

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



**EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE  
MICROPROPAGACIÓN MASAL EN PIÑA (*Ananas comosus*  
L. Merr.) VARIEDAD GOLDEN**

**POR:**

**JENNY XIOMARA ÁNGEL MOLINA  
JORGE JOSÉ GONZÁLEZ CABRERA**

**SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2013**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**



**EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE  
MICROPROPAGACIÓN MASAL EN PIÑA (*Ananas comosus*  
L. Merr.) VARIEDAD GOLDEN**

**POR:**

**JENNY XIOMARA ÁNGEL MOLINA  
JORGE JOSÉ GONZÁLEZ CABRERA**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2013**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

**ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO**

**SECRETARIA GENERAL**

**DRA. ANA LETICIA ZAVALETA DE AMAYA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DECANO**

**ING. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA**

**SECRETARIO**

**ING. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**ING. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA**

---

**DOCENTES DIRECTORES**

**ING. MARIO ANTONIO ORELLANA NÚÑEZ**

---

**ING. CARLOS ROBERTO ARÉVALO ALVARADO**

---

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN**

**ING. MARIO ANTONIO BERMÚDEZ MÁRQUEZ**

---

## RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), de octubre de 2012 a julio de 2013. El objetivo fue evaluar dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden, para mejorar la propagación del material genético y la calidad de las plantas. Se seleccionaron brotes de piña *in vitro*, en fase de multiplicación; cultivados en medio semisólido, con una longitud promedio de 2 cm y un peso fresco promedio de 0.30 g. Se utilizó medio de cultivo semisólido y líquido para las fases de multiplicación y enraizamiento, conformados por las sales de MS suplementado con BAP (1 mg.l<sup>-1</sup>), y AIB (1 mg.l<sup>-1</sup>) respectivamente. En el medio semisólido, se utilizaron 60 frascos de 100 ml y para el Sistema de Inmersión Temporal, se utilizaron 48 frascos de 400 ml. Se trabajó con un nivel de significancia de ( $p \leq 0.05$ ), y se aplicó la prueba de separación de medias. En la fase de multiplicación, el medio semisólido, generó los mayores pesos frescos promedios de brotes, de 215.10 g; también produjo un mayor número promedio de brotes por explante de 17.60, y el Sistema de Inmersión Temporal con 10 minutos de inmersión, generó las mayores longitudes promedios de brotes de 2.52 cm. En la fase de enraizamiento, el Sistema de Inmersión Temporal, con 10 minutos de inmersión, presentó la mayor longitud promedio de explantes de 6.43 cm; también generó la mayor longitud promedio de raíz de 2.15 cm y produjo el mayor número promedio de raíces por explante de 6.83. Para la fase de aclimatación *ex vitro*, el Sistema de Inmersión Temporal, con 10 minutos de inmersión, presentó las mayores longitudes promedios de explantes de 8.80 cm; además produjo la mejor longitud promedio de raíces de 2.22 cm, y generó un mayor número promedio de raíces por vitroplanta, de 6.90. Al finalizar esta fase, se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 100% para todos los tratamientos, y la mejor relación Beneficio-Costo lo presentó el Sistema de Inmersión Temporal, con 5 minutos de inmersión.

**Palabras clave:** SIT (Sistema de Inmersión Temporal), micropropagación masal, BAP (Bencilaminopurina), AIB (Acido Indól Butírico), MS (Murashige & Skoog), medio de cultivo semisólido, medio de cultivo líquido.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo a Dios todo poderoso, por permitirme lograr mis metas y brindarme la sabiduría y fortaleza para no rendirme ante las adversidades.

A mi padre Ángel Portillo, que me ha brindado todo su apoyo incondicional a través de su esfuerzo diario.

A los docentes directores Ing. Agr. M.Sc. Mario Antonio Orellana Núñez e Ing. Agr. Carlos Roberto Arévalo Alvarado por el aporte de sus conocimientos y por su colaboración para el desarrollo y finalización de esta investigación.

Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) por brindarnos sus instalaciones para la ejecución de la investigación.

A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología por brindarnos su valiosa colaboración en el desarrollo de la investigación.

A mi compañero de tesis Jorge José González Cabrera por tomar este desafío a mi lado.

A mis familiares y amigos por ser parte importante de este logro.

**Jenny Xiomara Ángel Molina**

*“Bendice, alma mía, a Jehová,  
y no olvides ninguno de sus  
beneficios”*

**Salmo 103:2**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Dios por prestarme estos años de vida con gran gozo y buena salud, también por brindarme la sabiduría y el entendimiento que me capacitó para reflexionar y lograr el discernimiento de la verdad, lo bueno y lo malo. Logrando finalmente el desarrollo del buen juicio y del sentido común, los cuales me ayudaron a culminar una etapa más de mi vida.

A mi padre Jorge González por su infinito apoyo moral e incondicional, por ser un padre responsable "cabeza de hogar" y digno de ser el ejemplo de hombre a seguir en mi vida. Gracias a él aprendí a estar atento cada día ya que la vida siempre nos espera con nuevos retos y complejidades, pero al enfrentarlos con serenidad, paciencia y perseverancia se pueden lograr los frutos deseados por más duras que sean las adversidades.

A mi madre por traerme a la vida y que a pesar de la distancia siempre está presente para brindarme su gran apoyo moral e incondicional. Gracias a ella aprendí que los sacrificios que se hacen en la vida al final si valen la pena y que todo lo bueno cuesta.

A mis hermanos que a pesar de la distancia siempre están presentes proporcionando su apoyo moral e incondicional.

A los docentes directores Ing. Agr. M.Sc. Mario Antonio Orellana Núñez y al Ing. Agr. Carlos Roberto Arévalo Alvarado por ser muy finos de su parte en compartir sus conocimientos y en guiarnos en el desarrollo de la investigación.

Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) por prestarnos sus instalaciones para el establecimiento de la investigación.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología del CENTA por capacitarnos para un adecuado uso de los equipos e instalaciones.

A mi compañera de tesis Jenny Ángel por haber finalizado conmigo este reto académico.

A todos mis familiares y amigos que incidieron para la realización de este sueño.

**Jorge José González Cabrera**

*"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo, y no en el resultado. Un esfuerzo*

*total es una victoria completa”*

**Mahatma Gandhi**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida y las fuerzas para poder llegar a culminar una etapa de mi vida.

A mi padre Ángel Portillo.

A los demás familiares y amigos por todo su apoyo incondicional.

**Jenny Xiomara Ángel Molina**

A Dios.

A mis padres Jorge González e Irene Cabrera.

A mis hermanos Denys González y Alejandro González.

A mis abuelos, tíos, primos, cuñadas y a todos los demás familiares y amigos que de alguna u otra forma me brindaron todo su apoyo moral y de forma incondicional.

**Jorge José González Cabrera**

## Índice General

Contenido	Pág.
Resumen.....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatoria.....	vi
Índice general.....	viii
Índice de cuadros.....	xii
Índice de figuras.....	xiv
Índice de anexos.....	xvi
Abreviaturas.....	xvii
Glosario.....	xvii
1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	3
2.1 Características generales de la especie.....	3
2.1.1 Origen y distribución.....	3
2.1.2 Taxonomía y descripción botánica.....	3
2.2 Propiedades y usos.....	5
2.3. Cultivo <i>In vitro</i> .....	5
2.3.1. Generalidades.....	5
2.3.2. Técnicas que se utilizan para la micropropagación de plantas.....	6
2.3.2.1. Cultivo de órganos.....	6
2.3.2.1.1. Cultivo de segmento de hojas.....	6

2.3.2.1.2. Cultivo de anteras o polen.....	7
2.3.2.1.3. Cultivo de flor.....	7
2.3.2.1.4 Cultivo de sarcocarpio o albumen.....	7
2.3.2.2. Cultivo de meristemos.....	7
2.3.2.3. Cultivo de callos.....	8
2.4. Medios de cultivo.....	8
2.4.1. Cultivo en medio semisólido.....	8
2.4.2. Cultivo en medio líquido.....	8
2.4.3. Componentes de medio de cultivo.....	9
2.4.3.1. Nutrientes minerales.....	9
2.4.3.2. Vitaminas.....	9
2.4.3.3. Sustancias reguladoras de crecimiento.....	9
2.4.3.4. Fuente de carbono.....	10
2.4.3.5. Agua.....	10
2.4.3.6. Agente gelificante.....	10
2.4.3.7. pH.....	10
2.5. Etapas de micropropagación clonal <i>in vitro</i> .....	10
2.5.1. Etapa 0. Preparación del material vegetal.....	11
2.5.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico.....	11
2.5.3. Etapa 2: Multiplicación.....	11
2.5.4. Etapa 3: Desarrollo.....	11
2.5.5. Etapa 4: enraizamiento.....	12

2.5.6. Etapa 5: Aclimatación de las plántulas enraizadas.....	12
2.6 Factores físicos que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> .....	13
2.6.1. Luz.....	13
2.6.2. Temperatura.....	13
2.6.3. Humedad relativa.....	13
2.7. Sistemas de Inmersión Temporal.....	14
2.7.1. Origen.....	14
2.7.2. Fundamentos fisiológicos del éxito de los Sistemas de Inmersión Temporal.....	14
2.7.3. Funcionamiento.....	15
2.7.4. Usos.....	15
2.8. Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> mediante el SIT.....	16
2.8.1. Frecuencia y tiempo de inmersión.....	16
2.8.2. La aireación.....	17
2.8.3. Turbulencia.....	17
2.8.4. Volumen y renovación del medio líquido.....	18
2.8.5. Acumulación de biomasa.....	18
2.9. Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal.....	19
2.10. Principales problemas en el Sistema de Inmersión Temporal.....	19
2.10.1. Hiperhidricidad o Vitrificación.....	19
2.10.2. Variación somaclonal.....	20
2.10.3. Mantenimiento de la asepsia.....	20

2.11. Estudios de cultivo <i>in vitro</i> de la piña.....	21
3. Materiales y métodos.....	23
3.1. Localización.....	23
3.2. Instalaciones.....	23
3.3. Materiales y equipo.....	23
3.3.1. Material vegetativo.....	23
3.3.2. Descripción de los métodos de micropropagación utilizados.....	24
3.3.2.1. Sistema de Inmersión Temporal.....	24
3.3.2.2. Método convencional.....	25
3.4. Metodología de laboratorio.....	25
3.4.1. Fase de multiplicación.....	25
3.4.1.1. Método convencional de multiplicación <i>in vitro</i> .....	26
3.4.1.2. Método de Sistema de Inmersión Temporal (SIT).....	26
3.4.1.3. Medio de cultivo para multiplicación. ....	26
3.4.1.4. Siembra de explantes para multiplicación.....	26
3.4.2. Fase de desarrollo.....	27
3.4.3. Fase de enraizamiento.....	27
3.5 Metodología de vivero.....	27
3.5.1. Fase de aclimatación para ambos métodos.....	27
3.6. Metodología estadística.....	28
3.6.1. Factor en estudio.....	28
3.6.2. Diseño estadístico.....	28

3.6.3. Prueba estadística.....	28
3.6.4. Variables evaluadas en las diferentes fases.....	29
3.6.5. Modelo matemático.....	29
3.7. Metodología económica.....	30
4. Resultados y discusión.....	31
4.1. Fase de multiplicación.....	31
4.1.1. Peso fresco promedio de brotes (g).....	31
4.1.2. Número promedio de brotes por explante.....	32
4.1.3. Longitud promedio de brotes (cm).....	33
4.2. Fase de desarrollo.....	36
4.3. Fase de enraizamiento.....	36
4.3.1. Longitud promedio de explantes (cm).....	36
4.3.2. Longitud promedio de raíz (cm).....	37
4.3.3. Número promedio de raíces.....	38
4.4. Fase de aclimatación.....	42
4.4.1. Longitud promedio de explantes (cm).....	42
4.4.2. Longitud promedio de raíz (cm).....	43
4.4.3. Número promedio de raíces.....	44
4.4.4. Porcentaje de sobrevivencia (%).....	45
4.5. Análisis económico.....	47
4.5.1. Fase de multiplicación.....	48
4.5.2. Fase de desarrollo.....	51

4.5.3. Fase de enraizamiento.....	54
5. Conclusiones.....	58
6. Recomendaciones.....	59
7. Bibliografía.....	60
8. Anexos.....	64

## Índice de Cuadros

En el texto	Pág.
Cuadro 1. Plano de distribución de los tratamientos en cada repetición en el laboratorio.....	30
Cuadro 2. Análisis de varianza para la variable independiente peso fresco promedio inicial de brotes (g).....	31
Cuadro 3. Análisis de varianza para la variable peso fresco promedio de brotes (g).....	32
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable número promedio de brotes por explante.....	33
Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable longitud promedio de brotes (cm).....	34
Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable longitud promedio de explantes (cm).....	37
Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable longitud promedio de raíz (cm)...	38
Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable número promedio de raíces.....	39
Cuadro 9. Análisis de Varianza para la variable longitud promedio de explantes (cm).....	42
Cuadro 10. Análisis de Varianza para la variable longitud promedio de raíz (cm)...	43
Cuadro 11. Análisis de Varianza para la variable número promedio de raíces.....	44
Cuadro 12. Análisis de presupuesto parcial para la fase de multiplicación mediante dos métodos de micropropagación masal en piña ( <i>Ananas comosus</i> L. Merr.) variedad Golden.....	49
Cuadro 13. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de multiplicación.....	50
Cuadro 14. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de multiplicación.....	50

Cuadro 15.	Análisis de presupuesto parcial para la fase de desarrollo mediante dos métodos de micropropagación masal en piña ( <i>Ananás comosus</i> L. Merr.) variedad Golden.....	51
Cuadro 16.	Presupuesto parcial de beneficio neto para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de desarrollo.....	52
Cuadro 17.	Presupuesto parcial de beneficio neto para el T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de desarrollo.....	52
Cuadro 18.	Análisis de presupuesto parcial para la fase de enraizamiento mediante dos métodos de micropropagación masal en piña ( <i>Ananás comosus</i> L. Merr.) variedad Golden.....	54
Cuadro 19.	Presupuesto parcial de beneficio neto para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de enraizamiento.....	54
Cuadro 20.	Presupuesto parcial de beneficio neto para el T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de enraizamiento.....	54

## Índice de Figuras

En el texto	Pág.
Figura 1. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable peso fresco promedio de brotes (g). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	32
Figura 2. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable número promedio de brotes por explante. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	33
Figura 3. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de brotes (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	34
Figura 4. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de explantes (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	37
Figura 5. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de raíz (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	38
Figura 6. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable número promedio de raíces (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	39
Figura 7. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de explantes (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	43
Figura 8. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de raíz (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	44

Figura 9.	Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable número promedio de raíces (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	45
Figura 10.	Efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en el cien por ciento de sobrevivencia. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	46
Figura 11.	Beneficios netos de los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) para la fase de multiplicación. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	51
Figura 12.	Beneficios netos de los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) para la fase de desarrollo. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	53
Figura 13.	Beneficios netos de los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) para la fase de enraizamiento. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.....	55

## Índice de Anexos

	Pág.
Cuadros.	
Cuadro A-1. Línea de producción de cultivo de piña desde la fase de laboratorio de cultivo de tejidos hasta el establecimiento en campo.....	64
Cuadro A-2. Principales países productores de piña.....	65
Cuadro A-3. Composición de cinco medios nutritivos básicos (MB) para el cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	66
Cuadro A-4. Rangos de concentraciones de macro y micro elementos empleados en medios de cultivo <i>in vitro</i> .....	67
Cuadro A-5. Base de datos del programa informático SAS para la fase de multiplicación.....	68
Cuadro A-6. Base de datos del programa informático SAS para la fase de enraizamiento.....	71
Cuadro A-7. Base de datos del programa informático SAS para la fase de aclimatación.....	73
Cuadro A-8. Análisis de presupuesto parcial para la fase de aclimatación de la investigación titulada evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña ( <i>Ananás comosus</i> L. Merr.) variedad Golden.....	76
Figuras.	
Figura A-1. Municipios productores de piña en El Salvador.....	76
Figura A-2. Distribución de especies del género <i>Ananas</i> .....	77
Figura A-3. <i>Ananas comosus</i> .....	78
Figura A-4. Técnicas que se utilizan para la micropropagación de plantas.....	79
Figura A-5. Diseño y funcionamiento del RITA ®.....	80
Figura A-6. Localización del Laboratorio de Biotecnología del CENTA.....	81
Figura A-7. Instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.....	82
Figura A-8. Diseño y funcionamiento del Sistema de Inmersión Temporal.....	83
Figura A-9. Descripción del Sistema de Inmersión Temporal.....	84
Figura A-10. Cámara de flujo laminar.....	85
Figura A-11. Instrumentos y materiales estériles.....	85
Figura A-12. Autoclave y otros utensilios al interior.....	86
Figura A-13. Siembra de explantes para ambos métodos en fase de multiplicación.....	86
Figura A-14. Fase de aclimatación para ambos métodos.....	87
Figura A-15. Distribución de los tratamientos en estudio.....	88
Figura A-16. Grafico de los costos para las diferentes etapas de micropropagación....	88

## Abreviaturas

**ABA:** Acido Abscísico.

**AIA:** Acido indol-3-acético.

**AIB:** Acido indol-3-butírico.

**ANA:** Acido  $\alpha$ -naftalenacético.

**BAP:** Bencil amino purina.

**BIT:** Biorreactor de Inmersión Temporal.

**MS:** Murashige y Skoog.

**RITA:** Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado.

**SIT:** Sistema de Inmersión Temporal.

## Glosario

**Agar:** Polisacárido que por sus propiedades gelificantes, se utiliza en la preparación de medios nutritivos para cultivos.

**Ápice meristemático:** Explante que cuenta del domo meristemático acompañado generalmente por uno o varios primordios foliares.

**Autoclave:** Cámara cerrada que permite, mediante la aplicación de calor y vapor a presión, esterilizar distintos objetos y sustancias (material de laboratorio, líquidos, etc.)

**Auxinas:** Grupo de reguladores de crecimiento de plantas (naturales o sintéticos) que estimulan la división celular, alargamiento, dominancia apical, iniciación de la raíz y floración.

**Cámara de crecimiento:** Espacio cerrado donde se controlan las condiciones ambientales (temperatura, luz y humedad).

**Citoquininas:** Son un grupo de fitohormonas que regulan la división celular y la diferenciación en tejidos vegetales, participan en el control del desarrollo y la senescencia.

**Cultivo aséptico:** Estéril, libre de organismos contaminantes (bacterias y hongos).

**Cultivo de tejidos:** Tejidos u órganos en un medio con sustancias nutritivas bajo condiciones estériles.

**Endurecimiento:** Proceso de adaptación de una planta crecida en invernadero o en un ambiente controlado a las condiciones ambientales del exterior.

**Explante:** Fragmento de una planta que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo.

**Fotoperiodo:** Duración de la luz del día o periodo de iluminación diaria que se suministra para el crecimiento de las plantas.

**Frecuencia de inmersión:** Es el periodo que transcurre de una inmersión a otra, estas pueden ser cada 2,3,4,6,8,10,12 horas según los objetivos del investigador.

**Medio líquido:** Son aquellos que no se les agrega ningún agente gelificante.

**Medio semisólido:** Son aquellos que se les ha agregado un agente gelificante

**Tiempo de inmersión:** Es el tiempo que el explante está en contacto con el medio líquido, este puede ser cada 1, 2, 5, 10,15, etc. minutos, según los objetivos del investigador.

**Variación somaclonal:** Son modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *In vitro*.

**Vitrificación o hiperhidricidad:** Es un desorden fisiológico que se presenta en ciertas especies de plantas, caracterizado por el desarrollo de tejidos vítreos producto de condiciones no adecuadas de cultivo y de difícil sobrevivencia al trasplante.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La piña (*Ananas comosus* L. Merr.), es un cultivo tropical, nativo de América del Sur, y su región de origen comprende desde el sur de Brasil hasta el norte de Argentina y Paraguay (Avilan 1988). El cultivo de piña en El Salvador para el año 2010, generó una producción de 3,145.77t, en una superficie de 179.90 ha, con un rendimiento de 17.48 t.ha<sup>-1</sup>, con un consumo neto de 12,731.77t; importándose 9,586.00t (75.29 %), con la consiguiente fuga de divisas de US\$ 2,032,000 (FAO 2013). Según el IV Censo Agropecuario 2007-2008 del Ministerio de Economía (2009), los departamentos de mayor producción de piña son: Santa Ana, La Paz, Morazán y la Unión (Figura A-1). La mayor área cultivada pertenece al departamento de Santa Ana, con 49 ha y el departamento de Ahuachapán, con la menor área cultivada de 0.12 ha. En El Salvador, el método más utilizado por los productores para el establecimiento del cultivo de piña, es la propagación vegetativa. Por lo que se debe realizar una buena selección y manejo adecuado de los hijos de piña, antes de la siembra; para evitar la diseminación de agentes patógenos, y una desigualdad del material vegetativo, para evitar que se eleven los costos de producción. Otro método de propagación, poco utilizado en el país, es el de cultivo de tejido. Existen laboratorios de biotecnología en el CENTA, ENA, FUSADES, Universidad Católica de Occidente y Universidad de El Salvador, que se dedican a la producción de plantas sanas, libres de enfermedades y de buena calidad; con la única desventaja, que esta tecnología es de altos costos de producción a pequeña escala. A pesar que en el país la demanda de piña fresca es alta y la producción baja, pero los agricultores no reaccionan para impulsar, el establecimiento de nuevas áreas destinadas para dicho rubro. Uno de los factores para que esto no ocurra, podría ser que a nivel nacional no hay suficiente material de siembra, para incrementar las áreas del cultivo. Existen organizaciones como ACOPASCA (Asociación Cooperativa de Producción Agropecuaria San Carlos) y APPES (Asociación de Productores de Piña de El Salvador) que están aumentando la productividad de los asociados; generando valor agregado al producto, y facilitando la comercialización de la piña y sus derivados, especialmente de la variedad Golden (Henríquez y Hernández 2008). Según Vicente Cruz, presidente de la APPES, los costos de establecimiento para el cultivo de piña sin riego, son de \$US\$ 11,428.57.ha<sup>-1</sup> y de \$US\$ 17,142.85.ha<sup>-1</sup> con la utilización de riego. Además hace mención, que cuando hay escases de semilla en la zona, los productores de piña de Santa María Ostuma, se ven en la necesidad de importarla desde Guatemala, a un costo de \$US\$ 0.20 por unidad (<sup>1</sup>).

