiento.....	29
Figura 13. Biosíntesis de auxina local para la regeneración de la raíz.....	31
Figura 14. Interacción de auxinas y cinetinas en la embriogénesis	33
Figura 15. Primordios foliares del mersistema	35
Figura 16. Floema y xilema	36
Figura 17. Transporte de las auxinas	38
Figura 18. Efecto de la auxina en plántulas <i>in vitro</i> de piña.....	40
Figura 19. Zona meristemática (zm).	41
Figura 20. Ciclo del cultivo <i>in vitro</i> de piña	43
Figura 21. Autoclave.....	45

Figura 22. Explante <i>in vitro</i> de piña en medio de cultivo semisólido y líquido.	46
Figura 23. Crioterapia	50
Figura 24. Desinfección de hijuelos.....	51
Figura 25. Obtención de cormos.....	52
Figura 26. Desinfección de cormos	53
Figura 27. Extracción de yemas axilares	54
Figura 28. Desinfección y siembra de yemas axilares	54
Figura 29. Micropropagación de plantas	59
Figura 30. Crecimiento de segmentos de piña de 4 mm de longitud.	63
Figura 31. Macollo de brotes	64
Figura 32. Macollos de brotes sembrados en medio MS	64
Figura 33. Construcción del sistema de inmersión temporal	65
Figura 34. Sistema de inmersión temporal	66
Figura 35. Funcionamiento del sistema de inmersión temporal	67
Figura 36. Reguladores de crecimiento.	68
Figura 37. Vaciado de los medios de cultivo.	71
Figura 38. Cultivo <i>in vitro</i> de piña en sistema de inmersión temporal	72
Figura 39. Evaluación del número y longitud de los brotes de piña	73
Figura 40. Número de brotes de piña.....	74
Figura 41. Segmento <i>in vitro</i> de piña.....	80
Figura 42. Yemas axilares de piña.....	81
Figura 43. Yemas adventicias de piña	82
Figura 44. Fenolización de explantes de piña.....	85

Figura 45. Longitud de brote de piña.....	92
Figura 46. Efecto de la mezcla de KIN y BAP en la longitud de brotes de piña.....	100
Figura 47. Laboratorio de Microbiología	128
Figura 48. Cámara de bioseguridad.	128
Figura 49. Medio de cultivo líquido y semisólido.	129
Figura 50. Sorosis en piña.....	130
Figura 51. Temporizadores digitales.....	131
Figura 52. Compresores de aire	131
Figura 53. Válvulas solenoides	132
Figura 54. Lámparas incandescentes	132
Figura 55. Parte eléctrica del sistema de inmersión temporal	133
Figura 56. Filtros de venteo Acro ® 50 de 0,2 µm politetrafluoroetileno (PTFE).	134
Figura 57. Peachímetro.	134
Figura 58. Autoclave.....	135
Figura 59. Medio Murashigue & Skoog, KIN y BAP	135

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos	69
Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) para el número de brotes en piña	75
Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) para la longitud de brotes en piña	87
Tabla 4. Comparación de medias de Tukey al 5 % de probabilidad	91
Tabla 5. Componentes del medio de cultivo para la micropropagación de piña.....	119
Tabla 6. Resultados de la primera semana	120
Tabla 7. Resultados de la segunda semana	121
Tabla 8. Resultados de la tercera semana.....	122
Tabla 9. Resultados de la cuarta semana.....	123
Tabla 10. Resultados de la quinta semana	124
Tabla 11. Resultados de la sexta semana	125
Tabla 12. Resultados de séptima semana.....	126
Tabla 13. Resultados de octava semana	127
Tabla 14. Registro de temperatura y humedad relativa.....	136

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la mezcla de dos cinetinas en el número y longitud de brotes de piña *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”, en sistema de inmersión temporal. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca. Se utilizó tres tratamientos con tres repeticiones. Las unidades experimentales estuvieron representadas por segmentos de piña de 4 mm de longitud, técnicamente conocido como explante, dentro de la mezcla de dos cinetinas, sometidas a las concentraciones de bencilaminopurina (BAP: $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con kinetina (KIN: 0,4; 0,8 y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) agregados al medio Murashige y Skoog (MS). Para establecer diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó la prueba de ANOVA, con un nivel de significancia de 5 %, encontrándose que no existe diferencias significativas en el número de brotes, pero si hay diferencias en la longitud de brotes. La mezcla de KIN y BAP fueron los principales factores de eficiencia que condicionaron el proceso organogénico directo de los explantes, incrementando el número y longitud de brotes de piña a los dos meses de siembra. El tratamiento T1 (MS + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN), permitió obtener el mayor número promedio de brotes por explante: 3. Con el tratamiento T3 (MS + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN), se logró la mayor longitud promedio de brotes por explante: 1,19 cm.

Palabras clave: Murashige y Skoog, sistemas de inmersión temporal, yemas axilares, kinetina, bencilaminopurina.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the effect of the mixture of two kinetins on the number and length of shoots of pineapple *Ananas comosus* L. Merr, variety “Golden”, in a temporary immersion system. This work was carried out in the Microbiology Laboratory of the Faculty of Health Sciences of the National University of Cajamarca. Three treatments with three repetitions were used. The experimental units were represented by pineapple segments 4 mm in length, technically known as an explant within the mixture of two kinetins, subjected to the concentrations of benzylaminopurine (BAP: 1 mg·L⁻¹) with kinetin (KIN: 0,4; 0,8 and 1,6 mg·L⁻¹) added to Murashige and Skoog (MS) medium. To establish significant differences between the treatments, the ANOVA test was applied, with a significance level of 5%, finding that there are no significant differences in the number of shoots, but there are differences in the length of shoots. The mixture of KIN and BAP were the main efficiency factors that conditioned the direct organogenic process of the explants, increasing the number and length of pineapple shoots two months after planting. Treatment T1 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,4 mg·L⁻¹ KIN), allowed to obtain the highest average number of shoots per explant: 3. With the T3 treatment (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 1,6 mg·L⁻¹ KIN), the highest average length of shoots per explant was achieved: 1,19 cm.

Key words: Murashige and Skoog, temporary immersion systems, axillary buds, kinetin,

benzylaminopurine.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El Perú, en el sector fruticultura, es poco o medianamente tecnificado, se desarrolla en áreas pequeñas, con poca financiación, usa riego por gravedad, poda mal o no lo hace, fertiliza sin mucha tecnología, usa agroquímicos en forma poco adecuada, descuidando el aspecto de residuos para el consumidor y tarda en renovar variedades (Odilo, 2019). La biotecnología vegetal, puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de variedades de plantas (Kessel, 2008).

La piña, es el cuarto fruto tropical más importante del mundo por su demanda en el mercado internacional, después del plátano, el mango y la papaya (Kader & Yahia, 2011).

Según datos estadísticos la siembra de piña en el Perú en el año 2016, fue de 15 182 ha (Sifuentes et al., 2016), las mayores áreas cosechadas se ubicaron en las regiones de Junín, La Libertad y Loreto, con 309 916; 25 475 y 17 472 toneladas de fruta producida, respectivamente.

En Cajamarca, en el año 2019, las mayores áreas cosechadas estuvieron en las provincias de San Ignacio, Jaén y Chota con 2335; 2886 y 540 toneladas respectivamente [Dirección Regional de Agricultura Cajamarca, comunicación personal, 9 de marzo de 2020].

La piña en el campo se propaga mediante hijuelos, pero su procedencia no garantiza la calidad genética y sanitaria de los cultivos, además, los métodos convencionales de propagación por hijuelos no satisfacen la creciente demanda de plantaciones, y son de baja calidad, por lo tanto es necesario utilizar herramientas biotecnológicas como la micropropagación de plantas (Ventura, 2018).

La primera cosecha de hijuelos de piña, material necesario para la propagación vegetativa en campo, ocurre en 24 meses después del inicio del ciclo de vida de la planta (Uriza, 2011). La técnica de micropropagación de plantas soluciona las limitaciones para obtener hijuelos de piña, mediante la embriogénesis somática y organogénesis adventicia (Blanco et al., 2017).

La embriogénesis somática, la organogénesis, el cultivo de embriones cigóticos, anteras y meristemas, son técnicas de importancia práctica que se han convertido en un prerequisite indispensable para la regeneración de los frutales, los cuales junto al empleo del sistema de inmersión temporal (SIT), deben ganar un mayor peso y relevancia en la micropropagación de especies frutales; la conservación en un medio de mínimo crecimiento resulta efectiva en frutales que se encuentran amenazados, la biotecnología permite obtener material de elevada productividad, esta tecnología junto con la técnica de la micropropagación, ha dado un gran aporte a la agricultura y constituye una vía fundamental en la actividad científico-tecnológica, por lo que el empleo de las técnicas de propagación *in vitro* en frutales, resulta una vía valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de estas especies (Kessel, 2008).

El sistema de inmersión temporal es una técnica de la micropropagación, el cual consiste en el uso de dos recipientes conectados mediante una manguera; la aplicación de un flujo de aire a uno de los frascos empuja el medio de cultivo líquido hacia el otro recipiente donde se encuentra el explante, luego de bañar el explante con el medio de cultivo, se invierte el proceso haciendo regresar el medio de cultivo al recipiente original (Maldonado, 2003). Los efectos positivos del sistema de inmersión temporal en la micropropagación están indicados para la proliferación de brotes, microtuberización y embriogénesis somática (Etienne & Berthouly, 2002).

La aplicación de marcadores moleculares para la caracterización e identificación de las variedades de frutales contribuye a la multiplicación y el mejoramiento genético; la aplicación de técnicas biotecnológicas en los frutales, a pesar de estar limitada por la oxidación fenólica de sus órganos y tejidos y por la contaminación microbiana, constituye una vía valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de especies frutales de interés (Kessel, 2008).

En piña, para sembrar una hectárea de este frutal se necesitan 50 000 brotes, llamados también hijuelos, pero para obtener un hijuelo se tendría que esperar 24 meses (Uriza, 2011). Con la micropropagación se acorta el tiempo en la obtención de hijuelos de piña, dado que se puede obtener más de 100 brotes de piña en cuatro meses, a partir de la siembra de un segmento de piña de cuatro milímetros de longitud, sembrados en un medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog (MS) el cual contiene macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, este medio MS al mezclarse con dos reguladores de crecimiento: 8 mg·L⁻¹ de kinetina (KIN) y 2 mg·L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), se logra incrementar el número y la longitud de brotes de piña (Ventura, 2018). El número y la longitud de brotes son parámetros fundamentales en la micropropagación (Méndez-Álvarez, 2014). Es importante señalar que la proporción entre auxina y cinetina, permite la proliferación y la diferenciación celular (Su et al., 2011).

La micropropagación se realiza en medio de cultivo semisólido (Ibrahim et al., 2013), y líquido (Mogollón et al., 2004), pero su eficiencia podría ser mejorada complementándola con el sistema de inmersión temporal, el cual debe ser utilizado solamente en la fase de multiplicación de brotes (Fundación para la Innovación Agraria [FIA], 2016), cuando el explante presenta un macollo de brotes que salen de una masa basal común expandida de tejido tipo callo (Hartmann et al., 2013), para lo cual, los explantes tienen que provenir de cultivos *in vitro* sembrados en medio semisólido (FIA, 2016).

Lo expuesto anteriormente, evidencia la importancia de la micropropagación para obtener plantas de piña en corto tiempo. Los objetivos que guiaron la presente investigación fueron los siguientes:

1. Determinar el efecto de bencilaminopurina (BAP: $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con kinetina (KIN: 0,4; 0,8 y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el número de brotes de piña *Ananas comosus* L. Merr, variedad "Golden", en sistema de inmersión temporal.
2. Determinar el efecto de bencilaminopurina (BAP: $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con kinetina (KIN: 0,4; 0,8 y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en la longitud de brotes de piña *Ananas comosus* L. Merr, variedad "Golden", en sistema de inmersión temporal.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes teóricos de la investigación

Diversas investigaciones se han realizado para aprovechar las ventajas del cultivo *in vitro* en el campo agrícola, particularmente para mejorar la eficiencia de los métodos de la propagación de piña, por ejemplo Ibrahim et al. (2013) usando medio de cultivo semisólido MS + 1 mg·L⁻¹ BAP condujo al crecimiento vegetativo de yemas axilares, y cuando incrementaron la concentración de BAP: 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mg·L⁻¹ agregados al medio MS, se logró el crecimiento de callos, estos callos al ser sembrados en MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,2 mg·L⁻¹ ANA produjeron brotes adventicios después de dos meses de siembra, las cantidad de brotes obtenidos fueron los siguientes: cuando utilizaron MS + 1 mg·L⁻¹ BAP obtuvieron 13,6 brotes, y con MS + 1 mg·L⁻¹ KIN lograron 18,6 brotes, estos investigadores finalmente concluyeron que la kinetina es más efectiva para incrementar el número de brotes que el BAP; estos resultados fueron obtenidos a partir de la siembra de segmentos nodales de piña de 1 cm de longitud, los cuales contenían de 2 a 3 nudos, por lo cual es importante según estos investigadores para incrementar el número de brotes de piña, la selección del explante y la concentración de los reguladores de crecimiento. Por otro lado Delgado (2004) usando MS + 1 mg·L⁻¹ BAP obtuvo 16,8 brotes/yema axilar en 60 días de siembra.

Zuraida et al. (2011) utilizando MS +1 mg·L⁻¹ BAP en un mes de siembra lograron 7 brotes/yema axilar, pero utilizando MS + 5 mg·L⁻¹ BAP consiguieron 10 brotes/yema axilar, los cuales se incrementaron a 23 y 24 brotes después de tres meses de siembra.

Rivas et al. (2014) mencionan que la presencia de auxina y cinetina en el medio de cultivo, influye en el brotamiento de piña, según sus estudios a los 90 días de siembra obtuvieron 93 brotes con una longitud de 1,6 cm usando como explantes iniciales yemas axilares de dos meses de siembra; sembrados en medio semisólido MS + 1 mg·L⁻¹ ANA + 3 mg·L⁻¹ BAP.

Delgado (2004) destaca que al usar el medio de cultivo MS + 2 mg·L⁻¹ BAP + 2 mg·L⁻¹ ANA se puede alcanzar un 90 % de diferenciación de yemas de piña.

Contrariamente, Blanco et al. (2011) mencionan que debido a la variación de las concentraciones endógenas de auxina y cinetinas de la piña “Tabe Caña”, “Eruwa Caña” y Gobernadora”, solamente observaron brotamiento en medios con 5 mg·L⁻¹ de tiamina independientemente de las concentraciones utilizadas de auxinas y cinetinas.

A partir de la siembra de un segmento de piña de 4 mm de longitud obtenidos de la base del tallo de plántulas *in vitro* de la variedad “Roja Trujillana”, en un tiempo de cuatro meses de siembra, se obtuvo 108 brotes de piña con el medio MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP y con MS + 4 mg·L⁻¹ BAP se obtuvo callos friables fácilmente disgregables, los medios de cultivo utilizados fueron renovados cada 30 días (Ventura, 2018).

Mercier et al. (2003) lograron inducir a la formación de protuberancias en la base de la hoja de piña, el mayor porcentaje de hojas cultivadas que formaron protuberancias fue del 40%, y el número medio más alto de brotes de regeneración de protuberancias por hoja fue de 3,5 con el medio de cultivo MS + 1 mg·L⁻¹ ANA + 2 mg·L⁻¹ BAP + Nitrato de amonio ((NH₄)₂SO₄): 500 mg·L⁻¹) + Sulfato de magnesio (MgSO₄· 7H₂O): 122 mg·L⁻¹ + Nitrato de calcio (Ca(NO₃)₂): 694 mg·L⁻¹ + Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄): 250 g mg·L⁻¹.

Wang et al. (2009) obtuvieron un porcentaje del 81-100 % de yemas adventicias en la base de hojas y en segmentos nodales del cultivar PRI 73-050 de la variedad “Cayena Liza” utilizando MS combinado con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA y 2; 3; 5 y $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP en tres semanas de cultivo.

2.2. Bases teóricas

La piña es el cuarto fruto tropical más importante del mundo por la demanda de su fruto (Kader & Yahia, 2011), pertenece a la familia de las Bromeliáceas (Baraona y Sancho, 1984), y es originaria de América tropical, especialmente de Brasil y Paraguay (Bravo et al., 1997). La piña se reproduce asexualmente por medio de la propagación vegetativa (Uriza 2011) a través de hijuelos del tallo, del pedúnculo, y de la corona (Munive, 2015), también se reproduce por semilla sexual, las cuales se forman en el fruto cuando hay polinización cruzada entre variedades (Reinhardt et al., 2018).

La polinización se realiza para el mejoramiento genético (Isidrón et al., 2003), El mejoramiento genético de la piña se canaliza hacia la productividad, calidad del fruto, homogeneidad fenológica de crecimiento, floración, reproducción, y a la resistencia a plagas y enfermedades (Pichis–Palcazu, 2010).

El cultivo de la piña se concentra principalmente en la selva central del Perú, donde se siembran las dos variedades tradicionales ‘Samba’ y ‘Hawaiana’ y las introducidas “Cayena Lisa” y MD–02, también se siembran los ecotipos “Pucalpina o Negra”; “Motilo - na”, “Blanca”, “Azúcar”, “Real” o “Hawaiana”; “Casha piña”, “Guacamayo” y “Roja Trujillana”; aproximadamente hasta la década de los 90, el 75 % del área cultivada de piña a nivel mundial, estuvo concentrado en la variedad “Cayena Lisa” con sus distintos clones; ésta situación está cambiando totalmente con la aparición del híbrido MD-02 o “Golden” el cual a desplazando a la

“Cayena Lisa” del mercado mundial de fruta fresca, por su calidad; la variedad “Golden” tiene hojas sin espinas de color verde oscuro; fruto de forma cilíndrica de cáscara amarillo verde a la madurez, pulpa amarilla y de sabor agradable, esta variedad es mucho más exigente a condiciones de manejo y necesidad de nutrientes que las otras variedades, porque es más susceptible a la “pudrición del corazón” y de las raíces, así como al ataque por bacterias (Pichis–Palcazu, 2010).

La piña `Golden´ es el cultivo más rentable en la selva central, las mayores producciones están en las provincias de Chanchamayo y Satipo del departamento de Junín (Munive 2015). La piña es una planta herbácea perenne, que crece en generaciones sucesivas cuyo sistema de propagación es exclusivamente por vía vegetativa a través de hijuelos, la piña tiene un sistema radicular pequeño fibroso, poco profundo y frágil, generalmente las raíces se encuentran en los primeros 15 cm del suelo, raramente pueden profundizar hasta 60 cm, las raíces subterráneas son fuertes, de ramificación escasa; sobre el suelo se forman raíces adventicias que se desarrollan a partir de las yemas axilares de las hojas basales, estas se enrollan alrededor del tallo y juegan un rol importante en la absorción de nutrientes; el tallo es corto relativamente grueso de consistencia herbácea y entrenudos muy próximos que le confieren una forma de maza, está cubierto por la base de las hojas, en el ápice del tallo se encuentra el meristema generadora de hojas durante la fase vegetativa y al culminar su crecimiento se diferencia para formar una inflorescencia y desarrollar un fruto múltiple; las hojas son erectas angostas y están adheridas al tallo formando un espiral compacto; una planta adulta de piña presenta un máximo de 70 a 80 hojas; la base de la hoja es envolvente en el tallo y se abre hacia afuera en una lámina lanceolada, acanalada, lo cual termina en una punta muy aguda; los bordes del limbo pueden ser completamente lisos, con espinas o de borde cortante, el largo y ancho son muy variables, así

como el color; las hojas de la piña se clasifican en A, B, C, D y E; siendo la hoja “D” la de mayor importancia puesto que representa el umbral del crecimiento y la actividad fisiológica de la planta, es útil para estimar el estado nutricional de la planta; la hoja “D” se caracteriza por ser la hoja adulta más joven que ha terminado su crecimiento, se diferencia de las otras hojas porque el borde del limbo en su base es perpendicular o ligeramente “divergente”; en condiciones normales de crecimiento esta hoja es la más larga tal como se muestra en la figura 1, y esta insertada en la parte más ancha del tallo y con el eje vertical forma un ángulo de 45° (Pichis–Palcazu, 2010).



Figura 1. Identificación de hoja la hoja D en la planta de piña. Fuente: Marca (2017).

El pedúnculo es una simple prolongación del tallo que soporta el fruto; el tamaño (longitud) y grosor tienen mucha importancia en la sostenibilidad del fruto, si los pedúnculos son muy largos y delgados las plantas tienen la tendencia a echarse produciéndose anomalías en los frutos como los quemados de sol y corona deformada, en el pedúnculo se desarrollan los hijuelos material que se usa para la siembra; los hijuelos que se utilizan para la propagación vegetativa provienen del tallo, del pedúnculo y de la corona (Pichis–Palcazu, 2010).

En la figura 2, Munive (2015) muestra una planta de piña con hijuelos del tallo, del pedúnculo y de la corona, los cuales son utilizados en la propagación vegetativa de la piña en campo.

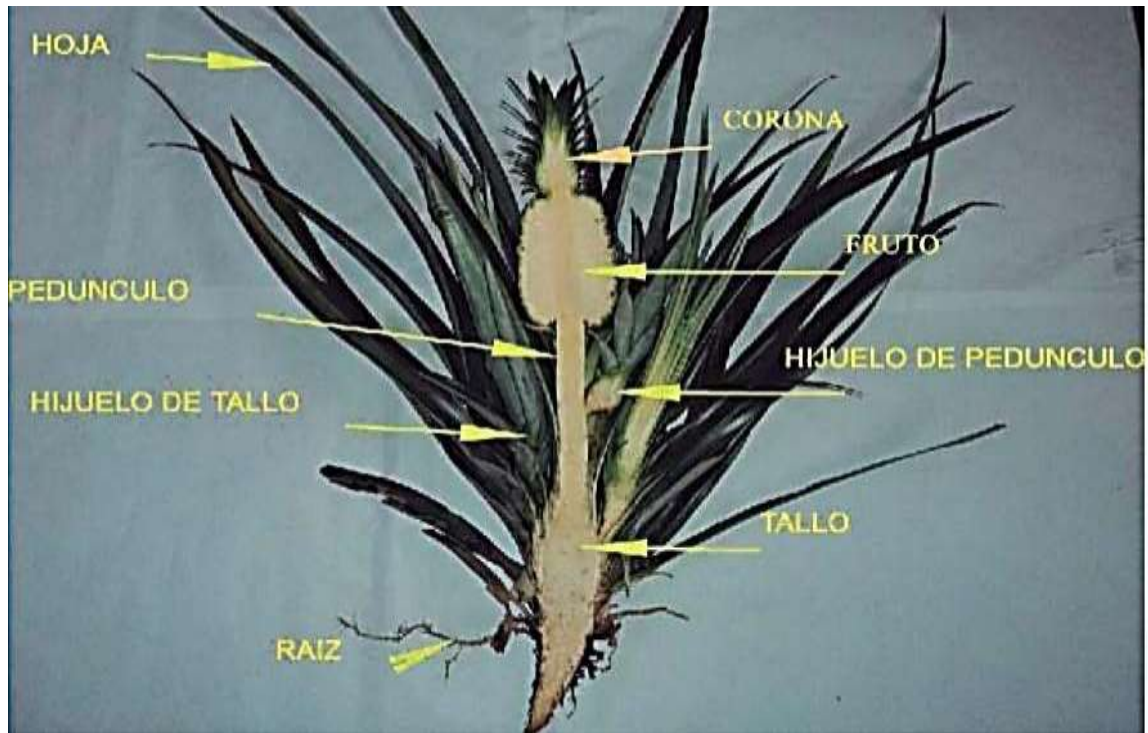


Figura 2. Hijuelos de piña. Fuente: Munive (2015).

En la figura 3 se muestra la inflorescencia de la piña en la cual podemos observar un número variable de flores de color violáceo; la apertura floral se inicia en la base de la inflorescencia y continúa hacia arriba en un periodo de 3 a 6 semanas, la flor de la piña está formada por tres sépalos que son cortos y anchos, tres pétalos que son alargados y finos, seis estambres un poco más cortos que los pétalos, el estilo termina en tres estigmas cada uno con un canal independiente que lo comunica con las celdas del ovario (Pichis-Palcazu, 2010). Los “frutillos” de piña pasan por tres estados en su desarrollo, estado 1, estado 2 y estado 3, cada frutillo se separa en brácteas, discos de flores, sépalos, pétalos y otros. Fuente: Mao et al. (2018).

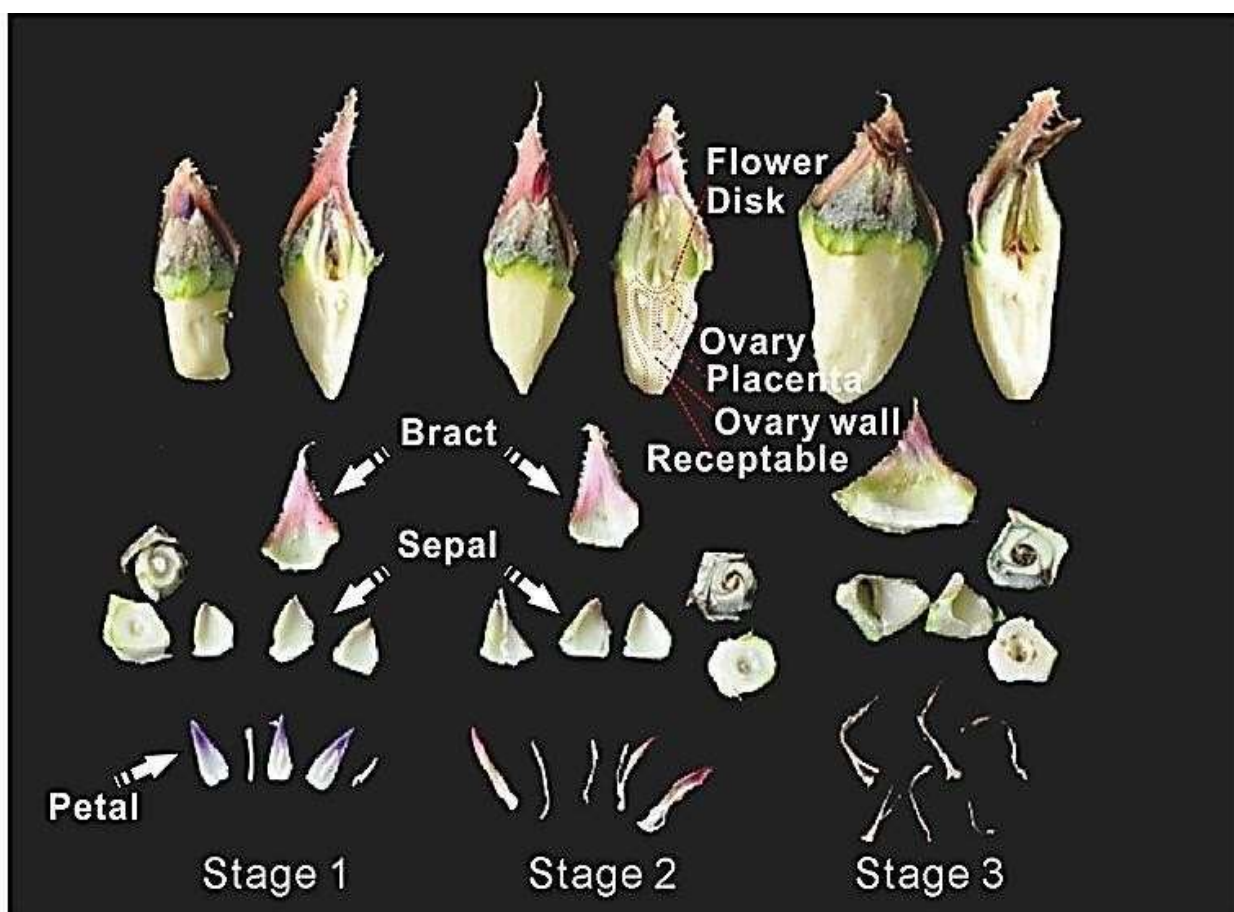


Figura 3. Estados del desarrollo del “frutillo” de piña. Fuente: Mao et al. (2018).

En la figura 4 mostramos la fusión de “frutillos” (sorosis) de la fruta de la piña, cada “frutillo” es un fruto individual, al exterior se presenta como un escudete poligonal duro y prominente, la mitad inferior del escudete está cubierta por el ápice de la bráctea y la superior por los tres sépalos (Pichis–Palcazu, 2010). A la fruta de la piña, se le puede clasificar en tres estados en su desarrollo. Estado 1: corresponde al momento en que los botones florales comienzan a florecer y la fruta comienza a expandirse en tamaño; al mismo tiempo, la división celular domina los procesos biológicos en la fruta. Estado 2: corresponde al momento en que termina el período de floración y la fruta expande su tamaño al ritmo más rápido; al mismo tiempo, la expansión celular domina los procesos biológicos en la fruta. Estado 3 corresponde al momento en que la fruta comienza su proceso de maduración y el proceso de expansión de la fruta se detiene (Mao et al., 2018).

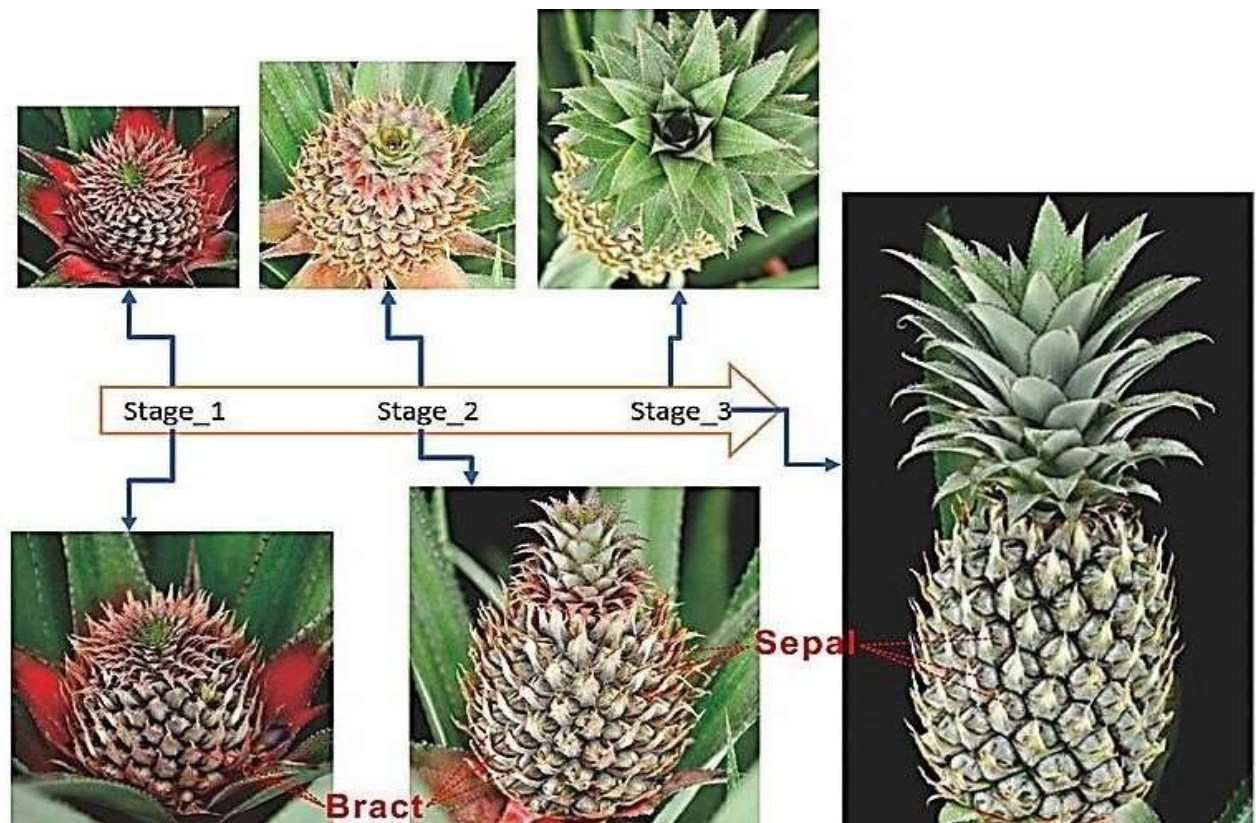


Figura 4. Estados de desarrollo de la fruta de piña. Mao et al. (2018).

En la figura 5 mostramos la anatomía del fruto de la piña, en donde se puede apreciar algunas vistas que se realizaron con el navegador de pictografía electrónica fluorescente de piña (eFP), para facilitar la exploración de la expresión génica durante el desarrollo de la fruta de piña: (A) Vista predeterminada del navegador eFP de piña con diferentes colores que denotan diferentes tejidos. (B) Una vista de un gen elegido al azar (Aco031614) con color oscuro que denota niveles de expresión más altos. (C) Una vista de un gen específico de estambre (Aco023419). (D) Una vista de un gen expresado constitutivamente (Aco004566). (Mao et al. 2018).