<sup>1</sup> /Cruz, V. 2012. Producción del cultivo de piña (entrevista). Santa María Ostuma, SV, APPES (Asociación de Productores de Piña de El Salvador).

Cabe mencionar que este cultivo posee una alta rentabilidad, ya que para 1 ha se necesitan 35,714.28 hijos, de los cuales se estima una pérdida del 5%; obteniendo al final un total de 33,928.57 piña.ha<sup>-1</sup>, con un precio de \$USSD 1.25 por unidad (<sup>1</sup>). Al utilizar la técnica de la micropropagación masal en piña, se logrará una regeneración entera de la planta; produciendo eficientemente plantas, genóticamente idénticas a la planta madre, libres de plagas y enfermedades. Al utilizar la técnica de micropropagación, mediante la aplicación del método del SIT, en el cultivo de piña; se pretende mostrar el impacto que esta tiene, con respecto a los métodos tradicionales de micropropagación; ya que se obtiene una mayor tasa de multiplicación y aclimatación, así como mayores niveles de supervivencia en condiciones de campo (Cruzat 2009). La ventaja de utilizar el Sistema de Inmersión Temporal, en la micropropagación masal en piña, es que el contacto del medio líquido, con el tejido del explante, se realiza de manera intermitente y no permanente; evitando la vitrificación de los explantes, generando en poco tiempo, una mayor cantidad de material vegetativo, que mantenga su calidad. Utilizando métodos convencionales de propagación, resultarían lentos en producir y de elevados costos de producción. Esta técnica, también permite elaborar una planificación adecuada, desde la fase de establecimiento del cultivo aséptico en laboratorio, hasta el establecimiento y producción del cultivo en campo (Cuadro A-1). Por tal razón, el objetivo general de la investigación, fue evaluar dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.); para mejorar la propagación del material genético, y la calidad de las plantas. Por otro lado el SIT, es un método muy aplicado en el cultivo de tejidos, a nivel regional, y aunque es poco reconocido en el ámbito nacional; este puede ayudar a mejorar la calidad, sanidad, homogeneidad y masificación del material de piña, para los productores, y así dispongan de un buen material de siembra, a bajos costos para incrementar su área de producción. Cruzat (2009), indica que el uso del SIT, reduce los costos de producción por planta; esto como consecuencia de la mecanización de algunas etapas de la micropropagación. Lo que reduce el uso de mano de obra, costos de los reactivos e insumos utilizados en el proceso; medidos en términos de unidades por planta terminada. Entre las características que aporta el SIT, es que hay un mayor contacto de la biomasa vegetal, y el medio; no hay restricciones en el intercambio gaseoso, tiene la posibilidad de controlar la composición del medio; así como también el intercambio de la atmosfera dentro del frasco. Estas características, se reflejan en mayores tasas de multiplicación, y en un mejor desarrollo de los explantes, en relación al método convencional medio semisólido.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

### 2.1 Características generales de la especie.

#### 2.1.1 Origen y distribución.

La piña (*Ananás comosus* L. Merr.) es originaria de Sur América específicamente de la zona tropical, la región de origen está situado entre 15° - 30° de latitud sur y 70° - 60° de longitud oeste (Figura A-2); comprendiendo el sur de Brasil y el norte de Argentina y Paraguay (Barker y Collins, citado por Avilán *et al.* 1988, Gutiérrez 2009). No se ha encontrado aún poblaciones silvestres de *A. comosus*, los piñales espontáneos en selvas y sabanas del norte de América del Sur son restos de siembras abandonadas. Tampoco hay evidencia de que *A. comosus* (L). Merr. pueda derivar de otros congéneres de frutos comestibles, como *A. bracteatus* y *A. erectifolius*, ni de especies morfológicamente afines como *A. paraguayensis*. En el estado actual de conocimientos no puede entonces asignarse a *A. comosus* ni un antecesor posible ni área de origen definida. La distribución prehispánica de la piña abarcó toda el área subtropical de América del Sur, Antillas, América central y México. En el siglo XVI fue llevada a África por portugueses y al final de ese siglo ya había llegado hasta Filipinas y Java (León 2000).

En relación a su distribución se indica, que luego del segundo viaje del Cristóbal Colón al Nuevo Mundo en 1493, los españoles y más tarde los portugueses llevaron plantas de ella en sus exploraciones por todos los trópicos, de tal manera que en 1548 las piñas eran conocidas en la India y otros países de Oriente (Ochse, citado por Avilán *et al.* 1988). Según FAO (2013), los principales países de mayor producción de piña para el año 2011 fueron: Tailandia, Brasil, Costa Rica, Filipinas (Cuadro A-2).

#### 2.1.2 Taxonomía y descripción botánica.

La piña pertenece a la familia de las Bromeliaceae del género de las *Ananas* y especie *comosus*, el nombre binomial de esta planta es *Ananas comosus* L. Merr. es comúnmente conocida como piña, ananá, anánas, piña roja española, piña de agua. La piña se propaga solo por vía vegetativa, para lo cual se dispone de tres clases de materiales de siembra: la corona de hojas que hay encima del fruto, que rara vez se usa; los bulbillos que brotan en la mayoría de los cultivares en la base de la fruta y que forman plantas que fructifican entre 18 y 22 meses, los brotes basales que nacen en las axilas de las hojas que fructifican entre 15 y 18 meses (Figura A-3a). El tallo en forma de masa, más ancho en la parte superior, está

cubierto por las bases de las hojas, que se secan y desintegran en la región basal. Los entrenudos son muy angostos y en ellos se encuentran yemas axilares y raíces. En el ápice hay un meristema que genera hojas y que al llegar a la madurez forma la inflorescencia. Las raíces, son adventicias, forman en la base del tronco un sistema corto y compacto, con numerosas raíces fuertes de ramificación escasa.

Las hojas forman una roseta que rodea completamente el tallo. Las inferiores miden apenas unos pocos centímetros; las centrales son más largas alcanzan de 0.5 hasta un metro de longitud y las apicales son más cortas, la base de las hojas es envolvente en el tallo y se abren arriba en una lámina lanceolada, acanalada, que termina en un ápice muy agudo; los bordes están provistos de espinas o son inermes, según el cultivar. Inflorescencia: de muchas flores unidas, cada una con una bráctea inferior; según el cultivar, el eje de la inflorescencia crece y se separa de la corona de las hojas y está provisto de brácteas agudas o bien la inflorescencia aparece como sentada en las hojas.

La flor individual de la piña (Figura A-3c), está formada por verticilos de tres partes: tres sépalos, tres pétalos, dos grupos de tres estambres y un gineceo de tres carpelos (Figura A-3d), en muchos cultivares no se forman semillas, aunque por polinización artificial se pueden obtener algunas; en otras normalmente se producen número reducido. La fruta de piña está constituida por la fusión de los tejidos de los frutos individuales y del eje de la inflorescencia. De cada flor se desarrolla un fruto individual que aparece hacia el exterior en forma de escudete poligonal, duro y prominente (Figura A-3f). La variabilidad en *Ananas comosus* L. Merr la partenocarpia es general. Los cultivares más corrientes son autoincompatible, aunque a veces se forman semillas diminutas, aplanadas, de tres a cinco milímetros de longitud por uno a dos milímetros de ancho, la testa de color café oscuro y superficie áspera. En cambio es factible obtener semilla de cruces intervarietales. Las mutaciones de yemas han formado cultivares con características favorables, como es la falta de espinas en las hojas (León 2000).

Las variedades conocidas en el país: Cayena lisa, Champaca F 153, Azucarón, De castilla y MD-2 (Sandoval 2010).

## **2.2 Propiedades y usos.**

La piña posee alto contenido nutricional por ser una excelente fuente de fibra, hidratos de carbono, vitaminas C, B1, B6 y E; además de minerales como el Potasio, Magnesio, Yodo, Cobre y Manganeseo. Combate la hipertensión, ayuda a la circulación, elimina la acidez estomacal, gases intestinales, diarrea, tratamiento de la obesidad, diurético, combate la artritis y celulitis. Buen afrodisiaco, desinfecta y cicatriza las heridas, ayuda a eliminar arrugas y a mantener la piel firme. Se utiliza para preparar postres, enlatados, jaleas y mermeladas entre otros productos (Berrios *et al.* 1996).

A la piña se le atribuyen varias propiedades medicinales y depurativas, resultando de la enzima proteolítica llamada bromelina, que ayuda a metabolizar los alimentos (Uriza 2011). La bromelina es un poderoso antiinflamatorio, efectivo en la cura de edemas y como suplemento en situaciones en que haya una retención de líquidos; previene la agregación plaquetaria, actuando como preventivo en los infartos del miocardio y las anginas de pecho. También se utiliza con éxito en la prevención de trombosis y tromboflebitis. Además es la base para la elaboración de algunos medicamentos y puede utilizarse como ablandador de carnes (Castañeda 2003).

## **2.3. Cultivo *In vitro*.**

### **2.3.1. Generalidades.**

Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido de cualquier parte de la planta es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo (Albarracín s.f.).

Roca y Mroginski (1993), señalan que los métodos de propagación *in vitro* permiten la obtención de una gran cantidad de plantas a partir de una planta madre en cortos periodos de tiempo, así como la disminución del espacio físico empleado para la propagación, disminución del tiempo de multiplicación de una planta y los costos del desarrollo que esta implica.

Además, la producción de un cultivo a través de la micropropagación elimina la posibilidad de interrupciones debido a los cambios de estación ya que se puede controlar las condiciones de humedad y temperatura en un invernadero. Por otro lado, la técnica es de

gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. (Albarracín s.f).

Cultivo de tejidos vegetales, es una descripción genérica que involucra diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo las de protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas (Albarracín s.f).

Según Mejía y Vittorelli (1988) existen dos clases de crecimiento en cultivo *In vitro*: a) organizado: se denomina así cuando se utilizan puntos de crecimiento (meristemas apicales) de tallos y raíces, yemas florales, pequeños frutos, nudos y cultivo de embriones. Estos explantes cuando son cultivadas *in vitro* continúan creciendo con su estructura. Y se denomina b) desorganizado: cuando segmentos de tejidos son cultivados *in vitro* estos carecen de estructuras diferenciadas. El tejido desorganizado puede incrementarse en volumen por sucesivos subcultivos y mantenerse en medio de cultivo por periodos largos. Cultivo de callos (células agregadas), cultivo de suspensión de células (medio líquido agitado), cultivo de protoplastos (células sin pared celular) y cultivo de anteras y de polen (para obtener plantas haploides) son considerados de crecimiento desorganizado como un paso intermedio para la regeneración de plántulas.

### **2.3.2. Técnicas que se utilizan para la micropropagación de plantas.**

#### **2.3.2.1. Cultivo de órganos.**

##### **2.3.2.1.1. Cultivo de segmento de hojas.**

En algunas especies se puede diferenciar los brotes a partir de los explantes de las hojas directamente (Figura A-4a). Algunas veces alcanza también el callo embriogénico y callo normal. Normalmente esta técnica es más riesgosa que el cultivo de meristemas, debido a que en esta misma, la tasa de mutación es alta. Para tener éxito con esta técnica, primero debe verificarse la no existencia de virus, y segundo que no vaya a ocurrir una mutación. Sin embargo esta técnica tiene ventajas para el mejoramiento genético porque permite la clonación de híbridos (Usui Kanji *et al.* 1996).

#### **2.3.2.1.2. Cultivo de anteras o polen.**

Esta técnica se utiliza especialmente para inducir plantas haploides (Figura A-4b). Las células haploides tienen la mitad de cromosomas de una planta normal. El reactivo que se utiliza para doblar la cantidad de cromosomas se llama Colchicina, el cual después de aplicarlo, provoca que la planta posea los pares de cromosomas completos. Esos materiales son homocigóticos (líneas puras), por consiguiente, si algunos poseen un carácter deseable, son útiles para cruzamiento. Es frecuentemente utilizada en programas de mejoramiento de algunas especies, como el arroz (Usui Kanji *et al.* 1996).

#### **2.3.2.1.3. Cultivo de flor.**

Algunas partes de la flor (excepto proembriones cruzados o anteras) tienen la habilidad de diferenciarse en brotes (Figura A-4c). Generalmente esos órganos son muy limpios en el capullo, por eso son útiles como material para iniciar el cultivo de tejidos, porque se pueden desinfectar fácilmente. Sobre todo, se ha utilizado frecuentemente el ovario, estilo y los estambres (sin anteras). Si se quieren utilizar para la producción, se deben diferenciar los brotes directamente del órgano, sin pasar por el proceso de callo. En familias de Liliaceae, Amaryllidaceae, Iridaceae, etc, se reporta que no aparecen mutaciones (Usui Kanji *et al.* 1996).

#### **2.3.2.1.4 Cultivo de sarcocarpio o albumen.**

Esta técnica no es común. En algunas especies se forma el callo embriogénico o el callo normal del sarcocarpio o albumen (Figura A-4d). Las células de este tejido tienen altas concentraciones de materiales nutritivos. Por eso en el futuro se piensa en la posibilidad de utilizar esta técnica para bioquímica. Generalmente el albumen tienen los genes triploides. Sin embargo por el momento no se ha informado el éxito de tener triploides por el cultivo de albumen (Usui Kanji *et al.* 1996).

#### **2.3.2.2. Cultivo de meristemas.**

El cultivo de meristemas apical de un tallo se emplea para la obtención de plantas libres de virus ya que estos patógenos tienen dificultades para alcanzar esta zona cuando la planta está creciendo activamente. Para obtener un meristemo apical es necesario tomar segmentos apicales de tallos obtenidos *in vitro* o procedentes de plantas crecidas en condiciones en el exterior. Si se realiza la segunda posibilidad será necesario realizar una asepsia previa del tejido. Posteriormente se eliminan los primordios foliares que rodean al

meristemas hasta dejar al descubierto el domo meristemático. Finalmente con uno o dos pares de primordios foliares y se coloca sobre un medio adecuado, procurando colocar la zona de corte hacia abajo. Una vez que empieza a desarrollarse el meristema en el medio de cultivo actúa como en una cadena multiplicativa en un proceso de micropropagación (Albarracín s.f).

#### **2.3.2.3. Cultivo de callos.**

El callo es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales se llevan a una desdiferenciación celular, formando una masa amorfa de tejido, como resultado de la proliferación continua y acelerada de las células. La coloración de este tejido también varía, pueden existir callos que carecen de pigmentos y mientras que otros pueden ser de distintos tonos de verdes, amarillo, café o rojo. La inducción del callo ocurre colocando el explante en contacto con un medio de cultivo que promueva y mantenga un crecimiento y una división celular continua. La proliferación del callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal: hoja, raíz, polen, embriones, semillas, entre otros (Hurtado y Merino, citado por González 2003). Es frecuentemente utilizada en programas de mejoramiento de algunas especies, como caña de azúcar, arroz.

#### **2.4. Medios de cultivo.**

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos *in vitro*. Existen dos tipos de medio en los que se puede realizar un cultivo *in vitro*: semisólido y líquido (Mroginski *et al.* 2010).

##### **2.4.1. Cultivo en medio semisólido.**

Son aquellos que se les ha agregado un agente gelificante y son ampliamente usados en el establecimiento de explantes. El explante se mantiene estático sobre el medio, con solo uno de sus extremos en contacto por donde se realiza la absorción de nutrientes (Lorenzo *et al.*, citado por Cruzat 2009).

##### **2.4.2. Cultivo en medio líquido.**

Son aquellos que no se les agrega ningún agente gelificante, la utilización de este da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios semisólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio de cultivo y a las menores gradientes de

difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes (George, citado por Cruzat 2009).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos básicos para el cultivo vegetales *in vitro* Heller 1953, 1954; Murashige & Skoog 1962; Gamborg 1968 y 1979; Schenk & Hildebrandt 1972; De Fossard 1976 (Cuadro A-3) (Krikorian 1993).

### **2.4.3. Componentes de medio de cultivo.**

Básicamente, los medios de cultivos se componen de compuestos que suministran: nutrientes minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, una fuente de carbono, agente gelificante (en el caso de medios semisólidos) (Mroginski *et al.* 2010).

#### **2.4.3.1. Nutrientes minerales.**

Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micro nutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras, como Potasio (K), Azufre (S), Fosforo (P), Nitrógeno (N), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (FE) y se utilizan en concentraciones milimolares (mM); mientras que los elementos como: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) Y Yodo (I) se utilizan en concentraciones micromolares (uM) (Cuadro A-4) (Albarracín 2012).

#### **2.4.3.2. Vitaminas.**

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catabólicas en el organismo y son requeridas en pequeñas cantidades; de todas las empleadas, solo las vitaminas del complejo B (Thiamina-HCl, B<sub>1</sub>; Acido Nicotínico, B<sub>6</sub> y Piridoxina-HCl, B<sub>12</sub>) son necesarias y de estas solamente la Thiamina es indispensable en el medio (Roca y Mroginski 1993).

#### **2.4.3.3. Sustancias reguladoras de crecimiento.**

En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen citocininas (Bencil amino purina, KIN, ZEA, 2ip, Thidiazuron) y auxinas (Ácido Naftalenacético, 2,4-D, Ácido Indolacético, Acido Indolbutírico, NOA, Dicamba, Picloram). Las Giberelinas (especialmente Ácido Giberélico 3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. El Acido Abscísico (ABA), es usado en algunos casos (Mroginski *et al.* 2010).

#### **2.4.3.4. Fuente de carbono.**

Los carbohidratos son usados como fuente de energía y carbono, dentro de ellos, la sacarosa es utilizada universalmente en concentraciones de 2 al 5%. En algunos medios se la reemplaza por glucosa y en casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos (Mroginski *et al.* 2010).

#### **2.4.3.5. Agua.**

El agua es una de los compuestos químicos más importantes del medio de cultivo, preferentemente debe utilizarse bidestilada, tridestilada o desmineralizada para garantizar mayor pureza (Hartman y Kester 1985).

#### **2.4.3.6. Agente gelificante.**

Para el caso de medios semisólido, se utiliza el agar (entre 0.6 y 1%), es el compuesto mas utilizado. También pueden emplearse Agargel (0.40- 0.60%), Transferfgel (2.0-2.60 %), Phytigel (0.25-0.40 %), agarosa (0.80-0.90 %) y Gelrate (0.10-0.20%) (Mroginski *et al.* 2010).

#### **2.4.3.7. pH.**

Pierik citado por Jaramillo (2013), menciona que se conoce poco la influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo *in vitro*. Se supone que el pH en el rango 5.0 a 6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6.0. Un pH bajo (menor de 4.5) o alto (mayor que 7.0), generalmente frena el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones: la auxina IAA y el ácido giberélico se hacen menos estables, el agar pierde su rigidez, algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar, la vitamina B1 y el ácido pantoténico se hacen menos estables y se retarda la absorción de iones amonio. El pH varía con el autoclaveado, si se parte de un pH en el rango 5.0 a 7.0, generalmente sufre un descenso de 0.3 a 0.5 unidades.

### **2.5. Etapas de micropropagación clonal *in vitro*.**

Murashige y otros citados por Roca y Mroginski (1993) encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

### **2.5.1. Etapa 0. Preparación del material vegetal.**

Para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un periodo 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 adecuado para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo s.f).

### **2.5.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico.**

Corresponde a la obtención de un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado, para lo que se debe efectuar un proceso de desinfección sobre el explante y así evitar la presencia de microorganismos que pudieran destruir el cultivo en un periodo corto de tiempo a consecuencia de la competencia por los nutrientes del medio de cultivo (Roca y Mroginski 1993).

Mejia y Vittorelli (1988), mencionan que esta fase también se conoce como estado de establecimiento donde la planta (explante), es desinfectada y cultivada asépticamente en un medio de cultivo, produciéndose el crecimiento de la plántula o la proliferación de callos.

### **2.5.3. Etapa 2: Multiplicación.**

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento) (Olmos *et al.* 2010).

Krikorian (1993), menciona que los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir otros brotes mediante la repetición de ciclos de cultivo o bien mediante la inducción de brotes de nuevos u organogénesis. La multiplicación clonal ha sido aplicada a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas. Durante esta fase de multiplicación de brotes, las citocininas son los reguladores de crecimiento más utilizados.

### **2.5.4. Etapa 3: Desarrollo.**

Según Albarracín (2012) los brotes propagados en la etapa de multiplicación *in vitro* son trasladados a un medio de cultivo que contiene concentraciones menores de sales minerales. Por ejemplo el medio de Murashigue y Skoog (1962), es diluido a la mitad de su

concentración obteniendo medio MS al 50 % y sin ningún tipo de hormona de crecimiento. Esta fase tiene como objetivo favorecer el desarrollo de los brotes antes del enraizamiento (Orellana 1997).

#### **2.5.5. Etapa 4: Enraizamiento.**

La fase de enraizamiento tiene como objetivo producir una planta que pueda sobrevivir a las condiciones del trasplante (Krikorian, citado por Orellana 1997). El enraizamiento de brotes es con frecuencia inducido *in vitro*, y tiene la ventaja de obtener plántulas asépticas con mayor probabilidad de sobrevivir al ambiente *ex vitro*. Sin embargo, es una labor más intensa que la realizada durante el enraizamiento *ex vitro* (Bonga y Von Aderkas, citados por Orellana 1997). Dumas y Monteuis, citados por Orellana (1997) mencionan que existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la oxidación, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento. Murashige, citado por Roca y Mroginski (1993) menciona que esta fase también es conocida como etapa de pretrasplante; y tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

#### **2.5.6. Etapa 5: Aclimatación de las plántulas enraizadas.**

El mayor porcentaje de pérdidas de plántulas producidas *in vitro*, ocurre en su fase de transferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente exterior. Casi todo el esfuerzo invertido durante el cultivo de tejidos se perdería si las plantas que se regeneraran de esos tejidos mueren cuando intentan desarrollarse en un ambiente que inicialmente puede resultar desfavorable (Segovia y Laing, citados por Orellana 1997). Según Pierik (1990) las plantas cultivadas *in vitro* tienen generalmente la cutícula (capas de cera) escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90-100%, que se da *in vitro*. Como consecuencia, cuando se transfiere la planta al suelo, se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en las condiciones *in vivo* es más baja. La aclimatación puede realizarse permitiendo a las plantas *in vitro* habituarse de forma gradual a una humedad relativa más baja, como la que encontrara *ex vitro*. El desarrollo del mecanismo de cierre estomático es un componente muy importante de la aclimatación. Según Bonga y Von Aderkas, citados por Orellana (1997) cuando un gran número de plántulas es aclimatado, es necesario establecer un buen sistema de nebulización, pero cuando son pequeños grupos, pueden utilizarse los “mini invernaderos”, o el uso de bolsas

plásticas; también se ha hecho uso de micorrizas para promover el enraizamiento, mientras que algunas especies son fáciles de trasplantar al suelo.