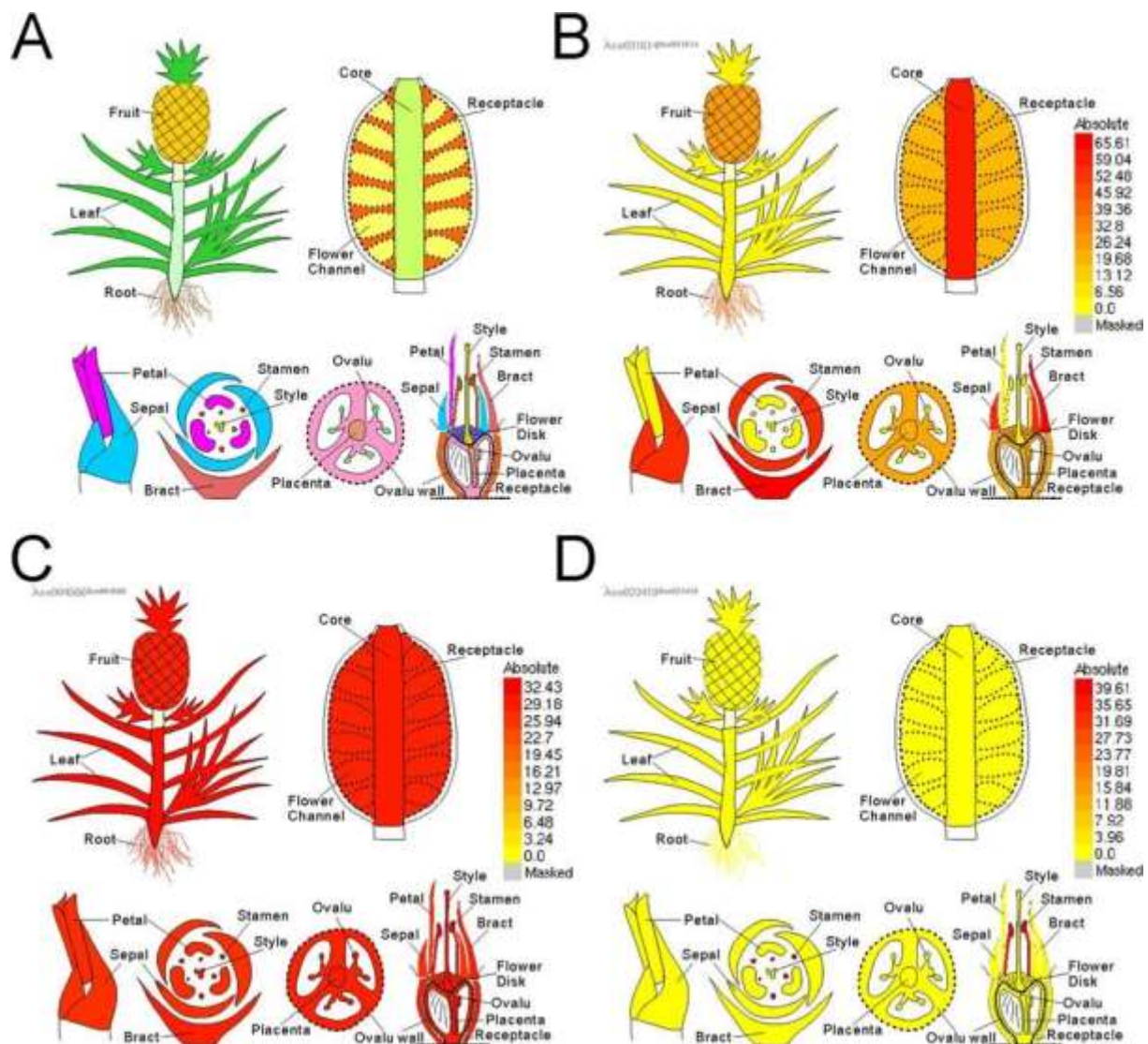


Figura 5. Anatomía del fruto de la piña. Fuente: Mao et al. (2018).

2.3. Condiciones agroclimáticas de la piña

Uriza, (2011) menciona que la piña necesita:

1. Una precipitación pluvial media anual de 1,000 a 1,800 mm³, en localidades donde ocurren más de tres meses con menos de 60 mm³ de lluvia se reduce la probabilidad de obtener cosechas abundantes y de calidad durante todo el año;
2. Una temperatura media anual promedio de 24 a 25°C, con valores extremos absolutos que no bajen de los 20°C, ni excedan los 35°C.
3. La pendiente, preferentemente, menor al 6 % o condicionada a la aplicación estricta de prácticas de control de la erosión que incluyen el uso de camas con pendiente controlada, drenes, canales de desagüe y acolchado plástico total.
4. Los vientos frecuentes no mayores a 50 km/h, o en su ocurrencia procurar la protección de las plantaciones con malla-sombra para reducir sus efectos negativos sobre plantas y frutos;
5. Los suelos deben tener buen drenaje y profundidad de más de 1 metro, con textura arenosa, migajón-arenoso o migajón areno-arcilloso y pH entre 4,5 y 5,5, valores mayores de pH resultan en alta incidencia de pudriciones de raíz y cogollo por hongos del género *Phytophthora* spp, especialmente en este híbrido que es doblemente susceptible en comparación con el clásico clon Cayena Lisa.

La piña crece bien hasta 1200 m s.n.m. altitudes superiores a los indicados pueden causar problemas en el crecimiento y desarrollo del cultivo; hay plantaciones de “Samba” sobre 1500 m de altitud; pero a esta altura las plantas presentan un crecimiento más lento y el vigor de las mismas es menor que plantas que crecen en menores alturas (Pichis–Palcazu, 2010).

2.4. Micropropagación de plantas

La micropropagación, es el conjunto de técnicas y métodos para la propagación vegetativa a partir de una parte de la planta donante llamado explante, en forma eficiente, rápida, y en grandes cantidades, durante todo el año, con elevada calidad sanitaria, y con características genéticas similares a la planta que les dio origen (Méndez-Álvarez, 2014). Los explantes pueden ser tallos, ramas, hojas, raíces y callos, los cuales se colocan en un medio nutritivo especial, bajo condiciones controladas de luz y temperatura para que continúen su desarrollo, tal y como lo hacía la planta “madre” (Escobar et al., 2012). Siendo la división celular, el agrandamiento y la diferenciación celular, la base de su crecimiento y desarrollo (Rose, 2017).

La micropropagación permite la multiplicación rápida del material vegetal continuamente durante todo el año, en un entorno controlado, independientemente de la temporada, obteniéndose plantas uniformes (Tomar et al., 2008), permitiendo la multiplicación de plantas en una superficie reducida con mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, y la facilidad para transportar el material vegetal *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras (Roca y Mroginski, 1991). También permite obtener plantas difíciles de propagar en campo (Suarez y Quintero, 2014). Las condiciones ambientales del campo se pueden simular en el laboratorio, como el pH, el temperatura, la humedad, y el fotoperiodo (Mogollón et al., 2004). Con la micropropagación se puede establecer colecciones o bancos de germoplasma, y se puede obtener plantas libres de enfermedades mediante el cultivo *in vitro* de meristemas (Escobar et al., 2012), también puede realizar la duplicación de cromosomas mediante el uso de colchicina con el fin de incrementar las variedades de piña (Istiqomah & Shofi, 2018).

La micropropagación es una herramienta del fitomejoramiento; esta técnica permite la propagación de plantas en vías de extinción, además se puede clonar individuos "élite" con desempeño agronómico destacado, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma; se puede obtener metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejoramiento genético de plantas, germinación de semillas, y la realización de estudios fisiológicos (Guadalupe, 2016).

La micropropagación ha sido aplicada a diversas especies biológicas, y el interés científico por transferir esta tecnología a escala industrial ha ido creciendo rápidamente; el uso de la tecnología *in vitro* para la propagación comercial de diferentes especies de plantas y la producción de compuestos bioactivos a partir de ellas, se ha convertido en una industria rentable en todo el mundo; en las últimas décadas el progreso en la tecnología de micropropagación se dirigió hacia la introducción del medio líquido para el cultivo en condiciones sumergidas en diferentes tipos de biorreactores con el fin de automatizar todo el proceso (Yancheva et al., 2019).

La micropropagación de plantas se puede llevar a cabo durante todo el año, independientemente de la temporada y el clima, sin embargo, esta tecnología es costosa en comparación con los métodos convencionales de propagación mediante semillas, esquejes e injertos (Suman, 2017). El costo de producción es elevado por la mano de obra y los productos químicos; además, no todas las especies de plantas son viables de propagar *in vitro* debido a que algunas son recalcitrantes y cada especie requiere de métodos específicos resultando costoso la estandarización de protocolos (Tomar et al., 2008).

Varios problemas bien definidos en calidad fisiológica, epigenética y genética están asociados con el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de plantas, y estos son: la pérdida

de potencial organogénico (recalcitrancia), la hiperhidricidad (vitrificación) y la variación somaclonal que va desde la morfogénesis directa a través de embriones somáticos y brotes adventicios; hasta la morfogénesis indirecta cuando involucra el cultivo de callos (Cassells, 2001).

Los procedimientos en la micropropagación de plantas en medio de cultivo semisólido y líquido, son de una intensa laboriosidad, debido al número de manipulaciones que implica, y los costos de producción son relativamente altos, además para su aplicación se requiere un alto componente de mano de obra calificada (Etienne y Berthouly, 2002). Los avances recientes en las técnicas de micropropagación han abordado parcialmente el factor de costo sin comprometer la calidad de las plantas producidas; en los países industrializados la mano de obra es el principal factor a tener en cuenta a la hora de reducir el costo de producción, por lo tanto se requiere un monitoreo constante de los costos de los insumos en términos de capital, químicos, energía, y trabajo para mejorar opciones sobre cómo se puede reducir el costo de producción (Tomar et al., 2008), para lo cual es esencial adoptar medidas a fin de reducir el costo de producción por planta; esto requiere prácticas rentables y un uso óptimo de los materiales y equipos tales como el uso de sistema de inmersión temporal (Suman, 2017).

Debido al costo creciente de la mano de obra en los países desarrollados, el sistema convencional de micropropagación (semisólido y líquido), ha sido desafiado por el costo de producción y la baja ganancia bruta, para lo cual se ha tenido que automatizar los sistemas de propagación, a fin de reducir los requisitos de mano de obra (Chu, 1995).

El sistema de inmersión temporal reduce el tiempo de trabajo en la obtención de plantas, el área de estanterías, el número de contenedores utilizados y elimina la hiperhidricidad el cual es un desorden fisiológico ocasionado por la siembra de explantes en el medio líquido, causado principalmente por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos, este desorden fisiológico, es una limitante en la micropropagación, pues no permite el desarrollo normal de los explantes (Etienne & Berthouly, 2002).

El uso de sistemas de inmersión en la micropropagación de plantas, puede aumentar la velocidad de multiplicación y crecimiento de los cultivos, reduciendo así los requisitos de espacio, energía y mano de obra (Suman, 2017). Cuando se realiza de forma manual la micropropagación, se incrementa los riesgos de contaminación (Chu, 1995).

El sistema de inmersión temporal reduce los tiempos en la obtención de plantas, aumento del rendimiento biológico, y la reducción de costos hasta un 20 % menos frente al medio semisólido (Escalona et al., 1999), además se pueden obtener plantas mejor aclimatadas para el ambiente natural, que las obtenidas en los medios tradicionales: medio semisólido y líquido (Etienne & Berthouly, 2002).

Se han reportado mejoras en los protocolos sistema de inmersión temporal previamente desarrollados para especies económicamente importantes, y esto continúa dando fe de sus beneficios en comparación con los protocolos que emplean medios semisólidos o líquidos (Watt, 2012). El sistema de inmersión temporal no reemplaza el método convencional de micropropagación en agar y en líquido, más bien debe entenderse como una técnica complementaria de la micropropagación convencional, recomendándose su uso solamente en la etapa de multiplicación y elongación de brotes (FIA, 2016).

Los efectos positivos del sistema de inmersión temporal en la micropropagación están indicados para la proliferación de brotes y embriogénesis somática; la duración y la frecuencia de inmersión de los explantes en el medio de cultivo contenidos en sistema de inmersión temporal, es el parámetro más decisivo para la eficiencia del sistema, se debe tener en cuenta que la optimización del volumen del medio de cultivo y el volumen del recipiente mejora la proliferación de los brotes y la calidad del material vegetal (Etienne & Berthouly, 2002).

La oxigenación del medio de cultivo es importante para evitar la oxidación y vitrificación en los explantes (FIA, 2016). La hiperhidricidad, que afecta gravemente a los cultivos en medio líquidos, puede eliminarse con el sistema de inmersión temporal, para lo cual se tiene que ajustar los tiempos de inmersión (Etienne & Berthouly, 2002). En piña se han utilizado los siguientes tiempos y frecuencias de inmersión: Blanco et al. (2011) utilizaron tiempos de inmersión de 30 minutos cada 12 horas. Escalona et al. (1999) usaron 2 minutos cada 3 horas, al igual que Silva et al., (2007); por otro lado Alverca (2015) utilizó tiempos de inmersión de 4 minutos cada 4 horas.

El sistema de inmersión temporal se ha probado en otros cultivos, permitiendo la regeneración exitosa de de microtubérculos de *Solanum tuberosum* y embriones somáticos de *Coffea arabica* (Etienne & Berthouly, 2002).

En la figura 6 mostramos el funcionamiento del sistema de inmersión temporal, cuyo funcionamiento es el siguiente: A: Se abre una válvula solenoide, y el aire comprimido fuerza el medio al contenedor de la planta, sumergiéndola (B). C: Después de un tiempo, se abre una segunda válvula solenoide, y la presión del aire hace que el medio vuelva al recipiente original (A). 1: compresor de aire, 2: válvulas solenoides, 3: filtros hidrófobos (0,2 mm). Fuente: Escalona et al. (1999).

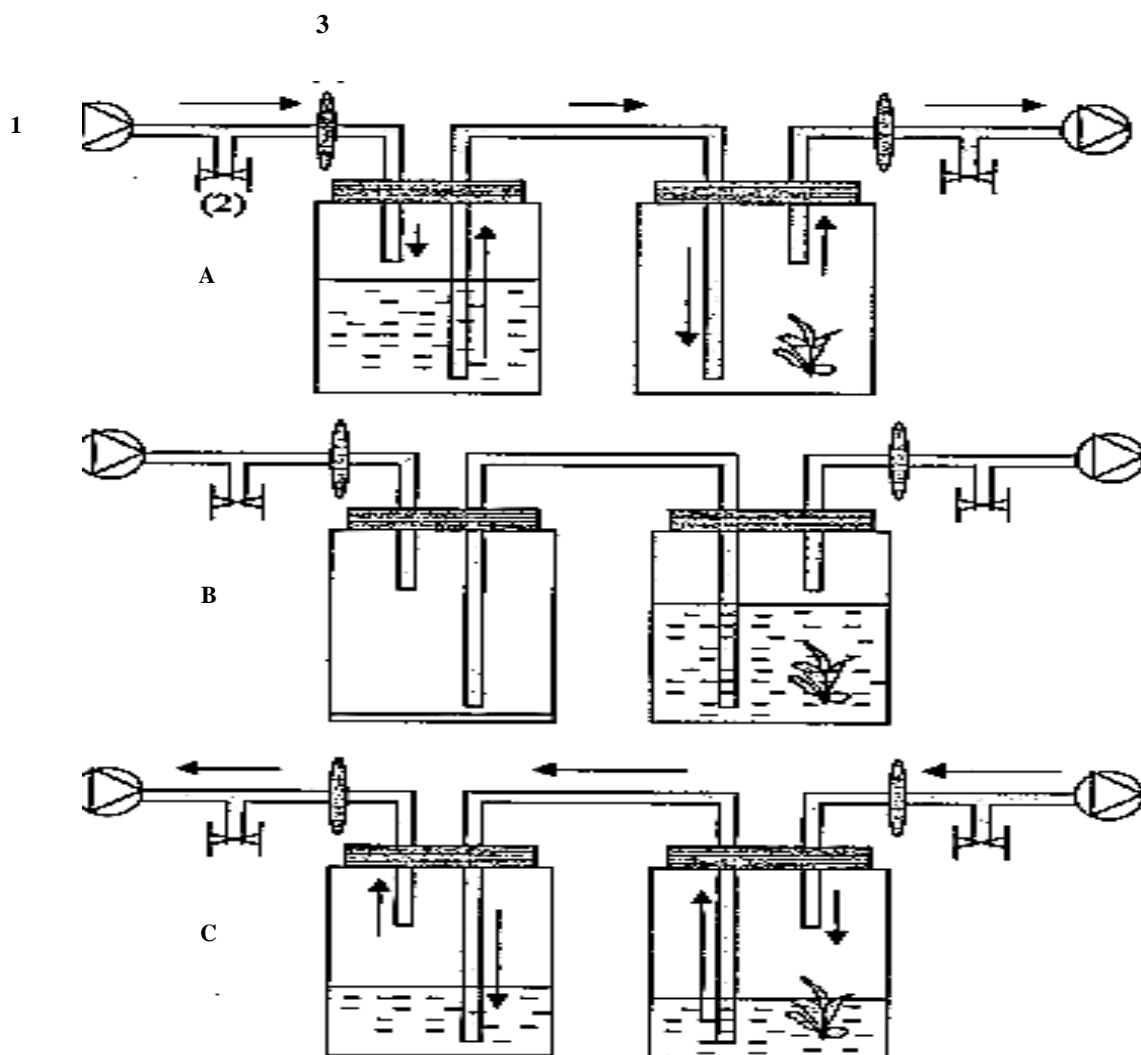


Figura 6. Sistema de inmersión temporal. Fuente: Escalona et al. (1999).

Los resultados alcanzados, mediante el cultivo *in vitro* de plantas de piña, demuestran que se logran altos porcentajes de supervivencia en las vitroplantas (90 %), además los análisis bromatológicos realizados a los frutos, indican que éstos cumplen con las características descritas internacionalmente para la piña MD-2; en la figura 7 se muestra el proceso de maduración natural de los frutos de piña producidos por plántulas *in vitro* (Rodríguez et al., 2016).



Figura 7. Fruta de la piña “Golden:”. Fuente: Rodríguez et al. (2016).

2.5. Ingredientes del medio de cultivo

Hartmann et al. (2013) menciona que los ingredientes del medio de cultivo varían según el tipo de planta, y de la etapa de propagación en que se esté trabajando, estos ingredientes se pueden agrupar en categorías específicas:

- a. Sales inorgánicas, las cuales proporcionan los macroelementos al medio de cultivo, que incluye carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), fósforo (P), potasio (K), nitrógeno (N), azufre (S), calcio (Ca), y magnesio (Mg), y los microelementos tales como el hierro (Fe), cloro (Cl), manganeso (Mn), boro (B), zinc (Zn), cobre (Cu), y el molibdeno (Mo) (Roca y Mroginski, 1991), de los macro y microelementos que contiene el medio MS se pueden preparar soluciones concentradas las cuales se guardan en el refrigerador; el medio MS se ha

usado ampliamente en un buen número de especies y tipos de cultivos, como plantas herbáceas y para cultivo de tejidos en general; para otros tipos de plantas, como especies leñosas, se utiliza el medio (WPM); el medio Anderson (And) para rododendros, el cual tiene una concentración baja en sales; el medio Gamborg B5 se ha utilizado ampliamente para cultivo de células y de tejidos.

- b. Compuestos orgánicos como fuente de carbono; cuando se prepara el medio de cultivo se emplea a la sucrosa del 2 al 4 %, pero en algunos casos se puede utilizar hasta 12 % para el cultivo de embriones jóvenes, también se puede utilizar la glucosa para monocotiledóneas.
- c. Ingredientes naturales complejos como el agua de coco a razón del 10 al 20% por volumen en el medio de cultivo, estimulan un crecimiento extra en los explantes.
- d. Medios de sostén inerte como el agar, son utilizados para estabilizar los explantes en el medio de cultivo.

De las vitaminas que contiene el medio de cultivo, la tiamina es la más importante, y su uso varía de 0,1 a 0,5 mg·L⁻¹, también se le agrega la glicina a razón de 2 mg·L⁻¹ (Hurtado y Merino, 1991), el ácido nicotínico (0,5 mg·L⁻¹), piridoxina (0,5 mg·L⁻¹); en muchos cultivos resulta beneficioso el inositol a razón de 100 mg·L⁻¹ (Hartmann et al., 2013).

2.6. Reguladores del crecimiento

Los reguladores de crecimiento son compuestos producidos por la misma planta, los cuales ejercen su función a bajas concentraciones, y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control; los reguladores de crecimiento son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales (Cortes et al., 2019).

Los reguladores de crecimiento pueden ser clasificados según su estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, sus efectos inhibitorios o estimulantes; algunas se clasifican en familias (auxinas y cinetinas); es necesario tener en cuenta aspectos críticos como oportunidad de aplicación, dosis, sensibilidad de la variedad y la condición de la planta, visto que cada planta requerirá de unas condiciones específicas de crecimiento que pueden afectarse por la concentración de ellos en el medio de cultivo (Cortes et al., 2019).

2.7. Efecto de los reguladores del crecimiento en plantas

Los reguladores del crecimiento pueden originar mediante la organogénesis directa *in vitro* de piña, la formación de callos con medio MS + 4 mg·L⁻¹ BAP (C); y brotes con medio MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP (D), a partir de la siembra de un segmento (B), obtenido de la base de una plántula *in vitro* (A) de piña de piña, mostrado en la figura 8 (Ventura, 2018).

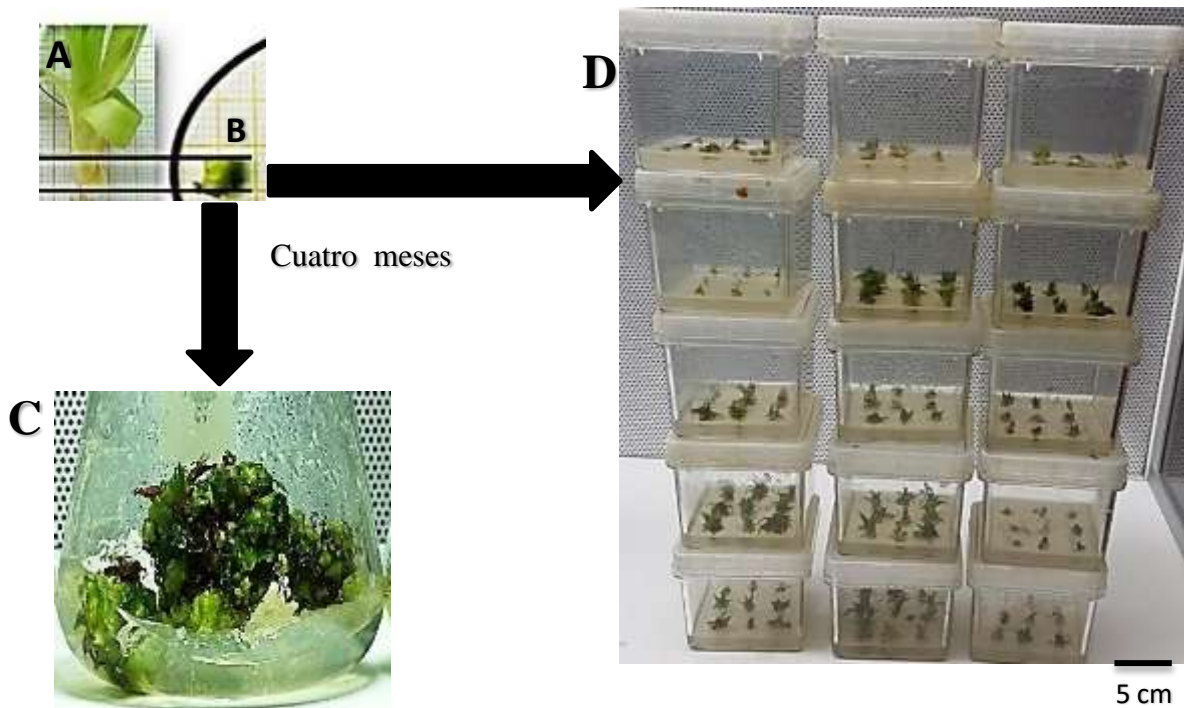


Figura 8. Organogénesis directa *in vitro* de piña. Fuente: Ventura (2018).

Los reguladores de crecimiento según su concentración en el medio de cultivo pueden originar la formación de callos, los cuales se forman en la porción basal de hojas *in vitro* de piña, después de 10 días de cultivo, tal como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Callos basales en hoja *in vitro* de piña. Fuente: Mercier et al. (2003).

Los reguladores de crecimiento también logran la formación de yemas adventicias en la base de las hojas (A), y yemas adventicias en segmentos nodales de piña de 5 mm de longitud (B), tal como se muestra en la figura 10.

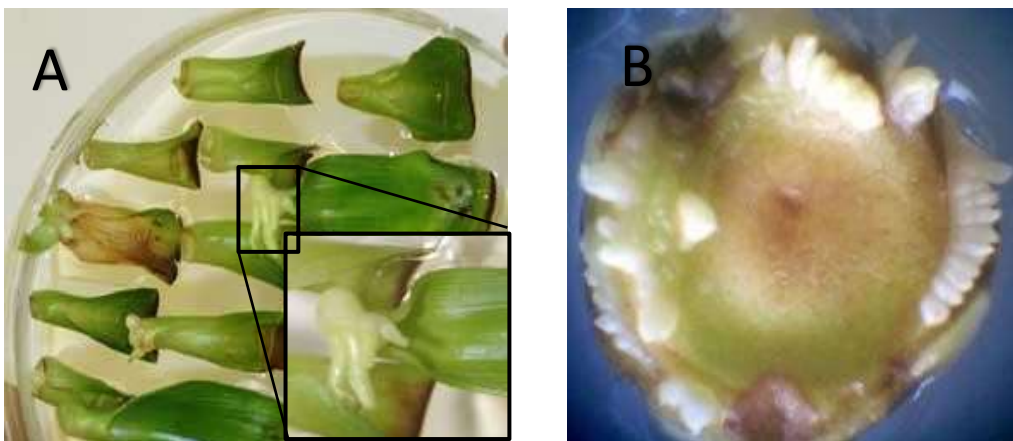


Figura 10. Yemas adventicias en segmentos *in vitro* de piña. Fuente: Wang et al. (2009).

En la figura 11, Ventura (2018) muestra la importancia de manejar las concentraciones adecuadas de las cinetinas (KIN y BAP); tal como se puede apreciar en la figura 11a; 11b y 11c, con 0; 2 y 4 mg·L⁻¹ BAP, en donde los explantes muestran un buen desarrollo en el número y longitud de brotes, los mismo sucede con 8 mg·L⁻¹ KIN mezclado con 0; 2 y 4 mg·L⁻¹ BAP, figura 11d; 11e y 11f, pero con 16 mg·L⁻¹ de KIN más 0; 2 y 4 mg·L⁻¹ BAP ocasiona el pardeamiento oxidativo de los tejidos vegetales (necrosis celular), bajo número de brotes y muerte de los explantes, figura 11g; 11h y 11i; para este experimento se utilizó como material inicial segmentos de piña de 4 mm de longitud, sembrados en 3 mL de medio MS semisólido de en dos meses de siembra.

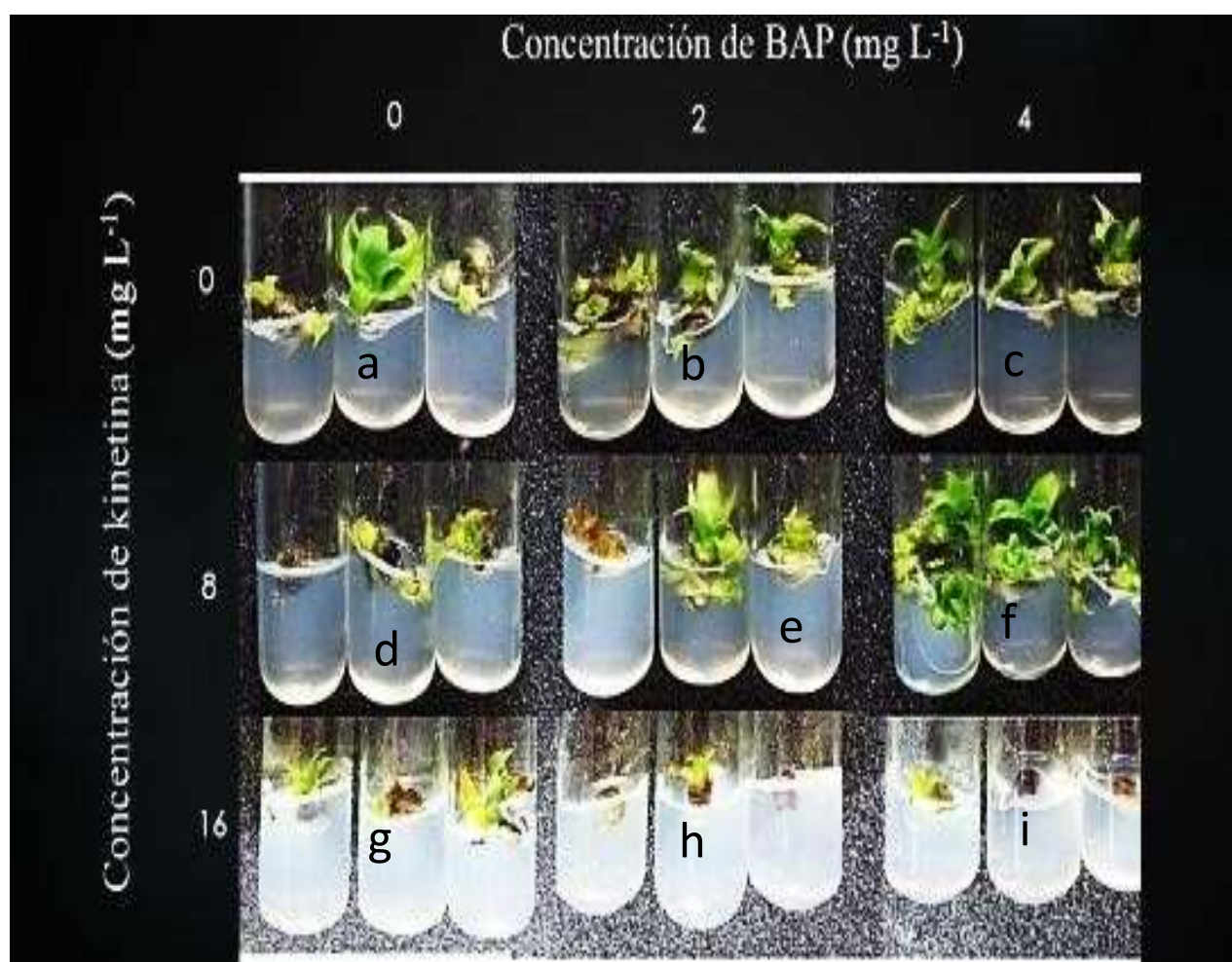


Figura 11. Efecto del BAP y KIN en explantes *in vitro* de piña. Fuente Ventura (2018).

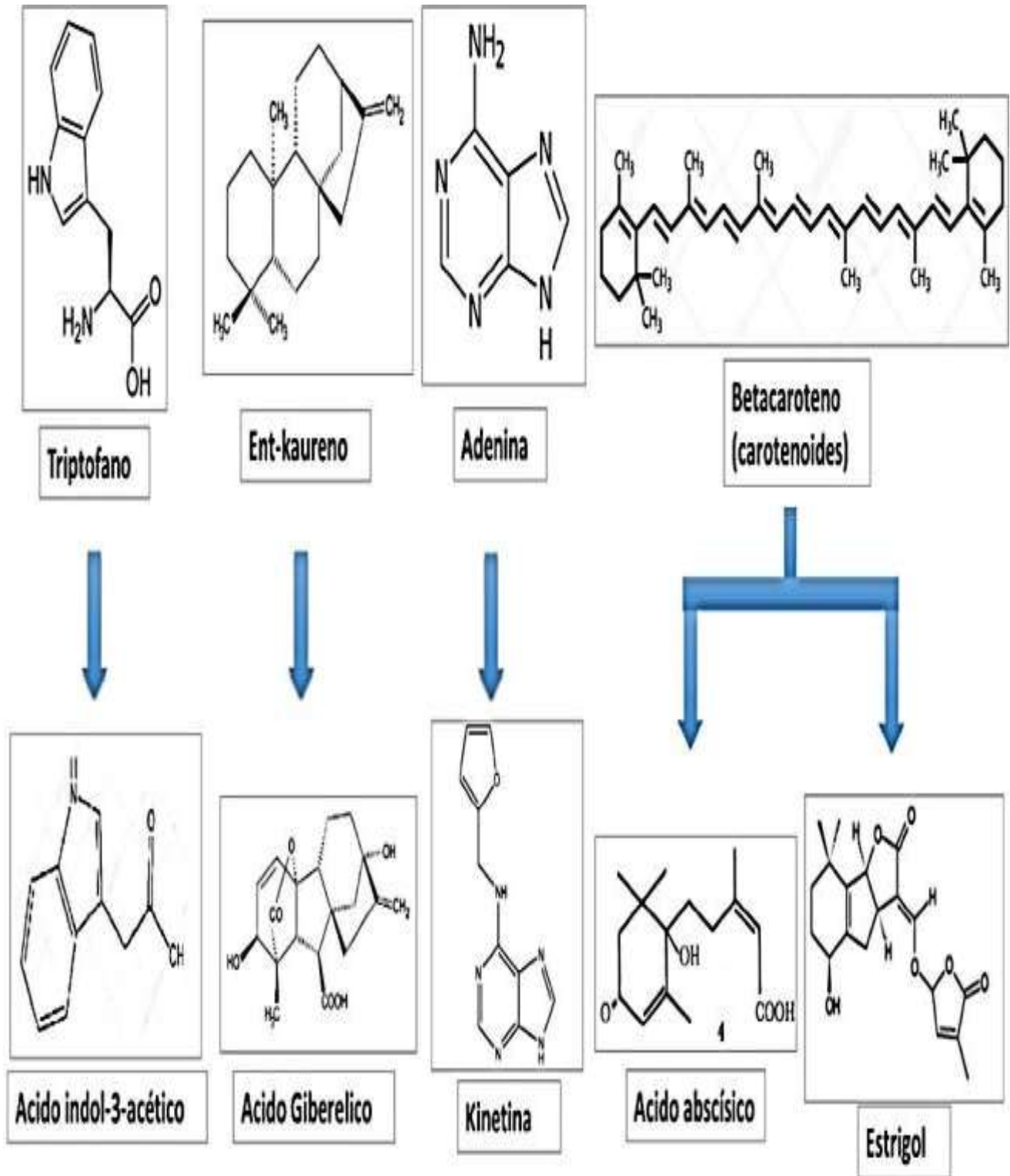
Los principales reguladores de crecimiento más conocidos en la aplicación biotecnológica son las auxinas, giberelinas, cinetinas, ácido abscísico, ácido salicílico, poliaminas, jasmonatos y derivados, brasinoesteroides, etileno y estrigolactonas; los reguladores de crecimiento requieren para su síntesis de manera natural diferentes precursores que generalmente son obtenidos del medio en el que las plantas se desarrollan, en ocasiones dichos precursores se obtienen como parte del metabolismo secundario que otros microorganismos presentes en la rizosfera que realizan para sobrevivir (Cortes et al., 2019). Las auxinas y las cinetinas también se forman dentro la planta por la presencia de *Agrobacterium tumefaciens* el cual provoca, especialmente en las dicotiledóneas, una enfermedad neoplásica denominada agalla de cuello o corona, el tumor es inducido por la integración de un segmento de ADN (conocido como T-ADN) del plasmido Ti de la bacteria en el genoma de la planta, la región T-ADN posee genes específicos para la biosíntesis de auxinas y citocininas (Bieto & Talón, 2013).

A continuación Fichet (2017), menciona las principales funciones de algunos reguladores de crecimiento:

- Giberelinas. División y elongación celular, crecimiento de frutos, desarrollo floral (inhibición de la floración en frutales, 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, promueven germinación de semillas. Principales formas activas: AG₁, AG₃, AG₄ y AG₇.
- Brasinoesteroides. División y elongación celular, fotomorfogénesis, desarrollo de las partes reproductivas, respuesta a estrés, senescencia de las hojas y germinación de semillas. Principales formas activas: catasterona (CS) y brasinolido (BS).

- Estrigolactonas. Inhibición de la ramificación lateral, senescencia de las hojas, simbiosis con hongos del suelo (micorrizas) y favorecen el crecimiento radical, pero inhiben el desarrollo de raíces adventicias. Principales formas activas: estrigol, orobanchol, sogolactona, entre otros.
- Etileno. Crecimiento radical, efecto final de la abscisión de órganos, maduración y desarrollo de pigmentos en fruta, respuesta a ataque de patógenos, germinación de semillas, respuesta a estrés y floración en determinadas especies. Principal forma activa: etileno.
- Ácido abscísico. Cierre estomático, tolerancia a estrés abióticos (hídrico o salino) pero también vinculado en algunos tipos de estrés biótico (respuesta a ataques de patógenos), senescencia de hojas, inhibición de la germinación de semillas, vinculado con las síntesis de carotenos y promotor de la maduración de la fruta no climatérica. Principal forma activa: ácido abscísico (ABA).
- Jasmonatos. Defensa de la planta a ataque de insectos herbívoros, respuesta a ciertos ataques de patógenos mediante necrosis, desarrollo de la parte reproductiva de la flor, apertura estomática, inhibición del desarrollo radical y de la germinación. Principal forma activa: jasmonoil-isoleucina (JA-Ile).
- Ácido salicílico. Principalmente en resistencia sistémica adquirida (SAR) contra patógenos, tolerancia a estrés abiótico como toxicidad por metales pesados, implicado en desarrollo celular, de tricomas, senescencia y apertura estomática. Principal forma activa: ácido salicílico (SA).

En la figura 12 se muestran las diferentes estructuras químicas de los precursores necesarios para la producción de cada regulador de crecimiento (Cortes et al., 2019).



Continuación

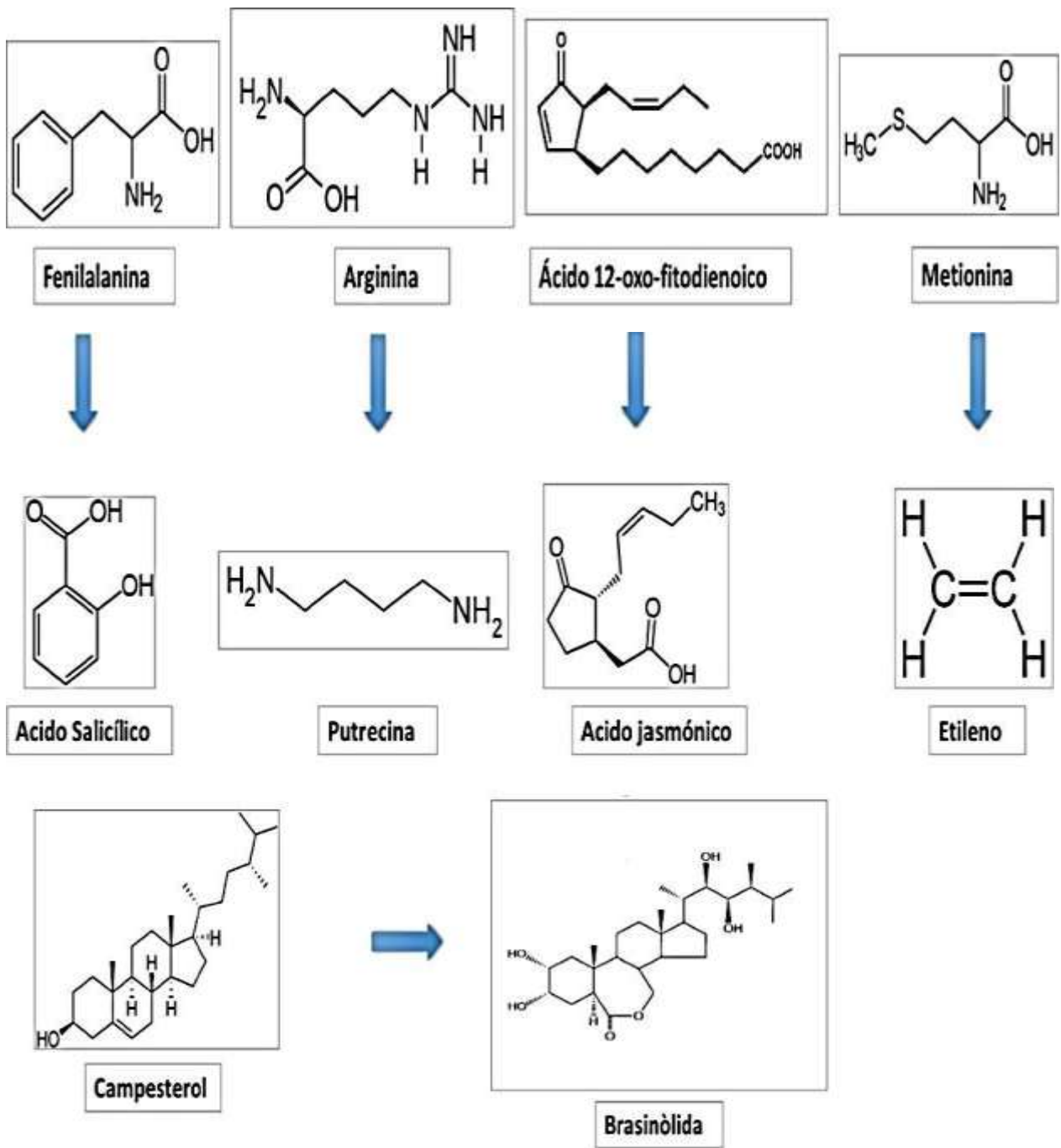


Figura 12. Reguladores de crecimiento. Fuente: Cortes et al., (2019).

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y que se trasladan a otra parte donde a bajas concentraciones inducen a una respuesta fisiológica, por ejemplo en el hijuelo de piña solo se encuentra 6 microgramos de ácido indolacético (AIA) por kilogramo de material vegetal (Chóez, 2018), y en un segmento *in vitro* de la variedad “Cayena Liza” hay 5 picomoles de AIA, por gramo de peso fresco (Souza et al., 2010). Se conocen cinco grupos de reguladores de crecimiento, las auxinas, las cinetinas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico, todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta (Chóez, 2018). Los reguladores de crecimiento tienen acción en los mismos sitios de su síntesis (Jordán y Casaretto, 2006), localizadas en meristemas apicales y hojas jóvenes (Hartmann et al., 2013).

La interacción de múltiples hormonas puede servir para determinar el tamaño de las aberturas estomáticas; el ácido abscísico (ABA) es uno de los principales actores que regulan la función estomática; las auxinas, las cinetinas, el etileno, los brasinoesteroides, los jasmonatos y el ácido salicílico también contribuyen a la regulación de la apertura del estoma (Acharya & Assmann, 2009).

Los reguladores de crecimiento influyen en los procesos fisiológicos a bajas concentraciones, como el crecimiento, diferenciación celular, desarrollo y movimientos estomáticos; también actúan en conjunto o en oposición entre sí, de modo que la condición final de crecimiento o desarrollo representa el efecto neto de un equilibrio hormonal (Davies, 2010). Los reguladores de crecimiento desempeñan papeles importantes en las redes de señalización involucradas en las respuestas de las plantas a una amplia gama de estrés biótico y abiótico, en el que están involucrados auxinas, cinetinas; el ácido salicílico, los jasmonatos y el etileno (Bari & Jones 2009).

Otros reguladores como el ácido abscísico (ABA), el ácido giberélico (AG₃), los brasinoesteroides (BR) y las hormonas peptídicas, permiten una respuesta molecular contra diversas enfermedades y plagas (Bari & Jones 2009).

El meristemo de la raíz puede regenerarse tras la eliminación de su nicho de células madre mediante el reclutamiento de células remanentes, la regeneración se inicia por la acumulación rápida de auxina cerca del sitio de la lesión tal como se muestra en la figura 13 (Matosevich et al. 2020).

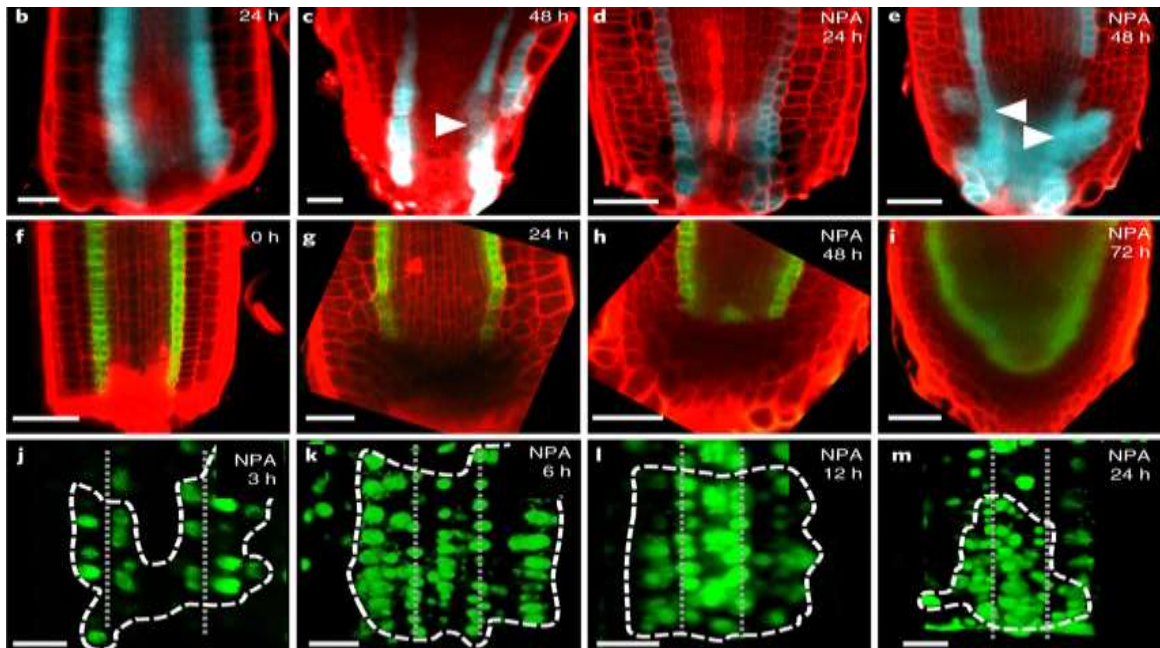


Figura 13. Biosíntesis de auxina local para la regeneración de la raíz. Fuente: Matosevich et al. (2020).

Los reguladores de crecimiento están relacionados con la mejora de la tolerancia a la sequía, entre ellos, se sabe que ABA juega un papel crucial en la respuesta al estrés por sequía regulando la conductancia estomática, el desarrollo de la raíz, la fotosíntesis y otros procesos morfofisiológicos y moleculares, después del ABA, el ácido jasmónico (AJ) también está involucrado en la tolerancia a la sequía de varias maneras, incluido el cierre de estomas, la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el desarrollo de la raíz; además, las

auxinas, las cinetinas, el etileno, las giberelinas y los brasinoesteroides también participan en la regulación de la tolerancia a la sequía, estos reguladores permiten las respuestas protectoras de las plantas contra las tensiones tanto bióticas como abióticas (Hasanuzzaman et al., 2019). Una mayor producción de ROS en comparación con las concentraciones normales es perjudicial para las células vegetales; sin embargo, la maquinaria enzimática y no enzimática trabaja en conjunto para eliminar ROS y proteger las plantas de daños (Hasanuzzaman et al., 2019).

La presencia y acción conjunta de las auxinas y cinetinas o de cada una de ellas, inducen una expresión morfogénica: brotes, raíces y la proliferación de masas celulares con escasa diferenciación, permitiendo regenerar plantas de forma masiva *in vitro* a partir de células, y a la vez, lograr los avances en ingeniería genética, mediante el potencial de la biotecnología derivada de la totipotencia celular vegetal (Jordán y Casaretto, 2006).

Los reguladores de crecimiento permiten el funcionamiento normal de una planta, en sus células, tejidos y órganos desde la germinación hasta la senescencia, facilitando la comunicación y la coordinación de la actividad celular; la regulación que ejercen debe contemplarse desde la perspectiva de una interacción hormonal; un reguladores de crecimiento puede sintetizarse en diferentes puntos de la planta; y puede actuar sobre varios procesos, y sobre un proceso específico pueden actuar muchas de ellas permitiendo la activación de genes en el núcleo de la célula (Fichet, 2017). Los reguladores de crecimiento también permite la síntesis de ADN, en el cual están implicados principalmente auxinas y cinetinas (Arellan et al., 2008). Su et al. (2011) mencionan que en la etapa de 16 células del proembrión, la auxina se transporta desde las células suspensoras hasta el proembrión apical y se acumula en el proembrión completo, en el que WUSCHEL (WUS) el cual es un factor de transcripción homeodominio, se expresa inicialmente en cuatro células internas de este embrión globular temprano.

El WUS es necesario para el mantenimiento del nicho de células madre en el meristemo apical del brote, la diferenciación de primordios laterales, la totipotencia de las células vegetales y otros procesos celulares diversos (Jha et al., 2020).

En el embrión globular tardío, el transporte direccional de auxina se invierte hacia las células suspensoras, lo que lleva a la acumulación de auxina en la célula superior del suspensor para formar la hipófisis; en la etapa de transición, la hipófisis ha sufrido una división celular asimétrica que da como resultado la formación de la célula pequeña superior y la célula hija basal grande. La célula superior mantiene la actividad fosforilada de la señalización de cinetinas. En la célula basal grande, la auxina reprime la señalización de cinetinas a través de una vía dependiente de ARR7 / 15. Esta interacción antagonista entre auxina y cinetinas en ambas células controla el establecimiento del nicho de células madre de la raíz embrionaria mostrado en la figura 14 (Su et al., 2011)

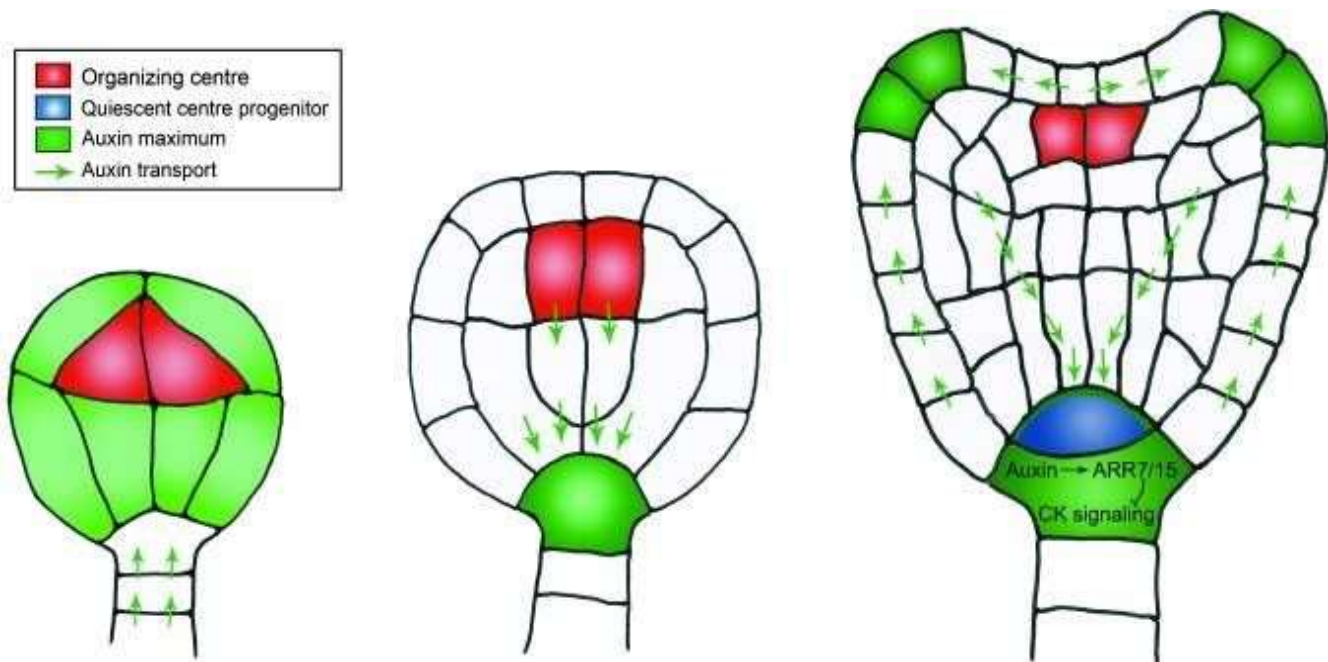


Figura 14. Interacción de auxinas y cinetinas en la embriogénesis. Fuente. Su et al. (2011).

La comprensión de la interacción de auxinas y cinetinas en la regulación del desarrollo de las plantas y la organogénesis, ha avanzado considerablemente durante más de medio siglo; muchos de los primeros experimentos han revelado las funciones esenciales de ambas hormonas en la proliferación celular y la regeneración de nuevos órganos, es sorprendente que la decisión del destino celular en tejidos específicos dependa de la proporción entre auxina y cinetinas, que mantiene la proliferación celular o estimula la diferenciación celular para formar nuevos órganos, como brotes o raíces, los estudios sobre hormonas durante las dos últimas décadas se han centrado principalmente en analizar los mutantes de genes implicados en la síntesis y catabolismo de hormonas, y los que codifican receptores y componentes de señalización. Debido a la extensa redundancia funcional entre los miembros de la familia de genes, el análisis de la regulación por retroalimentación de ambas vías hormonales sigue siendo un trabajo complicado, recientemente, la investigación se ha orientado a identificar los factores clave involucrados en la interacción de estas dos hormonas para controlar aspectos específicos del desarrollo de las plantas, la diafonía entre cinetinas y auxinas en el meristemo de brote y raíz se destaca en el meristema de la raíz, la auxina induce la división celular meristemática, mientras que la cinetinas promueve que la célula cambie del estado meristemático al diferenciado mediante la inhibición de la señalización de auxina; por el contrario, en el meristema del brote, la cinetinas promueve la proliferación de células madre e inhibe la diferenciación de células madre, mientras que la auxina desencadena la iniciación del primordio del órgano mediante la represión de la biosíntesis de cinetinas, por lo tanto, las interacciones antagonistas son los reguladores clave para la diferenciación celular y el mantenimiento en la zona de transición del meristemo de la raíz o en los sitios de iniciación del órgano del meristemo del brote (Su et al., 2011).

- **Auxinas**

Las auxinas son una familia de hormonas (Cortes et al., 2019), dentro de esta familia de hormonas las más utilizadas en el establecimiento de los cultivos *in vitro* son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (ANA), ácido 3-indoleacético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB) (Roca y Mroginsk, 1991), y el rango de uso en la micropropagación de plantas son : (ANA: de 0,1 a 10 mg·L⁻¹); (AIB: de 0,1 a 10 mg·L⁻¹); (2,4-D: de 0,05 a 0,5 mg·L⁻¹); y (AIA: de 1 a 50 mg·L⁻¹) (Hartmann et al., 2013). El AIA es la principal auxina en la mayoría de las plantas, y se sintetiza a partir de triptófano; los sitios de biosíntesis del AIA son básicamente primordios foliares, figura 15, también se sintetizan en las hojas jóvenes y semillas en desarrollo (Davies, 2010).

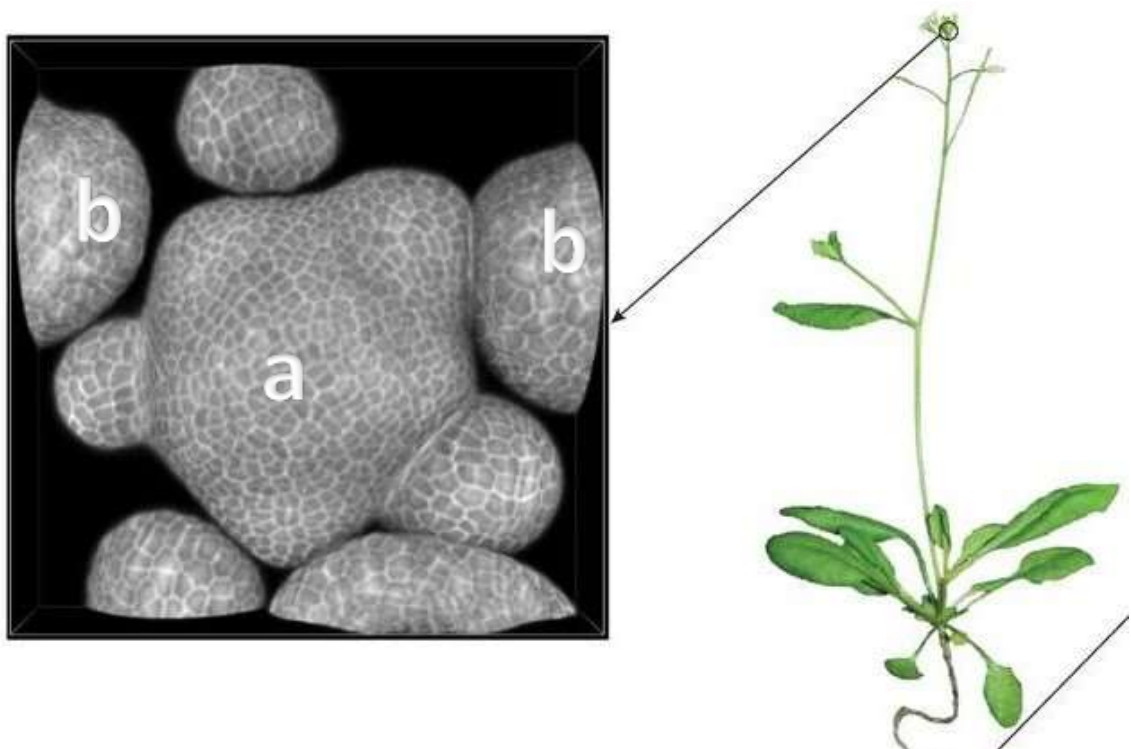


Figura 15. Primordios foliares del mersistema. Meristema (a) y primordios foliares (b) de *Arabidopsis thaliana*. Fuente: Gailloch et al. (2015).

Existen dos maneras de transportar a las auxinas en el interior de la planta; uno rápido y de larga distancia, que se lleva a cabo por difusión en los haces vasculares (xilema y floema) tal como se muestra en la figura 16, y transporta a las auxinas de los órganos jóvenes de la parte aérea al resto de la planta (Garay-Arroyo et al., 2014). El transporte a la raíz de la auxina involucra el floema (Davies, 2010).

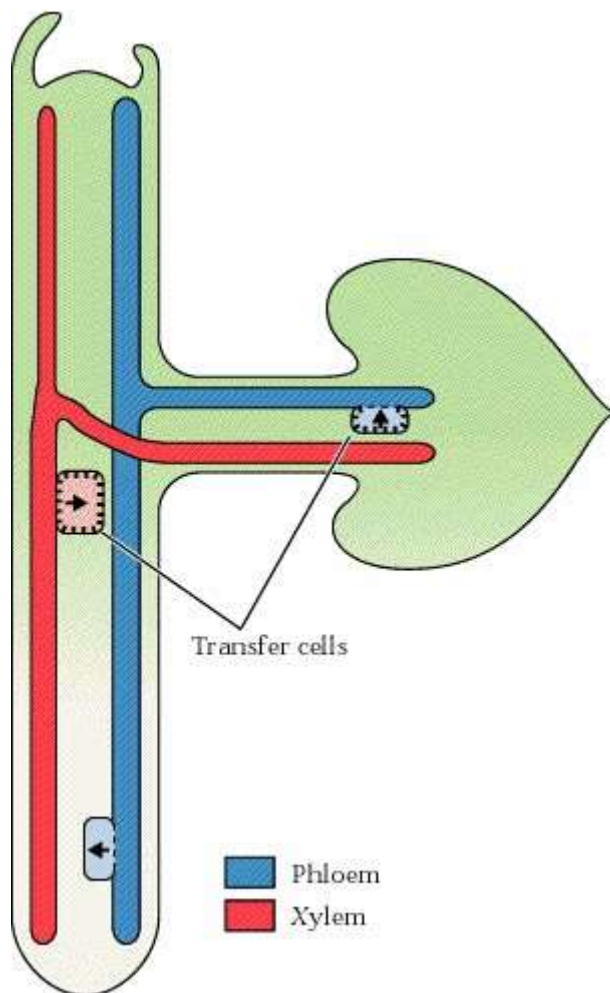


Figura 16. Floema y xilema. Fuente. Concenço et al. (2007)

Se ha demostrado que la acción de las auxinas en ciertos tejidos depende de su interacción con otras hormonas, por ejemplo en el meristemo de la raíz los niveles elevados de auxinas mantienen la actividad meristemática promoviendo la división celular; sin embargo, en la zona de diferenciación las cinetinas reprimen el transporte y la señalización de las auxinas bajando sus niveles y permitiendo que en esta zona se lleve a cabo la diferenciación, asimismo las auxinas regulan la biosíntesis de giberelinas y en conjunto, estas dos hormonas afectan de manera determinante el crecimiento de la planta, finalmente, se han reportado interacciones de las auxinas con otras hormonas como brasinoesteroides, ácido abscísico y etileno, estas interacciones también contribuyen a la regulación de las respuestas de las auxinas (Garay-Arroyo et al., 2014).

Los transportadores transmembranales llamados PIN y PILs, permiten el transporte de la auxina de célula a célula, las diferencias de pH entre el citoplasma y la pared celular permiten el transporte del AIA debido a que es un ácido débil; en el citoplasma (pH=7), el AIA está en forma aniónica (AIA⁻), mientras que en el apoplasto (pH=5) el AIA está protonado en forma de AIAH, el cual puede transitar a través de la membrana plasmática hasta el citoplasma.

El transporte del AIA de manera específica se da a través de los transportadores de eflujo (PIN 1, 2, 3, 4 y 7 (verde) y ABCB (rojo) y a través de los transportadores de influjo (AUX1/LAX) (Morado) que se localizan dentro de la membrana plasmática (Garay-Arroyo et al., 2014).

Para el transporte en el retículo endoplásmico participan PIN5 (amarillo), PIN6 y PIN8 (Azul) y PILs (Café) (Garay-Arroyo et al., 2014). Los transportadores transmembranales llamados PIN y PILs se muestran en figura 17.

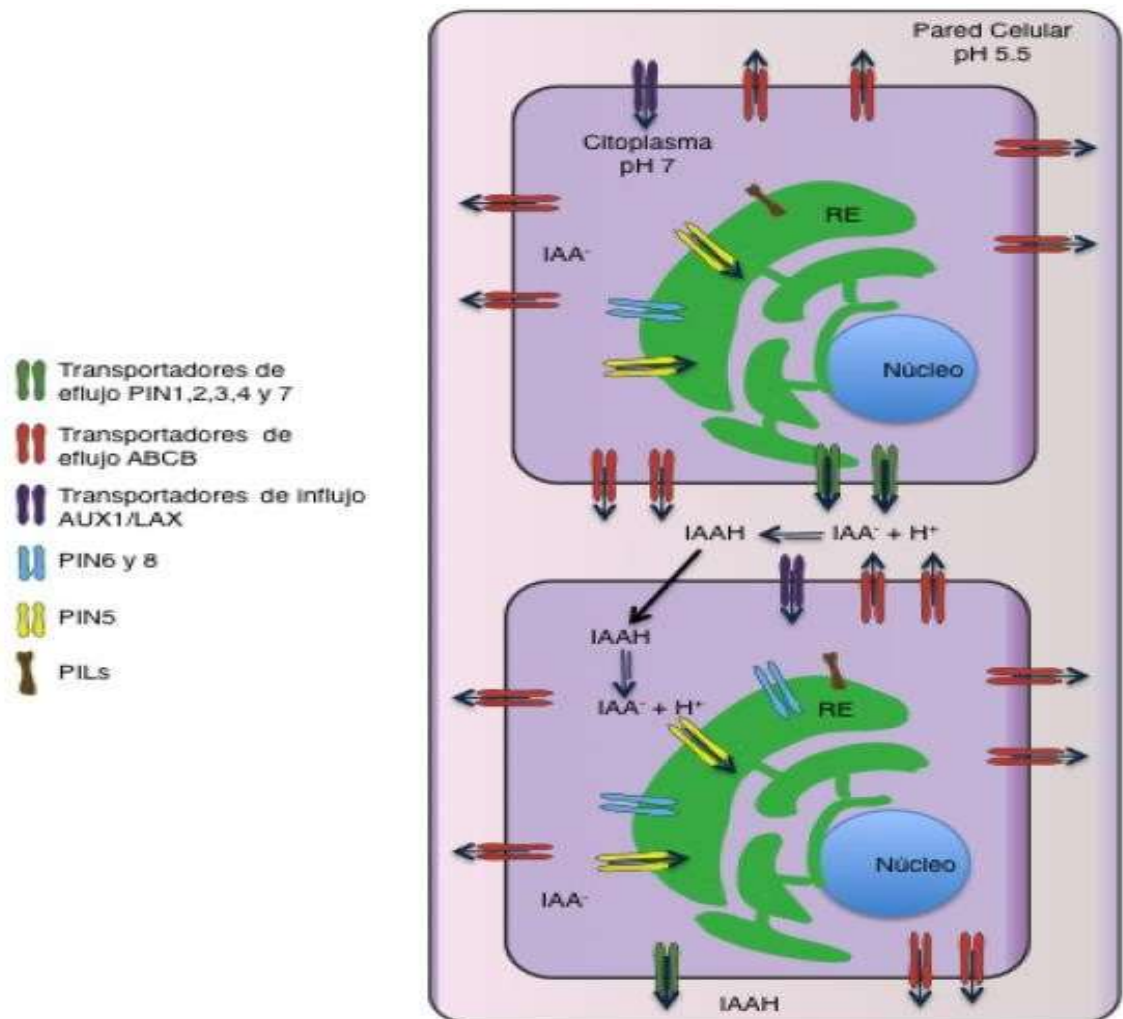


Figura 17. Transporte de las auxinas. Fuente: Garay-Arroyo et al. (2014).

Las auxinas mezcladas con la cinetinas estimulan el crecimiento celular, el crecimiento del tallo; en el cultivo de tejidos vegetales también promueve la división celular en el cambium; estimula el inicio de la raíz en los esquejes del tallo, así como el desarrollo y diferenciación de raíces.

La auxina media la respuesta tropística (flexión) de brotes y raíces por la gravedad y la luz, la auxina del brote apical inhibe el crecimiento de yemas laterales; retrasa la senescencia de la hoja, la auxina puede inhibir o promover la abscisión de hojas y frutos; retrasar la maduración, promueve la floración de las bromeliáceas y estimula la diferenciación del tejido vascular: floema y xilema (Davies, 2010). Las auxinas estimulan la división celular, el alargamiento y la iniciación de la floración (Zaid et al., 2004), también influyen en el fototropismo y gravitropismo de las plantas (Fichet, 2017).

Las auxinas participan durante todo el ciclo de vida de las plantas, se distribuyen dentro de los tejidos, lo que da lugar a procesos morfogénicos; los gradientes de auxinas se establecen principalmente por medio del transporte polar; la regulación de auxinas en la planta incluye:

- La cantidad de auxina biológicamente activa dentro de los tejidos que está dada por la expresión diferencial de los genes.
- La capacidad de formar heterodímeros de las proteínas que participan en la vía de transducción de señales, así como la regulación de la expresión genética.
- 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.
- La cantidad libre de auxinas que se modifica por conjugación y por compartimentalización; permite la comprensión de cómo estos procesos se acoplan para dar una respuesta diferencial de células y tejidos (Garay-Arroyo et al., 2014).

- Las auxinas incrementan el contenido osmótico y la permeabilidad de las células, disminuyen la presión de la pared celular, inducen a la producción de proteínas, y a la formación del sistema radicular (Cortes et al., 2019). En la figura 18 se puede apreciar como la auxina incrementa la longitud de brote (A) y la formación del sistema radicular (B) (Ventura, 2018).