## **2.6 Factores físicos que influyen en el cultivo *in vitro*.**

Los cultivos de tejidos vegetales deben de mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales más favorables. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre los cultivos (Vidalie 1986).

### **2.6.1. Luz.**

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperíodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. La mayoría de los cultivos desarrollan a una intensidad lumínica entre 5 a 25 W/m<sup>2</sup> (1000 a 5000 lux). Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga. El fotoperíodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín 1993).

### **2.6.2. Temperatura.**

Temperatura de las cámaras de cultivo se regula en general entre 22 y 28°C, permitiendo así el desarrollo tanto de especies de climas templados como de plantas tropicales. Es de destacar que durante el periodo iluminado, la temperatura en el interior de los frascos de cultivo es de 1-2°C superior a la de la cámara, debido al efecto invernadero; se crea así un termoperíodo suave. La velocidad de síntesis y de degradación de distintos compuestos y por ende el nivel de producción y acumulación de metabolitos también es influenciado por la temperatura (Marín 1993).

### **2.6.3. Humedad relativa.**

En cuanto a la humedad relativa, esta se mantiene en alrededor del 70 % en las condiciones en las que se realizan habitualmente los cultivos, aunque varía con la temperatura de la cámara y el tipo y cierre de los recipientes. El porcentaje de humedad relativa no es reportado en la mayoría de los trabajos sobre cultivo *in vitro* de vegetales (George 1987).

## **2.7. Sistemas de Inmersión Temporal.**

### **2.7.1. Origen.**

El primero en aplicar una técnica de inmersión periódica en medios de cultivo líquido fue Steward en el año 1952; cuya modificación realizada en el año 1956 fue denominada “los aparatos Steward”. En esta invención el medio líquido era transferido de un tubo a otro dejando el tejido en una fase gaseosa y viceversa. Otros intentos se realizaron empleando el mismo principio y fue hasta 1985 que Tissierat y Vandercook operaron el primer equipo automatizado que aplicaba el principio de “cambio de flujo” (Preil, citado por Albarracín 2012). Lo que dio inicio al debate acerca de cultivar tejidos *in vitro* que permanezcan temporalmente inmersos en un determinado medio (Albarracín 2012).

En 1993, Alvard y colaboradores, introdujeron el envase RITA® y en 1995 Tiesson y Alvard desarrollaron el nuevo concepto de inmersión temporal para cultivo *in vitro* de plantas usando medio líquido, lo que generaría un interés a nivel mundial por esta novedosa técnica (Preil y colaboradores, citados por Albarracín 2012).

### **2.7.2. Fundamentos fisiológicos del éxito de los sistemas de inmersión temporal.**

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) constituyen una tecnología accesible que permite automatizar de forma parcial algunas etapas del cultivo *in vitro*, aumentando la eficiencia biológica y productiva del material propagado sin los efectos colaterales causados por los medios de cultivo líquido estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia (De Fera *et al.*, 2002). El principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente (Damiano *et al.* citado por Cruzat 2009).

Los sistemas de inmersión temporal emplean medios líquidos lo cual facilita la asimilación de nutrientes por explantes. La planta entra en contacto con este medio con cierta frecuencia durante un corto periodo de tiempo lo que evita los problemas de Hiperhidricidad (desorden morfológico y fisiológico que provoca una estructura cristalina y acuosa del tejido, además de un crecimiento distorsionado) provocados por los medios líquidos en contacto permanentes (Posada *et al.*, 2003). Además, estos sistemas permiten la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la acumulación de gases nocivos como el etileno (que promueve la senescencia de los tejidos). Los sistemas de inmersión temporal facilitan la regulación de la concentración de CO<sub>2</sub> y mejoran la oxigenación de los tejidos. Los explantes

retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de nutrientes, lo cual se traduce en un incremento más vigoroso y mejor desarrollo (Tiesson y Alvard citados por BASAIL *et al.*, 2003).

### **2.7.3. Funcionamiento.**

El Sistema RITA® es un recipiente especialmente diseñado para el cultivo *in vitro* de plantas usando la inmersión temporal. Los explantes son colocados en la parte superior del recipiente y el medio de cultivo en la parte inferior. Un flujo de aire con una presión menor de 0.2 bares entra a través de un filtro de 0.2  $\mu$  el cual es conectado a un tubo central creando una presión en el medio de cultivo en la parte inferior del recipiente. Esta presión permite que el medio pueda ascender hacia la parte superior del recipiente a través de los orificios de la placa y la malla que contiene los explantes. Estos son inmersos en el medio de cultivo durante el tiempo en que la presión es programada (Figura A-5). Una vez que la presión se elimina, el medio de cultivo retorna por gravedad a la parte inferior del recipiente (Orellana, citado por Albarracín 2012).

### **2.7.4. Usos.**

Es así que se iniciaron diversas actividades y pruebas en sistemas de inmersión temporal resultando en la variación en el diseño de recipientes, equipos y tratamientos basados en tiempos de inmersión y frecuencias que dependerían directamente de los tipos de cultivo de interés (Albarracín 2012).

Según Orellana citado por Albarracín 2012 es necesario conocer que alrededor de 500 millones de plantas clonadas *in vitro* fueron propagadas en 1990 en laboratorios de Europa occidental, Estados Unidos e Israel; producción que se concentra en laboratorios comerciales cuyo objetivo es la propagación de una especie vegetal específica de acuerdo a sus requerimientos. Hasta la actualidad estas cifras se mantienen en aumento y la propagación de plantas *in vitro* se ha incrementado en niveles exponenciales hasta países de América Latina como Cuba, Brasil, Costa Rica, entre otros.

En un estudio realizado por Winkelmann y colaboradores citados por Albarracín (2012), reporta datos estadísticos para la producción comercial de plantas *in vitro* en Alemania, e indican que el número de laboratorios de cultivo *in vitro* ha ido aumentando paulatinamente tanto como la producción anual de plantas propagadas en dichos centros. Es así que dicho

estudio muestra que si en el año de 1984 Alemania contaba con apenas 12 laboratorios cuya producción comercial de plantas *in vitro* era de un millón de plantas anuales; en datos recopilados para el año 2006 la producción ascendió a 48 millones por año en apenas 30 laboratorios de producción comercial. Con ello, se puede estimar que una cifra considerablemente alta de plantas propagadas *in vitro* se producen a nivel mundial anualmente.

Orellana citado por Albarracín 2012 también menciona que es importante recalcar que los datos citados corresponden a plantas cultivadas en condiciones *in vitro* mediante propagación convencional, es decir, la técnica conocida como la primera generación experimentada en diversos países a nivel mundial. Dicha metodología implica tecnología avanzada y capacitación técnica de alta disciplina por lo que sus costos representan rubros elevados en lo que corresponde a mano de obra, instalaciones, insumos y materiales de alta calidad.

De allí que la tendencia al cambio ha envuelto también a las técnicas biotecnológicas con la finalidad de satisfacer las demandas comerciales por diversos cultivos, las cuales mediante los sistemas de propagación tradicional no son satisfechas. Por ello, se han buscado tecnologías que consigan hacer de la micropropagación un proceso más efectivo reduciendo costos e incrementando el número de plantas de producción *in vitro* tal como lo permiten los sistemas de inmersión temporal con el empleo de medios de cultivo líquido (Albarracín 2012).

## **2.8. Factores que influyen en el cultivo *in vitro* mediante el Sistema de Inmersión Temporal.**

### **2. 8.1. Frecuencia y tiempo de inmersión.**

Estudios realizados por González (2003) demuestran que el efecto de la frecuencia de inmersión en el desarrollo de brotes puede explicarse por la disponibilidad de los nutrientes. Salisbury, citado por González (2003), indica que utilizar una mayor frecuencia de inmersión puede presentar efectos como una baja en la concentración de oxígeno.

El choque osmótico sufrido por los explantes durante cada inmersión en el medio de cultivo, posiblemente a mayor frecuencia los tejidos sufran un nivel de estrés que afecte la respuesta del explante (Maya, citado por González 2003). En sistemas de inmersión temporal de cultivo con tejido, es evidente que el tiempo de inmersión es muy importante, puesto que regula la

absorción de nutrientes y expresión de hiperhidricidad. Los tiempos de inmersión utilizados para diferentes trabajos varían considerablemente; esto es probablemente debido a la gran variedad de especies, procesos y sistemas de micropropagación de inmersión temporal utilizado. Los largos tiempos de inmersión (1 h cada 6 h) demuestran ser eficaces para la tuberización de papa, mientras que los cortos tiempos de inmersión (1 min cada 12 h) estimulan la producción de embriones somáticos más en el café y el caucho (Berthouly y Etienne 2005).

Krueger *et al.*, citados Berthouly y Etienne (2005), mostraron la importancia de las inmersión para la proliferación de brotes. Se observaron hiperhidricidad con inmersiones de 5 min cada 30 min, pero no se observó con inmersiones durante 5 min cada 60 min. Por otra parte, la primera combinación es mejor para el número de brotes obtenidos.

### **2.8.2. La aireación.**

La aireación es uno de los factores más influyentes sobre la propagación *in vitro* mediante sistemas de inmersión temporal. En primer lugar debido al ingreso del flujo de aire a los envases del SIT se acciona el mecanismo de cada ciclo de inmersión que eventualmente mantendrá a los explantes en contacto con el medio de cultivo líquido. Ziv, citado por Albarracín (2012), señala que el empleo de biorreactores con levantamiento de aire presenta un aumento en la proliferación de yemas meristematicas y una reducción de los cortes de los tejidos siendo este el resultado deseado al propagar plántulas mediante SIT.

### **2.8.3. Turbulencia.**

Como se menciona anteriormente, el mecanismo de traslado de medio de cultivo de un recipiente al otro en el sistema de inmersión temporal es accionado por la presión de un flujo de aire de entrada ejercida mediante el compresor por las válvulas de carga y descarga, generando así dicho mecanismo; de allí que el SIT es considerado bajo estas condiciones un biorreactor agitado por flujo de aire, lo que implica que esta entrada de aire genere turbulencia (Albarracín 2012).

La turbulencia o efecto de la agitación puede constituirse en un problema para el cultivo de células o tejidos en suspensión debido a la formación de grupos o agregados los cuales afectan a la agitación, por lo tanto a la difusión del oxígeno (Pérez, citado por Albarracín 2012). Además si en un ciclo de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal, la

turbulencia generada es excesiva, esto puede causar la destrucción del tejido. Por ello, dicho factor debe ser controlado adoptando diversas medidas que reduzcan la afectación del cultivo tales como: el empleo de una presión de flujo de aire correcta que será determinada para cada tipo de cultivo y especie de interés, un control mediante variaciones en la composición del medio de cultivo que eviten la formación de agregados celulares y además la manipulación durante los subcultivos (Pérez, citado por Albarracín 2012).

#### **2.8.4. Volumen y renovación del medio líquido.**

Es particularmente importante optimizar el volumen del medio de cultivo líquido por explante cuando se utiliza sistemas de inmersión temporal, tales como sistemas RITA®. Lorenzo *et al.*, citados Berthouly y Etienne (2005), encontraron que multiplicando por 10 veces el volumen de medio de cultivo para brotes de caña de azúcar. Se incrementaba el coeficiente de multiplicación de 8.3 brotes por explante a 23.9 brotes transcurridos 30 días. Sin embargo, el volumen de medio utilizado no afectó la longitud de los brotes formados. Los mayores volúmenes demuestran ser menos eficiente. Utilizando el mismo sistema de inmersión temporal, Escalona *et al.*, citado por Berthouly y Etienne (2005), demostraron de manera similar con piña que un volumen de medio de cultivo óptimo para la proliferación de brotes, que se estimó es 200 ml por explante para esa especie. En este caso, volúmenes más grandes también condujo a una caída en la tasa de proliferación.

#### **2.8.5. Acumulación de biomasa.**

Como se mencionó anteriormente, el empleo de medio de cultivo líquido en las diferentes etapas de la micropropagación favorece el desarrollo de explantes y tal como se ha reportado para diferentes especies vegetales existen incrementos significativos de la tasa de proliferación (Bermúdez *et al.*, citado por Albarracín 2012). Sin embargo, se ha citado también la acumulación de biomasa como factor altamente influyente en el cultivo mediante este tipo de técnica como los sistemas de inmersión temporal. La acumulación de excesiva biomasa en los Sistemas Inmersión Temporal se presenta principalmente por factores como excesivo desarrollo y crecimiento de los propágulos una vez transcurrido el ciclo de multiplicación. Dicho crecimiento puede afectar el índice de multiplicación y disminuirlo considerablemente, por ende, la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal también se vería afectado. Bermúdez *et al.*, citado por Albarracín (2012), han señalado que el uso de retardantes de crecimiento en los medios de cultivo logran disminuir el crecimiento de hojas y

estimulan la producción de nuevos brotes disminuyendo la probabilidad de afectación sobre el coeficiente de proliferación debido a acumulación de biomasa.

### **2.9. Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal.**

Disminuye los costos de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio. Permite una mejor nutrición mineral, por el contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión por capilaridad, ya que una fina película de medio se mantiene sobre los explantes. Existe una fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente, ya que permite una renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión. También permite una mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas y mayor control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia de las inmersiones (González 2003). Permite la protección de cada recipiente contra la contaminación por medio del uso de filtros, además la manipulación individual es fácil y anula los riesgos de contaminación cruzada (CIRAD, citado por González 2003).

### **2.10. Principales problemas en el Sistema de Inmersión Temporal.**

Se ha encontrado también que este tipo de sistemas presenta ciertos problemas en cuanto al desarrollo de los cultivos de interés. En la actualidad, este sistema ha alcanzado una alta automatización y se han logrado contrarrestar algunas desventajas producidas al emplearlo; sin embargo, entre los principales inconvenientes con los que los investigadores se han encontrado frecuentemente están aquellos relacionados con la fisiología del cultivo después de efectuados los ciclos de inmersión además del mantenimiento de la calidad genética de una determinada especie vegetal en estudio y el difícil mantenimiento de la asepsia en los recipientes (Preil y Hvoslef-Eide, citado por Albarracín 2012).

#### **2.10.1. Hiperhidricidad o Vitrificación.**

Es un desorden fisiológico que se presenta en ciertas especies de plantas, caracterizado por el desarrollo de tejidos vítreos producto de condiciones no adecuadas de cultivo y de difícil sobrevivencia al trasplante. Este fenómeno se caracteriza por presentar una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, afectando los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso. La responsabilidad de estos desordenes fisiológicos puede atribuirse a la composición y la consistencia del medio de cultivo, por ejemplo un bajo contenido en agar, esto sucede especialmente en medio líquido causado por el exceso de humedad; exceso de

factores nutricionales; altos niveles de reguladores de crecimiento y baja intensidad lumínica. Los factores claves de la vitrificación son la humedad relativa y el potencial hídrico dentro del medio de cultivo (Toro y Gómez, citados por López 2013).

La micropropagación en medio de cultivo líquido aumenta la absorción de nutrientes y promueve el crecimiento rápido de los tejidos, pero con frecuencia aumenta la hiperhidricidad. El contacto continuo de tejidos de la planta con el medio líquido, ya sea total o parcial, es la fuente de hiperhidricidad (Debergh *et al.*; Ziv *et al.*; Hussey, citados por Berthouly y Etienne 2005). Además, mencionan que la hiperhidricidad o vitrificación puede ser considerablemente reducida mediante un estricto control de los tiempos de inmersión. También se pueden adoptar variaciones al empleo del Sistema Inmersión Temporal utilizando soportes de celulosa, bloques o esponjas que sostengan las plántulas en el medio líquido.

#### **2.10.2. Variación somaclonal.**

Según Larkin y Scowcroft citados por Roca y Mroginski (1993) son modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *In vitro*. Muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. La variación somaclonal que pudiere afectar a las plántulas *in vitro* en sistemas de inmersión temporal se trata de diferencias genotípicas en el material vegetal causadas por arreglos cromosomales. Estas variaciones están más ampliamente difundidas en plantas regeneradas a partir de callo (Ziv, citado por Albarracín 2012). Una de las principales desventajas de la variación somaclonal representa la divergencia del material cuando se requiere uniformidad clonal como por ejemplo en las industrias forestales y de horticultura (Prasanna *et al.*, citado por Albarracín 2012).

Garita y Gómez (2000), mencionan que las plantas provenientes del “callo” o de las estructuras similares a protocormos deben ser cuidadosamente analizadas para su estabilidad genética. En piña es frecuente la aparición de variantes somaclonales, por lo que se prefieren vías directas de regeneración como la proliferación de yemas axilares.

#### **2.10.3. Mantenimiento de la asepsia.**

Como es conocido generalmente, las técnicas de cultivo *in vitro* necesitan conservar un control estricto de la asepsia para mantener el adecuado desarrollo y producción de

plántulas y, las técnicas de cultivo en medios líquidos como el Sistema de Inmersión Temporal no son la excepción. Es así que en este tipo de sistemas, la probabilidad de contaminación se puede desplegar más rápidamente y dispersar con mayor facilidad en el medio líquido y puede acarrear pérdidas hasta del 100% del cultivo. Por ello, el material vegetal a ser inoculado en el Sistema de Inmersión Temporal debe estar sometido previamente a subcultivos que permitan asegurar su asepsia en fin de controlar el crecimiento indeseado de microorganismos patógenos (Preil y Hvoslef-Eide, citado por Albarracín 2012).

### **2.11. Estudios de cultivo *in vitro* de la piña.**

El Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®) se ha utilizado con éxito para la propagación de piña, caña de azúcar, banano, plátano, especies forestales y ornamentales. Con el empleo de este sistema los coeficientes de multiplicación se incrementan en un rango de 20 a 70% en dependencia de la especie y las condiciones del cultivo. De igual forma, la calidad intrínseca de los brotes aumenta, permitiendo alcanzar niveles de supervivencia superiores al 95 %. Para lograr una mayor efectividad en el sistema se evalúan diferentes variables *in vitro* como el tiempo y frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, la presencia de retardantes del crecimiento en el medio de proliferación, condiciones ambientales, duración de la fase de proliferación y genotipo, entre otros (CIRAD, citado por González 2003).

Estudio realizado por Blanco *et al.*, (2011), evaluarón la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal Automatizado RITA®, en la multiplicación de brotes de piña (*Ananas comosus* L, Merr.) variedad Tabë Canã. Este sistema ha sido reportado como muy eficiente en la multiplicación de muchas especies de plantas de variedades de piña. (Escalona *et al*; González *et al*; De García *et al.*, citados por Blanco *et al.*, 2011) transfirieron 10 brotes adventicios de Tabë Canã al sistema RITA con medio de multiplicación. Después de ocho semanas se obtuvieron 39.4 brotes por explante que al compararlo con el numero de brotes obtenidos en agitación constante (CV =  $9.18 \pm 1,26$ ), se evidencio que RITA® es un sistema eficaz para la multiplicación de brotes.

Sepea y Sagawa, citados por García y Serrano (2005) lograron obtener alrededor de 5000 plantas a partir de un solo explante con medio liquido Murashige y skoog (MS) adicionado con agua de coco y transferidos a BAP para formar brotes axilares capaces de enraizar.

Krikorian citado por Garcia y Serrano (2005) demostró que *Ananas erectifolius*, una especie silvestre de piña, puede formar embriones somáticos sometiendo los brotes a cinetina (KIN)

y la auxina 2,4 D en un medio líquido Kheik y Hildebrand, primero se forma un callo que requiere ser transferido a un medio semisólido MS con adenosina y posteriormente a un medio con citocinina BAP y finalmente a un medio MS con auxina de naftalenacético (NAA). Escalona *et al*, citado Berthouly & Etienne (2005), mencionan que en piña la tasa de supervivencia aumenta linealmente con el tamaño del brote, es decir, que brotes de piña de más de 6 cm de longitud pueden cultivarse directamente en el invernadero, con 90 a 100% de supervivencia.

### **3. MATERIALES Y METODOS.**

#### **3.1. Localización.**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (Figura A-6), km. 33 1/2, carretera Panamericana, cantón San Andrés, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad a 460 m.s.n.m., con una Latitud Norte de 13° 48.5 y una Longitud Oeste de 89° 24.4, con valores de temperatura promedio anual de 24.4 °C, humedad relativa de 77% y una precipitación pluvial anual de 2,657 mm (MARN 2013).

#### **3.2. Instalaciones.**

El ensayo se instaló en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Biotecnología del CENTA, que tiene las siguientes dimensiones 3.00 m de largo, 3.00 m de ancho y 3.00 m de alto (Figura A-7a). El estante que se utilizó para colocar los tratamientos con las unidades experimentales (medio líquido y semisólido) estaba constituido de cuatro niveles y con las siguientes dimensiones 185 cm de largo, 200 cm de alto, 45.5 cm de ancho. En donde cada nivel del estante tenía una separación de 47.5 cm (Figura A-7b).

Todas las actividades realizadas en la etapa de laboratorio que incluyeron la fase de multiplicación, desarrollo y enraizamiento; se desarrollaron en el cuarto de micropropagación del Laboratorio de Biotecnología del CENTA (Figura A-7c). La fase de aclimatación se desarrolló en un macrotunel del Laboratorio de Biotecnología y consta de las siguientes dimensiones 9 m de largo x 4 m de ancho x 5 m de alto (Figura A-7d). Al interior de este se distribuyeron los tratamientos en un microtunel con las siguientes dimensiones 1.80 m de ancho x 6 m de largo x 1.00 m de alto (Figura A-7e).