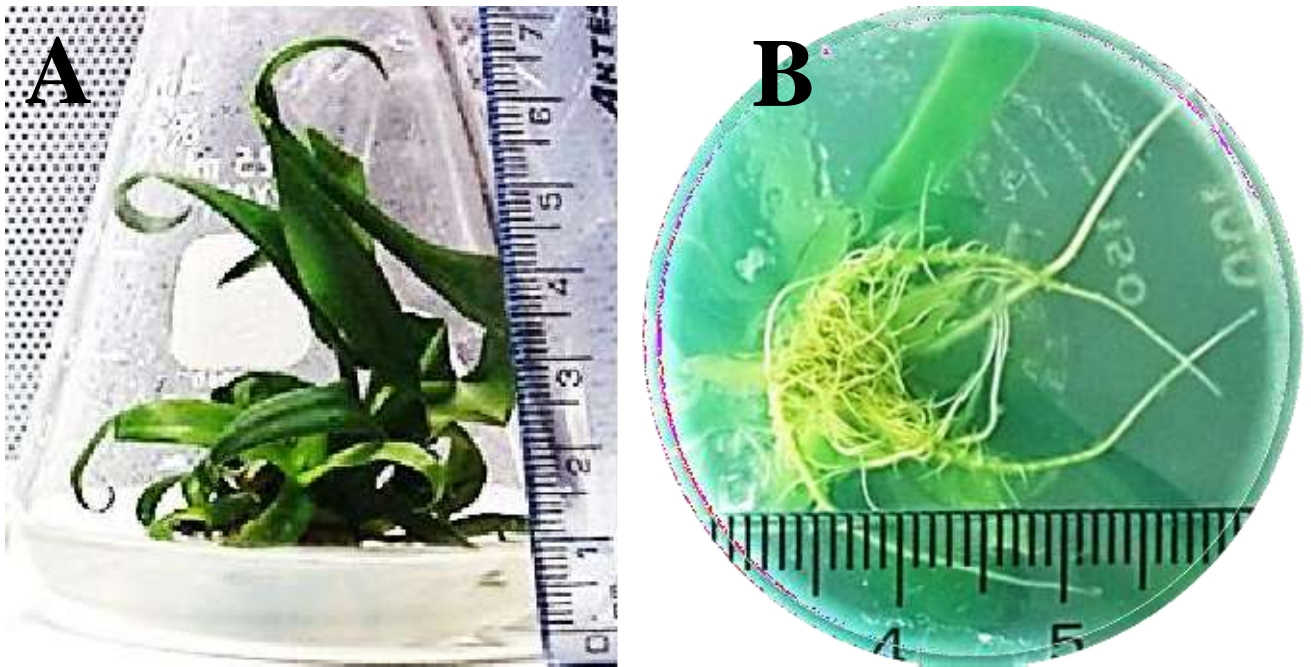


Figura 18. Efecto de la auxina en plántulas *in vitro* de piña. Fuente: Ventura (2018).

- **Cinetinas**

Las cinetinas son una familia de hormonas (Cortes et al., 2019). Las cuales estimulan el brotamiento (Hartmann et al., 2013). Las más utilizadas en el establecimiento de los cultivos *in vitro* son: la kinetina, la bencilaminopurina y la zeatina (Roca y Mroginsk 1991) y el rango de su uso en la micropropagación de plantas varia de 0,1 a 10 mg·L⁻¹ (Hartmann et al., 2013).

Las cinetinas son derivados de la purina, caracterizados por la capacidad de inducir a la división celular en cultivo de tejidos (en presencia de auxina); la cinetina más común en la planta es la zeatina; las cinetinas también se presentan como ribósidos y ribótidos, las cinetinas se sintetizan a través de la modificación bioquímica de la adenina y se produce en las semillas en desarrollo, y en el ápice de la raíz mostrado en la figura 19.

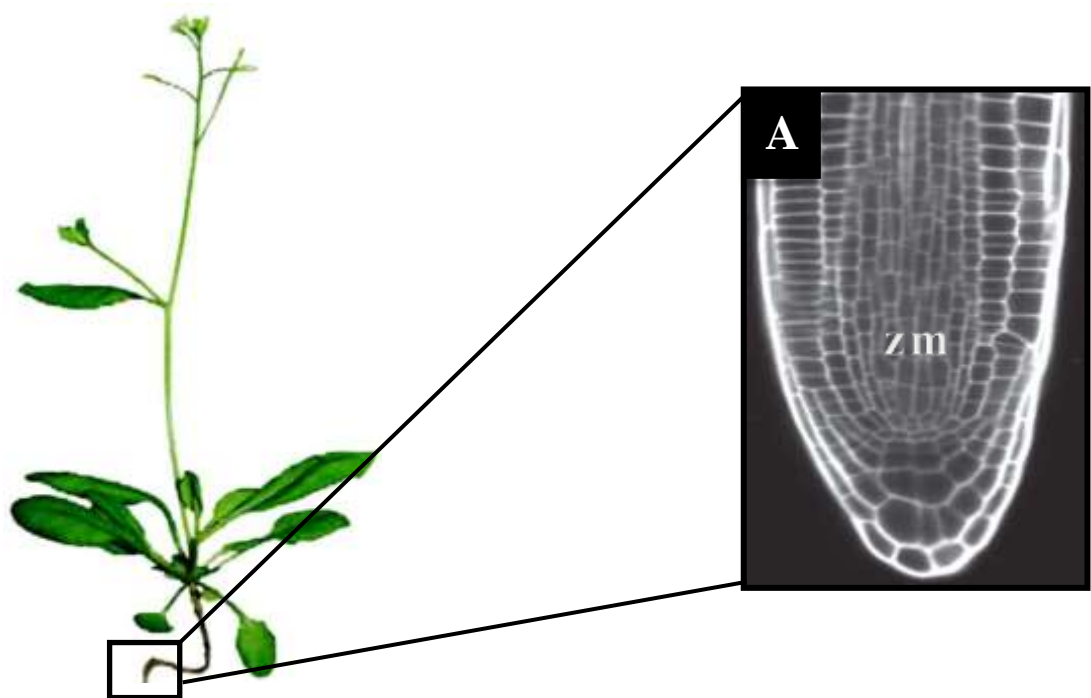


Figura 19. Zona meristemática (zm). A: Ápice de la raíz de Arabidopsis thaliana. Fuente: Gaillochet & Lohmann (2015).

Las cinetinas promueven el inicio del brotamiento y el crecimiento de yemas laterales debido a que inhibe la dominancia apical; las cinetinas también promueven la expansión de la hoja resultante únicamente del agrandamiento celular, esto es probablemente el mecanismo por el cual el área total de la hoja se ajusta a compensar la extensión del crecimiento de la raíz; las cinetinas retrasan la senescencia de la hoja, pueden mejorar la apertura de los estomas, promueve el desarrollo de cloroplastos en

vista de que la aplicación de cinetinas conduce a una acumulación de clorofila, induciendo la conversión de etioplastos en cloroplastos (Davies, 2010).

Ventura (2018) muestra el actuar de las auxinas y cinetinas en el número y longitud de brotes y de raíces, desde la etapa de multiplicación hasta la etapa de enraizamiento, en la etapa de multiplicación los segmentos de piña de 4 mm de longitud, fueron obtenidos de la base del tallo de plántulas *in vitro*, cada segmento fue sembrado en 3 mL de medio de cultivo semisólido compuesto por MS + 2 mg·L⁻¹ BAP + 8 mg·L⁻¹ KIN en tubos de ensayo por un mes, pasado este tiempo, los segmentos presentaron brotes de 0,5 a 1 cm de longitud, luego cada brote fue sembrado en matraces con 30 mL del mismo medio por tres meses lo que permitió que siga incrementándose el número y la longitud de brotes hasta formarse en un macollo de brotes (Ventura 2018).

Terminada la etapa de multiplicación, los macollos de brotes se dividieron individualmente cortándolos con un bisturí y luego fueron sembrados en medio MS sin reguladores por dos meses afín de incrementar la longitud de los brotes hasta obtener plántulas de 5 a 6 cm, estas plántulas pasado este tiempo presentaron raíces, por lo que tuvieron que ser cortadas y eliminadas las raíces para estandarizar las plántulas y así puedan estos explantes, entrar a la etapa de enraizamiento por dos meses más, para lo cual se usó el medio de enraizamiento compuesto por MS + 4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹ AIB) (Ventura, 2018).

En la figura 20 se muestra el ciclo del cultivo *in vitro* de piña en medio MS semisólido en el cual se podemos apreciar: 1: Segmentos de la base del tallo de 4 mm de longitud. 2: Brotes de un mes de siembra sembrados en 3 mL de medio compuesto por (MS + 2 mg·L⁻¹ BAP + 8 mg·L⁻¹ KIN). 3: macollo de brotes de cuatro meses de siembra sembrados en 30 mL de medio MS + 2 mg·L⁻¹ BAP + 8 mg·L⁻¹ KIN. 4: plántulas de seis meses de siembra sembrados en 30 mL de medio MS sin reguladores. 5: Esquejes enraizados de dos meses de siembra sembrados en 30 mL de medio MS + 4 mg·L⁻¹ ANA + 4 mg·L⁻¹ AIB. (Ventura, 2018).

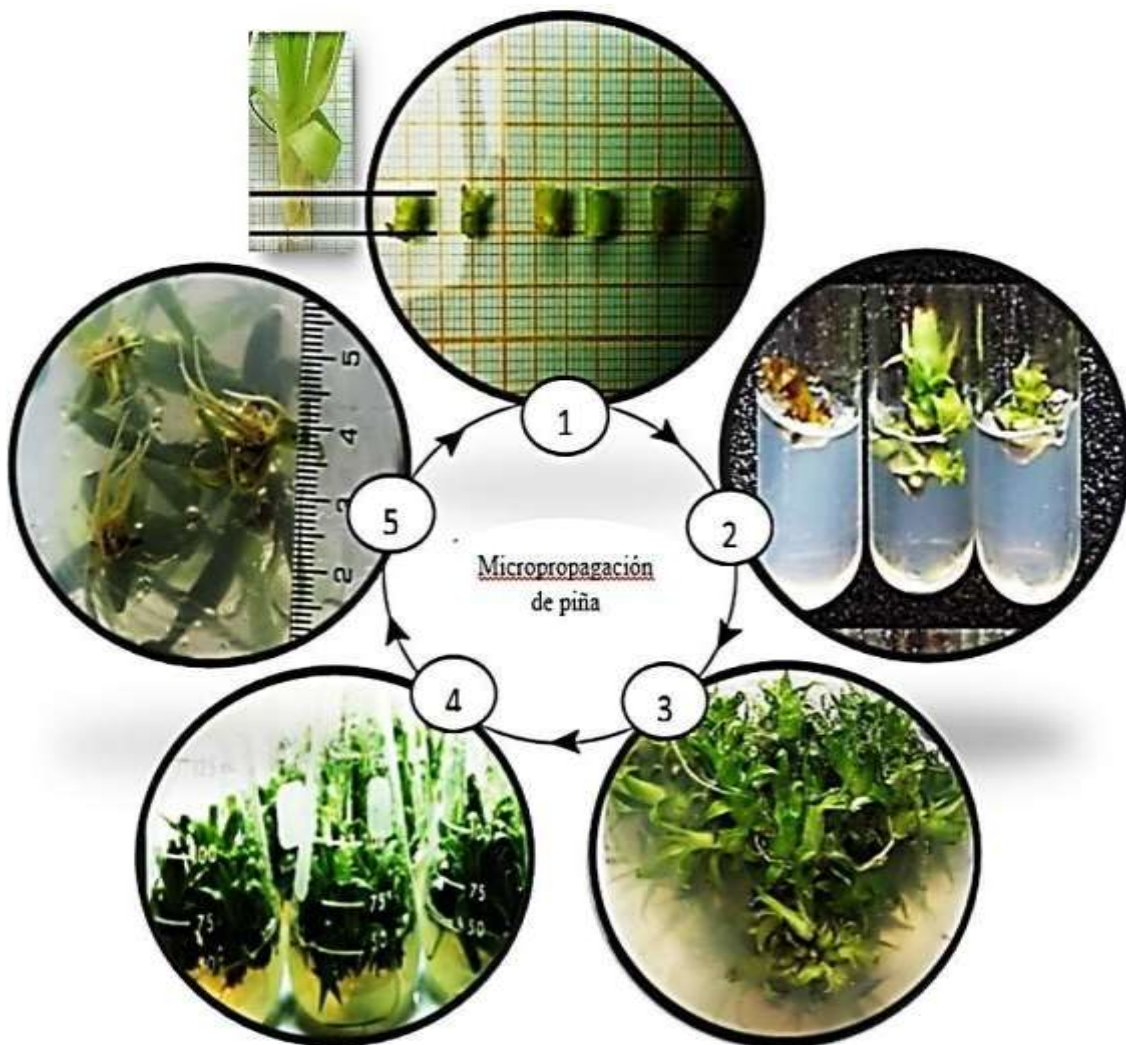


Figura 20. Ciclo del cultivo *in vitro* de piña. Fuente: Ventura (2018).

Las plantas poseen sistemas enzimáticos capaces de degradar las cinetinas como la cinetinas oxidasa/deshidrogenasa (CKX), la CKX es una proteína monomérica que degrada las bases y nucleósidos de las cinetinas isoprenoidicas que tienen una cadena lateral insaturada, tanto en el tabaco como en *Arabidopsis*, demuestran que la deficiencia en cinetinas provoca una reducción en la actividad de los meristemas vegetativos y florales del tallo, la cinetinas inhiben el desarrollo radicular y la formación de las raíces laterales, no obstante, estos resultados deben ser interpretados con cautela, porque experimentos recientes con mutantes de pérdida de función de los receptores de cinetinas parecen demostrar que dichas hormonas también actúan como reguladores positivos del desarrollo de las raíces, se ha considerado, casi de forma axiomática, que las cinetinas son sintetizadas mayoritariamente en las zonas meristemática de las raíces, tal hecho, sin embargo, no excluye la participación de los órganos aéreos, especialmente de los tejidos meristemáticos, en el proceso de biosíntesis de estas hormonas; durante la fase reproductora, también aparecen otros centros de producción importante de cinetinas, principalmente el endospermo (durante el desarrollo de las semillas) o el eje embrionario, que se convierte en el centro de producción y de distribución de las cinetinas cuando se inicia la germinación de las semillas, una vez sintetizadas, las cinetinas pueden ser distribuidas a otras partes de la planta a través del xilema, el floema, o ambos (Bieto & Talón, 2013).

2.9. Preparación de un litro de medio Murashige y Skoog

Para preparar un litro de medio de cultivo MS, primero se agrega 250 mL de agua destilada en un recipiente, mientras se agita se debe añadir $4,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MS en polvo; luego la sacarosa: $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, auxinas y cinetinas de acuerdo a los tratamientos; disuelto los productos, se debe enrazar a un litro ajustando el pH a 5,7 con NaOH y HCl antes de agregar los $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, luego se calentará la solución hasta la claridad del agar, y finalmente se esterilizará el medio de cultivo, en una autoclave la cual se muestra en la figura 21, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ o 15 psi, durante al menos 15 minutos (Ventura 2018).



Figura 21. Autoclave. Fuente: Ventura (2018).

2.10. Importancia del agar

Para mantener las plantas inmóviles en el medio de cultivo debe hacer uso del agar, el cual sirve como material de soporte de los explantes (Hurtado y Merino, 1997). El agar debe su valor en los sistemas de cultivo a dos propiedades: (a) este polvo se derrite al calentarlo, pero a temperatura ambiente se enfría formando un gel semisólido, (b) es en esencia biológicamente inerte. Los factores que afectan al agar son la concentración y el pH, por lo general un pH de 5 a 6 es el más adecuado para que solidifique el agar; el medio semisólido que se forma por el uso del agar, es un medio de contacto que permite un adecuado aprovechamiento de los nutrientes por parte de los explantes; con un pH muy ácido el agar no se solidificará bien, y tiende a deteriorarse con el calor (Hartmann et al., 2013). Se debe tener en cuenta que cuando se cultiva en medio líquido (sin agar) se mejora la absorción de nutrientes, sin embargo, se necesita cierto tipo de sostén para evitar que los explantes se hundan por lo que se tiene que emplear un agitador o tambor giratorio para proporcionar aireación al medio de cultivo (Hartmann et al., 2013). En la figura 22, se muestra dos explantes de piña, sembrados en agar y sin agar (líquido).

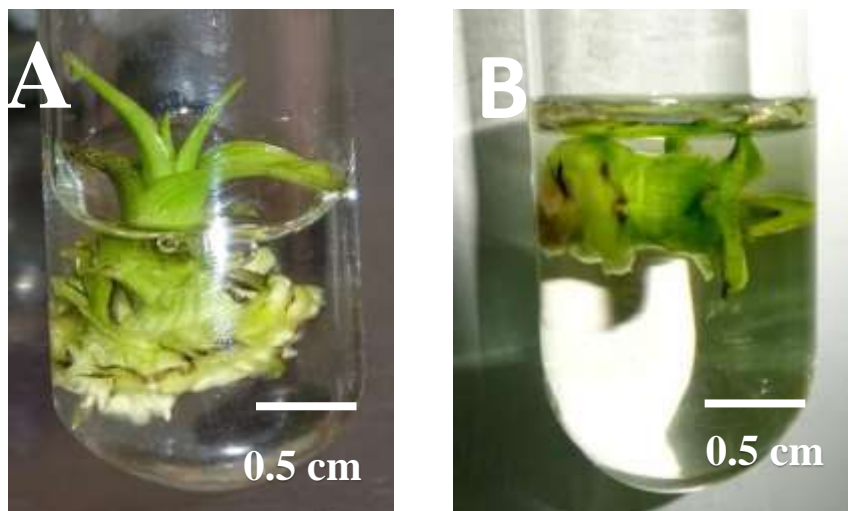


Figura 22. Explante *in vitro* de piña en medio de cultivo semisólido y líquido.
Fuente. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA, 2019).

2.11. Preparación para el establecimiento del cultivo *in vitro* de piña

En el manejo de las plantas “madre” se tiene que reducir el potencial de contaminación por hongos, bacterias, y virus; las plantas “madre” deben estar sanas y en crecimiento activo, que no estén o vayan a entrar en letargo, en ocasiones la poda o el incremento de iluminación (aumentando la longitud del día) resultan útiles para producir nuevas fases de crecimiento activo, el tipo de explante y su ubicación en la planta madre varían mucho con el objetivo del cultivo, así como con las especies, y a veces con el cultivar, para la obtención de puntas de tallo, las plantas más convenientes son aquellas que están en crecimiento relativamente activo, utilizando ya sea puntos de crecimiento axilares o terminales de brotes, el tamaño de un explante puede variar de 1 a 5 mm de la punta meristemática, pero de un trozo de tallo o rama puede ser de varios centímetros de largo, también se puede usar una sección nodal que tenga una yema lateral, en plantas leñosas, se puede utilizar una yema de punta de tallo durmiente pero no en reposo.

También se pueden utilizar para obtener explantes, trozos de hojas que tengan nervaduras, escamas de bulbos, escapos florales y cotiledones, la remoción de las escamas de la yema, más el corte de la cicatriz de la hoja puede dejar solo tejidos estériles. (Hartmann et al., 2013). Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado, siendo recomendable mantener a las plantas madre es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas; en ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

El uso de la termoterapia es un método de control sanitario de fácil aplicación y que es eficaz para la erradicación de patógenos (bacterias, virus, hongos y nemátodos) de las semillas y de otros materiales vegetales de multiplicación vegetal, la termoterapia se basa en la susceptibilidad diferencial que existe entre el hospedante y sus parásitos internos y externos, en la termoterapia el material vegetal se sumerge en baño de agua caliente a una temperatura tal que los parásitos internos y externos mueran sin que el material vegetal sufra un daño letal, el rango que se utiliza varía de 47 a 50 C⁰ por una hora (Megino y González, 2005).

Para erradicar virus de los explantes, se hace uso de la termoterapia con el cultivo de meristemas, para ello las plantas son tratadas a 30 C⁰ por 8 horas, con una intensidad lumínica de (10000 lux), por cuatro semanas; los mejores resultados se han obtenido cuando la planta es decapitada antes de ser tratada por termoterapia, y las yemas axilares se encuentran creciendo mientras reciben el tratamiento de calor; no todas las células en una planta enferma llegan a ser infectadas con patógenos, un claro ejemplo son los tejidos meristemáticos de la raíz y brotes terminales de la planta, en vista de que solamente la cúpula y los primeros primordios foliares se encuentran libres de virus debido a la alta actividad metabólica de las células meristemáticas; los virus no pueden tomar el control de la maquinaria biosintética de la planta, por la carencia de tejido vascular y a la ausencia de diferenciación celular en la zona meristemática; en la zona meristemática los virus que infectan los tejidos no vasculares, se diseminan de célula a célula través de los conductos intercelulares (plasmodesmos), este es un proceso lento por lo que resulta relativamente difícil que los virus infecten en su totalidad las células de la zona meristemática que vienen dividiéndose rápidamente por la mayor concentración de auxinas que se encuentra en esta zona (Panta y Golmirzaie, 1997).

En el cultivo de meristemas, la termoterapia y la quimioterapia, tienen limitaciones, como los desafíos mecánicos de la escisión de meristemas y la baja tasa de regeneración, baja resistencia a altas temperaturas, fitotoxicidad y efectos mutagénicos de los químicos utilizados en los procedimientos, frente a estas limitaciones, la crioterapia es una herramienta biotecnológica recientemente desarrollada que ha sido muy efectiva en la eliminación de virus de especies de plantas económicamente importantes (Kaya et al., 2020).

La crioterapia de puntas de brote es un nuevo método para la erradicación de patógenos basado en técnicas de criopreservación; la criopreservación se refiere al almacenamiento de muestras biológicas a temperatura ultra baja, generalmente la de nitrógeno líquido (-196°C), y se considera como un medio ideal para el almacenamiento a largo plazo de germoplasma de plantas. En la crioterapia, los patógenos de las plantas como virus, fitoplasmas y bacterias se erradican de las puntas de los brotes exponiéndolos brevemente al nitrógeno líquido, la distribución desigual de los virus y los microbios obligados por vasculatura limitada en las puntas de los brotes permiten la eliminación de las células infectadas al lesionarlas con el tratamiento criogénico y la regeneración de brotes sanos de las células meristemáticas libres de patógenos sobrevivientes (Wang et al., 2009).

En la figura 23 se muestra el efecto la termoterapia seguida de la crioterapia aplicado al meristema de los brotes, con el fin de mejorar la erradicación del virus, esto se realiza mediante el cultivo de meristemas. Abreviaturas: (AD) capa superior de células del meristema apical. (HC) células sanas. (KC) células muertas. (LP 1) primordio de hoja 1. (LP 2) primordio de la hoja 2. (PIC) células infectadas con patógenos. (SC) células sobrevivientes. (Wang et al., 2009).

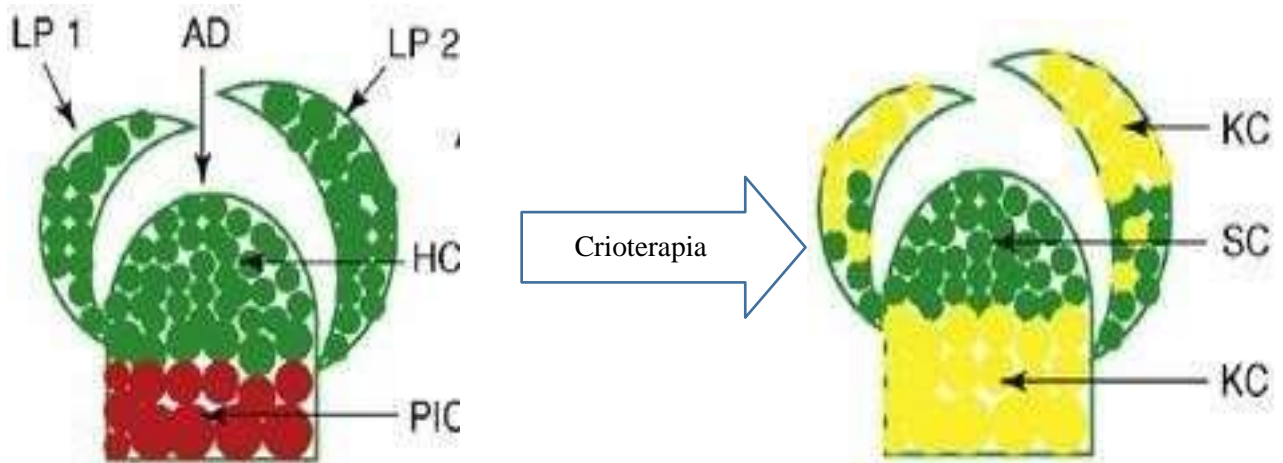


Figura 23. Crioterapia. Fuente: Wang et al, (2009).

Cuando se elige una la planta madre de la cual vamos a obtener explantes como yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, entre otros (Castillo, 2004), estos explantes por contener microflora contaminante externa como hongos y bacterias se debe desinfectar antes de colocarlo en medio de cultivo estéril, y así evitar que sigan creciendo en el medio de cultivo; si no se controlan estos contaminantes podrían matar el explante a utilizar (Escobar et al., 2012).

Se ha comprobado que en concentraciones de 0,003 % de hipoclorito de sodio añadidos al medio de cultivo, puede ser beneficioso para los explantes, considerando que controla la microflora contaminante sin causar fitotoxicidad en los explantes, por lo tanto, la esterilización con hipoclorito de sodio puede usarse como un reemplazo para la esterilización térmica de los medios de cultivo (Pais et al., 2016).

2.12. Desinfección de explantes

INIA (2019) recomienda para la desinfección de hijuelos de piña lo siguiente:

- a. Sumergir en solución fungicida - insecticida ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Benomyl + $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de alphacypermetrina) por 15 minutos (figura 24A), luego se exponen bajo sombra para su secado por un lapso de cinco días (figura 24B) pasado los cinco días los hijuelos son llevados a laboratorio para un posterior tratamiento.



Figura 24. Desinfección de hijuelos. A: Tratamiento sanitario.
B: Secado bajo sombra. Fuente: INIA (2019).

- b. Después de sumergir los hijuelos en la solución fungicida - insecticida, son cortados de parte apical y basal, a fin de quedarse con la región intermedia donde se concentra el cormo con yemas no diferenciadas, este material se lava en constante agitación con agua y detergente por un intermedio de 10 minutos, enseguida, se trata con $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kasumin (kasugamicina) por 20 minutos, se enjuaga con agua destilada estéril y se retiran las brácteas para exponer el cormo; el cormo resultante es lavado y nuevamente tratado con $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kasumin por un intervalo de 10 minutos con menor frecuencia de agitación a fin de evitar daño físico en las yemas axilares expuestas.

En la figura 25 se muestra la región intermedia del hijuelo donde se encuentra el cormo, el cual es expuesto cuando se logra retirar las brácteas.

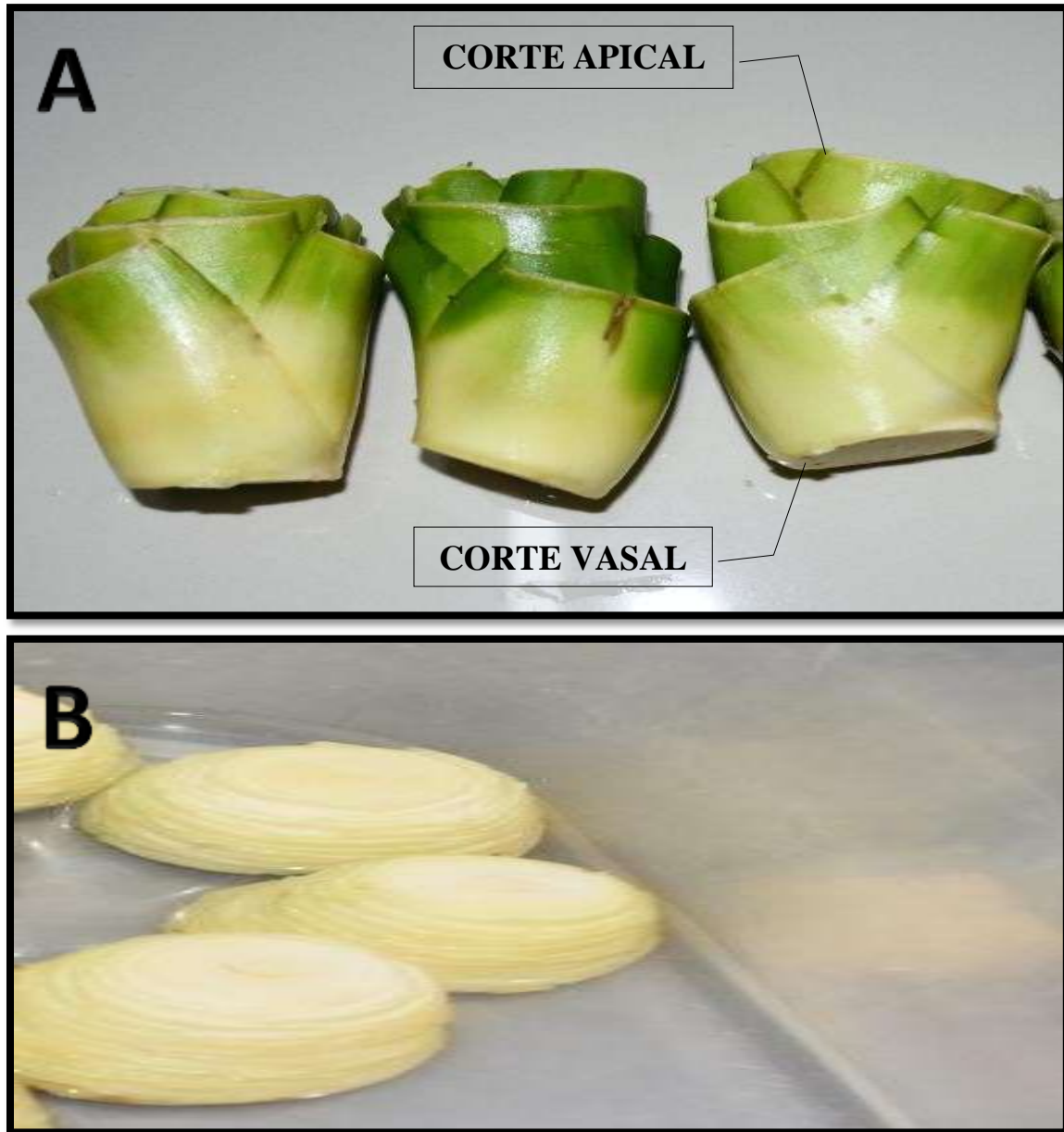


Figura 25. Obtención de cormos. A: Región intermedia del hijuelo donde se encuentra el cormo. B: Cormo. Fuente: INIA (2019).

c. Luego el corno se lava por dos veces y se lleva a la cámara de flujo laminar para su desinfección.

d. En la figura 26, se muestra la desinfección de cormos, para lo cual se recomienda realizarlo en dos etapas, la primera consiste en colocar el corno en una solución de 1 % de hipoclorito de sodio por un intervalo de 20 minutos en constante agitación y luego enjuagar tres veces por 1 minuto cada uno, con agua destilada estéril, esta actividad se realiza en la cámara de flujo laminar.-



Figura 26. Desinfección de cormos. Fuente: INIA (2019).

- e. Las yemas axilares son extraídas del cormo con una proporción de tejido basal, tal como se observa en la figura 27, las yemas son extraídas haciendo dos cortes longitudinales y 2 cortes transversales, obteniendo una yema más un cubo de tejido basal, de aproximadamente 7 mm².



Figura 27. Extracción de yemas axilares. Fuente: INIA (2019).

- f. Finalmente las yemas axilares son tratadas con 0,5 % de hipoclorito de sodio por 5 minutos y posteriormente enjuagados tres veces con agua destilada estéril y son inoculadas en un medio de cultivo líquido en agitación (65 rpm) para su diferenciación. En la figura 28 se muestra la desinfección de yemas axilares y siembra de una yema axilar en tubo de ensayo.

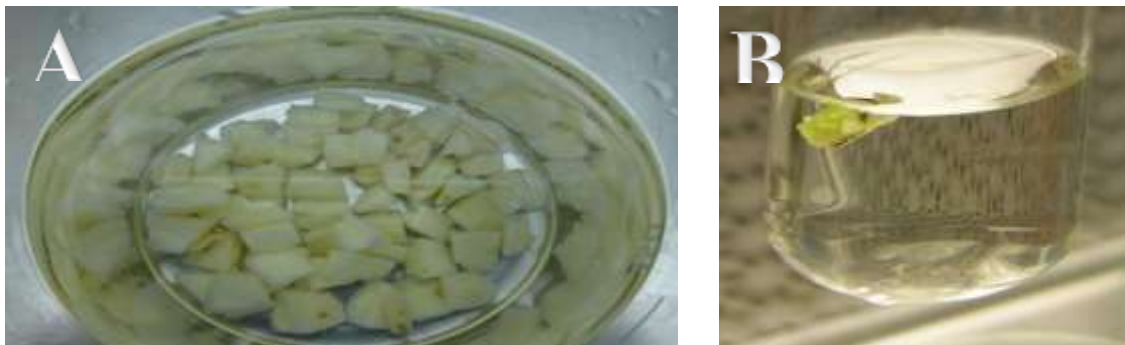


Figura 28. Desinfección y siembra de yemas axilares. A: Desinfección de yemas axilares. B: siembra de yema axilar. Fuente: INIA (2019).

Los desinfectantes primarios son alcoholes (etílico, metílico o isopropílico) y los hipocloritos de calcio y sodio, vendidos como blanqueadores de uso casero, de ordinario con 5,25 % de ingrediente activo, la dosis común de uso es de 20 % v/v (una parte de blanqueador por cuatro partes de agua) pero también se puede probar una gama de concentraciones, se deben añadir unas cuantas gotas de surfactante o detergente para mejorar el cubrimiento superficial (Hartmann et al., 2013).

La efectividad de los desinfectantes es esencialmente tiempo-dosis, el cual aumenta con ambos factores, pero la capacidad de dañar los tejidos también aumenta, algunos contaminantes bacterianos como *Basillus subtilis*, *Erwinia* y *Seudomonas* a veces se quedan dentro de las plántulas sin que se detecten sino más adelante del periodo de cultivo; para mejorar el control del desarrollo de bacterias, también se puede usar antibióticos en el medio de cultivo (Hartmann et al., 2013).

Ibrahim et al. (2013) recomiendan remojar yemas axilares de piña en solución antioxidante de ácido cítrico (150 mg L^{-1}) y ácido ascórbico (100 mg 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 durante 15 minutos y luego enjuagarlas con agua destilada estéril tres veces durante 15 minutos. Castillo (2004) recomienda que luego de la desinfección del material seleccionado, se debe colocar en medio de cultivo estéril por una semana para que comience el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales y así iniciar el ciclo de cultivo *in vitro*.

Es necesario un pretratamiento de los explantes antes de pasar a la Etapa 1 o establecimiento, en el pretratamiento los explantes son colocados en un medio de cultivo MS semisólido, pero sin hormonas, si los explantes contienen sustancias fenólicas que exudan de la superficie cortada, se puede añadir al medio de cultivo carbón activado, y antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido cítrico (Hartmann et al., 2013). El carbón activado ha sido reconocido como uno de los adsorbentes más antiguos y ampliamente utilizados para absorber contaminantes orgánicos e inorgánicos (Bhatnagar et al., 2013).

La oxidación fenólica de los explantes, puede ocasionar serios problemas en el establecimiento, multiplicación y supervivencia de la mayoría de las especies vegetales, para evitar este desorden fisiológico se debe hacer uso del carbón activado, pero el carbón activado no solo absorbe sustancias fenólicas tóxicas liberadas por el material vegetal al medio de cultivo, sino también nutrientes del medio (García y Tabarez, 2008).

El uso del carbón activado debe darse en bajas concentraciones (0,1 al 1 %) para absorber sustancias inhibitoras del crecimiento, que se forman como desecho en los medios de cultivo (Hurtado y Merino, 1997). En piña se usa $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbón activado, para el cultivo de yemas axilares (Rivas et al., 2014), El carbón activado se puede obtener de las cáscaras de naranja, piña, coco y plátano (Arrocha et al., 2019).

2.13. Etapas del cultivo *in vitro*

- Etapa I: Establecimiento

La función de esta etapa es establecer al explante en el medio de cultivo e inducir al desarrollo de brotes múltiples para la multiplicación posterior, lo cual puede implicar: (1) estimular la formación de brotes axilares; (2) la iniciación de brotes adventicios en brotes,

hojas, escamas de bulbos, escapos florales, cotiledones y material similar; (3) la iniciación de formación de callo en las superficies cortadas. En consecuencia, el medio a seleccionar varía con la especie, y el tipo de explante a utilizar; el medio de cultivo básico incluye los ingredientes del medio MS; el control del desarrollo se logra manipulando las concentraciones de auxina y cinetinas; si se desean brotes axilares se emplea una concentración moderada de cinetinas (BAP, KIN) (Hartmann et al., 2013).

Para el establecimiento de yemas axilares de piña se recomienda cultivarlos en medio MS + 4 mg·L⁻¹ tiamina + 0,5 mg·L⁻¹ ANA + 0,5 mg·L⁻¹ AIB + 0,5 mg·L⁻¹ BAP + 10 g·L⁻¹ carbón activado, el pH debe ser ajustado a 5,8 (Rivas et al., 2014).

La concentración de auxinas en etapa I, debe mantenerse baja (de 0,01 a 0,1 mg·L⁻¹) u omitirse por completo, para la formación de callo, se necesita mayores concentraciones de auxina (de 1 a 10 mg·L⁻¹), pero debe ajustarse a la concentración adecuada de las cinetinas, usualmente se necesitan de cuatro a seis semanas para completar la Etapa 1, y producir explantes listos para la Etapa II. (Hartmann et al., 2013).

- Etapa II: Multiplicación

En esta etapa se recomienda el uso del sistema de inmersión temporal (FIA, 2016). En la etapa de multiplicación cada explante se ha desarrollado a formar un macollo de brotes que salen de una masa basal común expandida de tejido tipo callo, ahora esta estructura se divide en propágulos separados que se trasplantan a un medio de cultivo fresco, el tipo de medio que se utilice depende del tipo de planta a cultivar, de ordinario es esencialmente el mismo que se usó en la Etapa 1, pero a menudo se aumenta las concentración de cinetinas, y a falta de instrucciones específicas es necesario experimentar para ajustar las concentraciones de manera de optimizar la tasa de multiplicación y la producción de plantas uniformes, los

propágulos obtenidos de la Etapa I, se coloca en un recipiente con un medio fresco, el tamaño óptimo de los propágulos y el modo de cortarlos y separarlos varía en las diferentes especies, generalmente existe una masa crítica de tejido que debe alcanzar el explante en la cual se pueden hacer cortes de un tamaño que se obtengan una producción rápida y uniforme en la transferencia (Hartmann et al., 2013).

La división del explante, se puede hacer en sentido vertical, cortando la masa de callo en secciones, conservando en cada una de ellas una parte de la sección basal; en algunos casos es posible que se desarrolle un brote dominante que inhibe el alargamiento de otros (Hartmann et al., 2013).

El nuevo cultivo se hace cortando los brotes y transfiriendo la base a un nuevo medio de cultivo, la colocación de los brotes alargados en posición horizontal sobre el agar funciona como un tipo de acodamiento y a menudo estimula el desarrollo de brotes laterales, las etapas de multiplicación pueden repetirse varias veces para aumentar la provisión de material hasta cierto número para luego entrar en la etapa III de enraizamiento (Hartmann et al., 2013).

- Etapa III: Enraizamiento

Ventura (2018) menciona que los explantes de piña *in vitro* de 5 cm a 6 cm de longitud, obtenidos de la fase de multiplicación de brotes, son sometidos a las auxinas para incrementar el número de raíces, para lo cual utilizó concentraciones de ANA (0, 2 y 4 mg·L⁻¹) mezclado con AIB (0, 2 y 4 mg·L⁻¹).

A continuación mostramos en la figura 29 los diferentes explantes utilizados en la micropropagación de plantas.

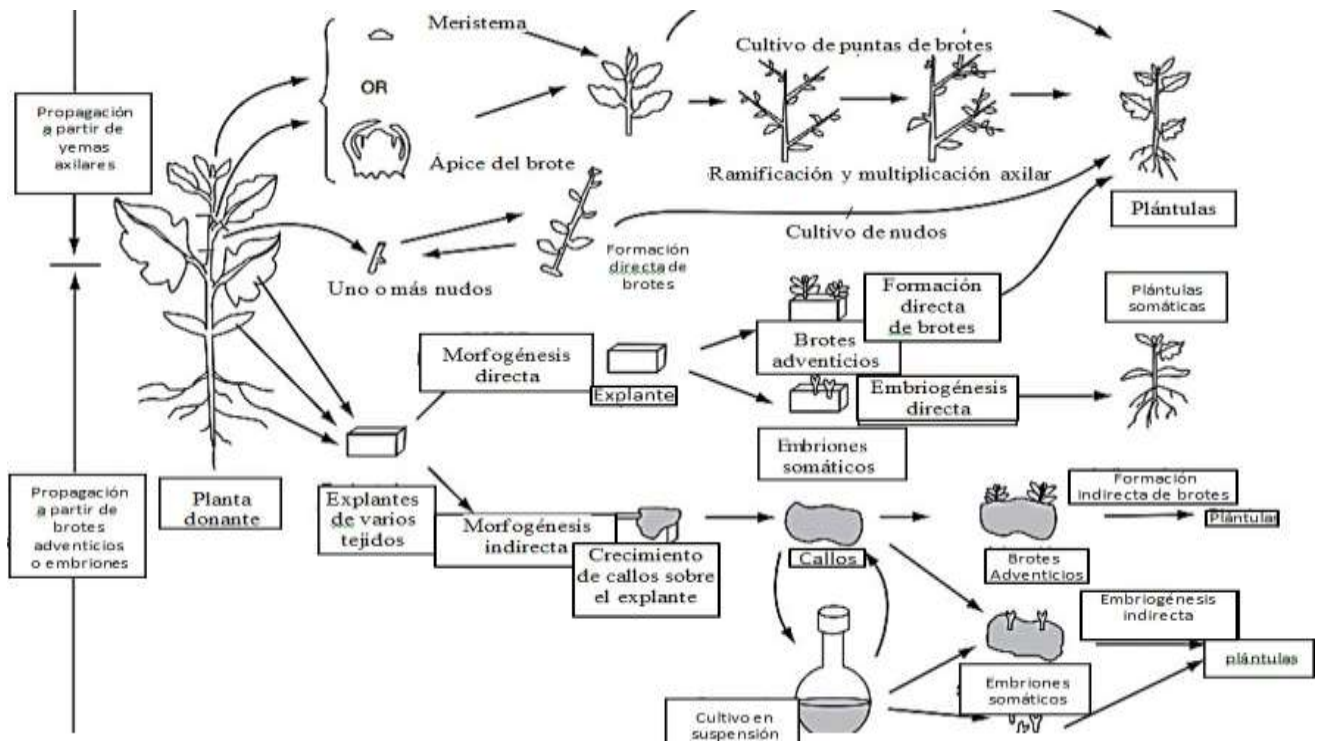


Figura 29. Micropropagación de plantas. Fuente: Cassells (2001).

- Etapa IV: Enraizamiento *ex vitro* y aclimatación

En el enraizamiento *ex vitro* y aclimatación, el mejor resultado se dio en la variedad “Hawaiana”, sin la adición de hormonas, con un promedio en número de raíces de 7,25 cm/explante y una longitud de 3,35 cm/explante, también hay enraizamiento con 50 mg·L⁻¹ ANA, en la variedad Hawaiana, con una sobrevivencia de 93,75 % y 79,16 % para la varedad “Champaka” (Aguiar et al., 2008). Para el enraizamiento *ex vitro de piña*, se debe usar un medio preparado con tierra de hormiga, arena fina y musgo en proporciones iguales (1:1:1), desinfectadas con formaldehido un mes antes del iniciado el proceso (Rivas et al., 2014).

2.14. Definición de términos básicos

- **Hiperhidricidad:** También conocida como vitrificación, es un trastorno morfológico y fisiológico en plantas, ya que sus tallos y hojas son a menudo gruesos, rígidos y fácilmente rompibles, este trastorno se caracteriza por la alta retención de agua en las células (Tovar, 2016).
- **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 axilares (Zaid et al., 2004).
- **Biorreactores:** Herramientas o dispositivos para generar productos usando la capacidad de conversión sintética o química de un sistema biológico, pueden ser fermentadores clásicos, sistemas de perfusión de cultivo celular, o biorreactores enzimáticos. Para la producción de proteínas o enzimas, normalmente se escogen microorganismos recombinantes como bacterias, células de mamíferos, o células de insectos o plantas (Biblioteca Agrícola Nacional de los Estados Unidos [NAL], 2018).
- **Cultivo *in vitro*:** Cultivo de células y tejidos fuera de un organismo vivo o en un entorno artificial.
- **Propagación clonal:** Reproducción asexual de plantas que se consideran genéticamente uniformes y originadas a partir de un único individuo o explante (De Bartolini y Lallana, 1995).
- **Organogénesis:** Formación de células diferenciadas y organización compleja de tejidos que permiten realizar funciones especializadas (NAL, 2018).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Ubicación geográfica

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, ubicado a 2650 m s.n.m. con 7° 10' 1" S. Y 78° 29' 43,54" W, Distrito, Provincia y Región Cajamarca – Perú. Durante el periodo experimental (diciembre 2019 – febrero 2020) la temperatura promedio fue de 29 °C, La humedad relativa promedio fue de 46 %, y el fotoperiodo fue regulado a 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad.

3.2 Materiales

a. Material experimental:

Segmentos de piña de 4 mm de longitud, de piña *Ananas comosus* L. merr, de la variedad “Golden”, los cuales fueron obtenidos de clones cultivados *in vitro* en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron:

- Bencilaminopurina (BAP) $C_{12}H_{11}N_5$;
- 6-furfurilaminopurina o Kinetina (KIN) $C_{10}H_9N_5O$.

b. Equipos de laboratorio:

- Autoclave (Wisconsin).
- Balanza analítica (Ohaus).
- Cocina eléctrica (Geovana).

- Compresor (Elite 802).
- Cámara de bioseguridad (Kessel).
- Destilador de agua (Cat).
- Peachímetro portátil (Oaktom).
- Temporizador (Ydt-Us6).
- Termohigrómetro (Htc).
- Electroválvula (Klpd).
- Medio basal Murashige y Skoog (MS).
- Sacarosa $C_{12}H_{22}O_{11}$.
- HCl y NaOH al 1 normal(N)
- Hipoclorito de sodio, alcohol etílico de 70 % y 96 %.
- Lentes.
- Filtros de 0,2 μm .
- Matraces.
- Mangueras de silicona de 5 mm de diámetro y 1 mm de grosor.
- Conectores de plástico.
- Botellas de vidrio de 100 mL.
- Placas de petri.
- Pinzas. -

3.3. Procedimiento

Se sembró segmentos de piña de 4 mm de longitud en medio MS semisólido, sin la adición externa de reguladores de crecimiento, con el fin de saber cuánto tiempo pueden permanecer creciendo longitudinalmente sin la renovación del medio MS, es importante señalar en este punto, que la planta produce sus propios reguladores de crecimiento auxina, cinetina giberelinas, entre otros, en un balance hormonal adecuado para su normal crecimiento, pero el medio MS el cual contiene macro y micronutrientes presentes en el medio de cultivo, al ser utilizados por la planta para su crecimiento, tienen que ser renovados cada cierto tiempo y así evitar cambios morfológicos ocasionados por la falta de nutrientes; este experimento también nos permitió proyectarnos, para saber la relación del número de explantes y la cantidad del medio de cultivo por explante a utilizar en el sistema de inmersión temporal. Finalmente se encontró que los explantes de piña pueden permanecer creciendo foliar y radicularmente, durante tres meses sin problemas de falta de nutrientes ni cambios morfológicos dañinos, como el amarillamiento de hojas, la pérdida del color verde normal de las plántulas *in vitro* de piña, entre otros.

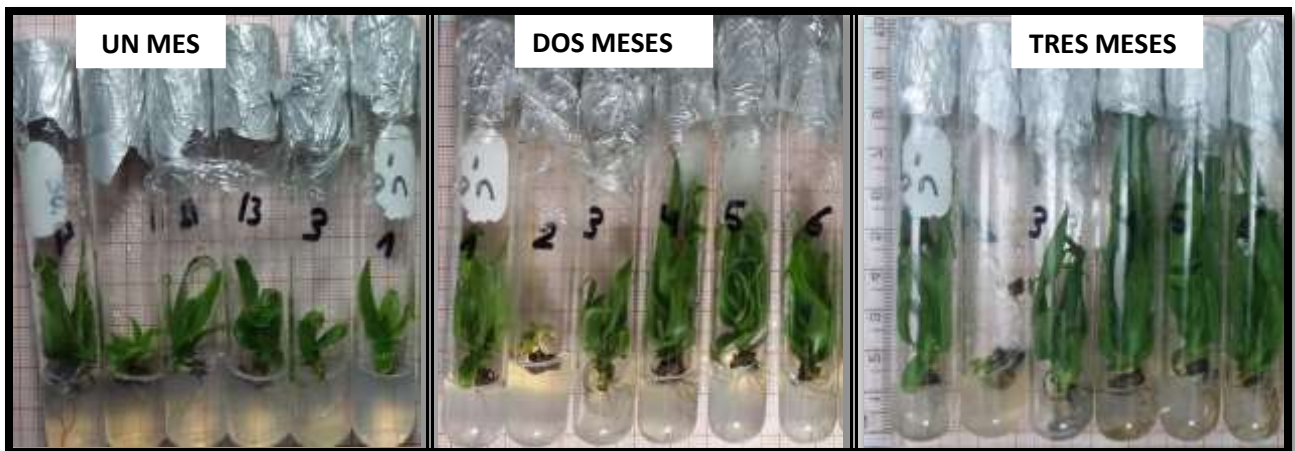


Figura 30. Crecimiento de segmentos de piña de 4 mm de longitud.

Luego de saber que los explantes de piña de cuatro milímetros pueden permanecer desarrollándose longitudinalmente por tres meses sin cambios morfológicos dañinos por falta de nutrientes, se procedió a la siembra de macollos de brotes de piña mostrado en la figura 31, en medio MS sin reguladores de crecimiento, en una proporción de tres a cinco macollos de brotes por 100 mL de medio MS, con el fin de incrementar el crecimiento longitudinal de los explantes, por un tiempo de cuatro meses. Para obtener los macollos de brotes mostrados se utilizó el medio propuesto por Ventura (2018) el cual consiste en MS semisólido + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP.



Figura 31. Macollo de brotes.

En la figura 32 se muestra a los macollos de tres meses de siembra, sembrados en medio MS sin reguladores de crecimiento con el fin de lograr una longitud de brote de 10 cm.



Figura 32. Macollos de brotes sembrados en medio MS.

3.4. Prototipo del sistema de inmersión temporal

A las botellas luego de ser lavadas y esterilizadas, se las envolvió en la boca de cada botella una cinta teflón, para que al momento de tapparlas se evite la fuga del aire; los filtros de ventilación de $0,2 \mu\text{m}$, fueron unidos con los conectores de plástico y las mangueras, con el fin de permitir el flujo del aire en los sistema de inmersión temporal, el flujo de aire fue ocasionado por cuatro compresores y regulados por medio de dos válvulas solenoides y dos controladores eléctricos, finalmente todos los componentes fueron unidos, tal como se muestra en la, figura 33, en donde mostramos lo siguiente: A: botellas. B: filtros. C: conectores. D: mangueras. E: sistema de inmersión temporal. F: sistema eléctrico compuesto por temporizadores (f), compresores (g) y válvulas solenoides (h), controladores (i).

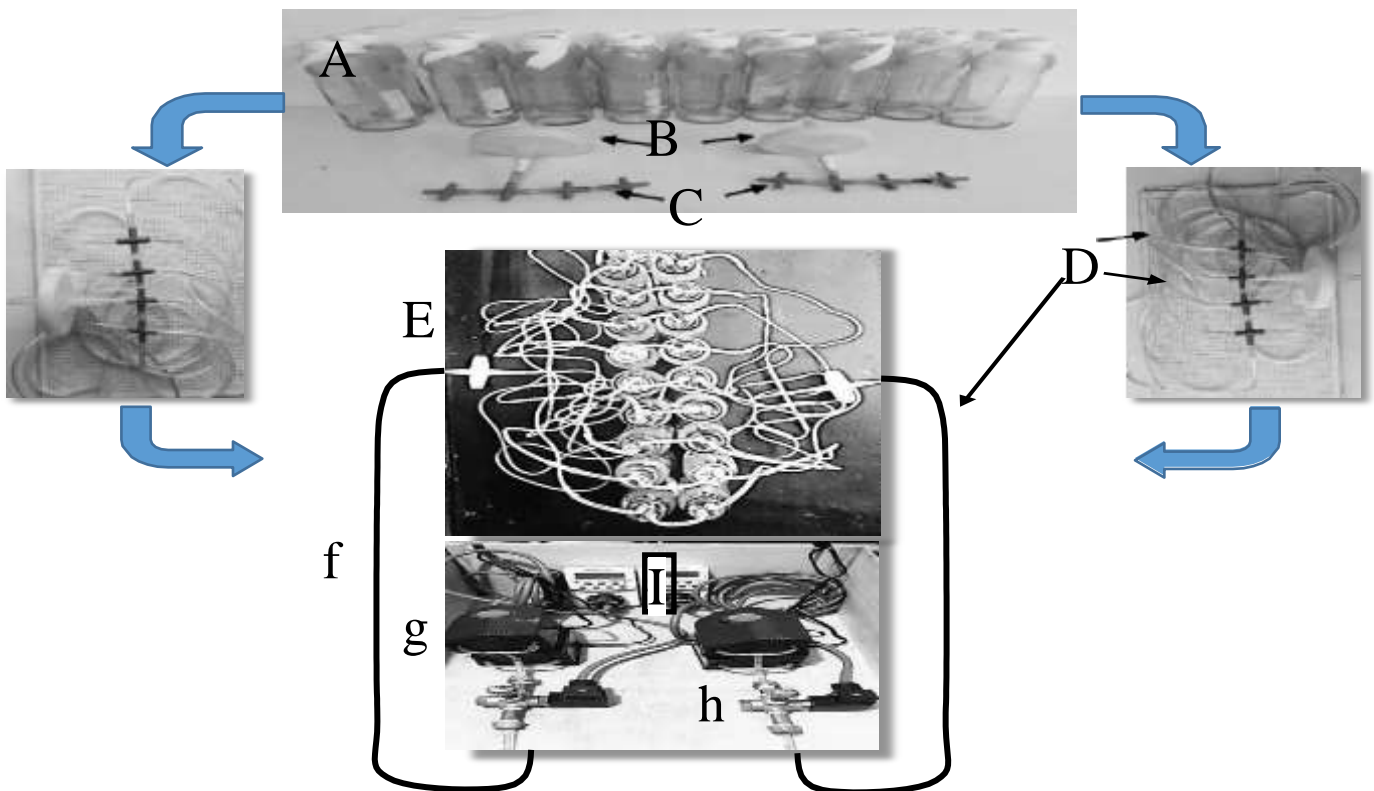


Figura 33. Construcción del sistema de inmersión temporal.

El sistema de inmersión temporal, básicamente está compuesto por dos recipientes, un recipiente para el crecimiento de los segmentos de piña y otro para almacenar el medio de cultivo, estos recipientes están conectados por mangueras de silicona tal como se muestra en la figura 34.

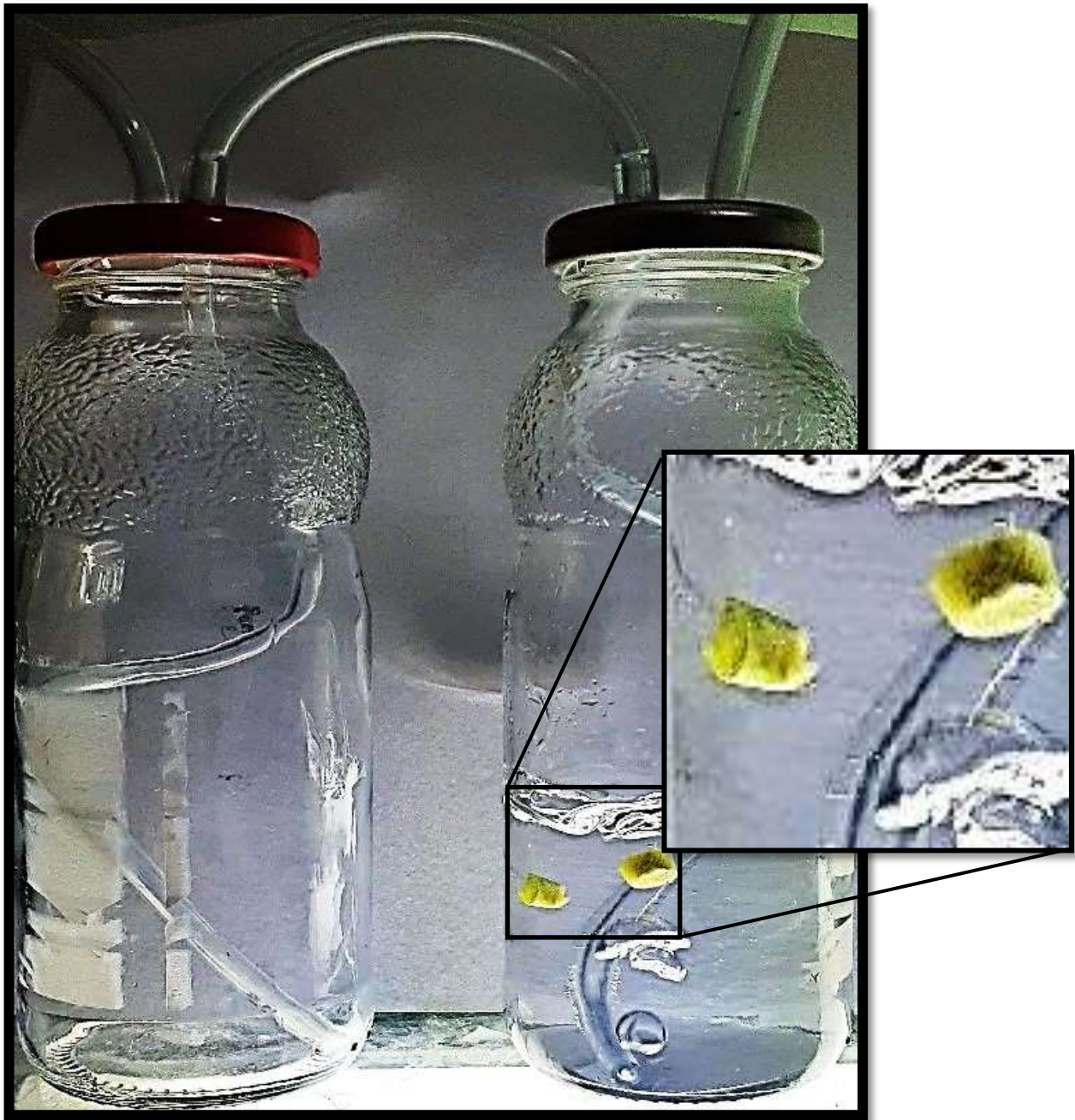


Figura 34. Sistema de inmersión temporal.

El funcionamiento del sistema de inmersión temporal de la figura 35 es el siguiente: (A) Se enciende el primer compresor y se abre su válvula solenoide, lo que permite que el aire comprimido fuerce el medio de cultivo al otro contenedor que contiene el explante (B). (C) Después de estar sumergido el explante en el medio de cultivo por 10 minutos, se enciende el otro compresor, abriéndose la segunda válvula solenoide, haciendo que la presión del aire fuerce el medio de cultivo al recipiente original. Las partes que componen el SIT, son los siguientes: (A). 1: compresor; 2: válvulas solenoides; 3: filtros hidrófobos de 0,2 μm los cuales esterilizan el aire que mueve el medio de cultivo de un recipiente a otro; 4: filtro de algodón hidrófilo; 5: explante; 6: aire; 7: temporizador eléctrico los cuales controlan la frecuencia y tiempo de inmersión.

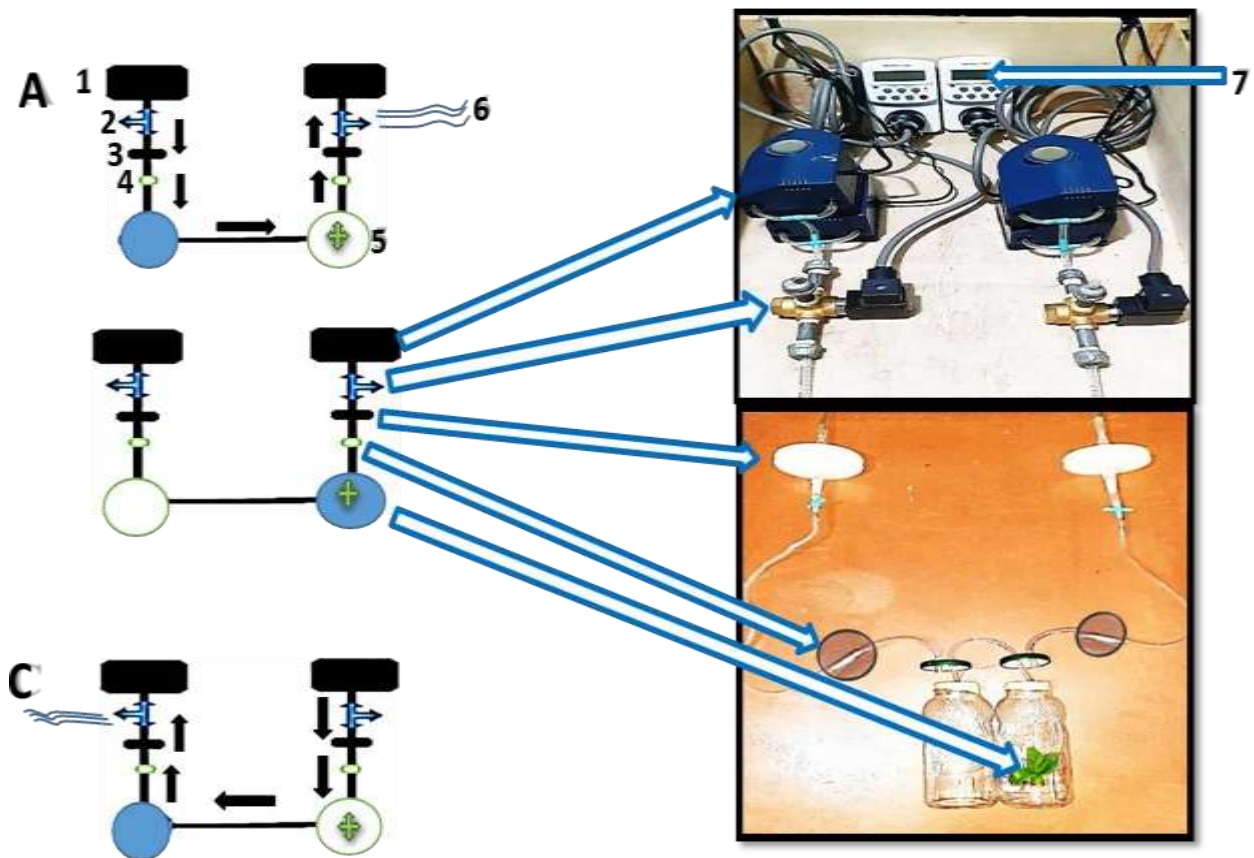


Figura 35. Funcionamiento del sistema de inmersión temporal.

3.5. Preparación de las soluciones reguladoras del pH

- Para preparar HCl al uno normal, se tenía que extraer con una jeringa 8,3 mL de HCl de 37 % de concentración y luego se vertió en un frasco de aforo de 100 mL y se enrazo a 100 mL con agua destilada.
- Para preparar NaOH al uno normal, se pesó en una balanza de precisión 4 g de NaOH en grajeas (lentejas) y luego se vertió en un frasco de aforo de 100 mL y se disolvió en 100 mL de agua destilada.

3.6. Preparación de los reguladores del crecimiento

Los reguladores de crecimiento BAP y KIN mostrados en la figura 36, son bases débiles, por lo tanto, se disolvieron en 0,3 y 0,7 mL de HCl al uno normal, generalmente se usa 0,3 mL de HCl uno normal por cada 10 mg de citocinina.

- Preparación del BAP: 4 mg de BAP se disolvió en 0,3 mL de HCl al uno normal y luego se enrazó a 100 mL con agua destilada estéril, para lograr una concentración de $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ó 40 partes por millón (ppm).
- Preparación de la KIN: 22 mg de KIN se disolvió en 0,7 mL de HCl al uno normal y luego se enrazó a 100 mL con agua destilada estéril con el fin de poder lograr una concentración de $220 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ó 220 ppm.



Figura 36. Reguladores de crecimiento.

3.7. Factores, niveles y tratamientos

- Factor B: Bencilaminopurina (BAP)
 - Niveles: b_0 :
 - $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Factor K: Kinetina (KIN)
 - Niveles:
 - k_0 : $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
 - k_1 : $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
 - k_2 : $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Los tratamientos son el resultado de las mezclas entre los niveles de cada factor y se indican en la tabla 1.

Tabla 1. *Tratamientos*

Tratamientos	Descripción
T1	MS + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN
T2	MS + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN
T3	MS + $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN

Para establecer diferencias significativas entre los tratamientos T1, T2 y T3, siendo las variables de valor numérico (longitud de brotes y número de brotes), se aplicó la prueba de ANOVA, con un nivel de significancia de 5 %.

3.8. Preparación del medio de cultivo

- Para preparar el tratamiento T1, se tuvo que:
 1. Disolver 1,78 g del producto en polvo MS en 300 mL de agua destilada en una botella de 500 mL de capacidad.
 2. Agregar 12 g de sacarosa.
 3. Añadir $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN
 4. Ajustar el pH añadiendo gota a gota de NaOH al 1 N y HCl al 1 N, hasta obtener un pH de 5,6 antes de enrazar a su volumen final (400 mL/botella).
- Para preparar el tratamiento T2, se tuvo que:
 1. Disolver 1,78 g del producto en polvo MS en 300 mL de agua destilada en una botella de 500 mL de capacidad.
 2. Agregar 12 g de sacarosa.
 3. Añadir $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN.
 4. Ajustar el pH añadiendo gota a gota de NaOH al 1 N y HCl al 1N hasta obtener un pH de 5,6 antes de enrazar a su volumen final (400 mL /botella).
- Para preparar el tratamiento T3, se tuvo que:
 1. Disolver 1,78 g del producto en polvo MS en 300 mL de agua destilada en una botella de 500 mL de capacidad.
 2. Agregar 12 g de sacarosa.
 3. Añadir $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN.
 4. Ajustar el pH añadiendo gota a gota de NaOH al 1 N y HCl al 1 N hasta obtener un pH de 5,6 antes de enrazar a su volumen final (400 mL /botella).

3.9. Vaciado de medios de cultivo en sistema de inmersión temporal

Las tres botellas de 500 mL que contenían 400 mL de medio de cultivo de los tres tratamientos T1, T2, T3 se esterilizaron con las 18 botellas a medio tapar, que conformaron el sistema de inmersión temporal, a una temperatura de 121 °C o 15 psi, durante 15 minutos, luego de esterilizados estos materiales, fueron llevados a la cámara de bioseguridad, en la cámara de bioseguridad se destaparon las botellas que contenían los medios de cultivo y las botellas que conforman el sistema de inmersión temporal, de las tres botellas que contenían 400 mL de medio de cultivo los cuales formaban los tres tratamientos, se vertió de cada una de ellas la cantidad de 300 mL de medio repartidos en tres sistema de inmersión temporal (100 mL por cada sistema de inmersión temporal), dejando los 100 mL sobrantes, para remplazar al frasco que pudiera romperse y contaminarse; esto fue el tratamiento T1 con tres repeticiones, lo mismo se hizo con la segunda y la tercera botella que contenían 400 mL de medio de cultivo del segundo y tercer tratamiento. En la figura 37 se muestra la forma del vaciado de los medios de cultivo en los tratamientos T1, T2, T3.