#### **3.3. Materiales y equipo.**

##### **3.3.1. Material vegetativo.**

El material vegetativo de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) de la variedad Golden, que se utilizó para la investigación se obtuvo del cuarto de crecimiento del Laboratorio de Biotecnología del CENTA, en fase de multiplicación proveniente de medio semisólido MS adicionado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. Los explantes seleccionados fueron aquellos con una altura promedio de 2 cm estos fueron cortados y separados de la base, desechando las partes necróticas y oxidadas. Cabe mencionar que este material vegetal fue introducido a partir de

yemas de la corona en el año 2010, en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) adicionado con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0.65 mg.l<sup>-1</sup> de Ácido Giberélico (AG3). Posteriormente este material fue introducido al cuarto de incubación a temperatura promedio de 26 ± 1 °C, fotoperiodo de 16 horas luz e intensidad lumínica de 1500 lux. Después del periodo de establecimiento aséptico fueron transferidos al medio de multiplicación MS adicionado con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP.

### **3.3.2. Descripción de los métodos de micropropagación utilizados.**

#### **3.3.2.1 Sistema de Inmersión Temporal.**

Para el Sistema de Inmersión Temporal en medio líquido, se utilizaron veinticuatro sistemas con inmersión temporal (Figura A-8). Cada uno estuvo conformado por dos frascos con las siguientes dimensiones 175 x 70 mm con un volumen de 400 ml. Los frascos fueron sellados con Plastic wrap y tapones de hule No. 6 con las siguientes dimensiones diámetro inferior de 2.50 cm, diámetro superior de 3.00 cm y una longitud de 2.50 cm (Figura A-9a); estos tenían dos orificios con un diámetro de 5 mm en donde se introdujeron dos varillas huecas de vidrios autoclavables con un diámetro de ¼".

Una de las varillas se encargaba de introducir y de expulsar el aire del interior del frasco, este tenía una longitud total de 10.00 cm, dentro del frasco el extremo inferior del tubo sobresalía con una longitud de 1.00 cm sin tocar el fondo del frasco y en el extremo superior del tubo sobresalía con una longitud de 7.00 cm, además se le añadió un trozo de manguera autoclavable con un diámetro externo de ¼" y diámetro interno de 3/16" y una longitud de 15.24 cm (Figura A-9b) y al extremo de este se colocó un filtro de aire microporo de la marca "Millipore ®" con una membrana de 0.2 µ de espesor y con las siguientes dimensiones 55 x 40 mm (Figura A-9c). La otra varilla de vidrio tenía el mismo diámetro que la antes mencionada y la funcionalidad era de conectar y transportar el medio de cultivo líquido de un frasco a otro y viceversa debido a la diferencia de presión generada al interior de los frascos, la varilla tenía una longitud total de 60.96 cm además fue moldeado en forma de "U" con una longitud de 24.50 cm para ambos brazos en el interior de los frascos y con una separación entre un brazo y otro de 11.96 cm cada uno de estos sobresalía al interior del frasco con una longitud de 15.00 cm hasta tocar el fondo del frasco, estas mismas estructuras sobresalían al exterior de los frascos con una longitud de 7.00 cm (Figura A-9d). La presión de aire fue generada por una bomba de vacío "Sartorius ®" con las siguientes dimensiones 203 x 145 x 187 mm (Figura A-9e), con un máximo de vacío del 90% (100 mbar, 76 torr).

### **3.3.2.2. Método convencional.**

El método convencional en medio semisólido, estaba conformado por sesenta frascos con las siguientes dimensiones 50 x 90 mm con un volumen de 100 ml, en este caso el sellado se realizó con tapaderas magenta y Plastic wrap (Figura A-9f).

Además se utilizaron los siguientes equipos y materiales complementarios como pinzas, escarpelos, beakers, tubos de ensayo, erlenmeyers, probetas, calentador y agitador eléctrico (Hotplate), pHmetro, desionizador, balanza analítica y autoclave.

### **3.4. Metodología de laboratorio.**

En esta fase se evaluaron dos tipos de sistemas de micropropagación *in vitro*; utilizando medio semisólido y el Sistema de Inmersión Temporal (medio líquido), realizándose tres etapas multiplicación, desarrollo y enraizamiento para ambos métodos.

Las condiciones en que estuvieron sometidos los explantes en el cuarto de crecimiento para las fases de multiplicación, desarrollo y enraizamiento fueron las siguientes:

Fotoperiodo de 16 horas luz.

Humedad Relativa 35 %.

Temperatura 24°C.

Cambio del medio de cultivo semisólido y líquido cada ciclo de 28 días.

Duración de cada una de las fases: Multiplicación (tres ciclos), Desarrollo (un ciclo) y Enraizamiento (un ciclo).

#### **3.4.1. Fase de multiplicación.**

Para iniciar esta fase se realizó una renovación del material de piña variedad Golden en fase de crecimiento que se encontraba en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Biotecnología del CENTA, para ello se seleccionaron los explantes más uniformes para obtener una homogeneización de las mismas. La siembra del material vegetativo para la fase de multiplicación se realizó en una cámara de flujo laminar marca Thermo® de las siguientes dimensiones 2.00 x 0.90 x 1.90 m (Figura A-10) y se realizó con instrumentos y materiales estériles (Figura A-11).

La temperatura del cuarto de micropropagación fue de 24°C con ambiente controlado y estrictas medidas de asepsia y fitosanitarias. En esta fase para ambos métodos convencional y Sistema de Inmersión Temporal se realizaron tres ciclos de 28 días cada uno.

#### **3.4.1.1. Método convencional de multiplicación *in vitro*.**

El material vegetativo seleccionado fue de cinco explantes por cada frasco con un peso promedio total de 1.55 g y una altura promedio de 2 cm por explante.

#### **3.4.1.2. Método de Sistema de Inmersión Temporal (SIT).**

El material vegetativo seleccionado fue de 25 explantes por cada sistema con un peso promedio total de 7.52 g y una altura promedio de 2 cm por explante.

#### **3.4.1.3. Medio de cultivo para multiplicación.**

Para la elaboración de los medios de cultivo líquido y semisólido se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), suplementado con  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP (Bencilaminopurina),  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa y pH de 5.7; en el caso de los medios semisólidos se adicionaron  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de Phytigel y antes de autoclavar se fundió completamente, luego fué colocado en frascos de 100 ml de capacidad, dispensando 25 ml de medio por frasco y posteriormente fueron tapados con tapaderas magentas.

El medio líquido fue colocado en frascos de vidrio de 400 ml de capacidad en donde se dispense 125, 150 y 300 ml de medio líquido en cada frasco para los ciclos I, II y III respectivamente y luego cada frasco fue tapado con papel aluminio.

Los frascos con medio de cultivo líquido y semisólido, fueron colocados en parrillas de acero con las siguientes dimensiones 45 x 60 cm y ambos fueron esterilizados a  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y 20 libras de presión durante 30 minutos en un autoclave "YANG TA MIN ®" con las siguientes dimensiones 0.80 x 1.50 x 1.80 m (Figura A-12).

#### **3.4.1.4. Siembra de explantes para multiplicación.**

Una vez que los medios de cultivo semisólido y líquido fueron distribuidos en sus respectivos frascos y esterilizados en autoclave; en cada uno de los frascos de 400 ml para el medio líquido del Sistema de Inmersión Temporal se sembraron la cantidad de 25 explantes y en los frascos de 100 ml para medio semisólido del método convencional se sembraron 5 explantes (Figura A-13). Para esta actividad se utilizó la cámara de flujo laminar Thermo ®, dicho equipo ayudo a mantener las condiciones asépticas idóneas para mantener un bajo porcentaje de contaminación.

En el caso del método convencional semisólido al finalizar el segundo ciclo (56 días) después de la siembra en la fase de multiplicación se realizó una subdivisión de los brotes.

Al finalizar el tercer ciclo (84 días) después de la siembra en la fase de multiplicación para ambos métodos de micropropagación Sistema de Inmersión Temporal y convencional, se realizó la toma de datos.

#### **3.4.2. Fase de desarrollo.**

Esta fase tiene como objetivo favorecer el desarrollo de los brotes antes del enraizamiento; para dar inicio a esta fase se realizó nuevamente una selección de los brotes desarrollados en la fase de multiplicación y con una longitud aproximada de tres centímetros. El medio de cultivo líquido y semisólido empleado en la fase de desarrollo estuvo compuesto por el mismo medio de cultivo utilizado en la fase de multiplicación pero con los macro y micronutrientes reducidos al 50% y sin la aplicación de BAP. Cabe mencionar que para el método convencional y el Sistema de Inmersión Temporal esta fase tuvo una duración de un ciclo de 28 días.

#### **3.4.3. Fase de enraizamiento.**

Los explantes provenientes de la fase de desarrollo fueron transferidos a un nuevo medio de cultivo fresco de enraizamiento. Únicamente los explantes producidos y desarrollados en el método convencional fueron limpiados antes de su resiembra en un nuevo medio de cultivo semisólido para enraizamiento; y los explantes producidos y desarrollados en el método del Sistema de Inmersión Temporal únicamente se les cambió el frasco con medio anterior por otro frasco con un nuevo medio de cultivo líquido para enraizamiento. El medio de cultivo semisólido y líquido de esta fase estuvo constituido de la misma forma que la fase de desarrollo, a diferencia que se le adiciono  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB (Acido Indól Butírico) para estimular la producción de raíces en los brotes, esta fase tuvo una duración de un ciclo de 28 días.

### **3.5. Metodología de vivero.**

En esta etapa se desarrolló la fase de aclimatación de las vitroplantas provenientes de la fase de enraizamiento.

#### **3.5.1. Fase de aclimatación para ambos métodos.**

Para iniciar la fase de aclimatación se utilizaron muestras de 10 vitroplantas por repetición, es decir 60 vitroplantas por tratamiento, haciendo un total de 180 vitroplantas por los tres tratamientos provenientes del ciclo de enraizamiento, estas fueron extraídas de sus

respectivos frascos y sometidas a un lavado para retirar el exceso de medio de cultivo en las raíces (Figura A-14a). Posteriormente las vitroplantas fueron trasplantadas en bandejas plásticas negras de 200 celdas y se distribuyeron e identificaron en sus respectivos tratamientos (Figura A-14b) El sustrato utilizado para el llenado de las bandejas fue una mezcla para germinación con la siguiente composición turba de esfagno (grande), perlita hortícola, lana de roca, cal dolomítica y calcítica, carga fertilizante inicial y agente humectante, luego fueron trasladadas al macrotunel y colocadas en un microtunel utilizado como propagador, en donde días antes de su utilización este fue preparado y cubierto con plástico especial que ayudo a mantener la humedad relativa alta y este fue destapado a los ocho días después de haberse colocado las bandejas al interior del propagador. La duración de esta fase fue de 30 días a partir del trasplante, el manejo que se les dio a las vitroplantas fue únicamente la aplicación de riego tres veces por semana, una vez al día (Figura A-14c) y la evaluación semanal de la sobrevivencia de las vitroplantas. Al finalizar la toma de datos de esta fase las vitroplantas fueron trasplantadas en bolsas negras de polietileno 4"x6" (Figura A-14d) con una mezcla de sustrato de tierra negra, piedra pómez, granza de arroz quemada y aplicación de Carbofuran ( $C_{12}H_{15}NO_3$ ) como insecticida y nematicida.

### **3.6. Metodología estadística.**

#### **3.6.1. Factor en estudio.**

El factor en estudio de esta investigación lo constituyeron los sistemas de micropropagación y los tratamientos lo conforma los sistemas con sus respectivos tiempos de inmersión del Sistema de Inmersión Temporal y el medio semisólido del método convencional. Quedando de la siguiente manera T1 Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión cada dos horas, T2 Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión cada dos horas y T0 método convencional medio semisólido (Figura A-15).

#### **3.6.2. Diseño estadístico.**

Para el análisis de los datos se aplico el diseño estadístico completamente al azar con tres tratamientos y seis repeticiones

#### **3.6.3. Prueba estadística.**

Para determinar cuál de los tratamientos produjo los mejores efectos se aplico la prueba estadista de Tukey.

#### **3.6.4. Variables evaluadas en las diferentes fases.**

##### Fase de multiplicación.

Peso fresco promedio de brotes (g).

Número promedio de brotes por explante.

Longitud promedio de brotes (cm).

##### Fase de enraizamiento.

Longitud promedio de brote (cm).

Longitud promedio de raíz (cm).

Número promedio de raíces.

##### Fase de aclimatación.

Longitud promedio de explante (cm).

Longitud promedio de raíz (cm).

Número promedio de raíces.

Porcentaje de sobrevivencia (%).

Para el análisis de la información generada en la investigación se utilizó el software estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1 Se trabajo con un nivel de confianza de 95 %.

#### **3.6.5. Modelo matemático.**

Se utilizo el modelo estadístico:  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$

Donde:

$Y_{ij}$  = Característica bajo estudio observado en la parcela "j" y donde se aplicó el tratamiento.

$\mu$  = Media experimental

$\tau_i$  = Efecto del tratamiento i

$\epsilon_{ij}$  = Error experimental de la celda (i, j)

i = 1, 2, ..., a = número de tratamientos

j = 1, 2, ..., r = número de repeticiones de cada tratamiento

Cuadro 1. Plano de distribución de los tratamientos en cada repetición en el laboratorio.

R I		R II		R III		R IV		R V		R VI	
Parcela	Trat.										
101	T1	201	T1	301	T1	401	T1	501	T1	601	T1
102	T2	202	T2	302	T2	402	T2	502	T2	602	T2
103	T0	203	T0	303	T0	403	T0	503	T0	603	T0

### 3.7. Metodología económica.

Para el análisis económico de la investigación se utilizó el análisis de presupuesto parcial propuesto por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT (1988), el cual se fundamenta en los rendimientos medios, rendimientos ajustados, beneficios brutos de laboratorio y los costos que varían. Y el presupuesto parcial de beneficio neto de Ramírez (1994), el cual se fundamenta en la comparación de ganancias o ingresos adicionales de las tecnologías propuestas contra la tecnología que se aplica al momento de la investigación. Para el caso de esta investigación el tratamiento testigo lo constituye el método convencional (medio semisólido) y las alternativas propuestas Sistema de Inmersión Temporal con tiempos de 5 y 10 minutos de inmersión.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Fase de multiplicación.

Para la evaluación de técnicas de cultivo de tejidos, específicamente en la micropropagación de cualquier material vegetativo, las variables que mejores respuestas ofrecen, para aceptar una tecnología desde el punto de vista estadístico en la fase de multiplicación son: peso fresco promedio de brotes (g), número promedio de brotes por explante y longitud promedio de brotes (cm). Para la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados.

#### 4.1.1. Peso fresco promedio de brotes (g).

Previo al análisis de varianza de la variable, se verificó si estos pesos frescos promedios finales, no habían sido afectados por el peso fresco promedio inicial de los brotes, utilizando la técnica del análisis de covarianza; demostrándose al final que dichos pesos frescos promedios finales no fueron afectados en ningún momento por el peso fresco promedio inicial de los brotes (Cuadro 2); por lo que se procedió al análisis normal de las variables. Después de realizado el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 3); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal y el método convencional produjeron efectos diferentes en el peso fresco promedio de brotes (g) y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-5g), el tratamiento que presentó el mejor efecto fué T0 (método convencional medio semisólido), con una media igual a 215.10 g, seguido de T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión), con medias de 96.45 y 92.01 g respectivamente (Figura 1).

Cuadro 2. Análisis de varianza para la variable independiente peso fresco promedio inicial de brotes (g).

<b>F de V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F Cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamientos</b>	2	0.75194444	0.37597222	2.09 <sup>NS</sup>	0.1584
<b>Error</b>	15	2.70041667	0.18002778		
<b>Total</b>	17	3.45236111			

R-Cuadrado= 0.217806, C.V= 5.580813, Significancia= 0.05%, NS= No significativo

Cuadro 3. Análisis de varianza para la variable peso fresco promedio de brotes (g).

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	58498.21861	29249.10931	39.28*	<.0001
<b>Error</b>	15	11170.18208	744.67881		
<b>Total</b>	17	69668.40069			

R-Cuadrado= 0.839666, C.V= 20.28614, Significancia= 0.05%, \*= Significativo

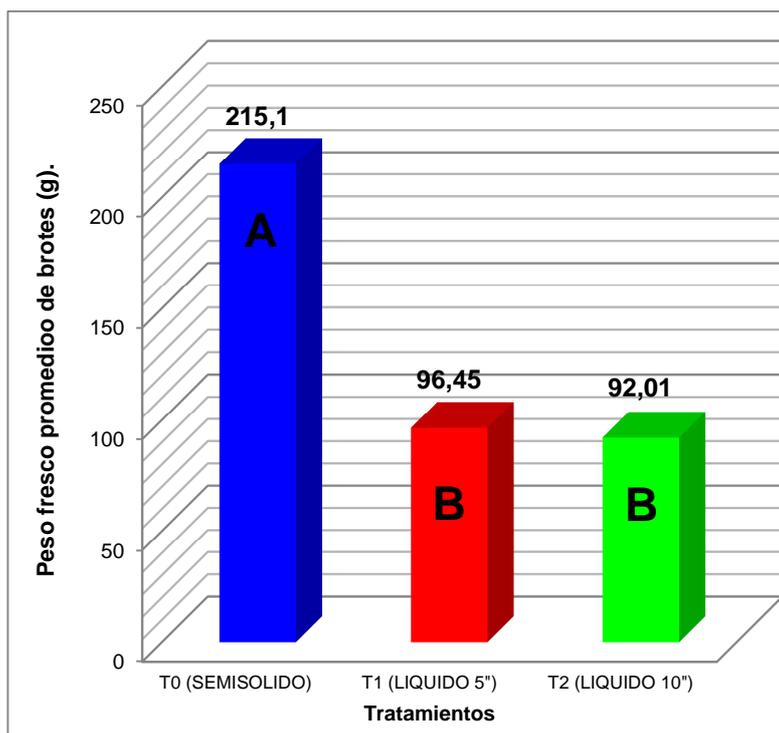


Figura 1. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable peso fresco promedio de brotes (g). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.1.2. Número promedio de brotes por explante.

Después de realizado el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 4); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal y el método convencional produjeron efectos diferentes, en el número promedio de brotes por explante y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-5h), el tratamiento que presentó el mejor efecto fue T0 (método convencional medio semisólido), con una media igual a 17.60 brotes por explante, seguido de T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo

de 5 minutos de inmersión), y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) con medias de 9.41 y 8.58 brotes por explante respectivamente (Figura 2).

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable número promedio de brotes por explante.

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	298.1195111	149.0597556	18.84*	<.0001
<b>Error</b>	15	118.6984000	7.9132267		
<b>Total</b>	17	416.8179111			

R-Cuadrado= 0.715227, C.V= 23.70322, Significancia= 0.05%, \*= Significativo

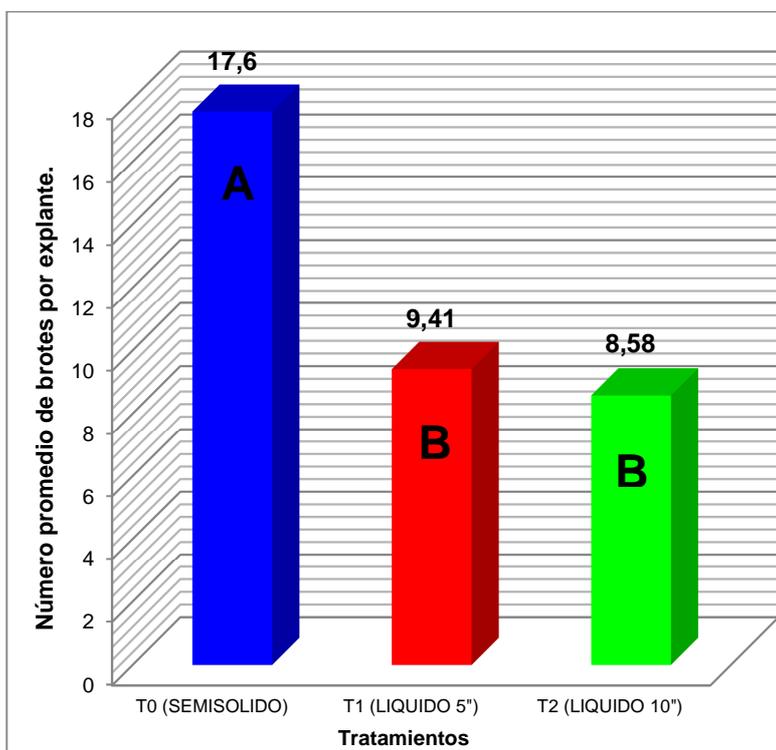


Figura 2. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable número promedio de brotes por explante. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.1.3. Longitud promedio de brotes (cm).

En esta variable después de realizado el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 5); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal, y el método convencional, produjeron efectos diferentes en la longitud promedio de brotes (cm), y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-5i) los tratamientos que presentaron los mejores efectos fueron T2 (Sistema de Inmersión

Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión), y T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), con medias de 2.52 y 2.03 cm respectivamente; seguido de T0 (método convencional medio semisólido), con una media igual a 1.37 cm (Figura 3).

Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable longitud promedio de brotes (cm).