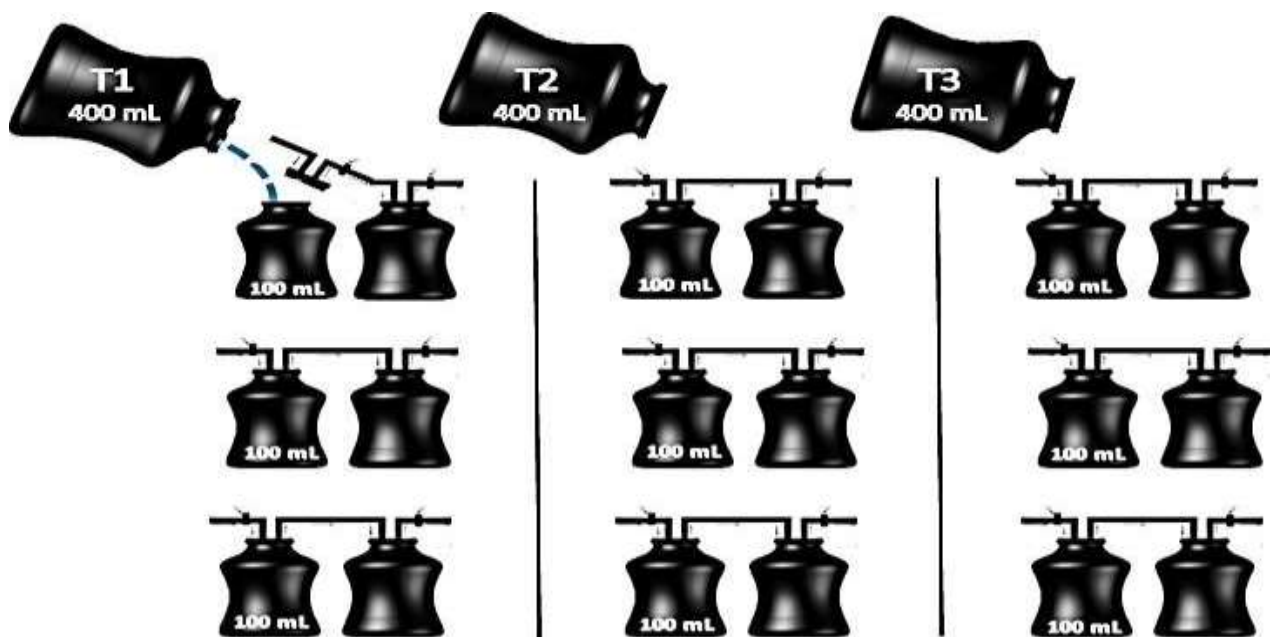


Figura 37. Vaciado de los medios de cultivo.

Luego se cortó segmentos de cuatro milímetros de la base de plántulas *in vitro* de piña para ser inoculados en el sistema de inmersión temporal (dos segmentos por cada sistema de inmersión temporal), tal como se muestra en la figura 38, donde mostramos lo siguiente: A: Segmentos de piña (flechas) de 4 mm de longitud. B: siembra de segmentos de piña en el sistema de inmersión temporal.

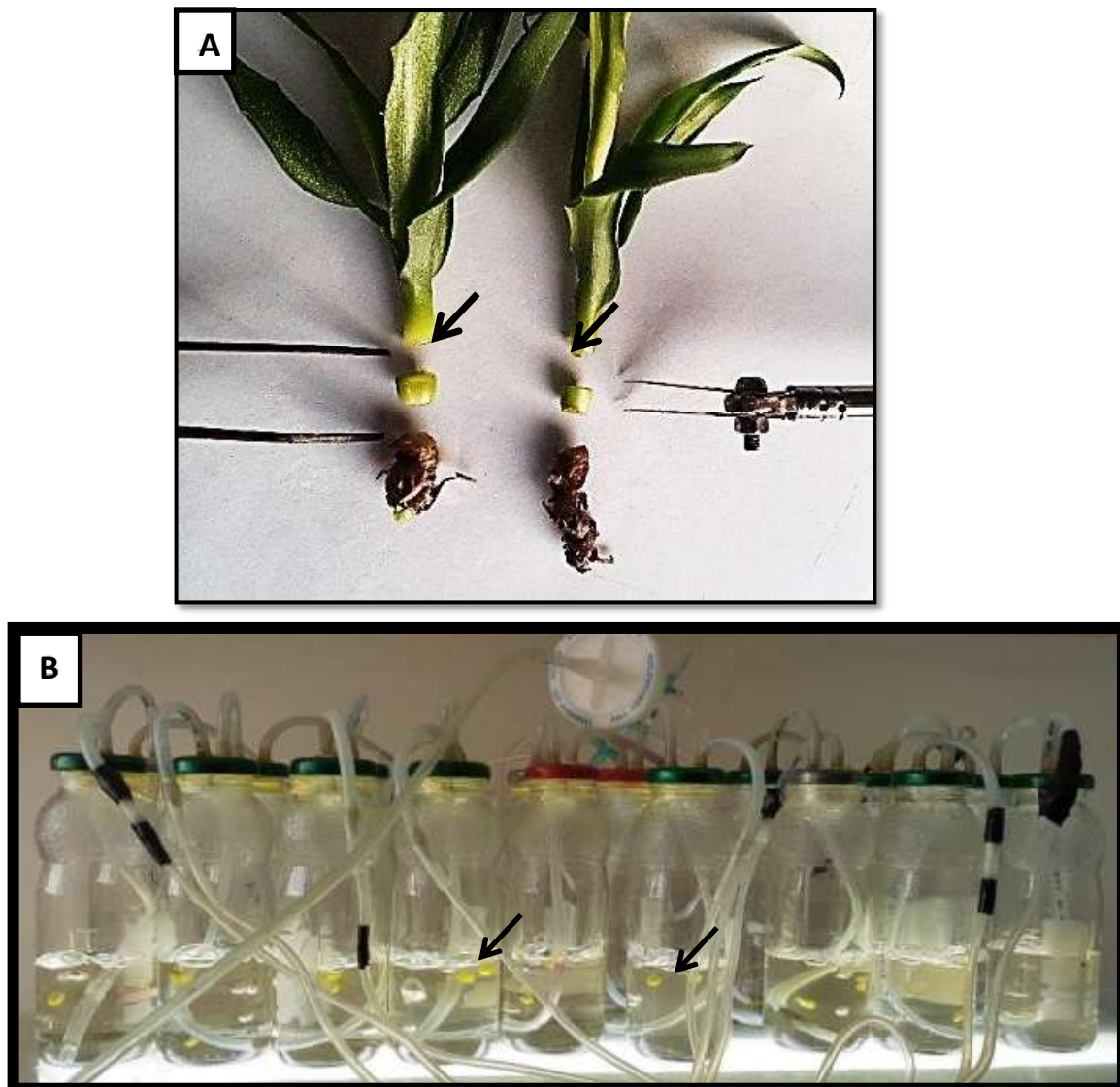


Figura 38. Cultivo *in vitro* de piña en sistema de inmersión temporal.

3.10. Evaluación del número y la longitud de brote en piña

El número y la longitud de los brotes fueron evaluados semanalmente durante dos meses, mediante la observación directa en las botellas, lo cual dificultó las evaluaciones, por eso para tener una evaluación más precisa y fiable, en el segundo mes se extrajo de las botellas los explantes con unas pinzas y fueron colocados sobre un vidrio el cual estuvo a su vez sobre un papel milimetrado como se muestra en la figura 39, esto nos permitió contar y medir con mayor exactitud el número y la longitud de los brotes; la longitud de los brotes se midió desde la base del brote hasta la parte más alta de la hoja, y para poder evaluar el número y la longitud de los brotes más pequeños, se utilizó un estereoscopio.

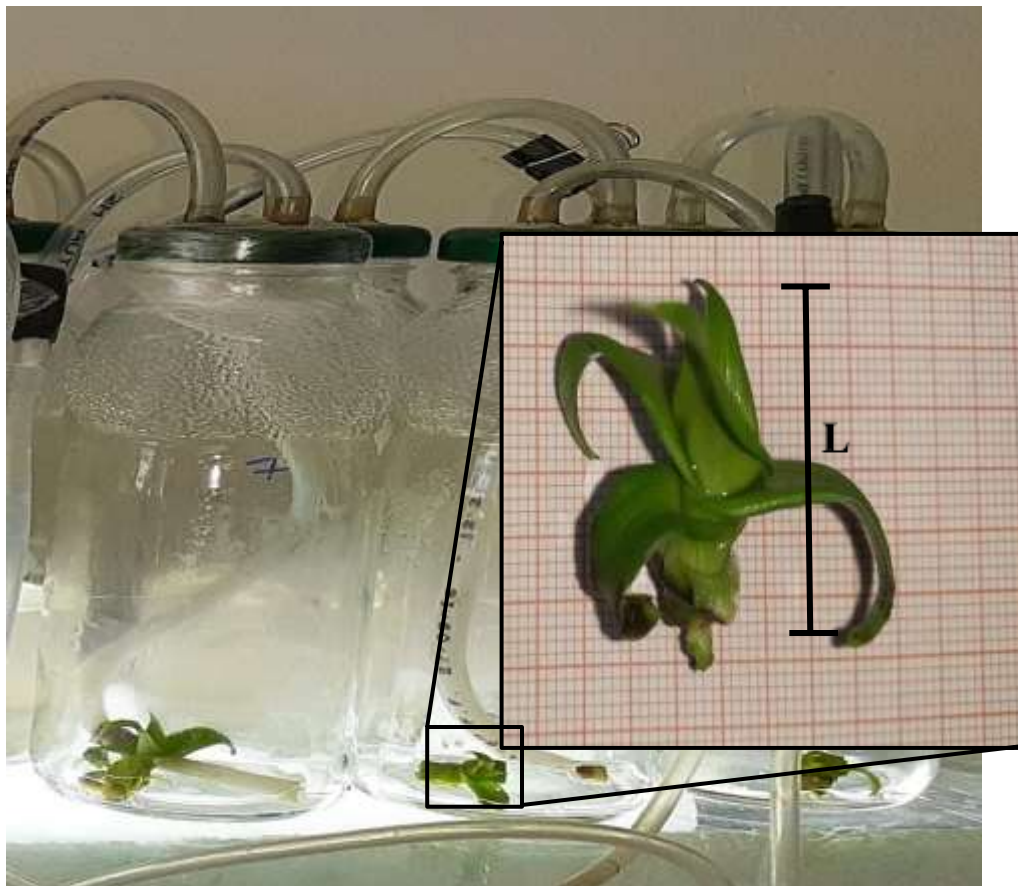


Figura 39. Evaluación del número y longitud de los brote de piña.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la dosis de la bencilaminopurina y kinetina en el número de brotes en piña

En la figura 40 se muestra los resultados del número de brotes por explante, producidos por la interacción de KIN y BAP. Con el tratamiento T1 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,4 mg·L⁻¹ KIN) se obtuvo el mayor número de brotes: 3 brotes/segmento, este resultado es superior al tratamiento T2 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,8 mg·L⁻¹ KIN), y al tratamiento T3 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 1,6 mg·L⁻¹ KIN) con los cuales se obtuvieron en promedio 2 brotes/segmento. Según el ANOVA, no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El mayor número de brotes obtenido con el tratamiento T1 se debe a una acción sinérgica de las cinetinas (1 mg·L⁻¹ BAP + 0,4 mg·L⁻¹ KIN), este balance hormonal de cinetinas, permitió el mayor brotamiento de yemas axilares. Ventura (2018) menciona que la interacción KIN y BAP actúan de forma conjunta, es decir que ambos producen un efecto significativo incrementando el número de brotes.

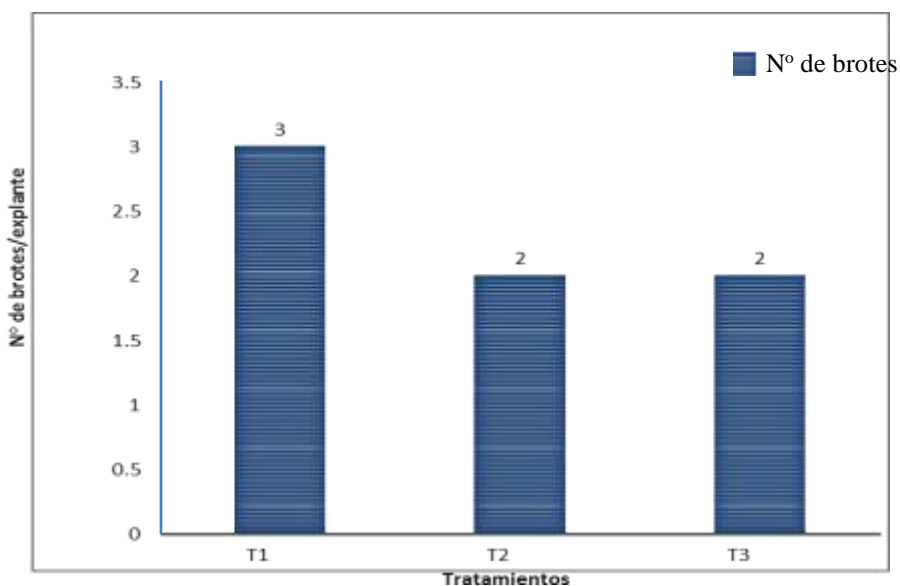


Figura 40. Número de brotes de piña

El análisis de varianza (ANOVA) de la tabla 2, para el número de brotes; al 5 % de probabilidad, se observa que no existe diferencia estadística significativa para los tratamientos T1, T2 y T3, dado que el valor de significación (p-valor = 0,2472) es mayor al 0,05 lo cual indica que el efecto de los tratamientos no se diferenciaron con respecto al número de brotes por explante, es decir, se obtuvieron resultados estadísticamente iguales. El elevado valor del coeficiente de variación (CV = 19,11 %) indica que los explantes, tras haber sido expuestos a diferentes balances hormonales de KIN y BAP durante el proceso de formación de brotes, los tejidos y células tienen una respuesta desigual, por ejemplo; algunos explantes incrementaron en el número de brotes , otros presentaron un brote dominante el cual tenía una mayor área foliar y un mayor diámetro de tallo frente a los demás brotes presentes en el mismo segmento de tallo, este brote dominante inhibió el desarrollo en longitud de las yemas axilares tal como lo menciona Hartmann et al. (2013).

Tabla 2. *Análisis de varianza (ANOVA) para el número de brotes en piña*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Tratamiento	0,292	2	0,146	1,7803 ^{ns}	0,2472>0.05
Error	0,4921	6	0,082		
Total	0,7841	8			

CV: 19,11%

El coeficiente de variación (19,11 %) del presente trabajo es inferior al obtenido por Ventura (2018) quien consiguió un coeficiente de variación de 39,04 %; pero superior al logrado por Mogollón et al. (2004) con un coeficiente de variación de 16,5 %, y al de Aguiar et al. (2008) con un coeficiente de variación de 13,6 %.

Ventura (2018) experimentó mezclas de (BAP: 0, 2 y 4 mg·L⁻¹) con (KIN: 0, 8 y 16 mg·L⁻¹) en el medio MS semisólido, incrementar el número y la longitud de brotes en piña, para lo cual sembró segmentos de piña de 4 mm de longitud de la variedad “Roja Trujillana” por un periodo de cuatro meses. Mogollón et al. (2004) utilizaron brotes de 1 cm de longitud sembrados en tres tratamientos: Tratamiento T1: MS, sin reguladores; Tratamiento T2 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,01 mg·L⁻¹ ANA), y Tratamiento T3 (1 mg·L⁻¹ BAP + 0,01 mg·L⁻¹ ANA + 2 mg·L⁻¹ AG₃). Aguiar et al. (2008), utilizaron tres concentraciones de (BAP: 3; 3,5 y 4 mg·L⁻¹) con una concentración de AIA (2 mg·L⁻¹) en plántulas *in vitro* de la variedad “Chanpaca y Hawaiana” por un tiempo de dos meses. Estos resultados demuestran el interés de los autores mencionados en buscar la concentración más adecuada de reguladores de crecimiento con el fin de establecer un protocolo para la micropropagación de piña.

En el trabajo que presentamos, la interacción de KIN y BAP al parecer tienen efecto en los explantes de piña, incrementando el número y la longitud de los brotes, lo cual posiblemente esté relacionado con la respuesta del explante a la concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, los explantes introducidos en el medio de cultivo, tuvieron un comportamiento desigual a los tratamientos, inclusive en el mismo tratamiento se encontraron respuestas diferentes, algunos explantes en el mismo tratamiento formaron brotes, otros presentaron yemas adventicias en proceso de diferenciación, algunos explantes se necrosaron, en la mayoría de los tratamientos se formó un brote dominante, el cual inhibió el desarrollo de los

brotos axilares, otros explantes se vieron seriamente afectados por la formación de los fenoles naturales del explante, los cuales se formaron cuando estos fueron cortados tal como lo menciona Morante et al. (2014).

En el presente estudio hemos demostrado que esta acción de las cinetinas es sinérgica, ya que la bencilaminopurina y kinetina actúan de forma conjunta para producir un efecto en el número y longitud de brotes de piña. Es importante señalar que la kinetina y la bencilaminopurina no son antagónicas entre ellas, porque se encuentran dentro de la familia de las cinetinas, además la bencilaminopurina complementa a la kinetina, para incrementar el número y la longitud de brotes de piña tal como lo reportó Ventura (2018). Si hablamos de antagonismo entre reguladores de crecimiento, sería importante indicar que el antagonismo tiene que ver básicamente con la mayor concentración de cinetinas frente a la menor concentración de auxinas, por ejemplo, en el presente estudio se puede observar que las altas concentraciones de dos cinetinas $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP mezclado con 0,4; 0,8 y $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN, inhibieron el accionar de las auxinas en la planta, y una muestra de ello es la no presencia de raíces en los explantes.

La auxina permite la dominancia apical lo que permite la inhibición de las yemas axilares, entonces al no producir el explante auxinas en concentraciones suficientes para permitir la dominancia apical por la presencia de las cinetinas, las cinetinas probablemente tomarían el control de la planta, liberando las yemas axilares, permitiendo así la reentrada en el ciclo celular de las yemas axilares, lográndose así, el incremento del número y la longitud de brotes.

Se debe tener en cuenta que las cantidades de auxina que produce la planta son bajas comparadas con las que se utilizan en el cultivo *in vitro*, Según Souza et al., (2010) mencionan que en un segmento *in vitro* de piña hay 5 picomoles de ácido indolacético AIA por gramo de peso fresco.

Por otro lado Chóez (2018) menciona que en hijuelos de piña obtenidos en campo, solamente se puede encontrar 6 microgramos de AIA por kilogramo de material vegetal.

En consecuencia la alta concentración de las cinetinas del presente trabajo frente a la baja concentración de las auxinas que produce la planta *in vitro* de piña, ocasionaría el antagonismo hormonal de las cinetinas frente a las auxinas, inhibiendo el accionar de las auxinas en los explantes, pero, si fueran bajas las concentraciones de los reguladores de crecimiento en picomoles, tal como lo reportó Chóez (2018), permitiría el desarrollo normal de una planta *in vitro* de piña por su balance hormonal auxina-cinetina. Ventura (2018) menciona que al sembrar segmentos de piña en un medio de cultivo Murashige y Skoog sin la adición externa de reguladores de crecimiento, obtuvo el desarrollo normal de estos explantes.

El desarrollo normal de la plántula *in vitro* es posible porque la planta misma produce sus propios reguladores de crecimiento como auxinas, cinetinas entre otros, en concentraciones suficientes para su normal crecimiento, logrando así una masa radicular directamente proporcional al desarrollo aéreo del vegetal.

Kurepa et al. (2019) menciona que las hormonas auxina y cinetinas son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y que debido a la importancia central de los meristemas apicales de raíces y brotes en el crecimiento de las plantas, las interacciones auxina-cinetina se han analizado predominantemente en relación con la formación y función de los meristemas apicales, por el contrario, las interacciones auxina-cinetina durante el crecimiento de órganos han permanecido en gran parte inexploradas, una interacción específica entre auxina y cinetina opera tanto en la raíz como en el brote, donde sirve como un determinante adicional del desarrollo de la planta.

Kurepa et al. (2019), mencionan que la auxina en concentraciones bajas limita la acción de las cinetinas pero un aumento en el nivel de cinetinas contrarresta este efecto inhibitor y conduce a una inhibición de la señalización de auxinas, por lo que a concentraciones más altas de ambas hormonas, estas interacciones antagonistas entre cinetinas y auxina están ausentes, también, los controles inhibidores mutuos son asimétricos y permiten una acción hormonal tanto antagonista como aditiva, la cinetina y la auxina actúan de manera antagónica a concentraciones bajas, y solo a concentraciones altas actúan de forma aditiva. La inhibición de la señalización de citoquininas por auxina contribuye al control del crecimiento de raíces y brotes (p. Ej., La reducción de la expansión de las hojas, el aumento de la acumulación de antocianinas y la disminución de la formación de raíces laterales) sugiere que las acciones de la auxina sobre el crecimiento de raíces y brotes implican supresión de la señalización de citocininas para facilitar los procesos promovidos por auxinas. Aunque la acción antagonista de la auxina y la citocinina fue unidireccional en plantas no tratadas cultivadas en condiciones de laboratorio (la auxina inhibe la acción de la citocinina, pero la citocinina no inhibe la acción de la auxina).

Sobre la selección de los segmentos nodales de la base del tallo, Ibrahim et al. (2013) menciona que la fuente del explante es importante en el proceso de multiplicación *in vitro* de piña, siendo los más calificados los segmentos nodales, sobre todo si se los somete al efecto de la kinetina teniendo en cuenta que esta kinetina es más efectiva en la multiplicación de brotes que el BAP.

Aunque la kinetina es más efectiva que el BAP en la multiplicación de brotes, cuando estas interaccionan juntas el resultado es mejor para incrementar el número de brotes, tal como lo reportó Ventura (2018) quien al utilizar $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KIN + $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, logró incrementar el número de brotes aún más que cuando utilizó KIN y BAP por separado, además las plantas obtenidas mediante la interacción de KIN y BAP fueron más vigorosas.

Cabe indicar que fisiológicamente los nudos de los segmentos de piña de cuatro milímetros, están separados milimétricamente uno del otro, por lo cual al extraer dichos segmentos de plántulas *in vitro*, pueden ir acompañado de un meristema con varias yemas axilares, o bien solo pueden estar presentes las yemas axilares sin el meristema apical, esto último puede tener un efecto en los explantes en el incremento del número de brotes y la longitud de brotes. Souza et al., (2010) menciona que durante el proceso de desarrollo de los órganos laterales después de la decapitación de la planta, la división y diferenciación celular ocurren de manera equilibrada iniciada por señales específicas, lo que desencadena la reentrada en el ciclo celular. En la figura 41 se muestra las características del segmento *in vitro* de piña de 4 mm.

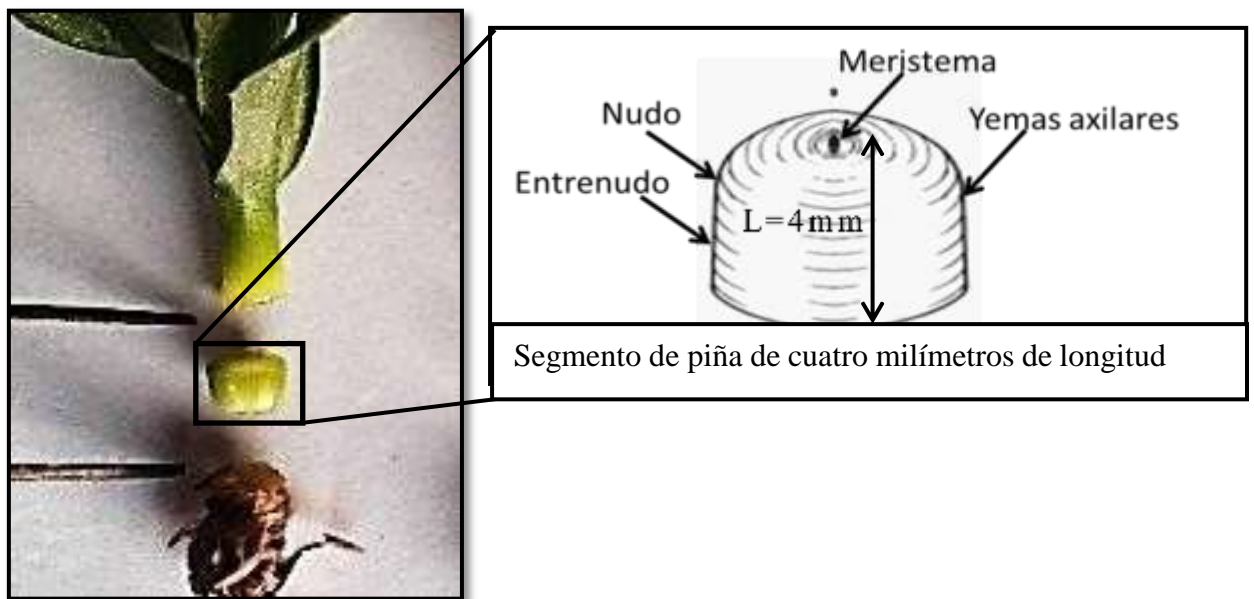


Figura 41. Segmento *in vitro* de piña.

Davies (2010) señala que las cinetinas inhiben la dominancia apical, mientras que Hartmann et al. (2013) indica que las auxinas producidas en el meristema apical inhiben el desarrollo en longitud de las yemas axilares.

Lo mencionado por Davies (2010) quién señala que las cinetinas inhiben la dominancia apical, es similar a lo que obtenido en la presente investigación, dado que cuando se agregó al medio de cultivo KIN y BAP se logró el crecimiento longitudinal de las yemas axilares, inhibiéndose el desarrollo del meristema apical, zona productora de las auxinas, tal como se observa en la figura 42. donde se puede apreciar la inhibición del meristema por efecto de las cinetinas y la reentrada en el ciclo celular de las yemas axilares. Para poder observar las yemas axilares, se hizo uso de un estereoscopio de 5x de ocular y de 10x de objetivo.

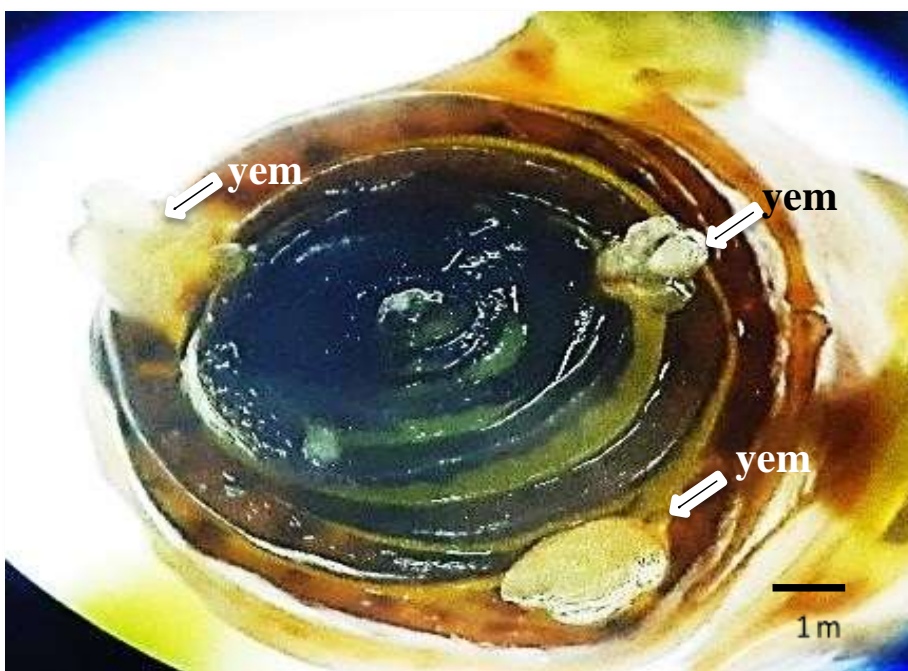


Figura 42. Yemas axilares de piña

Si no hay un crecimiento del meristema, la producción de auxinas se vería limitada, pues en esta zona es donde se produce este regulador de crecimiento, tal como lo menciona Davies, (2010).

En el tratamiento T1 ($MS + 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ BAP} + 0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KIN}$) no hubo presencia de yemas adventicias en los explantes, pero en el tratamiento T2 ($MS + 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ BAP} + 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KIN}$) y en el tratamiento T3 ($MS + 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ BAP} + 1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KIN}$), además de formarse brotes

en los explantes, se encontró la formación yemas adventicias (flechas) en proceso de diferenciación celular dos meses de siembra, mostrados en la figura 43. Las yemas fueron observadas con un estereoscopio de 5x de ocular y de 10x de objetivo.

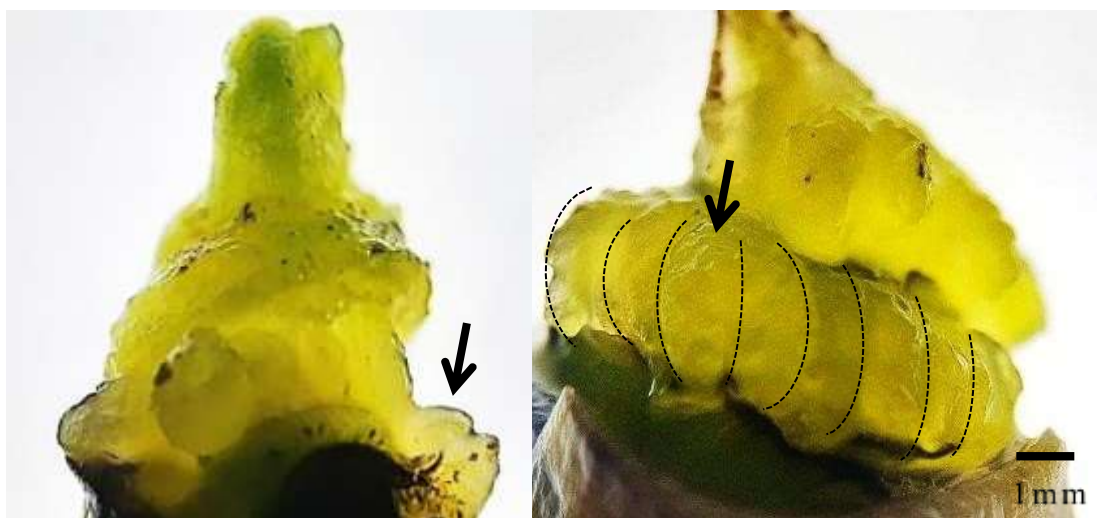


Figura 43. Yemas adventicias de piña.

Los resultados del presente estudio son similares a los obtenidos por otros investigadores, en donde se hicieron uso de KIN y BAP para incrementar el número y la longitud de brotes de piña; las cantidades de BAP que utilizaron estos investigadores varían de 1 a 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; de KIN está entre 1 a 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; y de ANA se usaron de 0,01 hasta 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, estas concentraciones de KIN, BAP y ANA según sus resultados incrementan o disminuyen el número y la longitud de brotes, según el balance hormonal auxina-cinetina (Ibrahim et al., 2013; Ventura 2018; Delgado 2004; Zuraida et al., 2011; Akbar et al., 2003; Mogollón et al., 2004 y Blanco et al., 2011).

Si no se toma en cuenta este balance hormonal de los reguladores de crecimiento los explantes pueden verse afectados, tal como lo mencionan Ibrahim et al. (2013) quien al usar MS + 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP condujo a la necrosis y muerte en brotes axilares y callos, pero si el balance

hormonal auxina-citocinina es el adecuado en el medio de cultivo, incrementa el número y la longitud de brotes, la formación de embriones somáticos y callos; por ejemplo, en medio semisólido, Ventura (2018) en cuatro meses de siembra, obtuvo 108 brotes/segmento, usando el medio de cultivo compuesto por MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP y usando MS + 4 mg·L⁻¹ BAP obtuvo callos friables denominados así, por separarse fácilmente.

Delgado (2004) usando MS + 1 mg·L⁻¹ BAP obtuvo 16,8 brotes/yema axilar en 60 días de siembra. Por otro lado Zuraida et al. (2011) usando MS + 1 mg·L⁻¹ BAP logró 7 brotes/yema axilar en un mes de siembra. En cambio Ibrahim et al. (2013) a partir de la siembra de segmentos nodales de 1 cm de longitud, los cuales contenían de uno a tres nudos, al ser sembrados en MS + 1 mg·L⁻¹ KIN obtuvo 18,6 brotes/segmento, y con MS + 1 mg·L⁻¹ BAP logró 13,6 brotes/segmento en dos meses de siembra. Akbar et al. (2003) utilizando puntas de meristemas de la corona de piña, cultivadas en MS + 1,5 mg·L⁻¹ ANA + 1,0 mg·L⁻¹ KIN obtuvo callos en tres semanas de siembra, y este callo cultivado en MS + 1,5 mg·L⁻¹ KIN + 0,5 mg·L⁻¹ ANA condujo al 100 % de brotamiento de los callos en dos meses de siembra.

En medio líquido Mogollón et al. (2004) con MS + 0,01 mg·L⁻¹ ANA + 1 mg·L⁻¹ BAP obtuvieron 38,6 brotes/brote.

Blanco et al. (2011) lograron 9,18 brotes/brote con MS + 0,5 mg·L⁻¹ BAP + 1 mg·L⁻¹ ANA + 1 mg·L⁻¹ AIB. Zuraida et al. (2011) utilizando (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP) consiguieron 31 brotes/yema axilar.