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	4.03270000	2.01635000	30.93*	<.0001
<b>Error</b>	15	0.97795000	0.06519667		
<b>Total</b>	17	5.01065000			

R-Cuadrado= 0.804826, C.V= 12.90664, Significancia= 0.05%, \*= Significativo

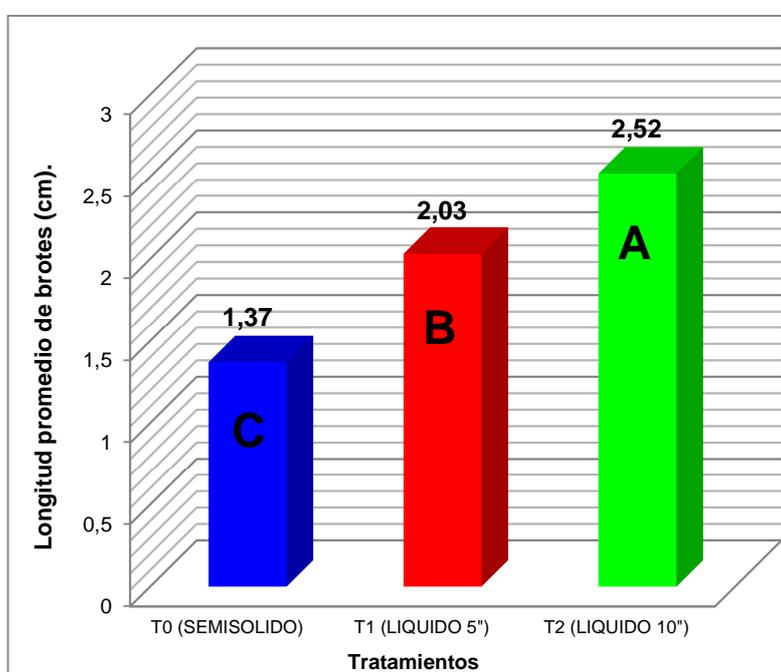


Figura 3. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de brotes (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

Escalona *et al.* (1999), compararon la tasa de multiplicación, en relación al peso fresco generado por los brotes de piña de la variedad Cayenne lisa, evaluando los medios de cultivo semisólido, líquido permanente y en inmersión temporal. Obteniendo mejores resultados de peso fresco, en el tratamiento con medio líquido, en inmersión temporal, con 200 ml/explante y con inmersiones de 2 minutos cada 3 hrs; seguido del tratamiento con

medio líquido permanente y medio semisólido; con medias de la masa por cultivo de 11 g, 2.75 g y 1.75 g respectivamente, en periodos de 4 y 7 semanas. Estudios realizados por Blanco *et al.* (2011), sobre medios de cultivo de consistencia líquida, utilizados para la fase de multiplicación, determinaron que al transferir 10 brotes adventicios de la variedad de piña Tabe Cana, en sistema RITA, para un período de 8 semanas se obtuvieron 39.4 brotes por explante. Se evidencia que RITA, es un sistema eficaz para la multiplicación de brotes de piña. Estudios realizados por Jiménez (2005), al evaluar la respuesta de la longitud promedio de brotes de piña de la variedad MD-2, utilizando dos sistemas de propagación *in vitro*, medio semisólido y líquido, en Sistema de Inmersión Temporal; obtuvo después de 8 semanas de inoculados los explantes iniciales, longitudes promedios de 3.3 cm por brote, en medio líquido en Sistema de Inmersión Temporal y 1.1 cm por brote, en medio semisólido.

Los resultados presentados en la investigación, al emplear el Sistema de Inmersión Temporal, para las variables peso fresco promedio de brotes (g), número promedio de brotes por explante y longitud promedio de brotes (cm); no concuerdan de forma positiva para todos los autores antes mencionados; posiblemente a los siguientes factores:

En un principio para la fase de multiplicación, se obtuvo estadísticamente un mayor número de brotes producidos por T0 (método convencional medio semisólido); esto se debió a que al desarrollar la metodología de subdivisión del material vegetativo para T0 (método convencional medio semisólido), demandó una mayor área de siembra aumentando de 0.84 m<sup>2</sup> a 2.52 m<sup>2</sup>, generando por tal razón un mayor número de brotes, al finalizar la fase de multiplicación. Posiblemente esto le permitió a T0 (método convencional medio semisólido) obtener ventaja sobre T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minuto de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), en donde no se realizó ninguna subdivisión del material vegetativo en la fase de multiplicación.

Otro factor que pudo haber influido en los resultados obtenidos, fue el volumen de los frascos de vidrio utilizados en el Sistema de Inmersión Temporal, provocando la aglomeración del material vegetativo, al interior de los frascos, ya que no se realizó una subdivisión del material, durante los tres ciclos que duro la fase; esto fue un factor negativo que inhibió la multiplicación y desarrollo de nuevos brotes de piña.

Finalmente otro factor que incidió directamente en los resultados obtenidos en la investigación, fué que las inmersiones realizadas en el experimento, se hicieron de forma manual, ya que no se contó con un cerebro electrónico que ayudara a realizar las frecuencias y los tiempos de inmersión de forma automatizada, para lograr las óptimas de un

100%; realizándose solamente el 33% de estas; siendo esto una de las limitantes en el Sistema de Inmersión Temporal, para la multiplicación de brotes.

Escalona (1999), manifiesta que los sistemas líquidos, desarrollan plantas competentes para su posterior aclimatación *ex vitro*; ya que estas experimentan un mayor desarrollo foliar, comparado con el medio sólido, y un gran número de explantes en cortos periodos de tiempo. Vílchez (2007), estas diferencias que hubo en los resultados obtenidos, con respecto a las frecuencias de inmersión utilizadas, se debe al contacto intermitente de los explantes con el medio líquido; el cual esta reducido a una delgada capa de medio de cultivo, que se adhiere a los explantes por cohesión, y que se renueva en cada nueva inmersión, al igual que la atmosfera gaseosa en el recipiente del cultivo; permitiendo un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un intercambio gaseoso más eficiente.

#### **4.2. Fase de Desarrollo.**

Esta fase, no se evaluó estadísticamente, ya que el objetivo fue favorecer el desarrollo y acondicionamiento de los explantes, antes del traslado a la fase de enraizamiento; además se utilizo el medio Murashige y Skoog (1962), reducido al 50% y sin reguladores de crecimiento; obteniendo el 100% de sobrevivencia de los explantes para esta fase.

#### **4.3. Fase de enraizamiento.**

Para la evaluación de técnicas de cultivo de tejidos, específicamente en la micropropagación de cualquier material vegetativo; las variables que mejores respuestas ofrecen para aceptar una tecnología desde el punto de vista estadístico, en la fase de enraizamiento son: longitud promedio de explantes (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíces. Para la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados.

##### **4.3.1. Longitud promedio de explantes (cm).**

Estadísticamente, después de realizado el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 6); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal, y el método convencional, produjeron efectos diferentes en la longitud promedio de explantes (cm), y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-6e), los tratamientos que presentaron los mejores efectos fueron T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), y T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), con medias de 6.43 y 5.94 cm respectivamente;

seguido de T0 (método convencional medio semisólido) con una media igual a 3.63 cm (Figura 4).

Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable longitud promedio de explantes (cm).

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	26.82027778	13.41013889	16.85*	0.0001
<b>Error</b>	15	11.94095000	0.79606333		
<b>Total</b>	17	38.76122778			

R-Cuadrado= 0.691936, C.V= 16.72049, Significancia= 0.05%, \*= Significativo

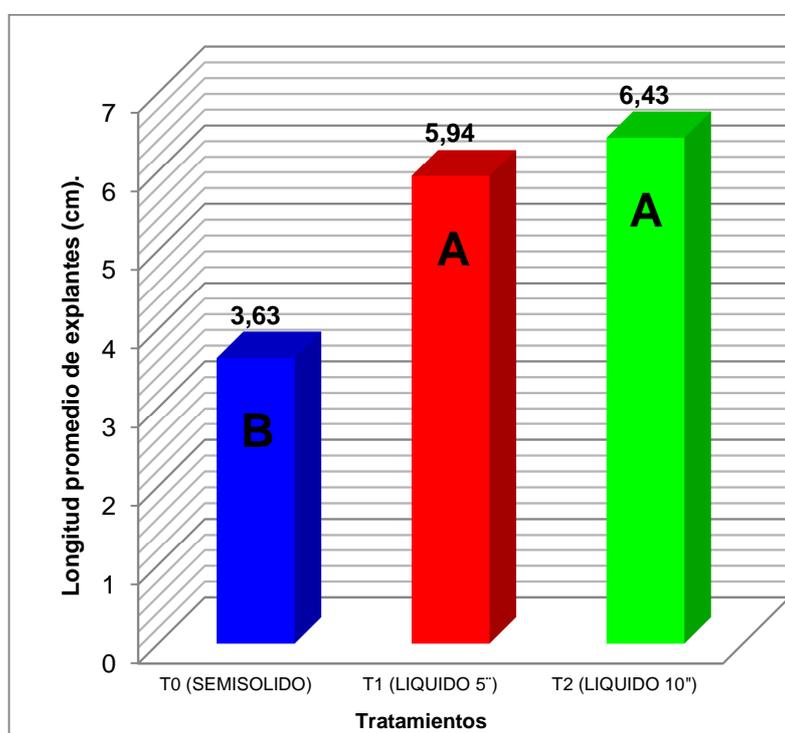


Figura 4. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de explantes (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.3.2. Longitud promedio de raíz (cm).

Estadísticamente, después de realizado el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 7); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal y el método convencional, produjeron efectos diferentes en la longitud promedio de raíz (cm), y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-6f),

los tratamientos que presentaron los mejores efectos fueron T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión), y T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), con medias de 2.15 y 1.87 cm respectivamente; seguido de T0 (método convencional medio semisólido), con una media igual a 1.28 cm (Figura 5).

Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable longitud promedio de raíz (cm).

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	2.37041111	1.18520556	5.69*	0.0145
<b>Error</b>	15	3.12216667	0.20814444		
<b>Total</b>	17	5.49257778			

R-Cuadrado= 0.431566, C.V= 25.75945, Significancia= 0.05%, \*= Significativo

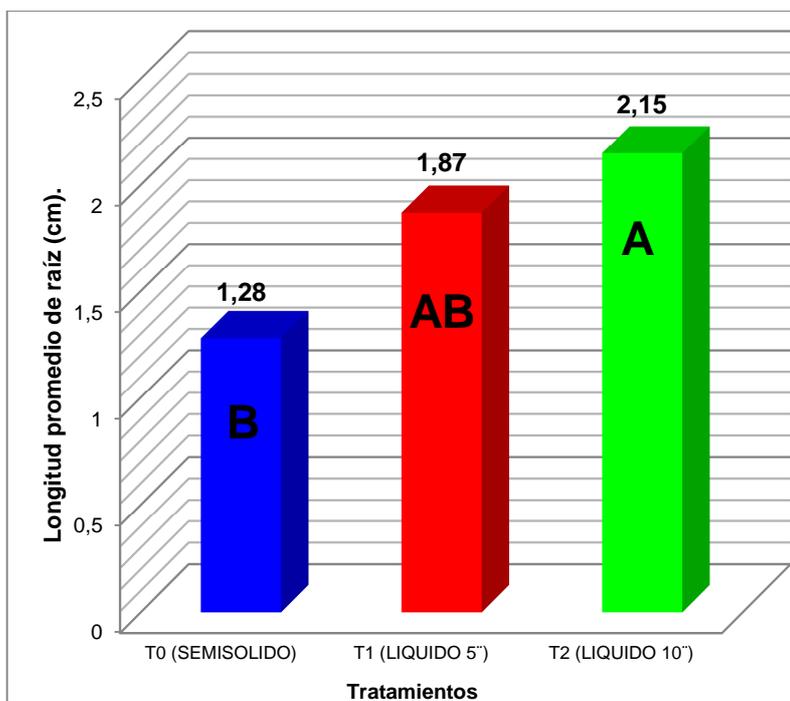


Figura 5. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de raíz (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.3.3. Número promedio de raíces.

Después de realizado el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 8), es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal, y el método convencional, produjeron efectos diferentes en el número promedio

de raíces, y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-6g), el tratamiento que presento el mejor efecto fue T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), con una media igual a 6.83 raíces, seguido de T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), y T0 (método convencional medio semisólido), con medias de 4.91 y 4.76 raíces respectivamente (Figura 6).

Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable número promedio de raíces.

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	15.93444444	7.96722222	6.48*	0.0094
<b>Error</b>	15	18.43500000	1.22900000		
<b>Total</b>	17	34.36944444			

R-Cuadrado= 0.463622, C.V= 20.13607, Significancia= 0.05 %, \*= Significativo

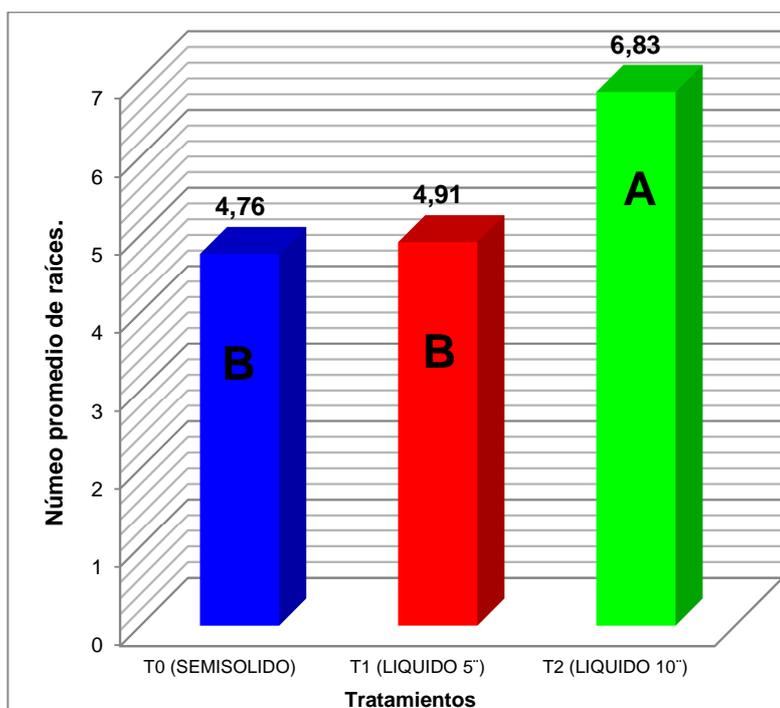


Figura 6. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable número promedio de raíces (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

Suárez (2011), realizó estudios en micropropagación *in vitro*, utilizando piña Híbrido MD-2, en medio líquido permanente, en donde evaluó dos tipos de corte, y diez concentraciones de AIA mas sacarosa. Presentando la mayor longitud promedio de explante, el tratamiento con

corte transversal, concentraciones de  $0.75 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIA y  $45 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa, obteniendo un valor promedio de 2.18 cm.

Estudios realizados por Rocha y Treminio (2008), en embriogénesis somática, en reproducción *in vitro* de piña cultivar MD-2, evaluaron el efecto de cinco concentraciones de AIA, y sacarosa en medio de cultivo semisólido, en relación a la altura de planta en fase de enraizamiento. Obteniendo mayor altura de plantas al utilizar el tratamiento con concentraciones de  $0.75 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIA y  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa, con un valor promedio de 3.75 cm; seguido de los tratamientos con concentraciones de  $0.50 \text{ mg.l}^{-1}$ , con  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa y sin regulador de crecimiento, con  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa; obteniendo valores promedios de alturas de explante de 3.21 y 3.14 cm respectivamente.

Estudios realizados por Blanco *et al.* (2011), al evaluar tres variedades de piña Eruwä Cana, Tabe Cana y Gobernadora, utilizando medio semisólido sin reguladores de crecimiento, en un periodo de 8 a 10 semanas; determinaron que las longitudes de las raíces formadas por las variedades de piña, fueron significativas entre ellas; siendo las variedad Gobernadora y Tabe Cana, las que produjeron mayores longitudes promedio de raíz con valores iguales a 2.2 cm; no mostrando diferencias estadísticas significativas entre ellas, seguido de la variedad Eruwä Cana, que produjo el menor valor en la longitud de raíz de 1.47 cm. También obtuvo así resultados de número promedio de raíces, en cada una de las variedades Eruwä Cana de 2.2; Tabe Cana 2.1 y Gobernadora 3.5 respectivamente.

Saucedo *et al.* (2008), determinaron la mejor interacción entre las variedades Champaka y Hawaiana, con concentraciones de auxinas AIB ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ), ANA ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) y sin hormonas; en la variable longitud de raíces de los explantes, utilizando medio semisólido. Presentando la mejor interacción, la variedad Hawaiana con la concentración de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB, y  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, obteniendo valores de 3.8 y 3.5 cm respectivamente. No así para la variedad Champaka, cuya mejor respuesta, la presento sin la utilización de hormonas, con un valor promedio de 3.3 cm, para ambos cultivares; presentando longitudes promedios de raíz de 2.9 cm, y para el cultivar MD-2, los tratamientos sin regulador de crecimiento,  $0.01 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP, y  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, resultaron estadísticamente iguales; con promedios en la longitud de 2.9, 2.7 y 2.7 cm respectivamente.

Estudios realizados por Jiménez (2005), sobre la respuesta morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*), en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, menciona que a pesar de que los medios de cultivos, en el que se desarrollaron los brotes de piña, no fueron preparados para inducir el enraizamiento *in vitro*; aun así esta variable fue evaluada, debido a la presencia de raíces, a partir de la cuarta semana después de la siembra; obteniendo mejores resultados

en medio líquido, con un número promedio de raíz 2.3 y 0.80 en medio semisólido, al término de ocho semanas.

Los resultados presentados en la investigación, al emplear el Sistema de Inmersión Temporal para las variables longitud promedio de explante (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíz por explante, no concuerdan con los autores antes mencionados; posiblemente debido a los siguientes factores.

Primero, finalizada la fase de multiplicación, se realizó una fase previa antes de la fase de enraizamiento, denominada fase de desarrollo; ya que es de gran importancia para mejorar el desarrollo de los brotes, como etapa previa de acondicionamiento, para la formación de raíces en los brotes; se utilizó medio de cultivo con sales minerales MS, reducido al 50%, más 30 gr.l<sup>-1</sup> de sacarosa, y un pH ajustado a 5.7; sin adición de hormona de crecimiento. Algunas veces es muy difícil enraizar los brotes después de la multiplicación, debido al exceso de citoquininas usadas en la fase de multiplicación o a la presencia de inhibidores endógenos; por tal razón la eliminación de estos factores, puede realizarse mediante la transferencia de los brotes a un medio libre de hormona, por un periodo corto; antes de exponerlos a la auxina que estimula el enraizamiento (Krikorian citado por Orellana 1997). Por tal razón en la investigación, se decidió realizar esta etapa, pues favoreció el desarrollo de los explantes; así mismo el enraizamiento de éstos. Orellana (1997), menciona que los altos porcentajes de enraizamiento que se obtienen, así como también el número y longitud de raíces producidas, demuestran la efectividad, no solo del procedimiento de enraizamiento utilizado, sino también de la integración de una etapa previa de desarrollo de los brotes, o fase de acondicionamiento antes del enraizamiento.

Segundo, por el estado del medio de cultivo en que se realizó la fase de enraizamiento, en donde se utilizaron las sales de MS, reducidos al 50%, adicionado con 30 gr.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 mg.l<sup>-1</sup> de la hormona de enraizamiento AIB (Ácido Indol Butírico).

Tercero, por la utilización del medio líquido en el Sistema de Inmersión Temporal, que mediante las inmersiones realizadas, permitió el baño constante de los explantes con el medio de cultivo; favoreciendo además al intercambio gaseoso en el interior de los frascos. Generando en la investigación; una mayor longitud promedio de explantes (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíces; superando al método convencional en medio semisólido.

#### 4.4. Fase de aclimatación.

Para la evaluación de técnicas de cultivo de tejidos, específicamente en la micropropagación de cualquier material vegetativo, las variables que mejores respuestas ofrecen para aceptar una tecnología, desde el punto de vista estadístico en la fase de aclimatación son: longitud promedio de explantes (cm), longitud promedio de raíz (cm), número promedio de raíces y porcentaje de sobrevivencia (%). Para la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados.

##### 4.4.1. Longitud promedio de explantes (cm).

Se realizó el análisis de varianza, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 9); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal, y el método convencional, produjeron efectos diferentes en la longitud promedio de explantes y según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-7e), el tratamiento que presentó el mejor efecto fue T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión); con una media igual a 8.80 cm, seguido de T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), y T0 (método convencional medio semisólido), con medias de 7.81 y 7.23 cm respectivamente (Figura 7).

Cuadro 9. Análisis de Varianza para la variable longitud promedio de explantes (cm).

<b>F de V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F Cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamientos</b>	2	7.55737778	3.77868889	5.15*	0.0198
<b>Error</b>	15	10.99851667	0.73323444		
<b>Total</b>	17	18.55589444			

R-Cuadrado= 0.407276, C.V= 10.77171, Significancia= 0.05 %, \*= Significativo

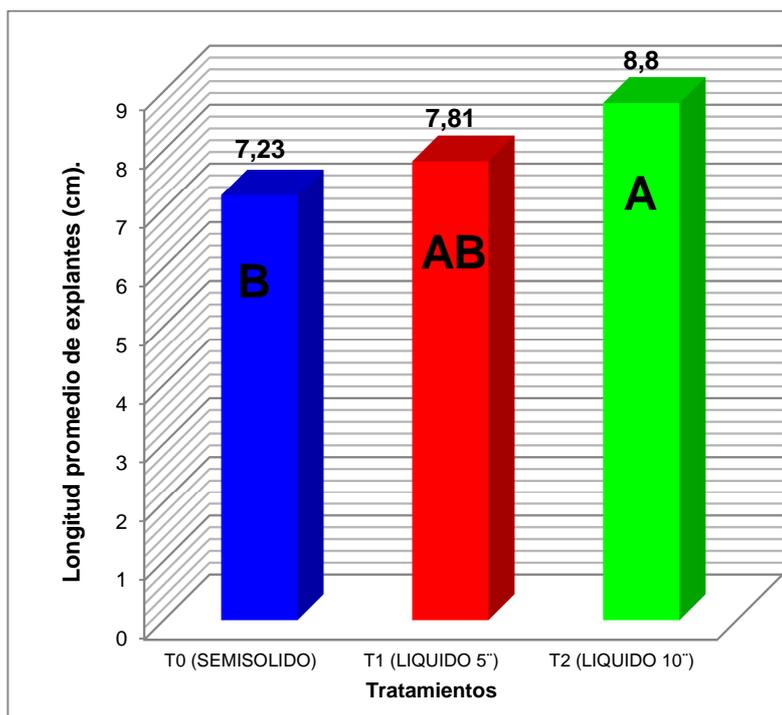


Figura 7. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de explantes (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.4.2. Longitud promedio de raíz (cm).

Después de realizado el análisis de varianza, no se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 10); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal y el método convencional, produjeron los mismos efectos en la longitud promedio de raíces y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-7f); el tratamiento que presento el mejor efecto fue T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), con una media igual a 2.22 cm, seguido de T0 (método convencional medio semisólido), y T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión) con medias de 2.05 y 2.03 cm respectivamente (Figura 8).

Cuadro 10. Análisis de Varianza para la variable longitud promedio de raíz (cm).

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	0.12333333	0.06166667	0.29 <sup>NS</sup>	0.7513
<b>Error</b>	15	3.17331667	0.21155444		
<b>Total</b>	17	3.29665000			

R-Cuadrado= 0.037412, C.V= 21.85038, Significancia= 0.05 %, NS= No significativo

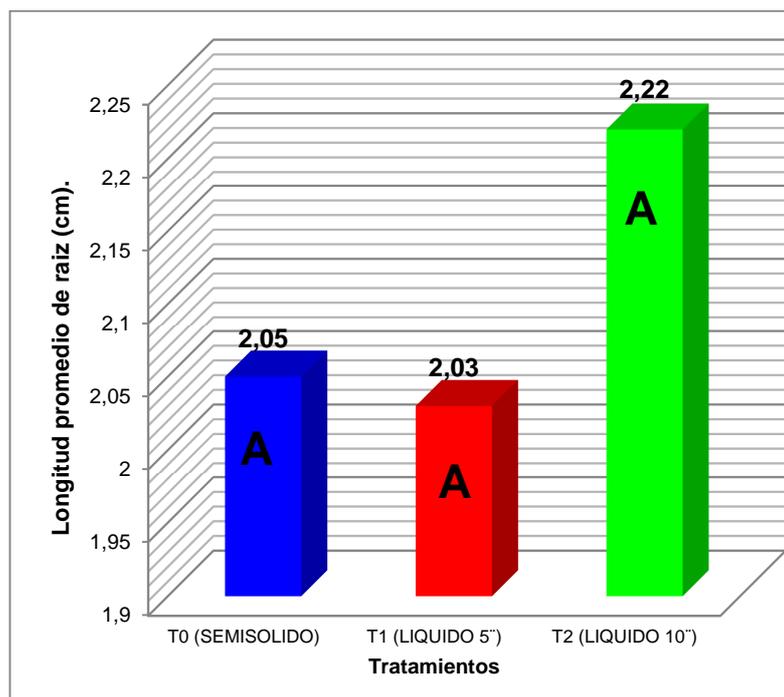


Figura 8. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable longitud promedio de raíz (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.4.3. Número promedio de raíces.

En esta variable, después de realizado el análisis de varianza, no se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio (Cuadro 11); es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal, y el método convencional, produjeron los mismos efectos en la número promedio de raíces, y que según la prueba estadística de Tukey (Cuadro A-7g), el tratamiento que presentó el mejor efecto fue T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), con una media igual a 6.90 raíces por vitroplanta, seguido de T0 (método convencional medio semisólido), y T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), con medias de 6.75 y 5.76 raíces por vitroplanta respectivamente (Figura 9).

Cuadro 11. Análisis de Varianza para la variable número promedio de raíces.

F de V	G.L	S.C	C.M	F Cal	Pr > F
<b>Tratamientos</b>	2	4.54777778	2.27388889	2.33 <sup>NS</sup>	0.131
<b>Error</b>	15	14.60833333	0.97388889		
<b>Total</b>	17	19.15611111			

R-Cuadrado= 0.237406, C.V= 15.24759, Significancia= 0.05 %, NS= No significativo

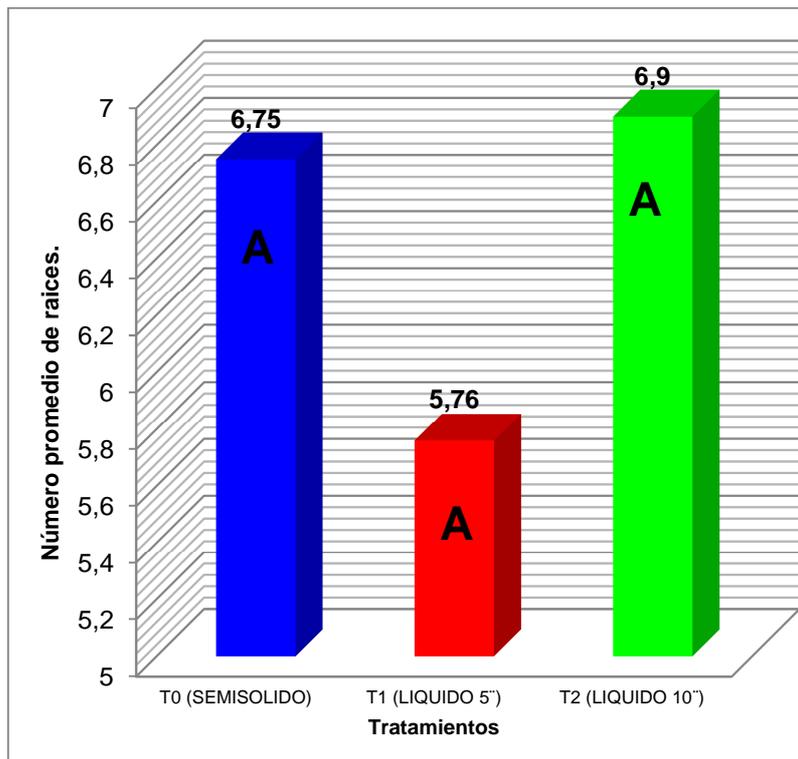


Figura 9. Diferencias de las medias según la prueba de Tukey y el efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en la variable número promedio de raíces (cm). Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.4.4. Porcentaje de sobrevivencia (%).

Los resultados de esta variable, se obtuvieron de una muestra de sesenta vitroplantas, por tratamiento, y fue realizada en base a la observación y cuantificación semanal de las vitroplantas, determinándose de esta forma la sobrevivencia de las muestras. Para este caso no fue necesario aplicar una prueba estadística, debido a que las muestras seleccionadas para dicho estudio en fase de aclimatación, presentaron el 100% de sobrevivencia, para todos los tratamientos en un periodo de 30 días (Figura 10). Cabe mencionar que los excelentes resultados obtenidos en la sobrevivencia de las vitroplantas de piña, de la variedad Golden, pudo deberse al tipo de sustrato utilizado, ya que fue una mezcla para germinación.



T0 (SEMISOLIDO)

T1 (LIQUIDO 5'')

T2 (LIQUIDO 10'')

Figura 10. Efecto de la utilización de dos métodos (Sistema de Inmersión Temporal y convencional) de micropropagación masal en piña, en el cien por ciento de sobrevivencia. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

Suarez (2011), quien en su trabajo de investigación titulado *Micropropagación In vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales, evaluó en la fase de aclimatación, la longitud promedio de explante, utilizando como sustrato turba estéril. Al término de la fase, obtuvo una longitud promedio/explante de 16.92 cm. Pineda *et al.* (2012), demostraron que utilizando un sustrato compuesto de tierra negra y arena lavada, en una relación de 1:1, se obtienen longitudes promedios por explante de 9 y 15 cm.

Pérez *et al.* (1996), evaluaron cuatro sustratos; arena, escoria volcánica, pómez y mezcla a base de estiércol de bovino, tierra orgánica y arena de río, en una relación 2:1:1, en el endurecimiento de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), propagadas *in vitro*; mostrando, que el sustrato que mejor número promedio de raíz expreso fue la arena, con 12.17 respectivamente; seguido de la escoria volcánica, pómez y finalmente la mezcla con los siguientes resultados 8.94, 8.50 y 7.72 respectivamente. Pérez *et al.* (2011), también evaluaron la variable número promedio de raíz, utilizando como sustratos, Cachaza y Humus de lombriz al 100%; ambos sustratos manifestaron los siguientes resultados: 18.7 y 12.2 respectivamente.

Estudios realizados por Garita y Gómez (2000), sobre la Micropropagación de piña variedad Champaka F-153, evaluaron en la fase de aclimatación, el efecto de diferentes sustratos y observaron que el sustrato de fibra de coco molida, presento los mejores resultados en longitud promedio de raíz 2.06 cm; y utilizando turba mas fibra de coco molida, presento longitud promedio de raíz de 1.30 cm. Pineda *et al.* (2012), demostraron que en la fase de aclimatación, utilizando un sustrato compuesto de tierra y arena lavada, en proporciones de 1:1, y mantenidas en propagadores, presentaron un 100% de supervivencia.

Los resultados presentados en la investigación, al emplear el Sistema de Inmersión Temporal, para las variables: longitud promedio de explantes (cm), longitud promedio de raíz (cm), número promedio de raíces y porcentaje de sobrevivencia (%), son muy similares a los autores antes mencionados; posiblemente a los siguientes factores:

Al trasladar las vitroplantas del laboratorio de cultivo de tejidos, al área de invernadero; requieren que se les proporcionen las condiciones óptimas, para que puedan aclimatarse y desarrollarse; una de éstas es la humedad relativa, ya que las plantas cultivadas *in vitro*, tienen generalmente la cutícula (capa de cera), escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90-100% que se da *in vitro*. Por tal razón, los primeros días son determinantes, ya que las vitroplantas deben ser colocadas en un propagador, que debe estar cerrado por un cierto tiempo (8 días); para que las vitroplantas se acostumbren a las condiciones *ex vitro*.

Ahuja citado por Orellana (1997), menciona que la transición entre el ambiente *in vitro*, con un 100% de humedad relativa, a un ambiente *ex vitro*, con un porcentaje de humedad menor, es un factor crítico para la sobrevivencia de las plántulas. Además las plántulas *in vitro*, viven en un ambiente heterótrofo, donde el medio de cultivo suplente los azúcares y otros nutrientes para su desarrollo. Las hojas de estas plántulas, a pesar de ser verdes, probablemente no son completamente activas para fotosintetizar; no poseen capa cerosa ni cutícula, lo que las hace más susceptibles durante la fase de aclimatación. Otro factor importante, es el tipo de sustrato donde se trasplantaran las vitroplantas de piña.

Hepton citado por Pérez *et al.* (2011), menciona que el drenaje y eliminación del agua, son necesarios para el crecimiento de la piña; ya que el sistema radical es intolerante a los suelos mal aireados, y que los ideales deben tener alto contenido de materia orgánica, con excelente drenaje interno, y alto contenido de aire, para proveer cantidades óptimas de agua, nutrientes y oxígeno a las raíces de las plantas.

Ortiz *et al* citado por Pérez *et al* (2011), menciona que la baja permeabilidad y escasa aireación de los sustratos orgánicos, para el crecimiento del sistema radical; son características indeseables, que contribuyen a incrementar el porcentaje de mortalidad de las vitroplantas.

#### **4.5. Análisis económico.**

En toda investigación, aquellos tratamientos que pueden presentar los mejores efectos desde el punto de vista estadístico, no son siempre los que presentan la mejor relación beneficio-costos. Un elemento que es determinante, para que un productor seleccione este

tipo de material, es la rentabilidad que genere la tecnología. Por lo tanto, un análisis económico, le permite al productor tomar la mejor opción tecnológica. Esta mejor opción se determina muy fácilmente, a través del análisis de presupuesto parcial y beneficio neto, en donde los resultados se presentan a continuación.

#### **4.5.1. Fase de multiplicación.**

##### **Rendimientos medios.**

Consiste en presentar la relación de la producción total por área, utilizada de cada tratamiento. Por ejemplo, en la investigación realizada, produjo el mayor rendimiento el T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), seguido del T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), y T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con valores de 2824, 2576 y 1684 respectivamente (Cuadro 12).

##### **Rendimientos ajustados.**

Es el rendimiento medio reducido en un 10%, debido a que el manejo realizado en la investigación es más preciso, obteniendo rendimientos ajustados para T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), y T0 (Testigo método convencional medio semisólido), de 2541.60, 2318.40 y 1515.60 respectivamente (Cuadro 12).

##### **Beneficio bruto de laboratorio.**

Se calcula mediante el precio de venta de un brote producido en laboratorio, con un valor de \$USDD 0.14, multiplicado por el rendimiento ajustado. Obteniendo el mayor beneficio bruto el T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), seguido del T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión) y T0 (Testigo método convencional medio semisólido); con valores de \$USDD 355.82, 324.57 y 212.18 respectivamente (Cuadro 12).

##### **Costos que varían.**

Son los costos que varían de un tratamiento a otro, presentando los costos relacionados con los insumos, la mano de obra, la depreciación del equipo por el tiempo utilizado, y el uso de energía eléctrica (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de presupuesto parcial para la fase de multiplicación mediante dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden.

<b>1. Rendimientos.</b>	<b>T0 (Testigo MSS)</b>	<b>T1 (SIT 5 min.)</b>	<b>T2 (SIT 10 min.)</b>
Rendimiento medio.	1684	2824	2576
Rendimiento ajustado.	1515.60	2541.60	2318.40
Beneficios brutos de laboratorio.	212.18	355.82	324.57
<b>2. Costos que varían \$USSD/Trat.</b>			
Costo por el uso de bomba de vacío.	0	0.25	0.51
Costo de energía por el uso de bomba de vacío.	0	0.33	0.67
Costo por el uso de Hotplate.	0.12	0.04	0.04
Costo de energía por el uso de Hotplate.	0.59	0.19	0.19
Costo por el uso de Phytigel.	3.99	0	0
Costo del Sistema de Inmersión Temporal.	0	7.00	7.00
Costo del método convencional Medio Semisólido.	15.55	0	0
Costo de mano de obra.	30.94	23.54	23.54
<b>3. Total de costos que varían.</b>	<b>51.19</b>	<b>31.35</b>	<b>31.95</b>

### **Beneficio neto.**

Se obtiene de comparar las ganancias o ingresos adicionales, de cada una de las tecnologías propuestas, en comparación con los costos adicionales de la tecnología, que se aplica en el momento de la investigación (tratamiento testigo). Determinándose estas ganancias o ingresos adicionales, que se obtienen de sumar los ingresos adicionales de la tecnología propuesta, más el total de costos que varían del tratamiento testigo; mientras que los costos adicionales, se obtienen de sumar el costo total que varía de la tecnología propuesta, más la disminución de ingresos de aplicar el tratamiento testigo. Obteniéndose el beneficio neto de las diferencias existentes entre ganancias, o ingresos adicionales del tratamiento testigo. Por ejemplo, en la comparación de T1 (Sistema de Inmersión Temporal,

con tiempo de 5 minutos de inmersión), contra T0 (Testigo método convencional medio semisólido), nos produjo una ganancia o ingreso adicional para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), igual a \$USSD 407.01; el cual se obtuvo de sumar el beneficio bruto de T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión) mas el total de costos que varían de T0 (Testigo método convencional medio semisólido). Mientras que para el T0 (Testigo método convencional medio semisólido), su ganancia o ingreso adicional fue de \$USSD 243.53, el cual se obtuvo de sumar el total de costos que varían de T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), mas el beneficio bruto de T0 (Testigo método convencional medio semisólido), produciéndose al final un beneficio neto igual a \$USSD 163.48, el cual se obtiene de restar la ganancia o ingreso adicional de T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión), menos la ganancia o ingreso adicional de T0 (Testigo método convencional medio semisólido), tal como se observa en el cuadro 13.

Cuadro 13. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de multiplicación.

<b>Ganancias o Ingresos adicionales.</b>	<b>\$USSD</b>
1. Ingresos adicionales	355.82
2. Disminución de costos	51.19
<b>(A) Total de Ingresos adicionales</b>	<b>407.01</b>
<b>Costos adicionales.</b>	
1. Costos adicionales	31.35
2. Disminución de ingresos	212.18
<b>(B) Total de Costos adicionales</b>	<b>243.53</b>
<b>Cambio en el ingreso neto (A-B).</b>	<b>(407.01- 243.53) = 163.48</b>

El cambio propuesto por el T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), es rentable y produce un aumento en el ingreso neto, que al utilizar la alternativa T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con un valor de \$USSD 163.48.

Cuadro 14. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de multiplicación.

<b>Ganancias o Ingresos adicionales.</b>	<b>\$USSD</b>
1. Ingresos adicionales	324.57
2. Disminución de costos	51.19
<b>(A) Total de Ingresos adicionales</b>	<b>375.76</b>
<b>Costos adicionales.</b>	
1. Costos adicionales	31.95
2. Disminución de ingresos	212.18
<b>(B) Total de Costos adicionales</b>	<b>244.13</b>
<b>Cambio en el ingreso neto (A-B).</b>	<b>(375.76 – 244.13) = 131.63</b>

Por lo tanto, el cambio propuesto por el T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), es rentable y produce un aumento en el ingreso neto, que al utilizar la alternativa T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con un valor de \$USSD 131.63.

Los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), produjeron los mayores beneficios netos, lo que se les atribuye, por ser los tratamientos que presentan los menores costos que varían, y una mayor producción de brotes por área, como se observa en la figura 11.

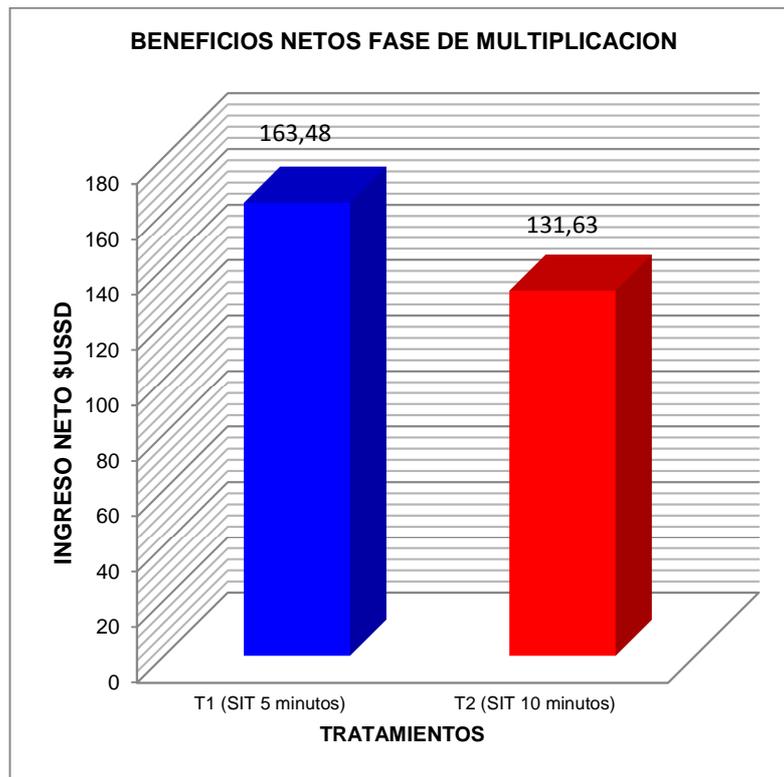


Figura 11. Beneficios netos de los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) para la fase de multiplicación. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.5.2. Fase de desarrollo.

Cuadro 15. Análisis de presupuesto parcial, para la fase de desarrollo mediante dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananás comosus* L. Merr.) variedad Golden.

1. Rendimientos.	T0 (Testigo MSS)	T1 (SIT 5 min.)	T2 (SIT 10 min.)
Rendimiento medio.	300	300	300
Rendimiento ajustado.	270	270	270
Beneficios brutos de laboratorio.	56.70	56.70	56.70
2. Costos que varían \$USDD/Trat.			
Costo por el uso de bomba de vacío.	0	0.08	0.17
Costo de energía por el uso de bomba de vacío.	0	0.11	0.22

Costo por el uso de Hotplate.	0.04	0.01	0.01
Costo de energía por el uso de Hotplate.	0.19	0.06	0.06
Costo por el uso de Phytigel.	2.38	0	0
Costo del Sistema de Inmersión Temporal.	0	2.33	2.33
Costo del método convencional Medio Semisólido.	3.11	0	0
Costo de mano de obra.	8.03	7.56	7.56
<b>3. Total de costos que varían.</b>	<b>13.71</b>	<b>10.15</b>	<b>10.35</b>

Cuadro 16. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de desarrollo.

<b>Ganancias o Ingresos adicionales.</b>	<b>\$USSD</b>
1. Ingresos adicionales	56.70
2. Disminución de costos	13.71
<b>(A) Total de Ingresos adicionales</b>	<b>70.41</b>
<b>Costos adicionales.</b>	
1. Costos adicionales	10.15
2. Disminución de ingresos	56.70
<b>(B) Total de Costos adicionales</b>	<b>66.85</b>
<b>Cambio en el ingreso neto (A-B).</b>	<b>(70.41 – 66.85) = 3.56</b>

Por lo tanto, el cambio propuesto por el T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), es rentable y produce un aumento en el ingreso neto, que al utilizar la alternativa T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con un valor de \$USSD 3.56.

Cuadro 17. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de desarrollo.

<b>Ganancias o Ingresos adicionales.</b>	<b>\$USSD</b>
1. Ingresos adicionales	56.70
2. Disminución de costos	13.71
<b>(A)Total de Ingresos adicionales</b>	<b>70.41</b>
<b>Costos adicionales.</b>	
1. Costos adicionales	10.35
2. Disminución de ingresos	56.70
<b>(B)Total de Costos adicionales</b>	<b>67.05</b>
<b>Cambio en el ingreso neto (A-B).</b>	<b>(70.41 – 67.05) = 3.36</b>

El cambio propuesto por el T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con 10 minutos de inmersión), es rentable y produce un aumento en el ingreso neto, que al utilizar la alternativa T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con un valor de \$USSD 3.36.

Los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), produjeron los mayores beneficios netos; lo que se les atribuye por ser los tratamientos que presentan los menores costos que varían, en el desarrollo de brotes de piña, como se observa en la figura 12.