Escalona et al. (1999) los cuales son unos referentes internacionales para casi todos los trabajos de investigación relacionado a la micropropagación de plantas, obtuvieron 6000 brotes en *Ananas comosus* L. variedad “Cayena Lisa”, usando MS + 2,1 mg·L⁻¹ BAP + 0,3 mg·L⁻¹ ANA + 1 mg·L⁻¹ pacrobutrazol (PBZ) con la ayuda del sistema de inmersión temporal. Blanco et al. (2011) usando MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,5 mg·L⁻¹ ANA consiguieron 39,4 brotes/brote en

sistema de inmersión temporal. Los resultados mencionados anteriormente nos llevan sugerir que el uso del ANA en las concentraciones descritas, podría ser un factor importante en la regulación de la uniformidad de los brotes.

El uso y la mezcla de KIN, BAP y ANA usados en diversos estudios, tienen un efecto en el número y la longitud de brotes de plántulas *in vitro* de piña, con lo cual se puede controlar la multiplicación de los brotes cuando estos interactúan entre sí.

En el presente trabajo cuando se cortó segmentos de 4 mm de la base de los tallos de plántulas *in vitro* de piña se produjo la fenolización de los explantes, tal como lo mencionó Morante et al. (2014). En algunos explantes al ser cortados y luego inoculados en el medio de cultivo líquido del sistema de inmersión temporal, ocasionó el necrosamiento del tallo y de las hojas, se inhibió el desarrollo de los brotes, y produjo la muerte de los segmentos de piña debido a la fenolización de los segmentos de piña.

En el sistema de inmersión temporal, es importante evitar la producción de fenoles en los explantes, para lo cual se tiene que sembrar los segmentos de piña recientemente cortados, en medio de cultivo semisólido hasta que cicatricen sus heridas teniendo en cuenta que en el medio semisólido hay menos humedad que en el medio líquido, lo cual es necesario para que los segmentos de piña puedan recuperarse más rápido.

Mishra y Gautam (2016) mencionan que la fenolización en las plantas se da porque la polifenol oxidasa (PPO) cataliza la oxidación fenólica lo que ocasiona el pardeamiento oxidativo en la planta; pero estos problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales se puede evitar o disminuir cultivándolos en medio líquido.

Azofeifa (2009) indica que las citocininas y las auxinas en un medio de cultivo alto en sales también ocasionan pardeamiento oxidativo de los explantes, por lo que recomienda diluir las sales y evitar concentraciones inadecuadas de reguladores de crecimiento para disminuir estos desordenes fisiológicos.

En la fenolización, la mayoría de radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les llama especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS), estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singulete (1O_2) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar el radical súper óxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (OH^-) respectivamente (Azofeifa, 2009).

En la figura 44, de izquierda a derecha mostramos dos explantes, el primer explante está muerto por la presencia de fenoles en todos sus tejidos, el segundo explante solo muestra los terminales de algunas hojas fenolizadas, esto debido al corte que se les realizó al momento de extraer las muestras.

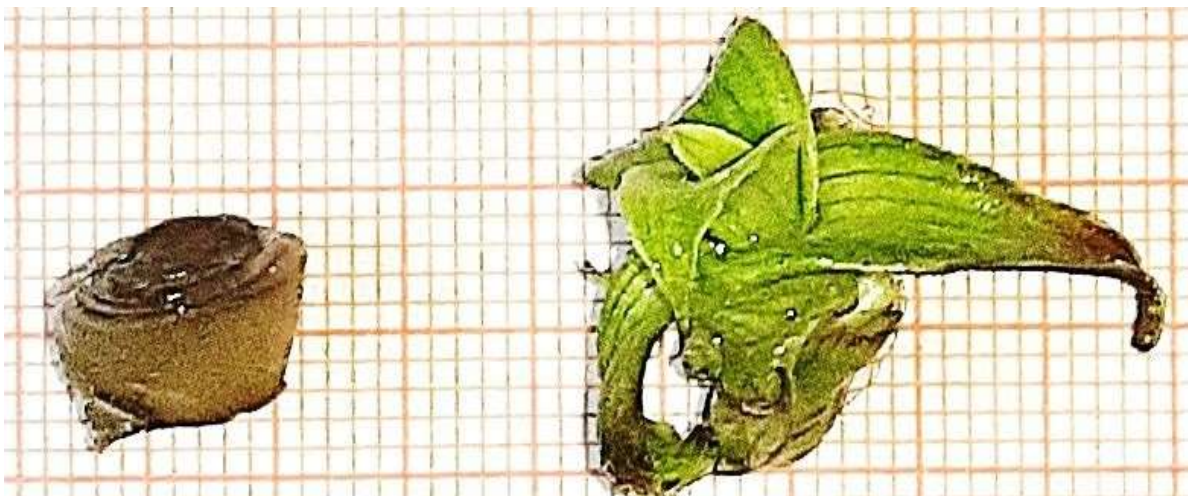


Figura 44. Fenolización de explantes de piña.

Benezer-Benezer et al. (2008). Mencionan que la ROS son una respuesta de defensa de la planta a un daño mecánico con una producción localizada de ROS permitiendo así muerte celular programada.

En tejidos vegetales intactos las PPO y sus sustratos fenólicos permanecen en compartimentos separados (cloroplastos y vacuolas), por lo que no tiene lugar ninguna reacción, la desorganización de la integridad de las células sucede como consecuencia de daños mecánicos o de forma natural durante procesos de senescencia, provocando una ruptura celular y una puesta en contacto de PPO y fenoles dando lugar a reacciones de pardeamiento enzimático (Morante et al. 2014). Para evitar el pardeamiento en explantes de piña Hartmann et al. (2013) recomienda hacer uso del ácido cítrico ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y del ácido ascórbico ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el medio de cultivo.

Es importante mencionar que en la micropropagación se busca la no variabilidad del material vegetal, para lo cual, Cassells (2001) menciona que la estrategia preferida para mantener la estabilidad del genoma es mediante el cultivo de nudos y meristemas, pero el riesgo de variación somaclonal depende del genotipo; aumenta desde la morfogénesis directa a través de embriones somáticos, hasta brotes adventicios; mientras que la morfogénesis indirecta particularmente cuando involucra subcultivos de callo; se asocia con variación de alta frecuencia, por lo que se recomienda evitar la generación de brotes adventicios especialmente a base de callos, dado que el acelerado brotamiento puede ocasionar variaciones somaclonales. Lo mencionado por Cassells (2001) respecto a la respuesta de la variabilidad del material vegetal tiene que ver básicamente con el interés de cada investigador, puesto que si se desea el mejoramiento genético, la variabilidad del material vegetal obtenido mediante el cultivo de embriones somáticos y callos sería lo mejor en este punto, pero si se desea la estabilidad genética el cultivo de nudos y de meristemas serían los más recomendables.

4.2. Efecto de la dosis de la bencilaminopurina y kinetina en la longitud de brotes en piña

En los resultados del análisis de varianza para la longitud de brote mostrados en la tabla 3, se encontró que al 5 % de probabilidad, existe significación estadística para los tratamientos, dado que el valor de significación (p-valor=0,0191) es menor al 0,05 lo cual indica que el efecto de los tratamientos se diferenció con respecto a la longitud de brotes, es decir, que los resultados fueron diferentes unos de otros. El alto valor del coeficiente de variación (CV = 53,74 %), indica una marcada diferencia en la respuesta de los explantes, aún al mismo tipo de medio de cultivo o tratamientos en estudio.

Ventura (2018) menciona que a pesar que se realice una adecuada selección y clasificación de explantes en base a las 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 explantes son muchos y diversos, es justificable una respuesta desuniforme aún dentro de los explantes sujetos al mismo tratamiento, como el desarrollo de un brote dominante el cual inhibió el alargamiento de otros brotes.

Tabla 3. *Análisis de varianza (ANOVA) para la longitud de brotes en piña*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Tratamiento	1,71	2	0,86	8,23*	0,0191<0.05
Error	0,62	6	0,1		
Total	2,33	8			

CV: 53,74 %

El coeficiente de variación de 53,74 %, que se logró en la presente investigación, es superior al obtenido por Ventura (2018) quien alcanzó un cv = 43,95 %, también es superior al obtenido por Mogollón et al. (2004) quien obtuvo coeficientes de variación de 18,2 %, 13,8 % y 11,5 % respectivamente. Aguiar et al. (2008) obtuvieron un cv = 17,52 %.

Las variaciones en la longitud de brote en el presente estudio, podrían deberse a la ausencia de auxina externa en el medio de cultivo. Como ya se mencionó anteriormente, las cantidades de la auxina que produce la planta *in vitro*, según Souza et al., (2010) es de 5 picomoles de ácido indolacético AIA por gramo de peso fresco. Davies (2010) menciona que la citocinina interactúa con auxina para inducir a la división celular en cultivo de tejidos vegetales.

Para disminuir las variaciones en el número y longitud de brotes de piña, ocasionadas por la fenolización de los explantes, se debería sembrar los explantes cortados primero en medio semisólido por dos meses, con un balance hormonal bajo de auxinas y cinetinas antes de ser sembrados en el sistema de inmersión temporal, es por esto que en el cultivo *in vitro* en medio semisólido tiene que complementarse con el sistema de inmersión temporal.

Rivas et al. (2014) recomiendan sembrar yemas axilares recién cortadas en medio semisólido MS + 5 mg·L⁻¹ ANA; 0,5 mg·L⁻¹ AIB + 0,5 mg·L⁻¹ BAP + 10 g·L⁻¹ carbón activado. Hartmann et al. (2013) recomiendan que los explantes recién cortados sean sembrados directamente en medio semisólido, en razón de que si son sembrados directamente en medio líquido ocasionaría lixiviación del material vegetal limitando el desarrollo del explante; tal como sucedió en nuestro experimento en donde los explantes recién cortados, fueron sembrados directamente en el medio de cultivo líquido ocasionando la fenolización de los explantes.

En los resultados logrados del presente trabajo, nos permite mencionar que a medida que se incrementaron las concentraciones de kinetina, también se incrementaron la elongación de los brotes sin formación de raíces, esto nos lleva sugerir que la cinetina en las concentraciones trabajadas en el presente trabajo de investigación puede influir en el alargamiento celular y la inhibición de raíces, y por lo tanto, no debe considerarse a la cinetina únicamente como una subsistencia de división celular.

La interacción de KIN y BAP nos permitió obtener explantes vigorosos con una coloración verde intensa. Davies (2010) menciona que las cinetinas se sintetizan a través de la modificación bioquímica de la adenina y se produce en las puntas de las raíces y en las semillas en desarrollo; promueven el inicio del brotamiento y el crecimiento de yemas laterales dado que inhibe la dominancia apical; promueve la expansión de la hoja resultante únicamente del agrandamiento celular, esto es probablemente el mecanismo por el cual el área total de la hoja se ajusta a compensar la extensión del crecimiento de la raíz; las cinetinas retrasan la senescencia de la hoja, pueden mejorar la apertura de los estomas, promueve el desarrollo de cloroplastos dado que la aplicación de cinetinas conduce a una acumulación de clorofila, induciendo la conversión de etioplastos en cloroplastos.

Souza et al., (2010) refiere que aunque las raíces se consideran una de las principales fuentes de cinetinas, esta hormona también se puede sintetizar a altas tasas en los tejidos de los brotes, además, incluso los cultivos de células vegetales pueden volverse autónomos para su división y crecimiento. Este fenómeno llamado habituación de cinetinas es un rasgo reversible que puede transmitirse mitóticamente, lo que indica la participación de la modificación del ADN en lugar de mutaciones.

Tanaka et al. (2006) afirma que en las plantas intactas cuando el ápice del brote crece predominantemente inhibe el crecimiento de las yemas axilares, pero después de la decapitación del ápice del brote, comienza el crecimiento de yemas axilares, a este fenómeno lo llaman dominancia apical, pero aunque se ha propuesto la participación de la auxina que reprime el crecimiento de yemas axilares, y cinetinas que promueve el crecimiento de yemas axilares, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares subyacentes, por lo que estos autores demostraron que la auxina regula negativamente la biosíntesis local de cinetinas en el tallo nodal

controlando el nivel de expresión del gen del guisante *Pisum sativum* L. adenosina fosfato - isopenteniltransferasa (PsIPT), que codifica una enzima clave en la biosíntesis de cinetinas. Estos autores mencionan que antes de la decapitación, PsIPT1 y las transcripciones de PsIPT2 eran indetectables, pero después de la decapitación, se indujeron notablemente en el tallo nodal junto con la acumulación de cinetinas (la expresión de PsIPT fue reprimida por la aplicación de AIA). Estos autores también indican que en el tallo nodal extirpado, la expresión de PsIPT y los niveles de cinetinas aumentaron en condiciones libres de AIA, además, la región del promotor β expresión de glucuronidasa, bajo el control de PsIPT2 en *Arabidopsis* transgénica fue reprimida por un AIA. Finalmente concluyen que estos resultados indicarían que en la dominancia apical una función de la auxina es reprimir la biosíntesis local de cinetinas en el tallo nodal y que, después de la decapitación, las cinetinas que se derivan de las raíces, se biosintetizan localmente en el tallo nodal en lugar de transportarse desde las raíces.

Al aplicar Tukey al 5 % de probabilidad para la longitud de brotes, se encontró que el mayor promedio respecto a la longitud de brotes, se obtuvo con el T3 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 1,6 mg·L⁻¹ KIN), lográndose 1,19 cm/segmento, este resultado es estadísticamente superior al T2 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,8 mg·L⁻¹ KIN) y también al tratamiento T1 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,4 mg·L⁻¹ KIN) con los cuales se obtuvieron en promedio 0,46 y 0,15 cm de longitud/segmento, siendo estos resultados los menores y a la vez estadísticamente iguales. Las cinetinas utilizadas en los Tratamientos T1, T2 y T3, también inhibieron la formación de raíces en los explantes.

En la tabla 4 presentamos la prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de probabilidad para la longitud de brotes, en donde se puede apreciar que el tratamiento T3, es superior al tratamiento T2, y al tratamiento T1, teniendo en cuenta que la interacción de KIN y BAP en los niveles de 1 mg·L⁻¹ de BAP + 1,6 mg·L⁻¹ de KIN ocasionaría un efecto en la mayor longitud de brote.

Tabla 4. Comparación de medias de Tukey al 5 % de probabilidad

Tratamiento	Longitud de brotes (cm)	Agrupación por Tukey
T3	1,19	A
T2	0,46	B
T1	0,15	B

En la figura 45, se observa resultados de la longitud de brotes, siendo el tratamiento T3 el de mayor longitud, y el tratamiento T1, el de menor longitud.

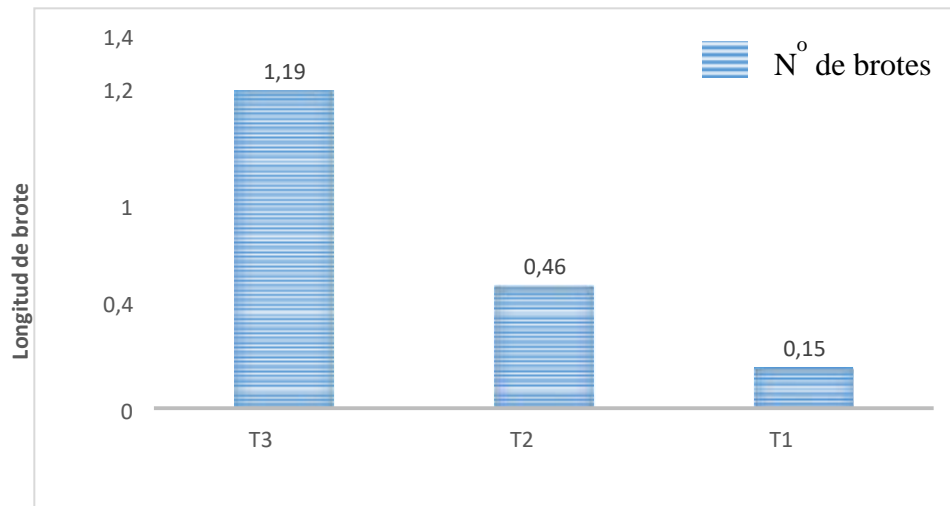


Figura 45. Longitud de brote de piña

La longitud de brote del tratamiento T3 (MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 1,6 mg·L⁻¹ KIN) donde se obtuvo 1,19 cm/segmento, es superior al obtenido por Blanco et al. (2011) quien consiguió una longitud de brote de 4 mm a partir de la siembra de yemas axilares de piña ecotipo “Eruwä Canä”, después de permanecer cuatro semanas en medios de cultivo semisólido y líquido, los cuales contenían la mezcla de MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 0,5 mg·L⁻¹ ANA + 0,5 mg·L⁻¹ AIB. El Tratamiento T3 obtenido en la presente investigación, también es inferior al alcanzado por Ventura (2018), quien logró una longitud de 5 cm/segmento cuando utilizó MS sin reguladores de crecimiento, pero este autor, cuando utilizó MS + 2 mg·L⁻¹ BAP, alcanzó una longitud de 3 cm de longitud/segmento, y combinando el medio MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP obtuvo 2 cm/segmento, pero cuando utilizó (MS + 4 mg·L⁻¹ BAP); (MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 4 mg·L⁻¹ BAP) y (MS + 16 mg·L⁻¹ KIN) consiguió en promedio 1 cm de longitud de brote. Los resultados mencionados anteriormente, sobre la micropropagación de piña, nos indican que

concentraciones mayores de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y KIN, ocasiona una disminución en la longitud de los explantes de piña, y en algunos caso ocasiona la muerte de los explantes, por fitotoxicidad, esta alteración tiene que ver con la concentración de los reguladores en el medio, el tipo de medio de cultivo utilizado (semisólido y líquido), y el tamaño del explante, tal como lo menciona Ibrahim et al. (2013) los cuales utilizando medio de cultivo semisólido MS con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, condujo al crecimiento de brotes axilares de piña de la variedad “Queen”, pero a medida que se incrementaron las concentraciones de BAP mayores a $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se produjo la formación de brotes axilares y callos, mientras que con $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, los brotes axilares y los callos se necrosaron; pero con la siembra de segmentos nodales, en un tiempo de dos meses, cultivados en medio MS semisólido, suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kinetina, se obtuvo 18,6 brotes/segmento, y con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP se logró 13,6 brotes/segmento, estos resultados demuestran que la fuente del explante con la mezcla de cinetinas, utilizados en la micropropagación *in vitro* de piña, tienen un papel importante en la multiplicación de brotes, concluyéndose que la kinetina es más efectiva en la multiplicación de brotes que el bencilaminopurina.

Schmülling (1997) menciona que a nivel celular la expresión del gen de la planta se puede alterar notablemente en respuesta a las cinetinas, lo que lleva a un aumento o disminución de la abundancia de transcripciones específicas; además las diferencias relativamente pequeñas en la concentración de cinetina endógena pueden cambiar los niveles de genes de ARNm en estado estacionario; este autor menciona que la fosforilación de proteínas juega un papel en la transmisión de la señal de cinetina; los productos de los genes regulados juegan un papel en diversos procesos biológicos, como la división celular, la fotosíntesis, el desarrollo de cloroplastos, la resistencia a las enfermedades y el metabolismo.

Con el resultado que logrado por Ventura (2018) cuando obtuvo más de 100 brotes de piña a partir de la siembra de un segmento de 4 mm de longitud en medio semisólido en un tiempo de cuatro meses utilizando MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP, se podría obtener hasta un millón de brotes de piña en una año, suficiente para abastecer 20 hectáreas, para lo cual se debe de tener en cuenta que la concentración de las cinetinas (KIN y BAP) deben ser menores que las utilizadas en el medio semisólido, por ejemplo, si se utiliza las concentraciones de 8 mg·L⁻¹ KIN y 2 mg·L⁻¹ BAP en medio MS líquido del sistema de inmersión temporal, ocasiona la necrosis y muerte de los explantes por exceso de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, y esto se debido a que el explante *in vitro* por un momento está completamente sumergido en el medio de cultivo, lo que ocasiona que las reacciones sean más rápidas a nivel celular que cuando se siembra en medio semisólido, los cuales mostramos en el anexo 11.

La necrosis y muerte de los explantes de piña de cuatro milímetros al utilizar 8 mg·L⁻¹ KIN y 2 mg·L⁻¹ BAP en el sistema de inmersión temporal se podría evitar si se utilizara concentración 1 mg·L⁻¹ de BAP y 1,6 de KIN, resultado obtenido en nuestra investigación el cual serviría para incrementar el número y la longitud de brotes de piña. Entonces para incrementar el número de brotes y obtener resultados parecidos al de Escalona et al. (1999) quien logró obtener 6000 brotes de piña en dos meses; se tendría que utilizar como material de partida un macollo de brotes de cuatro meses de siembra, sembrados en un medio semisólido compuesto por MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP obtenido por Ventura (2018), luego estos macollos de brotes de cuatro meses de siembra tendrán que ser sembrados en un sistema de inmersión temporal de 10 litros en una proporción de un macollo de brotes de cuatro meses de siembra sembrado en 200 mL de medio de cultivo recomendado por Escalona et al. (1999), para lo cual se tendrá que hacer uso del tratamiento T3 MS + 1 mg·L⁻¹ BAP + 1,6 mg·L⁻¹ KIN, obtenido en el presente trabajo.

Scheidt et al. (2009) menciona que el sistema de inmersión temporal representa una nueva alternativa en el escenario de producción plantas, permitiendo una buena nutrición, luminosidad y homogeneización del aire, en consecuencia una mejor productividad, y en piña es un equipo efectivo para producir plántulas a gran escala. Lemos et al. (2001) mencionan que la renovación constante del aire durante el período de transferencia del medio, elimina los posibles gases nocivos producidos por el metabolismo de las plantas que normalmente se acumulan en la fase gaseosa del sistema de inmersión temporal.

Escalona et al. (1999) mencionan que el sistema de inmersión temporal tuvo efectos positivos para la proliferación de brotes y la longitud de brote, en donde los reguladores de crecimiento, el tiempo de inmersión y la frecuencia de inmersión de los explantes en el medio de cultivo el cual fue de 10 minutos cada 2 horas, fueron los parámetros más decisivos para la eficiencia de este sistema; pero el volumen del medio no fue el adecuado en razón de que los explantes se vieron afectados por la cantidad de medio utilizado (se utilizó dos explantes sumergidos en 100 mL de medio).

Estos estudios nos llevan a sugerir que el sistema de inmersión temporal no reemplaza al medio de cultivo semisólido; más bien debe entenderse como un complemento de este sistema. Es importante indicar que en el medio semisólido los explantes pueden estar expuestos a mayores niveles de cinetinas, debido a que se puede incrementar las concentraciones de las cinetinas hasta en $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN mezclado con 2 y $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, sin problemas de fitotoxicidad, pero en el sistema de inmersión temporal no se podría utilizar estas concentraciones porque ocasionaría la muerte de los explante por exceso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Hay que tener en cuenta que al sembrar un explante de piña en el medio de cultivo semisólido, sólo una parte de este explante está sumergido en el medio (la base del explante), entonces la planta absorbe los nutrientes y los reguladores con menor velocidad que en un sistema de inmersión temporal, en cambio en el sistema de inmersión temporal la planta está sumergida en el medio de cultivo por lo que los reguladores de crecimiento ingresan con mayor facilidad en toda la planta, lo que ocasionaría una velocidad de reacción mayor a nivel celular que en el medio semisólido ocasionando un desorden fisiológico que puede llevar al explante a la necrosis de los tejidos por exceso de reguladores de crecimiento, tal como lo reporto el trabajo de Ventura (2018).

La cantidad de explantes en el sistema de inmersión temporal es un factor importante a tener en cuenta al momento de la micropropagación de piña puesto que según Hurtado y Merino (1991) los recipientes no deben tener una cantidad arbitraria de medio de cultivo, porque la frecuencia de supervivencia y crecimiento de los cultivos requiere un balance entre la masa del explante y la cantidad de los nutrientes, los explantes pequeños se ven grandemente afectados por cantidades grandes de medio; de la misma manera, el crecimiento de explantes grandes frecuentemente están restringidos por un inadecuado suministro de medio.

Escalona et al. (1999), señalan que a medida que se aumenta la disponibilidad de medio de cultivo en la micropropagación de piña se logra un coeficiente de multiplicación mayor; pero este decreció cuando las cantidades de medio de cultivo eran excesivamente grandes en comparación con el material vegetal presente en el sistema.

Hartmann et al. (2013) mencionan que el volumen adecuado del medio nutriente y el volumen del recipiente de cultivo mejoran sustancialmente la proliferación de brotes.

Rodríguez y Morales (2015) concluyen que los explantes son influenciados tanto por el volumen del medio como la densidad de explantes.

Al estudiar la relación de que debe existir entre el medio de cultivo y la cantidad de explantes en el sistema de inmersión temporal, para obtener buenos resultados en el sistema de inmersión temporal se recomienda ocupar la mayor área posible del contenedor en la siembra de los explantes, por lo que no se debe usar uno o dos explantes por sistema de inmersión temporal, a menos que los explantes sean utilizados tal como se realizó en nuestro experimento, considerando que si se hubiera colocado 10; 20 ó 30 explantes en el medio de cultivo líquido podrían haber muerto todos los explantes por exceso de fenoles en el medio y esto hubiera alterado los objetivos trazados, por lo que se recomienda utilizar primero brotes cultivados en medio semisólido, y luego ser transferidos al sistema de inmersión temporal, tal como lo trabajó Escalona et al. (1999).

Sobre la cantidad de medio de cultivo y el número de explantes que se debe utilizar en sistema de inmersión temporal, se encuentra poca información en piña, por lo que se citan a continuación algunos trabajos en piña y en otros cultivos, para tratar de entender este punto el cual es importante para evitar la hiperhidricidad, necrosamiento y muerte de los explantes, por ejemplo Basail et al. (2003) mencionan que obtuvo los mejores resultados en yuca al utilizar 20 mL de volumen de medio de cultivo con una densidad de 40 explantes/frasco. Pérez et al. (2012) mencionan que para multiplicar banano en sistema de inmersión temporal se debe utilizar MS + 3 mg·L⁻¹ BAP + 2 mg·L⁻¹ AIA con 40 mL de medio de cultivo por explante y 70 explantes por frasco de cultivo para obtener los mejores resultados.

Escalona et al. (1999) recomienda usar un macollo de brotes de piña de cuatro meses de siembra sembrado en 200 mL de medio de cultivo. Llanos (2015) menciona que se debe utilizar 30

explantes de piña por litro de medio de cultivo en el sistema de inmersión temporal, y el medio de cultivo debe estar conformado por MS +2 mg·L⁻¹ BAP + 2,1 mg·L⁻¹ ANA. Alverca (2015) menciona que al utilizar 13 explantes en un sistema de inmersión temporal de 1,4 L de medio de cultivo conformado por MS + 2,1 mg·L⁻¹ BAP + 0,3 mg·L⁻¹ ANA, logró obtener 361 plántulas a partir de la siembra de plántulas entre 2 a 3 cm, con dos a tres brotes.

Otro detalle a tomar en cuenta para mejorar la producción de brotes de piña, es que los explante de 4 mm de longitud que hemos utilizado en nuestra investigación al ser cortados no debieron ser sembrados inmediatamente en medio líquido del sistema de inmersión temporal, sino que primero tendrían que haber sido sembrados en el medio de cultivo semisólido para que cicatricen sus heridas hasta obtener una macollo de brotes mediante el uso de MS + 8 mg·L⁻¹ KIN + 2 mg·L⁻¹ BAP obtenido por Ventura (2018). Los explantes utilizados en la presente investigación al ser cortados y sembrados inmediatamente en el sistema de inmersión temporal ocasionó que no tuvieran tiempo de cicatrizar sus heridas y además se se lixiviaron los nutrientes de las células del explante, ocasionando una baja respuesta del número y la longitud de brotes por explante.

Hartmann et al. (2013) recomiendan que los explantes recién cortados deban ser sembrados inmediatamente en medio semisólido, teniendo en cuenta que si son sembrados directamente en medio líquido ocasionaría la lixiviación del material vegetal limitando el desarrollo del explante.

Los brotes obtenidos que logramos en el sistema de inmersión temporal fueron vigorosos con hojas cortas y gruesas de un color verde intenso, también se obtuvo yemas adventicias en proceso de diferenciación, la hiperhidricidad que afecta gravemente a los cultivos en medio líquido, no se presentó en presente trabajo.

Souza et al. (2010) consideran que los segmentos nodales de piña cultivados *in vitro* pueden servir como un modelo interesante para arrojar luz sobre la liberación de dominancia apical y la reentrada de células de meristemo axilar inactivo en el ciclo celular por decapitación de la yema apical y la consecuente formación de citocininas en las yemas axilares.

La mezcla de KIN y BAP fueron los principales factores de eficiencia que condicionaron el proceso organogénico directo de los explantes incrementando el número y longitud de brotes de piña puesto que, al inhibir la dominancia apical, activa el crecimiento de las yemas axilares (Davies, 2010).

En el sistema de inmersión temporal, Etienne & Berthouly (2002) mencionan que el material vegetal propagado por inmersión temporal puede desarrollarse mejor durante la fase de aclimatación que las plantas obtenidas en el medio semisólido y líquido.

En la figura 46, mostramos que la longitud de brotes en piña, se incrementa a medida que aumenta la concentración de kinetina, por lo que no debe considerarse a las cinetinas (KIN y BAP) solo como hormonas que sirve para la división celular, sino que también sirven para el alargamiento de los explantes y la dominancia apical.



Figura 46. Efecto de la mezcla de KIN y BAP en la longitud de brotes de piña.

4.3. Sistema de inmersión temporal

El sistema eléctrico del sistema de inmersión temporal mostrado en el anexo 15, y construido para el presente trabajo, permite la automatización del cultivo *in vitro*, y tiene la ventaja de ser fácilmente desarmable, con un peso aproximado de 5 kilos lo que permite que sea cómodamente transportable; el ruido que hace el equipo es de 90 decibelios.

En la micropropagación de plantas con el sistema de inmersión temporal varios investigadores mencionan que han logrado los mejores resultados que cuando utilizaron el medio de cultivo semisólido, por ejemplo Etienne & Berthouly, (2002) mencionan que los procedimientos en la micropropagación de plantas en medio de cultivo semisólido y líquido, son de una intensa laboriosidad debido al número de manipulaciones que implica y los costos de producción son relativamente altos, además para su aplicación se requiere un alto componente de mano de obra calificada, cuando se usa medio líquido para la micropropagación, varias estimaciones confirman grandes ganancias en la eficacia de la inmersión temporal. Los parámetros más involucrados en la reducción de costos de producción incluyen: (1) la drástica reducción en el trabajo; (2) reducción del área de estanterías; (3) reducción del número de contenedores utilizados; (4) mejores rendimientos biológicos; además según estos investigadores, el sistema de inmersión temporal reduce el tiempo de trabajo en la obtención de plantas, el área de estanterías, el número de contenedores utilizados y elimina la hiperhidricidad el cual es un desorden fisiológico ocasionado por la siembra de explantes en el medio líquido, causado principalmente por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos, este desorden fisiológico, es una limitante en la micropropagación, pues no permite el desarrollo normal de los explantes.

El sistema de inmersión temporal reduce los costos de producción hasta un 20 % menos frente al medio semisólido (Escalona et al., 1999)

El sistema de inmersión temporal permite obtener plantas mejor aclimatadas para el ambiente natural, que las producidas en los medios tradicionales: medio semisólido y líquido (Etienne & Berthouly, 2002).

Suman, (2017) plantea que los avances recientes en las técnicas de micropropagación han abordado parcialmente el factor de costo sin comprometer la calidad de las plantas producidas; en los países industrializados la mano de obra es el principal factor a tener en cuenta a la hora de reducir el costo de producción, por lo tanto se requiere un monitoreo constante de los costos de los insumos en términos de capital, químicos, energía, y trabajo para mejorar opciones sobre cómo se puede reducir el costo de producción, para lo cual según Tomar et al., (2008) es esencial adoptar medidas a fin de reducir el costo de producción por planta; esto requiere prácticas rentables y un uso óptimo de los materiales y equipos tales como el uso de sistema de inmersión temporal. Chu, (1995) postula que debido al costo creciente de la mano de obra en los países desarrollados, el sistema convencional de micropropagación (semisólido y líquido), ha sido desafiado por el costo de producción y la baja ganancia bruta, para lo cual se ha tenido que automatizar los sistemas de propagación, a fin de reducir los requisitos de mano de obra.

Según Chu, (1995) sostiene que al realizar de forma manual la micropropagación de plantas, se incrementa los riesgos de contaminación.

Se han reportado mejoras en los protocolos sistema de inmersión temporal previamente desarrollados para especies económicamente importantes, y esto continúa dando fe de sus beneficios en comparación con los protocolos que emplean medios semisólidos o líquidos (Watt, 2012).

El sistema de inmersión temporal no reemplaza el método convencional de micropropagación en agar y en líquido, más bien debe entenderse como una técnica complementaria de la micropropagación convencional, recomendándose su uso solamente en la etapa de multiplicación y elongación de brotes (FIA, 2016).

Los efectos positivos del sistema de inmersión temporal en la micropropagación están indicados para la proliferación de brotes y embriogénesis somática; la duración y la frecuencia de inmersión de los explantes en el medio de cultivo, es el parámetro más decisivo para la eficiencia del sistema; la optimización del volumen del medio de cultivo y el volumen del recipiente mejora la proliferación de los brotes y la calidad del material vegetal (Etienne & Berthouly, 2002).