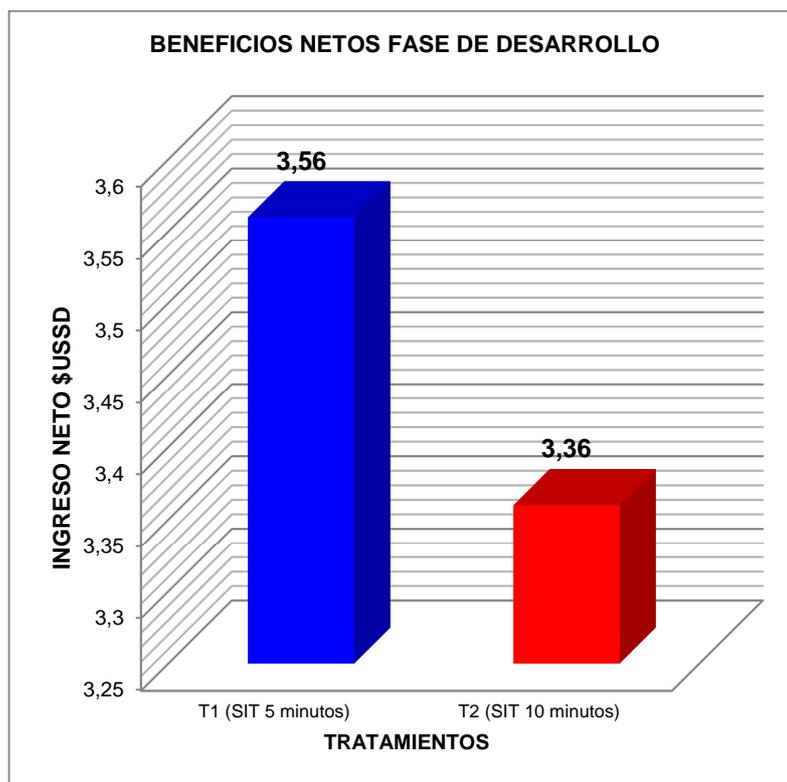


Figura 12. Beneficios netos de los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) para la fase de desarrollo. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

#### 4.5.3. Fase de enraizamiento.

Cuadro 18. Análisis de presupuesto parcial para la fase de enraizamiento mediante dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananás comosus* L. Merr.) variedad Golden.

	T0 (Testigo MSS)	T1 (SIT 5 min.)	T2 (SIT 10 min.)
<b>1. Rendimientos.</b>			
Rendimiento medio.	300	300	300
Rendimiento ajustado.	270	270	270
Beneficios brutos de laboratorio.	75.60	75.60	75.60
<b>2. Costos que varían \$USDD/Trat.</b>			
Costo por el uso de bomba de vacío.	0	0.08	0.17
Costo de energía por el uso de bomba de vacío.	0	0.11	0.22
Costo por el uso de Hotplate.	0.04	0.01	0.01
Costo de energía por el uso de Hotplate.	0.19	0.06	0.06
Costo por el uso de Phytigel.	2.38	0	0
Costo del Sistema de Inmersión Temporal.	0	2.33	2.33

Costo del método convencional Medio Semisólido.	3.11	0	0
Costo de mano de obra.	8.03	7.56	7.56
<b>3. Total de costos que varían.</b>	<b>13.71</b>	<b>10.15</b>	<b>10.35</b>

Cuadro 19. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de enraizamiento.

<b>Ganancias o Ingresos adicionales.</b>	<b>\$USSD</b>
1. Ingresos adicionales	75.60
2. Disminución de costos	13.71
<b>(C) Total de Ingresos adicionales</b>	<b>89.31</b>
<b>Costos adicionales.</b>	
1. Costos adicionales	10.15
2. Disminución de ingresos	75.60
<b>(D) Total de Costos adicionales</b>	<b>85.75</b>
<b>Cambio en el ingreso neto (A-B).</b>	<b>(89.31 – 85.75) = 3.56</b>

El cambio propuesto por el T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), es rentable y produce un aumento en el ingreso neto, que al utilizar la alternativa T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con un valor de \$USSD 3.56.

Cuadro 20. Presupuesto parcial de beneficio neto para el T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) comparado con el T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en la fase de enraizamiento.

<b>Ganancias o Ingresos adicionales.</b>	<b>\$USSD</b>
1. Ingresos adicionales	75.60
2. Disminución de costos	13.71
<b>(A) Total de Ingresos adicionales</b>	<b>89.31</b>
<b>Costos adicionales.</b>	
1. Costos adicionales	10.35
2. Disminución de ingresos	75.60
<b>(B) Total de Costos adicionales</b>	<b>85.95</b>
<b>Cambio en el ingreso neto (A-B).</b>	<b>(89.31 – 85.95) = 3.36</b>

El cambio propuesto por el T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), es rentable y produce un aumento en el ingreso neto, que al utilizar la alternativa T0 (Testigo método convencional medio semisólido), con un valor de \$USSD 3.36. Los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión), y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), produjeron los mayores beneficios netos; lo que se les atribuye por ser los tratamientos en

presentar los menores costos que varían, en el enraizamiento de brotes de piña, como se observa en la figura 13.

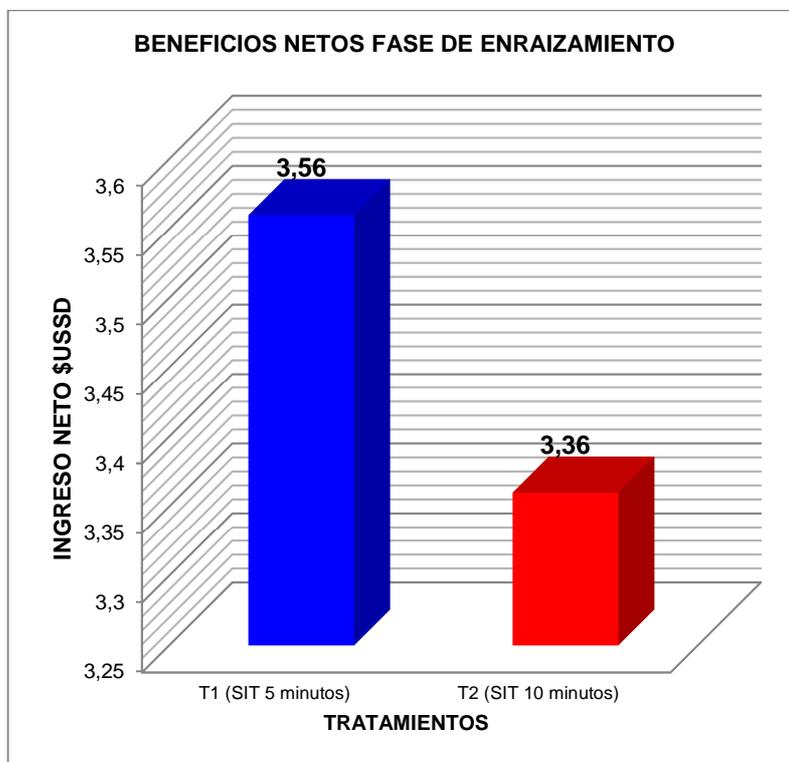


Figura 13. Beneficios netos de los tratamientos T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 minutos de inmersión) para la fase de enraizamiento. Tesis UES Ciencias Agronómicas 2013.

Cabe mencionar que para la fase de aclimatación, no se desarrollo el presupuesto parcial en base al beneficio neto, por tener igualdad de condiciones, tanto en el rendimiento ajustado como en su beneficio neto (Cuadro A-8).

Para la realización del análisis económico, se determinó el valor de una vitroplanta desarrollada y apta para su establecimiento en campo de \$0.45 por vitroplanta; este valor fue brindado y establecido por el Laboratorio de biotecnología del CENTA. Se asumió que el costo se ha distribuido en una forma proporcional para cada fase, haciendo la operación de dividir el valor de \$USDD 0.45 por vitroplanta entre las seis fases, obteniendo un valor de \$USDD 0.07 en cada una de ellas. Para obtener el valor de alguna de las fases, ya sea inicio; multiplicación, desarrollo, enraizamiento, aclimatación y desarrollo final. Se fué incrementando el valor de \$USDD 0.07 en cada una de las fases, obteniendo así los valores

de \$USDD 0.07, 0.14, 0.21, 0.28, 0.35 y 0.45 respectivamente (Figura A-16). Al desarrollar el análisis económico en la fase de multiplicación, se obtuvieron rendimientos medios para T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión) de 2824 y 2576 brotes por 0.84 m<sup>2</sup> respectivamente y para T0 (método convencional medio semisólido), se generó rendimientos medios de 5053 brotes por 2.52 m<sup>2</sup>. Cabe mencionar que estos rendimientos medios, fueron a partir de 300 explantes iniciales para cada uno de los tratamientos. Para tener una mejor comparación y percepción, del análisis económico entre los tratamientos, y los respectivos métodos de micropropagación empleados en la investigación; se decidió igualar el área utilizada por T0 (método convencional medio semisólido), en relación al área utilizada para T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión); ésto se realizó únicamente para la fase de multiplicación, obteniéndose finalmente un rendimiento medio para T0 (método convencional medio semisólido), de 1684 brotes por 0.84 m<sup>2</sup>. Es de mencionar que para las fases de desarrollo y enraizamiento, se mantuvieron las mismas unidades experimentales de 300 brotes iniciales en un área de 0.84 m<sup>2</sup>, para cada uno de los tratamientos en estudio. A pesar que el Sistema de Inmersión Temporal, utilizado en la investigación, no logró igualar la eficiencia óptima de los Sistemas de Inmersión Temporal Automatizados como RITA ® y BIT ®, en relación a una mayor producción de brotes como lo descrito por otros autores; podemos decir que además de todas las limitantes antes mencionadas en el Sistema de Inmersión Temporal se logró evidenciar en todas las fases, la superioridad económica sobre el método convencional medio semisólido, obteniendo beneficios netos para T1 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 5 minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal, con tiempo de 10 minutos de inmersión), de \$USDD 163.48 y 131.63. Con estos resultados, se confirma una vez más que el cambio propuesto de utilizar el Sistema de Inmersión Temporal, con tiempos de 5 y 10 minutos de inmersión son rentables, y producen un aumento considerable en el ingreso neto, que al utilizar el método convencional medio semisólido. De acuerdo con Cruzat (2009), el uso de las técnicas de propagación actuales se ha fundamentado en optimizar las herramientas de micropropagación in vitro con la finalidad de obtener mejoría tanto en los procesos como en la inversión económica enfocándose principalmente en la reducción de los costos y mejoramiento de la rentabilidad de los sistemas de micropropagación. Si bien la micropropagación convencional representa un sistema adecuado para la masificación de la producción de plantas en periodos cortos de tiempo, presenta también una limitante que

corresponde al alto costo de la planta (Paredes citado por Albarracín 2012). Este costo se atribuye principalmente a dos factores tales como: agente gelificante y alto costo por mano de obra. Albarracín (2012), determinó que para la multiplicación de plantas de cilandro cimarrón (*Eryngium foetidum*) utilizando el método convencional y Sistema de Inmersión Temporal, al efectuar el análisis de costo, obtuvo que el porcentaje correspondiente a costo por el uso de agar asciende a un 84.28% del medio de cultivo; es decir, este compuesto utilizado en el medio semisólido, y respecto al medio de cultivo líquido empleado en el sistema de inmersión temporal se prescinde de agar. Además el costo por planta multiplicada en medio semisólido es de 0.10 centavos de dólar mientras que al emplear sistemas de inmersión temporal el costo se reduce a 0.01 centavos de dólar, si bien la inversión inicial de implementación del Sistemas de Inmersión Temporal es alta, el beneficio-costos de su uso aumenta significativamente en cuanto al costo de producción.

## 5. CONCLUSIONES.

- ❖ Para la fase de multiplicación, se determinó que al utilizar el Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de 5 minutos de inmersión, cada 2 horas, generó la mayor cantidad de brotes de piña variedad Golden.
- ❖ En la fase de multiplicación, para el Sistema de Inmersión Temporal, se comprobó que el volumen del frasco utilizado no fue el adecuado; ya que al no realizarse la subdivisión del material vegetativo durante tres ciclos, generó una aglomeración al interior del frasco.
- ❖ En la fase de enraizamiento utilizando el Sistema de Inmersión Temporal, con un tiempo de 10 minutos de inmersión cada 2 horas, produjo una mejor calidad de explantes de piña variedad Golden.
- ❖ Para el Sistema de Inmersión Temporal, se comprobó que al realizarse de forma manual las frecuencias e inmersiones, en las fases de multiplicación, desarrollo y enraizamiento; no se obtuvieron los resultados esperados, debido a que éstas no se realizaron como se recomienda técnicamente.
- ❖ En la fase de aclimatación, se obtuvo un 100% de sobrevivencia de las vitroplantas de piña, utilizando un sustrato para germinación.
- ❖ El Sistema de Inmersión Temporal, con un tiempo de 5 minutos de inmersión cada 2 horas, presentó la mejor relación Beneficio-Costo, para la micropropagación masal de piña variedad Golden.

## 6. RECOMENDACIONES.

- ❖ En la fase de multiplicación, utilizar el Sistema de Inmersión Temporal, con un tiempo de 5 minutos de inmersión cada 2 horas, para producir una mayor cantidad de brotes de piña variedad Golden.
- ❖ En la fase de multiplicación, para el Sistema de Inmersión Temporal, utilizar frascos de mayor volumen, que permitan la multiplicación y desarrollo de nuevos brotes, sin necesidad de realizar subdivisiones del material vegetativo durante tres ciclos.
- ❖ Para generar una mejor calidad de explantes de piña variedad Golden, en la fase de enraizamiento, se debe utilizar el Sistema de Inmersión Temporal, con un tiempo de 10 minutos de inmersión cada 2 horas.
- ❖ Para obtener el 100% de sobrevivencia de las vitroplantas de piña variedad Golden, en la fase de aclimatación, utilizar un sustrato para germinación que permita buena aireación y buen drenaje del agua.
- ❖ Es necesario contar con un cerebro electrónico, que realice las frecuencias e inmersiones de forma automatizada, para obtener una mejor eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal, en las fases de multiplicación, desarrollo y enraizamiento.
- ❖ Para generar una mejor relación Beneficio-Costo, en la micropropagación masal de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden; se recomienda utilizar el Sistema de Inmersión Temporal, de forma automatizado, con un tiempo de 5 minutos de inmersión cada 2 horas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ Albarracín Acosta, CP. 2012. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC, 203 p.
- ❖ Albarracín More, H. s.f. Modulo de trabajo: métodos biotecnológicos. Moquegua, PE. 73 p.
- ❖ Avilán L; Leal F; Bautista D. 1988. Manual de fruticultura. Maracay, VE, AMERICA. CVIII, p. 531-532
- ❖ Basail M; Medero V; Martínez M; Ventura JC de la; López J; García M; Cabrera M; Santos A; Rayas A; Pons C; Bauta M; Álvarez M; García J. 2003. Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en micropropagación de la yuca en Sistema de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal. 3(2): 93-96
- ❖ Berrios vallecillos, EC de; López Ventura, YE; Miranda Henríquez, AD. 1996. Micropropagación de dos variedades de piña (*Ananas comosus* L. Merr) "Hawaiana" y "Azucarón", utilizando las yemas de la corona. Tesis Lic. Biol. San Salvador, SV, Universidad de El Salvador. 83 p.
- ❖ Berthouly M; Etienne H.2005. Temporal inmersión system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. Eds. AK Hvoslef-Eide; W Preil. Francia, CIRAD-AMIS. p. 165-195
- ❖ Blanco HA; Vargas TE; García E de. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. Revista Interciencia. 36(6)437-443
- ❖ Castañeda de Pretelt, P. 2003. Manual Técnico: Seminario sobre producción y manejo post cosecha de la piña para la Exportación. San Salvador, SV. República de China- OIRSA. p 3-6
- ❖ Castillo A. (s.f.). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las brujas. UY. INIA. 8 p.
- ❖ CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, MX). 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. Distrito Federal, MX. 79 p.
- ❖ Cruzat, GR. 2009. Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Chile. Ograma Ltda. p. 8-10

- ❖ De Feria M; Jiménez E; Chávez M.2002. Empleo de los sistemas de inmersión temporal para la multiplicación in vitro de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112. Biotecnología Vegetal 2(3): 143-147
- ❖ Escalona M; Lorenzo JC; González B; Daquinta M; González J; Borroco GC; Disjardins Y. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). Plant propagation in temporary inmersión system. Plant Cell Rep. 18:743-748
- ❖ FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2013. FAOSTAT: División de estadística (en línea). Roma, IT. Consultado 10 Abr. 2013. Disponible en <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>
- ❖ García MD; Serrano H. 2005. La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. Contactos. 56: 55-61
- ❖ Garita H; Gómez L. 2000. Micropropagación de la variedad piña champaka F-153. Revista Agronomía costarricense. 001(24):63-73
- ❖ George EF. 1987. Factors affecting growth and morphogenesis. I. Genotype and the physical environment. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology. Ed. E George. 2. ed. Edington, UK. Exegetics. p. 183-230
- ❖ González Luna, KS. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Tesis. Bach. Ing. Biot. Cartago, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. p. 10-11
- ❖ Gutiérrez, CY. 2009. Proyecto de desarrollo productivo cadena de valor frutícola: análisis del mercado para la piña. 8 p
- ❖ Hartman, HT; Kester,DE. 1985. Propagación de las plantas: principios y prácticas. Trad. A Marino. México, CONTINENTAL. p 639-666
- ❖ Henríquez, P; Hernández, C. 2008. IV concurso de sistematización de experiencias exitosas en agronegocios rurales en América Latina: asociación de productores de piña de El Salvador (APPES), iniciativa de asociatividad y gestión. San Salvador, SV, IICA. p. 1-6
- ❖ Jaramillo Jiménez KV. 2013. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito, Pichincha. Tesis. Ing. Agr. Quito, EC. Universidad Central de Ecuador. p. 7-14
- ❖ Jiménez Palma, R. 2005. Respuesta morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Bach. Ing. en Agro. San Carlos, CR. Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica. 64 p.

- ❖ Krikorian AD. 1993. Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación. Ed. W. Roca; LA Mroginski. Cali, CO. CIAT. p. 41-77
- ❖ León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José, CR, IICA. 522 p.
- ❖ López León, OM. 2013. Establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo *In Vitro* de *Agave letonae* (henequén) a partir de yemas axilares. Tesis Lic. Biol. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. p 34-35
- ❖ Marín JA.1993. Micropropagación de especies frutales. HortoFrutic. 1: 56-62.
- ❖ MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Dirección General del Observatorio Ambiental, Gerencia de Meteorología). 2013. Anuario Climatológico San Andrés. La Libertad, SV, 1p.
- ❖ Mejía Anaya, R; Vittorrelli, C. 1988. Programa de investigación en papa: cultivo *In vitro* de plantas de papa; manual de laboratorio. s.l. Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial. p. C1.5-C8. 77
- ❖ Ministerio de Economía.2009. IV Censo agropecuario 2007-2008: Resultados nacionales. San Salvador, SV, MAG. p 452-499
- ❖ Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Herramientas básicas: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. 2 ed. Eds. G Levitus; V Echenique; C Rubinstein; E Hopp; L Mroginski.. Buenos Aires,AR. ArgenBio. p. 21-22.
- ❖ Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- ❖ Olmos S; Luciani G; Galdeano E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma: Micropropagación. 2. ed. Eds. G Levitus; V Echenique; C Rubinstein; E Hopp; L Mroginski. Buenos Aires, AR. ArgenBio. p. 351-362
- ❖ Orellana Núñez MA. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis Mag. Sci. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. p. 17-21
- ❖ Pérez Flores JR; Flores Coto JC; Correa Guillen BM. 1996. Evaluación de cuatro sustratos y tres tamaños de plantas diferentes en el endurecimiento de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) propagadas *in vitro*. Tesis Ing. Agr. San Salvador, SV. UES. p. 56-99
- ❖ Pérez Fernández, N; Galindo Menéndez, L; Peláez Peláez; M; Rodríguez Obrador; E. 2011. Evaluación del comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*ananas comosus* (L) Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en fase de aclimatación. *Innovación Tecnológica.* 17(4):1-11

- ❖ Pierik RLM. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. L Ayerbe Mateo-Sagasta. Madrid ES. Mundi-Prensa. p. 127-132
- ❖ Pineda A; Vargas TE; Escala M; García E de. 2012. Organogénesis *In vitro* en piña “Española Roja” y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro* 24(3):175-186
- ❖ Posada L; Gómez R; Reyes M; Alvares L. 2003. Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Biotecnología Vegetal* 3(1):3-8
- ❖ Ramírez, O. 1994. El uso de presupuestos parciales en el manejo integrado de plagas (Hoja Técnica). *Manejo integrado de plagas*. 11: i-iv
- ❖ Roca, WM; Mroginski, LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CO, CIAT. p. C3.41-C5.95-C10.239
- ❖ Rocha Mendoza, DR; Treminio Reyes, SJ. 2008. Embriogénesis somática en reproducción *in vitro* del cultivo de piña (*Ananas comosus*. L. Merr) Cultivar MD-2. Trabajo de Diplomado. Managua, NI. UNA. 32 p.
- ❖ Sandoval Delgado, IA. 2010. Guía técnica del cultivo de la piña. Múltiples. El Salvador, CENTA. 23 p.
- ❖ Saucedo Aguilar, SG; Ramos Gavilanes, LE; Varas Giler, E; Carmigniani Castro, F. 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* 1:49-54
- ❖ Suárez Haro, FE. 2011. Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Tesis Ing. Agr. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 61 p.
- ❖ Uriza Ávila DE. 2011. Programa Estrategia para el Departamento Rural Susceptible de la Región Sur- Sureste de México: Trópico Húmedo 2011. Paquete Tecnológico piña MD2 (*Ananas comosus* var. *comosus*). Establecimiento y mantenimiento. Veracruz, MX. SAGARPA/INIFAP. p. 2
- ❖ Usui, K; Okabe, K; Pernillo, RB; Ramírez, AE. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA. 166 p.
- ❖ Vílchez, J; Ferrer, O; Albany, N. 2007. Multiplicación *In vitro* de Zabala en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*. 24(1):78-82
- ❖ Vidalie H. 1986. Cultivo *in vitro*. Distrito Federal, MX. Científica. s.p.

## 8. ANEXOS.

Cuadro A-1. Línea de producción de cultivo de piña desde laboratorio de cultivo de tejidos hasta el establecimiento en campo.

1	2	3
		
Duración 1 mes	Duración 3 meses	Duración 1 mes
<b>Iniciación</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Desarrollo</b>
<b>Total 1 mes</b>	<b>Total 4 meses</b>	<b>Total 5 meses</b>

4	5		6
			
Duración 1 mes	Duración 1 mes	Duración 2 meses	Duración 9 meses
<b>Enraizamiento</b>	Propagador	Invernadero	<b>Producción</b>
	<b>Aclimatación</b>		
<b>Total 6 meses</b>	<b>Total 9 meses</b>		<b>Total 18 meses</b>

Fuente: Elaboración propia. Cuadro A-2. Principales países productores de piña.