La oxigenación del medio de cultivo es importante para evitar la oxidación y vitrificación en los explantes (FIA, 2016). La hiperhidricidad, que afecta gravemente a los cultivos en medio líquidos, puede eliminarse con el sistema de inmersión temporal, para lo cual se tiene que ajustar los tiempos de inmersión (Etienne & Berthouly, 2002). En piña se han utilizado los siguientes tiempos y frecuencias de inmersión: Blanco et al. (2011) utilizaron tiempos de inmersión de 30 minutos cada 12 horas. Escalona et al. (1999) usaron 2 minutos cada 3 horas, al igual que Silva et al., (2007); Alverca (2015) utilizó tiempos de inmersión de 4 minutos cada 4 horas. En el presente trabajo de investigación se utilizó tiempos de inmersión de 10 minutos con una frecuencia de dos horas, lográndose los mejores resultados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Con el tratamiento uno (T1): Murashige y Skoog más 1 miligramo de bencilaminopurina y 0,4 miligramos de kinetina se encontró el mayor número de brotes: 3 brotes por plántula, en sistema de inmersión temporal
2. Con el tratamiento tres (T3): Murashige y Skoog más 1 miligramo de bencilaminopurina y 1,6 miligramos de kinetina se obtuvo la mayor longitud: 1,19 cm por plántula, en sistema de inmersión temporal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, B. R., & Assmann, S. M. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant molecular biology*, 69(4), 451- 462.
- Aguiar, S. G. S., Gavilanes, L. E. R., Giler, E. V., y Castro, F. C. (2008). Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. *Revista Ciencia y Tecnología*, 1(1), 49-54.
- Akbar, M. A., Karmakar, B. K., & Roy, S. K. (2003). Callus induction and high-frequency plant regeneration of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. *Plant Tissue Cult*, 13(2), 109-116.
- Alverca, W. (2015). *Micropropagación de Ananas comosus (L.) merr. Cultivar MD-2 “Golden”, mediante un sistema de inmersión temporal*”. (tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Martín, Perú
- Arellano, Y., García, E. y Vázquez-Ramos, J. M. (2008). Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia*, 42 (6), 637-644.
- Arrocha, F., Guevara, C., Gonzalez, M., Rivas, F. y Delgado, R. (2019). Evaluación de filtros de carbón activado basado en cáscaras de frutas (piña, plátano, coco, naranja). *Revista De Iniciación Científica*, 5, 79-83.

- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Baraona, M., y Sancho, E. (1984). *Fruticultura especial (Fruticultura II)*. San José, Costa Rica. UNED.
- Basail, M., Medero, V., Martínez, M., Ventura, J. D. L. C., López, J., García, M. & Bauta, M. (2003). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la micropropagación de la yuca en Sistema de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 3(2), 93 – 96.
- Benezer-Benezer, M., Castro-Mercado, E & García-Pineda, E . (2008). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 56-61.
- Blanco, A., Vargas, T., y de García, Eva (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.
- Blanco, H. A., Vargas, T. E., y García de García, E. C. (2017). Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19, 7-20.
- Bhatnagar, A., Hogland, W., Marques, M., & Sillanpää, M. (2013). An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. *Chemical Engineering Journal*, 219, 499-511.

- Bari, R., & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology*, 69(4), 473-488.
- Biblioteca Agrícola Nacional de los Estados Unidos. (2018). Glossary of Agricultural Terms / Glosario de Términos Agrícolas. Baltimore: USDA.
- Bieto, J. A & Talón, M. (Eds.) (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Barcelona, España. Universitat de Barcelona. McGraw Hill.
- Bravo, I., Fernández, S., Alcalá de Marcano, D., y Gallardo, M. (1997). El cultivo de la piña en Venezuela (No. IICA-F01 13). Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay (Venezuela)-FONAIAP Centro de Investigaciones del Estado de Lara, Maracay (Venezuela) IICA, Maracay (Venezuela). Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria para la Subregión Andina-Prociandino.
- Cassells, A., & Curry, R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2-3), 145-157.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay.
- Chóez, G. Andrés, I. (2012). Aislamiento y cuantificación de trans-zeatina en bioinsumos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando como patrón desechos de maíz (*Zea mays*). Trabajo final para la obtención del título de: Ingeniero Químico. Guayaquil: Espol. FCNM. 70 p.

- Chu I. (1995). Economic analysis of automated micropropagation. In: Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L. (eds) Automation and environmental control in plant tissue culture. *Springer*, Dordrecht.
- Cortes, J. S. A., Godoy, J. A., Cortés, J. D. A., y Mora, R. M. S. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129.
- Concenço, G., Ferreira, E.A., Ferreira, F.A y Santos, J.B. (2007). Plasmodesmos: transporte simplástico de herbicidas na planta. *Planta Daninha* , 25 (2), 423-432.
- Davies, P.J. (2010) Las hormonas vegetales: su naturaleza, ocurrencia y funciones. En: Davies PJ (eds) *Plant Hormones*. Springer, 1-15.
- Delgado, H. (2004). Propagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr), utilizando yemas axilares. (tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Martín, Perú.
- De Bartolini, A. B. C., y Lallana, A. V. H. (1995). Términos comúnmente usados en cultivo de tejidos. Paraná, Argentina: UNER.
- Escobar, R. H., Caicedo, E., Auradela, L., Azcarate, A., Dorado, C., y Tohme, J. (2012). El cultivo *in vitro*: Otra manera de propagar la yuca: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Área de Investigación.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., & Borroto, C. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.

- Fichet, L.T. 2017. Biosíntesis de las Fitohormonas y Modo de Acción de los Reguladores de Crecimiento. Serie Nutrición Vegetal Núm. 92. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 6 p.
- Freire, M. (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195-209.
- Fundación para la Innovación Agraria. (2016). Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal: proyecto de innovación en Regiones Metropolitana, del Maule, del BíoBío y de Los Ríos.
- Gaillochot, C., & Lohmann, J. U. (2015). the never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*, 142(13), 2237-2249.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.
- García, M. B., y Tabarez, Y. S. (2008). Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación *in vitro* de ñame. *Biotecnología Vegetal*, 8(2).
- Guadalupe, R. 2016. Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetal. Guanajuato, MX. No.59.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Fred, T. D., & Geneve, R. L. 2013. Principles and practices of plant propagation. United States of America. Pearson.
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Islam, M.T. (2019). Plant tolerance to environmental stress: role of phytoprotectants. Boca Ratón: CRC Press.
- Hurtado, M; Merino, M. 1991. *Cultivo de tejidos vegetales*. México. Trillas. 232 p.

- Ibrahim, M. A., Al-Taha, H., y Seheem, A. A. (2013). Effect of cytokinin type and concentration, and source of explant on shoot multiplication of pineapple plant (*Ananas comosus*' Queen') *in vitro*/Ucinek vrst in koncentracij citokininov ter vira stebelnih izseckov na *in vitro* razmnozevanje ananas (*Ananas comosus* "Queen"). Acta agriculturae Slovenica, 101(1), 15.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria. (2019). *Manual de propagación in vitro de piña (Ananas comosus L. Merr.) var. MD-2 Golden utilizando biorreactores de inmersión temporal. (2 ed.)* Perú, San Martín: Estación Experimental Agraria el Porvenir.
- Isidró, M., Rosales, Y., Pifferrer, A., Cisneros, A., Benega, R., & Carvajal, C. (2003). Caracterización del germoplasma de piña colectado en Cuba mediante prospección nacional: I. Localización, diversidad genética y situación actual. Cultivos tropicales, 24(1), 65-71.
- Istiqomah, N., & Shofi, M. (2018). Response of Pineapple Callus (*Ananas comosus* Merr.) through *In-Vitro* Colchicines Treatment. Scientiae Educatia: Jurnal Pendidikan Sains, 7(1), 1-10.
- Jordán, M., Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y cinetinas. Squeo, F, A., & Cardemil, L. (eds.). Fisiología Vegetal, 1-28.
- Jha, P., Ochatt, S.J. & Kumar, V. WUSCHEL (2020). A master regulator in plant growth signaling. Plant Cell Rep 39, 431– 444.

- Kaya E., Galatali S., Guldag S., Celik O. (2020) A New Perspective on Cryotherapy: Pathogen Elimination Using Plant Shoot Apical Meristem via Cryogenic Techniques. In: Naseem M., Dandekar T. (eds) Plant Stem Cells. Methods in Molecular Biology, vol 2094. Humana, New York, NY.
- Kader, A. A., & Yahia, E. M. (2011). Postharvest biology of tropical and subtropical fruits. In Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. (pp. 79-111). Woodhead Publishing.
- Kessel, A. (2008). Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. Cultivos Tropicales, 29, 27-37.
- Kurepa J, Shull TE, Smalle JA. (2019). Antagonistic activity of auxin and cytokinin in shoot and root organs. Plant Direct. 3(2).
- Llanos, C. I. (2015). Micropropagación *in vitro* de piña, *Ananas comosus* (L.) Merr Var. MD2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Maldonado, E. R., de Francisco, L. R., Gómez, O. A., y Cerda, M. C. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. Cent. Agríc, 30, 69-72.
- Marca, C. E. (2017). *Fertilización mineral y biofertilización en piña (Ananas comosus L. Merr.) cv. "Golden" en Río Negro (Satipo)*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

- Matosevich, R., Cohen, I., Gil-Yarom, N., Modrego, A., Friedlander-Shani, L., Verna, C., Scarpella, E & Efroni, I. (2020). Local auxin biosynthesis is required for root regeneration after wounding. *Nat. Plants* 6, 1020–1030.
- Megino, L. V., y González, C. I. (2005). La termoterapia aplicada al cultivo del ajo. *Agricultura: Revista agropecuaria*, (880), 866-869.
- Méndez-Álvarez, D., & Abdelnour-Esquivel, A. (2014). Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(27), 7-21.
- Mercier, H., Souza, B. M., Kraus, J. E., Hamasaki, R. M., y Sotta, B. (2003). Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiology*, 15(2), 107-112.
- 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, 3(1): 7-11.
- Mishra, B.B. y Gautam, S. (2016). Polifenol oxidasas: caracterización bioquímica y molecular, distribución, papel y su control. *Ingeniería de enzimas*, 5 (1), 141-149.
- Mogollón, N., Díaz, J. C., y Hernández, N. (2004). Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. “Queen Australia”. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 21(1), 15-21.
- Morante, J., Agnieszka-Obrebska, A., Bru-Martínez, R., Carranza, M., Pico-Saltos, R., y Nieto Rodríguez, E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*. 7(1): 23-31.

- Munive, L. (2015). *Producción del cultivo de Piña cv. Golden en la Selva Central Mazamari-Satipo* (Junín). Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Mao, Q., Chen, C., Xie, T., Luan, A., Liu, C., y He, Y. (2018). Comprehensive tissue-specific transcriptome profiling of pineapple (*Ananas comosus*) and building an eFP-browser for further study. *PeerJ*, 6, e6028.
- Odilo, D. (2019). Análisis de los diversos factores que inciden en la productividad de la fruticultura: Caso Perú. Santiago de Chile. Cieplan. Recuperado de <https://www.cieplan.org/wp-content/uploads/2019/09/PAPER-ODILIO-DUARTE.pdf>
- Pais, A. K., da Silva, A. P., de Souza, J. C., Teixeira, S. L., Ribeiro, J. M., Peixoto, A. R., y da Paz, C. D. (2016). Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology* 15(36), 1995-1998.
- Panta, A., y Golmirzaie, A. (1997). Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos con fines de producción de semilla de papa. Producción de tubérculos-Semillas de Papa. Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP). Fasc., 4, 1-8.
- Pérez, M. B., Vega, V. M., Martín, J. D. L. C. V., Gálvez, E. O., Delgado, M. T., Torres, J. L., y García, Y. B. (2012). Multiplicación del clon de banano 'FHIA-18'(AAAB) en sistema de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 8-19.
- Pichis-Palcazu, P. E. (2010). *Manual de Piña*. Proyecto Mejoramiento de la producción del Cultivo de la Piña Mediante Sistemas Agroforestales en el Distrito de Perené-Chanchamayo. Perú.

- Pineda, A., Vargas, T.E., Escala, M., y de García, E. (2012). Organogénesis *in vitro* en piña “Española Roja” y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro*, 24(3), 175-186.
- Reinhardt, D. H. R., Bartholomew, D. P., Souza, F. V. D., Carvalho, A. C. P. P. D., Pádua, T. R. P. D., Junghans, D. T., & Matos, A. P. D. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(6).
- Rivas, M. A. M., Mosquera, H. R. M., y Medina, C. L. A. (2014). Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de tres cultivares de piña *Ananas comosus* (L. Merr.) del Chocó, Colombia. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 4(2), 133-140.
- Roca, W. M., y Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*: CIAT.
- Rodríguez, R., Becquer, R., Pino, Y., López, D., Rodríguez, R. C., Lorente, G. Y., y González, J. L. (2016). Producción de frutos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) MD-2 a partir de vitroplantas. *Cultivos Tropicales*, 37, 40-48.
- Rodríguez, M., y Morales, D. (2015). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 31- 40. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>.
- Rose, R. J. (2017). *Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells*. CRC Press.

- Salisbury, F., y Ross, C. (2000). *Fisiología de las plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Paraninfo. Thompson Learning. Cap 16. 812 p.
- Schmülling, T., Schäfer, S., & Romanov, G. (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 505-519.
- Scheidt, G.N., Arakaki, A. H., Chimilovski, J. S., Portella, A., Caeser Franke, Spier, Michele, R., Woiciechowski, A. L., Biasi, L. A & Soccol, C. R. (2009). Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. Brazilian Archives of Biology and Technology 52 (spe), 37-43.
- Sifuentes, E., Albuja, E., Contreras, S., León, C., Moreyra, J., y Santa María, J. (2016). Anuario estadístico de la producción agrícola y ganadera 2015. In: Lima, Perú: MINAGRI.
- Silva, A. B. D., Pasqual, M., Teixeira, J. B., Araújo, A. G. D. (2007). Micropropagation methods of pineapple. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(9), 1257-1260.
- Souza, B.M., Molfetta-Machado, J.B., Freschi, L., Figueira, A., Purgatto, E., et al. Buckeridge, M.S., Van Sluys, M.A., & Mercier, H. 2010. Axillary bud development in pineapple nodal segments correlates with changes on cell cycle gene expression, hormone level, and sucrose and glutamate contents. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 46, 281–288.
- Su, YH., Liu, YB y Zhang, XS (2011). Auxin–Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Planta molecular*, 4 (4).
- Suarez, I. E., y Quintero, I. R. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemas pre-existentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1).

- Suman, S. (2017). Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch*, 17(1), 1-26.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* 45: 1028–1036; 2006.
- Tomar, U.K., Negi, U., Sinha, A. K., y Dantu, P.K. (2008). An Overview of the Economic Factors Influencing Micropropagation. Arid Forest Research Institute, India. 13 p.
- Tovar, J. A. (2016). Algunas características fisiológicas de plantas de vid variedad Pedro Ximénez en el proceso de aclimatación al exterior tras su propagación *in vitro*. (tesis de pregrado). Universidad de Sevilla. España.
- Uriza, A. (2011). Programa Estratégico para el Desarrollo Rural Sustentable de la Región Sureste de México: Trópico Húmedo. Paquete Tecnológico Piña MD2 (*Ananas comosus* var. *comosus*). Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental Cotaxtla/Papaloapan. Isla, Veracruz.
- Ventura, H. (2018). *Efecto de la citocinina y auxina en la organogénesis directa in vitro de Ananas Comosus L. Merr, var. "Roja Trujillana"*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
- Wang, Q. C., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M., & Valkonen, J. P. T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology*, 154(3), 351-363.

- Wang, M. L., Uruu, G., Xiong, L., He, X., Nagai, C., Cheah, K. T & Moore, P. H. (2009). Production of transgenic pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(2), 112-121.
- Watt, M. P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035.
- Yancheva, S., Georgieva, L., Badjakov, I., Dincheva, I., Georgieva, M., Georgiev, V., y Kondakova, V. (2019). Application of bioreactor technology in plant propagation and secondary metabolite production. *Journal of Central European Agriculture*, 20(1), 321-340.
- Zaid, A; Hughes, H; Porceddu, E; Nicholas, F. 2004. Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia.
- Zuraida, A. R., Shahnadz, A. N., Harteeni, A., Roowi, S., Radziah, C. C., y Sreeramanan, S. (2011). A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3859-3866.

ANEXOS

Anexo 1

Los componentes del medio de cultivo utilizados en presente trabajo experimental, para la micropropagación de piña se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes del medio de cultivo para la micropropagación de piña

	mg L ⁻¹
SALES	
Nitrato de amonio	1650
Ácido bórico	6,2
Cloruro de calcio (anhidro)	332,2
Hexahidrato de cloruro de cobalto	0,025
Sulfato cúprico pentahidratado	0,025
Disodio EDTA dihidratado	37,26
Sulfato de magnesio (anhidro)	180,70
Sulfato de manganeso monohidratado	16,9
Yoduro de potasio	0,83
Nitrato de potasio	1900
Fosfato de potasio monobásico	170
Clorhidrato de piridoxina	0,5
Molibdato de Sodio dihidratado	0,25
Clorhidrato de tiamina	0,1
Sulfato de zinc heptahidratado	8,60
VITAMINAS	
Tiamina	1
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
Myo-inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
REGULADORES DE CRECIMIENTO	
Bencilaminopurina	1
Kinetina	0,4; 0,8 y 1,6
OTRO AGREGADO	
Sacarosa	30 g·L ⁻¹
AGAR	6 g·L ⁻¹

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión temporal: 11 de diciembre del 2020.

Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 16 de diciembre 2019.

Tabla 6. Resultados de la primera semana

TRATAMIENTO		N ^{ro} DE SEGMENTO EVALUADO					
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{to}
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	1	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,3	0	0	0	0	0
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	0	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0	0	0	0	0	0
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	0	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0	0	0	0	0	0

Anexo 3

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión temporal: 11 de diciembre del 2020. Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 23 de diciembre 2019.

Tabla 7. Resultados de la segunda semana

TRATAMIENTO		N ^{ro} DE SEGMENTO EVALUADO					
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{ro}
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	1	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,4	0	0	0	0	0
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	0	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0	0	0	0	0	0
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	0	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0	0	0	0	0	0

Anexo 4

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad

Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión

temporal: 11 de diciembre del 2020. Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 30 de diciembre

2019.

Tabla 8. Resultados de la tercera semana

TRATAMIENTO		N ^{ro} DE SEGMENTO EVALUADO					
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{to}
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	1	0	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,9	0	0,3	0		0
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	1	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,2	0	0	0	0	0
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	1	1	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,9	0,7	0,5	0	0	0

Anexo 5

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad

Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión

temporal: 11 de diciembre del 2020. Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 6 de enero 2020

Tabla 9. Resultados de la cuarta semana

TRATAMIENTO		N ^{ro} DE SEGMENTO EVALUADO					
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{ro}
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	1	0	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	1	0	0,6	0	0	0
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	1	0	0	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,5	0	0	0	0	0
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	1	1	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	1,1	0,1	1,2	0	0	0

Anexo 6

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión temporal: 11 de diciembre del 2020.

Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 12 de enero 2020.

Tabla 10. Resultados de la quinta semana

TRATAMIENTO		Nro DE SEGMENTO EVALUADO					
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{ro}
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	1	2	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	1	2	1	0	0	0
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	1	2	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	1	2	1	0	0	0
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	1	2	1	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	1,4	0,5	0,5	0	0	0

Anexo 7

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión temporal: 11 de diciembre del 2020.

Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 19 de febrero 2020.

Tabla 11. Resultados de la sexta semana

TRATAMIENTO		N ^{ro} DE SEGMENTO EVALUADO						
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{ro}	
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	2	2	1	0	0	0	
	Longitud de brotes (cm)	0,8	0,2	1,4	0	0	0	
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	1	1	4	0	0	0	
	Longitud de brotes (cm)	1	0,2	0,3	0	0	0	
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	1	1	2	0	0	0	
	Longitud de brotes (cm)	2	1,5	0,9	0	0	0	

Anexo 8

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad "Golden"

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión temporal: 11 de diciembre del 2020.

Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 26 de febrero 2020.

Tabla 12. Resultados de séptima semana

TRATAMIENTO		N ^o DE SEGMENTO EVALUADO					
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{ro}
T1	N ^o de brotes/ explante	6	0	4	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,23	0	0,2	0	0	0
T2	N ^o de brotes/ explante	4	1	4	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	0,63	0,4	0,48	0	0	0
T3	N ^o de brotes/ explante	1	1	4	0	0	0
	Longitud de brotes (cm)	3	2	0,53	0	0	0

Anexo 9

CARTILLA DE EVALUACIÓN EN *Ananas comosus* L. Merr, variedad “Golden”

Lugar: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad

Nacional de Cajamarca. Fecha de instalación y funcionamiento del sistema de inmersión

temporal: 11 de diciembre del 2020.

Evaluador: Ventura Chilón Homero. Fecha: 4 de marzo 2020.

Tabla 13. Resultados de octava semana

TRATAMIENTO	N ^{ro} de	N ^{ro} DE SEGMENTO EVALUADO						TOTAL
		1 ^{ro}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{ro}	
T1	N ^{ro} de brotes/ explante	5	6	2	0	0	4	3
	Longitud de brotes (cm)	0,16	0,23	0,3	0	0	0,2	0,15
T2	N ^{ro} de brotes/ explante	1	4	1	1	3	4	2
	Longitud de brotes (cm)	0,1	0,63	0,15	0,4	0,23	0,48	0,46
T3	N ^{ro} de brotes/ explante	1	1	1	1	1	4	2
	Longitud de brotes (cm)	0,2	3	0,8	2	0,6	0,53	1,19



Figura 47. Laboratorio de Microbiología.



Figura 48. Cámara de bioseguridad.

Anexo 11

En la figura 49, se puede apreciar diferentes respuestas de los explantes, sembrados en el mismo medio de cultivo semisólido y líquido, el cual estuvo compuesto por MS + 8 mg·L⁻¹ KIN y 2 mg·L⁻¹ BAP, en el medio semisólido los explantes se mostraron vigorosos con un color verde intenso, mientras que en el medio líquido del sistema de inmersión temporal los explantes se necrosaron y otros murieron, es por eso que en el sistema de inmersión temporal se tiene que reducir la concentración de las cinetinas para evitar la muerte de los explantes de piña a niveles de 1 mg·L⁻¹ de BAP mezclado con 0,4; 0,8 y 1,6 mg·L⁻¹ de KIN

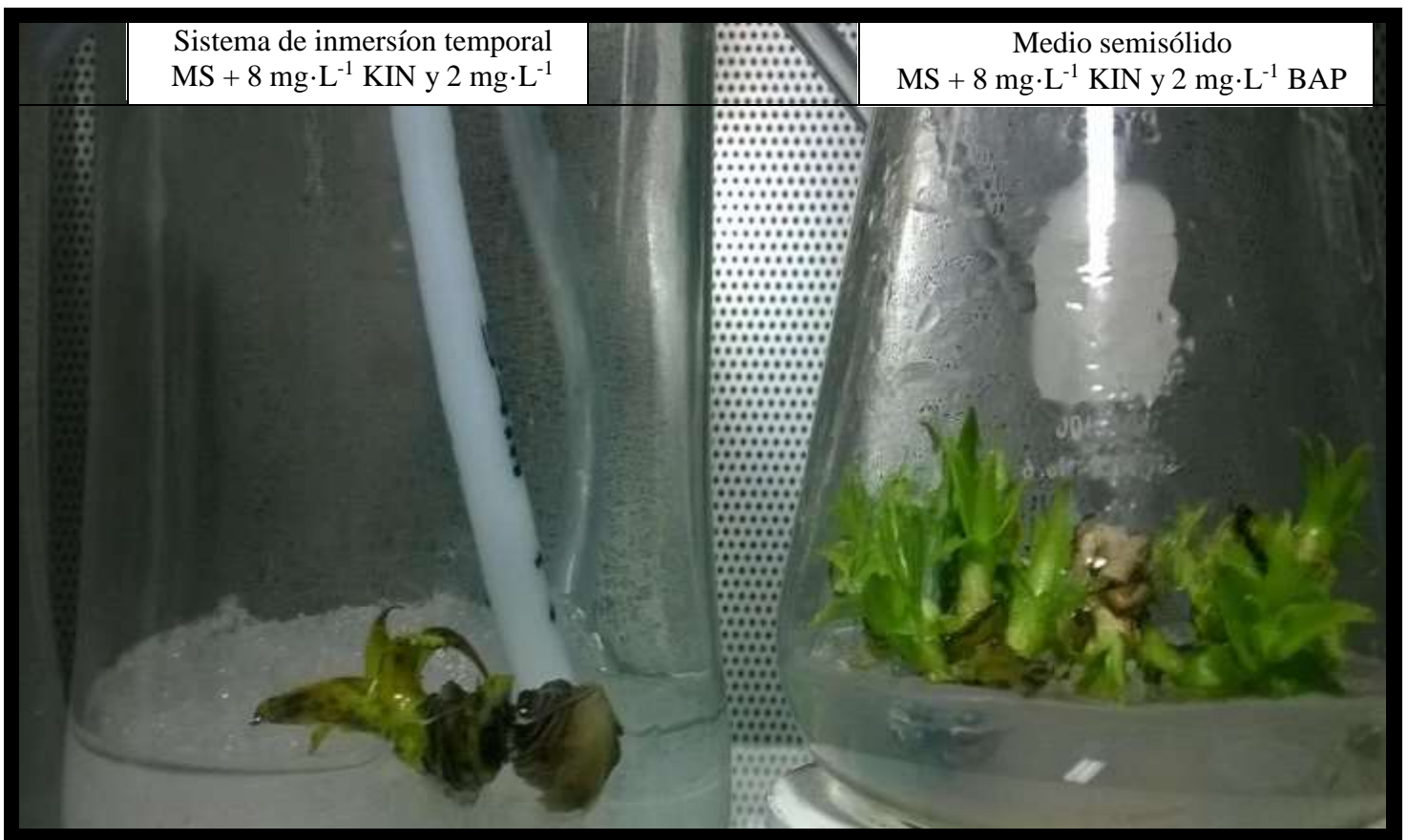


Figura 49. Medio de cultivo líquido y semisólido.

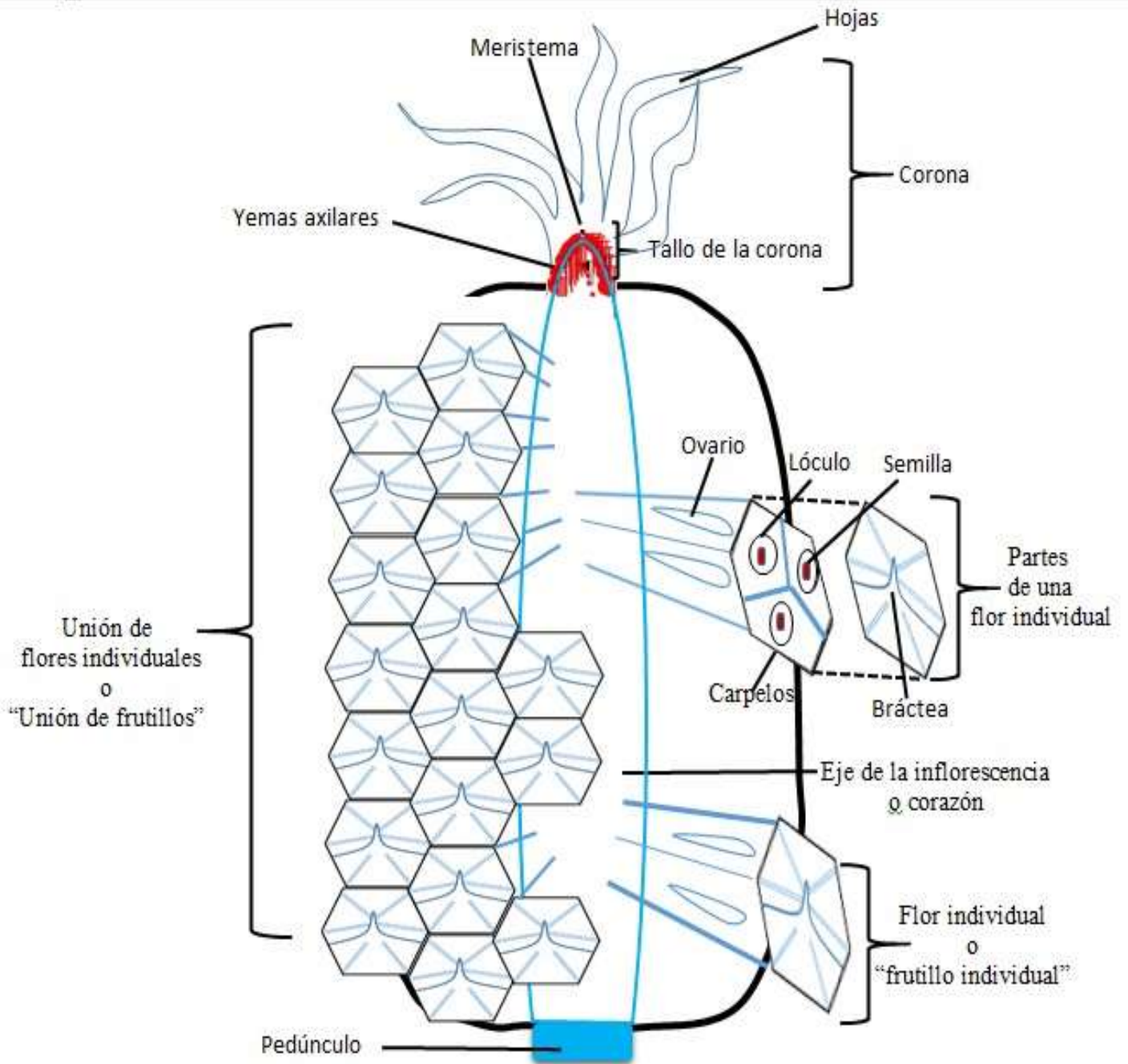


Figura 50. Sorosis en piña.



Figura 51. Temporizadores digitales



Figura 52. Compresores de aire



Figura 53. Válvulas solenoides.

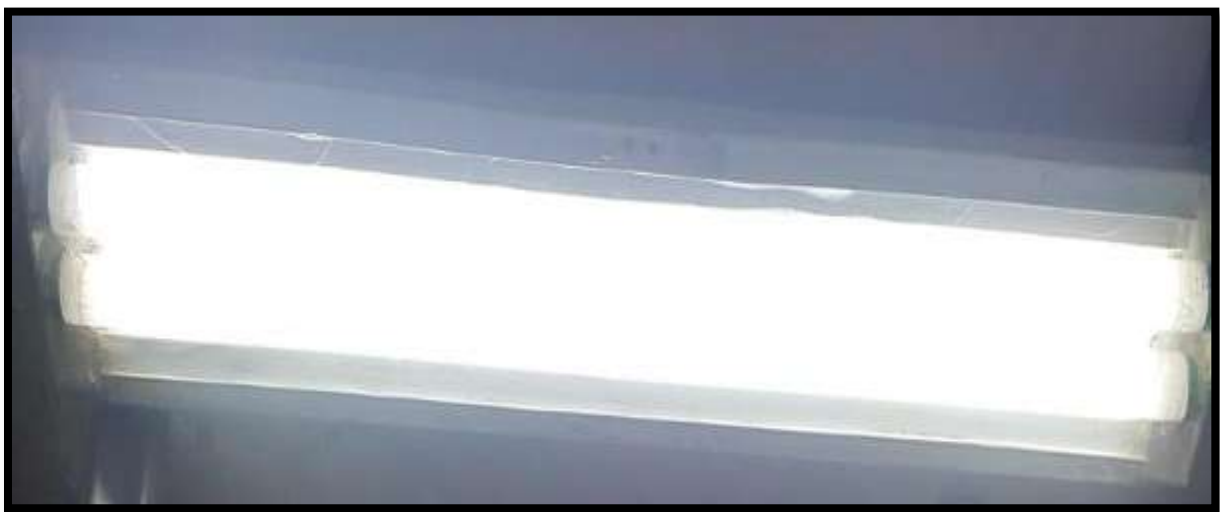


Figura 54. Lámparas incandescentes



Figura 55. Parte eléctrica del sistema de inmersión temporal



Figura 56. Filtros de venteo Acro ® 50 de 0,2 µm politetrafluoroetileno (PTFE).



Figura 57. Peachímetro.



Figura 58. Autoclave.



Figura 59. Medio Murashigue & Skoog, KIN y BAP.

Tabla 14. Registro de temperatura y humedad relativa

Fases de establecimiento y multiplicación					
Fecha	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Fecha	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
16/12/19	24,1	49,0	15/01/20	31,0	37,0
17/12/19	25,6	52,0	16/01/20	32,0	34,0
18/12/19	25,7	51,0	17/01/20	33,0	42,0
19/12/19	25,1	49,0	18/01/20	28,1	45,0
20/12/19	24,8	55,0	19/01/20	28,0	48,0
21/12/19	25,3	53,0	20/01/20	29,8	44,0
22/12/19	25,9	55,0	21/01/20	28,0	46,0
23/12/19	27,8	53,0	22/01/20	29,0	43,0
24/12/19	25,9	56,0	23/01/20	30,3	45,0
25/12/19	25,5	55,0	24/01/20	32,0	38,0
26/12/19	26,6	57,0	25/01/20	32,0	40,0
27/12/19	26,3	53,0	26/01/20	30,5	35,0
28/12/19	24,9	51,0	27/01/20	34,0	41,0
29/12/19	27,5	50,0	28/01/20	31,8	48,0
30/12/19	25,8	54,0	29/01/20	29,5	46,0
31/12/19	25,8	48,0	30/01/20	30,5	42,0
01/01/20	26,6	50,0	31/01/20	33,0	39,0
02/01/20	27,9	47,0	01/01/20	28,7	50,0
03/01/20	31,7	48,0	02/01/20	25,5	48,0
04/01/20	30,9	43,0	03/01/20	23,6	55,0
05/01/20	28,4	52,0	04/01/20	29,4	43,0
06/01/20	32,5	40,0	05/01/20	25,7	56,0
07/01/20	33,5	39,0	06/01/20	31,0	39,0
08/01/20	31,5	39,0	07/01/20	32,5	39,0
09/01/20	30,5	40,0	08/01/20	33,5	40,0
10/01/20	30,8	43,0	09/01/20	31,5	43,0
11/01/20	31,0	40,0	10/01/20	29,4	38,0
12/01/20	33,3	40,0	11/01/20	29,7	43,0
13/01/20	28,3	38,0	12/01/20	27,8	51,0
14/12/15	27,6	51,0	12/01/20	31,8	52,0