<b>Países productores de piña</b>	<b>Producción en toneladas para el año 2011</b>
Tailandia	2,593,207.00
Brasil	2,365,458.00
Costa Rica	2,268,956.00
Filipinas	2,246,806.00
Indonesia	1,540,626.00
India	1,415,000.00
Nigeria	1,400,000.00
China	1,351,367.00
México	742,926.00
Viet Nam	533,384.00
Venezuela	419,832.00
Estados Unidos de América	176,222.00

Fuente: FAO 2013.

Cuadro A-3. Composición de cinco medios nutritivos básicos (MB) para el cultivo de tejidos *in vitro*.

MINERAL SALT MEDIA FOR PLANT TISSUE AND CELL CULTURE										
Salts	MS (15) 1		ER (28) 2		B5 (29) 3		SH (26) 4		HE (25) 5	
	mg L	mM	mg L	mM	mg L	mM	mg L	mM	mg L	mM
Macronutrients										
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20.6	1200	15.0						
KNO <sub>3</sub>	1900	18.8	1900	18.8	2500	25	2500	25		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	3.0	440	3.0	150	1.0	200	1.4	75	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	1.5	370	1.5	250	1.0	400	1.6	250	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1.25	340	2.5						
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					134	1.0				
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>							300	2.6		
NaNO <sub>3</sub>									600	7.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O					150	1.1			125	0.9
KCl									750	10.0
Micronutrients										
	mg L	μM	mg L	μM	mg L	μM	mg L	μM	mg L	μM
KI	0.83	5.0			0.75	4.5	1.0	6.0	0.01	0.06
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	100	0.63	10	3.0	50	5.0	80	1.0	16.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	100	2.23	10					0.1	0.5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O					10	60	10	60		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	30			2.0	7.0	1.0	3.5	1.0	3.5
Zn. versenate			15	37						
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.0	0.025	0.1	0.25	1.0	0.1	0.4		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.1	0.0025	0.01	0.025	0.1	0.2	0.8	0.03	0.12
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.1	0.0025	0.01	0.025	0.1	0.1	0.4		
AlCl <sub>3</sub>									0.03	0.22
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O									0.03	0.13
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O									1.0	3.7
Na <sub>2</sub> ·EDTA	37.3	100	37.3	100	37.3	100	20	55		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	100	27.8	100	27.8	100	15	55		
Sucrose (g)	30		40		20		30			
pH	5.7		5.8		5.5		5.8			

Fuente: Murashige & Skoog, 1962.

Cuadro A-4. Rangos de concentraciones de macro y micro elementos empleados en medios de cultivo *in vitro*.

	<b>Elementos</b>	<b>Concentración</b>
<b>Macroelementos</b>	Nitrógeno	20 – 40 mM
	Azufre	1 – 3 mM
	Fósforo	1 – 3 mM
	Calcio	1 – 3 mM
	Magnesio	1 – 3 mM
	Potasio	20 – 30 mM
<b>Microelementos</b>	Hierro	-
	Boro	-
	Cobalto	0.1 uM
	Cobre	0.1 uM
	Yodo	-
	Manganeso	5 – 30 uM
	Molibdeno	0.1 uM
	Zinc	5 – 30 uM

Fuente: Albarracín, 2012.

Cuadro A-5. Base de datos del programa informático SAS para la fase de multiplicación.

a	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 1					
	The GLM Procedure					
	Class Level Information					
	Class	Levels	Values			
TRAT	3	1 2 3				
	Number of Observations Read		18			
	Number of Observations Used		18			
b	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 2					
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: PI					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
	Model	2	0.75194444	0.37597222	2.09	0.1584
	Error	15	2.70041667	0.18002778		
	Corrected Total	17	3.45236111			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	PI Mean	
		0.217806	5.580813	0.424297	7.602778	
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	0.75194444	0.37597222	2.09	0.1584	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
TRAT	2	0.75194444	0.37597222	2.09	0.1584	
c	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 3					
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: PF					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
	Model	2	58498.21861	29249.10931	39.28	<.0001
	Error	15	11170.18208	744.67881		
	Corrected Total	17	69668.40069			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	PF Mean	
		0.839666	20.28614	27.28880	134.5194	
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	58498.21861	29249.10931	39.28	<.0001	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
TRAT	2	58498.21861	29249.10931	39.28	<.0001	
d	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 4					
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: NUMBRO					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
	Model	2	298.1195111	149.0597556	18.84	<.0001
	Error	15	118.6984000	7.9132267		
	Corrected Total	17	416.8179111			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	NUMBRO Mean	
		0.715227	23.70322	2.813046	11.86778	
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	298.1195111	149.0597556	18.84	<.0001	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
TRAT	2	298.1195111	149.0597556	18.84	<.0001	

Nota: a) Información sobre el nivel de clase; b) Análisis de varianza para la variable peso fresco inicial de brotes g (PI); c) Análisis de varianza para la variable peso fresco final brotes g (PF); d) Análisis de varianza para la variable número promedio de brotes por explante.

e	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 5					
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: LONBRO					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	4.03270000	2.01635000	30.93	<.0001	
Error	15	0.97795000	0.06519667			
Corrected Total	17	5.01065000				
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LONBRO Mean		
	0.804826	12.90664	0.255336	1.978333		
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
	TRAT	2	4.03270000	2.01635000	30.93	<.0001
	Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
	TRAT	2	4.03270000	2.01635000	30.93	<.0001
f	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 6					
	The GLM Procedure					
	Tukey's Studentized Range (HSD) Test for PI					
	NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.					
	Alpha	0.05				
	Error Degrees of Freedom	15				
	Error Mean Square	0.180028				
	Critical Value of Studentized Range	3.67338				
	Minimum Significant Difference	0.6363				
	Means with the same letter are not significantly different.					
	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT		
	A	7.8917	6	3		
	A	7.4667	6	1		
	A	7.4500	6	2		
g	The SAS System 14:43 Thursday, March 6, 2013 7					
	The GLM Procedure					
	Tukey's Studentized Range (HSD) Test for PF					
	NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.					
	Alpha	0.05				
	Error Degrees of Freedom	15				
	Error Mean Square	744.6788				
	Critical Value of Studentized Range	3.67338				
	Minimum Significant Difference	40.924				
	Means with the same letter are not significantly different.					
	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT		
	A	215.10	6	3		
	B	96.45	6	1		
	B	92.01	6	2		

Nota: e) Análisis de varianza para la variable longitud promedio de brotes cm (LONBRO); f) Prueba de Tukey para las variable peso fresco inicial de brotes g (PI); g) Prueba de Tukey para las variable peso fresco final brotes g (PF).

h	<p style="text-align: center;">The SAS System      14:43 Thursday, March 6, 2013    8</p> <p style="text-align: center;">The GLM Procedure</p> <p style="text-align: center;">Tukey's Studentized Range (HSD) Test for NUMBRO</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>Alpha</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>Error Degrees of Freedom</td><td>15</td></tr> <tr><td>Error Mean Square</td><td>7.913227</td></tr> <tr><td>Critical Value of Studentized Range</td><td>3.67338</td></tr> <tr><td>Minimum Significant Difference</td><td>4.2186</td></tr> </table> <p style="text-align: center;">Means with the same letter are not significantly different.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr><th>Tukey Grouping</th><th>Mean</th><th>N</th><th>TRAT</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>17.603</td><td>6</td><td>3</td></tr> <tr><td>B</td><td>9.413</td><td>6</td><td>1</td></tr> <tr><td>B</td><td>8.587</td><td>6</td><td>2</td></tr> </tbody> </table>	Alpha	0.05	Error Degrees of Freedom	15	Error Mean Square	7.913227	Critical Value of Studentized Range	3.67338	Minimum Significant Difference	4.2186	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	17.603	6	3	B	9.413	6	1	B	8.587	6	2
Alpha	0.05																										
Error Degrees of Freedom	15																										
Error Mean Square	7.913227																										
Critical Value of Studentized Range	3.67338																										
Minimum Significant Difference	4.2186																										
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT																								
A	17.603	6	3																								
B	9.413	6	1																								
B	8.587	6	2																								
i	<p style="text-align: center;">The SAS System      14:43 Thursday, March 6, 2013    9</p> <p style="text-align: center;">The GLM Procedure</p> <p style="text-align: center;">Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LONBRO</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>Alpha</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>Error Degrees of Freedom</td><td>15</td></tr> <tr><td>Error Mean Square</td><td>0.065197</td></tr> <tr><td>Critical Value of Studentized Range</td><td>3.67338</td></tr> <tr><td>Minimum Significant Difference</td><td>0.3829</td></tr> </table> <p style="text-align: center;">Means with the same letter are not significantly different.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr><th>Tukey Grouping</th><th>Mean</th><th>N</th><th>TRAT</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>2.5267</td><td>6</td><td>2</td></tr> <tr><td>B</td><td>2.0367</td><td>6</td><td>1</td></tr> <tr><td>C</td><td>1.3717</td><td>6</td><td>3</td></tr> </tbody> </table>	Alpha	0.05	Error Degrees of Freedom	15	Error Mean Square	0.065197	Critical Value of Studentized Range	3.67338	Minimum Significant Difference	0.3829	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	2.5267	6	2	B	2.0367	6	1	C	1.3717	6	3
Alpha	0.05																										
Error Degrees of Freedom	15																										
Error Mean Square	0.065197																										
Critical Value of Studentized Range	3.67338																										
Minimum Significant Difference	0.3829																										
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT																								
A	2.5267	6	2																								
B	2.0367	6	1																								
C	1.3717	6	3																								
j	<pre> DATA FASE MULTIPLICACION; INPUT REP TRAT PI PF NUMBRO LONBRO; CARDS; 1 1 7.65 45.15 4.18 2.29 2 1 7.15 66.05 7.88 2.38 3 1 7.35 121.05 12.68 1.93 4 1 7.45 116.25 10.76 2.02 5 1 7.55 118.75 11.62 1.47 6 1 7.65 111.45 9.36 2.13 1 2 7.45 109.10 8.06 2.18 2 2 7.55 66.55 7.68 2.43 3 2 7.55 94.60 8.92 2.82 4 2 7.70 103.90 10.12 2.61 5 2 7.10 118.65 9.48 2.80 6 2 7.35 59.25 7.26 2.32 1 3 8.10 206.55 17.18 1.23 2 3 6.85 182.90 13.44 1.29 3 3 7.80 236.20 21.27 1.65 4 3 7.45 215.35 22.64 1.33 5 3 8.45 250.10 14.96 1.30 6 3 8.70 199.50 16.13 1.43 PROC GLM; CLASS TRAT; MODEL PI PF NUMBRO LONBRO=TRAT; MEANS TRAT/TUKEY; RUN; </pre>																										

Nota: h) Prueba de Tukey para la variable número promedio de brotes por explante (NUMBRO); i) Prueba de Tukey para las variable longitud promedio de brotes cm (LONBRO); j) Introducción de la base de datos para la fase de multiplicación.

Cuadro A-6. Base de datos del programa informático SAS para la fase de enraizamiento.

a	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 1</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Class Level Information</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Class</th> <th>Levels</th> <th>Values</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>3</td> <td>1 2 3</td> </tr> </tbody> </table> <p>Number of observations 18</p>	Class	Levels	Values	TRAT	3	1 2 3																																																				
Class	Levels	Values																																																									
TRAT	3	1 2 3																																																									
b	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 2</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Dependent Variable: LPE</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2</td> <td>26.82027778</td> <td>13.41013889</td> <td>16.85</td> <td>0.0001</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>15</td> <td>11.94095000</td> <td>0.79606333</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Corrected Total</td> <td>17</td> <td>38.76122778</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R-Square</th> <th>Coeff Var</th> <th>Root MSE</th> <th>LPE Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>0.691936</td> <td>16.72049</td> <td>0.892224</td> <td>5.336111</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Type I SS</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>26.82027778</td> <td>13.41013889</td> <td>16.85</td> <td>0.0001</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Type III SS</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>26.82027778</td> <td>13.41013889</td> <td>16.85</td> <td>0.0001</td> </tr> </tbody> </table>	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	Model	2	26.82027778	13.41013889	16.85	0.0001	Error	15	11.94095000	0.79606333			Corrected Total	17	38.76122778					R-Square	Coeff Var	Root MSE	LPE Mean		0.691936	16.72049	0.892224	5.336111	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	TRAT	2	26.82027778	13.41013889	16.85	0.0001	Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	TRAT	2	26.82027778	13.41013889	16.85	0.0001
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
Model	2	26.82027778	13.41013889	16.85	0.0001																																																						
Error	15	11.94095000	0.79606333																																																								
Corrected Total	17	38.76122778																																																									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LPE Mean																																																							
	0.691936	16.72049	0.892224	5.336111																																																							
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
TRAT	2	26.82027778	13.41013889	16.85	0.0001																																																						
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
TRAT	2	26.82027778	13.41013889	16.85	0.0001																																																						
c	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 3</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Dependent Variable: LPR</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2</td> <td>2.37041111</td> <td>1.18520556</td> <td>5.69</td> <td>0.0145</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>15</td> <td>3.12216667</td> <td>0.20814444</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Corrected Total</td> <td>17</td> <td>5.49257778</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R-Square</th> <th>Coeff Var</th> <th>Root MSE</th> <th>LPR Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>0.431566</td> <td>25.75945</td> <td>0.456229</td> <td>1.771111</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Type I SS</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>2.37041111</td> <td>1.18520556</td> <td>5.69</td> <td>0.0145</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Type III SS</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>2.37041111</td> <td>1.18520556</td> <td>5.69</td> <td>0.0145</td> </tr> </tbody> </table>	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	Model	2	2.37041111	1.18520556	5.69	0.0145	Error	15	3.12216667	0.20814444			Corrected Total	17	5.49257778					R-Square	Coeff Var	Root MSE	LPR Mean		0.431566	25.75945	0.456229	1.771111	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	TRAT	2	2.37041111	1.18520556	5.69	0.0145	Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	TRAT	2	2.37041111	1.18520556	5.69	0.0145
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
Model	2	2.37041111	1.18520556	5.69	0.0145																																																						
Error	15	3.12216667	0.20814444																																																								
Corrected Total	17	5.49257778																																																									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LPR Mean																																																							
	0.431566	25.75945	0.456229	1.771111																																																							
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
TRAT	2	2.37041111	1.18520556	5.69	0.0145																																																						
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
TRAT	2	2.37041111	1.18520556	5.69	0.0145																																																						
d	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 4</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Dependent Variable: NPR</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2</td> <td>15.93444444</td> <td>7.96722222</td> <td>6.48</td> <td>0.0094</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>15</td> <td>18.43500000</td> <td>1.22900000</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Corrected Total</td> <td>17</td> <td>34.36944444</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R-Square</th> <th>Coeff Var</th> <th>Root MSE</th> <th>NPR Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>0.463622</td> <td>20.13607</td> <td>1.108603</td> <td>5.505556</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Type I SS</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>15.93444444</td> <td>7.96722222</td> <td>6.48</td> <td>0.0094</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Type III SS</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Pr &gt; F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>15.93444444</td> <td>7.96722222</td> <td>6.48</td> <td>0.0094</td> </tr> </tbody> </table>	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	Model	2	15.93444444	7.96722222	6.48	0.0094	Error	15	18.43500000	1.22900000			Corrected Total	17	34.36944444					R-Square	Coeff Var	Root MSE	NPR Mean		0.463622	20.13607	1.108603	5.505556	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	TRAT	2	15.93444444	7.96722222	6.48	0.0094	Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	TRAT	2	15.93444444	7.96722222	6.48	0.0094
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
Model	2	15.93444444	7.96722222	6.48	0.0094																																																						
Error	15	18.43500000	1.22900000																																																								
Corrected Total	17	34.36944444																																																									
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NPR Mean																																																							
	0.463622	20.13607	1.108603	5.505556																																																							
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
TRAT	2	15.93444444	7.96722222	6.48	0.0094																																																						
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F																																																						
TRAT	2	15.93444444	7.96722222	6.48	0.0094																																																						
e	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 5</p>																																																										

Nota: a) Información sobre el nivel de clase; b) Análisis de varianza para la variable longitud promedio de explante cm (LPE); c) Análisis de varianza para la variable longitud promedio de raíz cm (LPR); d) Análisis de varianza para la variable número promedio de raíces (NPR).

	<p>The GLM Procedure</p> <p>Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LPE</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <p>Alpha 0.05  Error Degrees of Freedom 15  Error Mean Square 0.796063  Critical Value of Studentized Range 3.67338  Minimum Significant Difference 1.338</p> <p>Means with the same letter are not significantly different.</p> <table> <thead> <tr> <th>Tukey Grouping</th> <th>Mean</th> <th>N</th> <th>TRAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>6.4333</td> <td>6</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>5.9417</td> <td>6</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>3.6333</td> <td>6</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	6.4333	6	2	A	5.9417	6	1	B	3.6333	6	3
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT														
A	6.4333	6	2														
A	5.9417	6	1														
B	3.6333	6	3														
f	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 6</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LPR</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <p>Alpha 0.05  Error Degrees of Freedom 15  Error Mean Square 0.208144  Critical Value of Studentized Range 3.67338  Minimum Significant Difference 0.6842</p> <p>Means with the same letter are not significantly different.</p> <table> <thead> <tr> <th>Tukey Grouping</th> <th>Mean</th> <th>N</th> <th>TRAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>2.1567</td> <td>6</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>B A</td> <td>1.8717</td> <td>6</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>1.2850</td> <td>6</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	2.1567	6	2	B A	1.8717	6	1	B	1.2850	6	3
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT														
A	2.1567	6	2														
B A	1.8717	6	1														
B	1.2850	6	3														
g	<p>The SAS System 20:11 Tuesday, March 12, 2013 7</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Tukey's Studentized Range (HSD) Test for NPR</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <p>Alpha 0.05  Error Degrees of Freedom 15  Error Mean Square 1.229  Critical Value of Studentized Range 3.67338  Minimum Significant Difference 1.6625</p> <p>Means with the same letter are not significantly different.</p> <table> <thead> <tr> <th>Tukey Grouping</th> <th>Mean</th> <th>N</th> <th>TRAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>6.8333</td> <td>6</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>4.9167</td> <td>6</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>4.7667</td> <td>6</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	6.8333	6	2	B	4.9167	6	1	B	4.7667	6	3
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT														
A	6.8333	6	2														
B	4.9167	6	1														
B	4.7667	6	3														

Nota: e) Prueba de Tukey para la variable longitud promedio de explante cm (LPE); f) Prueba de Tukey para la variable longitud promedio de raíz cm (LPR); g) Prueba de Tukey para la variable número promedio de raíces (NPR).

```

DATA FASE ENRAIZAMIENTO;
INPUT REP TRAT LPE LPR NPR;
CARDS;
1 1 5.81 1.50 2.60
2 1 5.83 1.75 4.60
3 1 4.30 1.40 3.60
4 1 6.26 1.98 6.20
5 1 7.63 2.43 6.20
6 1 5.82 2.17 6.30
1 2 8.34 2.97 7.30
2 2 7.00 1.50 6.10
3 2 6.13 2.33 8.00
4 2 6.11 2.73 7.20
5 2 5.40 2.01 7.20
6 2 5.62 1.40 5.20
1 3 3.84 1.47 5.20
2 3 3.47 1.37 4.80
3 3 3.90 1.55 4.60
4 3 3.57 1.29 4.60
5 3 3.20 1.14 5.30
6 3 3.82 0.89 4.10
PROC GLM;
CLASS TRAT;
MODEL LPE LPR NPR=TRAT;
MEANS TRAT/TUKEY;
TITLE EVALUACION DE DOS METODOS DE MICROPROPAGACION MASAL EN PIÑA;
RUN;

```

Nota: h) Introducción de la base de datos para la fase de enraizamiento.

Cuadro A-7. Base de datos del programa informático SAS para la fase de aclimatación.

<b>a</b>	The SAS System	00:32 Thursday, March 21, 2013	1			
	The GLM Procedure					
	Class Level Information					
	Class	Levels	Values			
	TRAT	3	1 2 3			
	Number of Observations Read		18			
<b>b</b>	The SAS System	00:32 Thursday, March 21, 2013	2			
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: LONEXPL					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square		
	Model	2	7.55737778	3.77868889		
	Error	15	10.99851667	0.73323444		
	Corrected Total	17	18.55589444			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE		
		0.407276	10.77171	0.856291		
			LONEXPL Mean			
		7.949444				
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
	TRAT	2	7.55737778	3.77868889	5.15	0.0198
	Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
	TRAT	2	7.55737778	3.77868889	5.15	0.0198

Nota: a) Información sobre el nivel de clase; b) Análisis de varianza para la variable longitud promedio de explante cm (LEXPL).

c	The SAS System 00:32 Thursday, March 21, 2013 3					
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: LONRAIZ					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
	Model	2	0.12333333	0.06166667	0.29	0.7513
	Error	15	3.17331667	0.21155444		
	Corrected Total	17	3.29665000			
	R-Square	0.037412	Coeff Var	21.85038	Root MSE	0.459950
					LONRAIZ Mean	2.105000
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	0.12333333	0.06166667	0.29	0.7513	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
TRAT	2	0.12333333	0.06166667	0.29	0.7513	
d	The SAS System 00:32 Thursday, March 21, 2013 4					
	The GLM Procedure					
	Dependent Variable: NUMRAIZ					
	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
	Model	2	4.54777778	2.27388889	2.33	0.1310
	Error	15	14.60833333	0.97388889		
	Corrected Total	17	19.15611111			
	R-Square	0.237406	Coeff Var	15.24759	Root MSE	0.986858
					NUMRAIZ Mean	6.472222
	Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	4.54777778	2.27388889	2.33	0.1310	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
TRAT	2	4.54777778	2.27388889	2.33	0.1310	
e	The SAS System 00:32 Thursday, March 21, 2013 5					
	The GLM Procedure					
	Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LONEXPL					
	NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.					
	Alpha					0.05
	Error Degrees of Freedom					15
	Error Mean Square					0.733234
	Critical Value of Studentized Range					3.67338
	Minimum Significant Difference					1.2841
	Means with the same letter are not significantly different.					
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT			
A	8.8017	6	2			
B A	7.8150	6	1			
B	7.2317	6	3			

Nota: c) Análisis de varianza para la variable longitud promedio de raíz cm (LONRAIZ); d) Análisis de varianza para la variable número promedio de raíces (NUMRAIZ); e) Prueba de Tukey para la variable longitud promedio de explante cm (LEXPL).

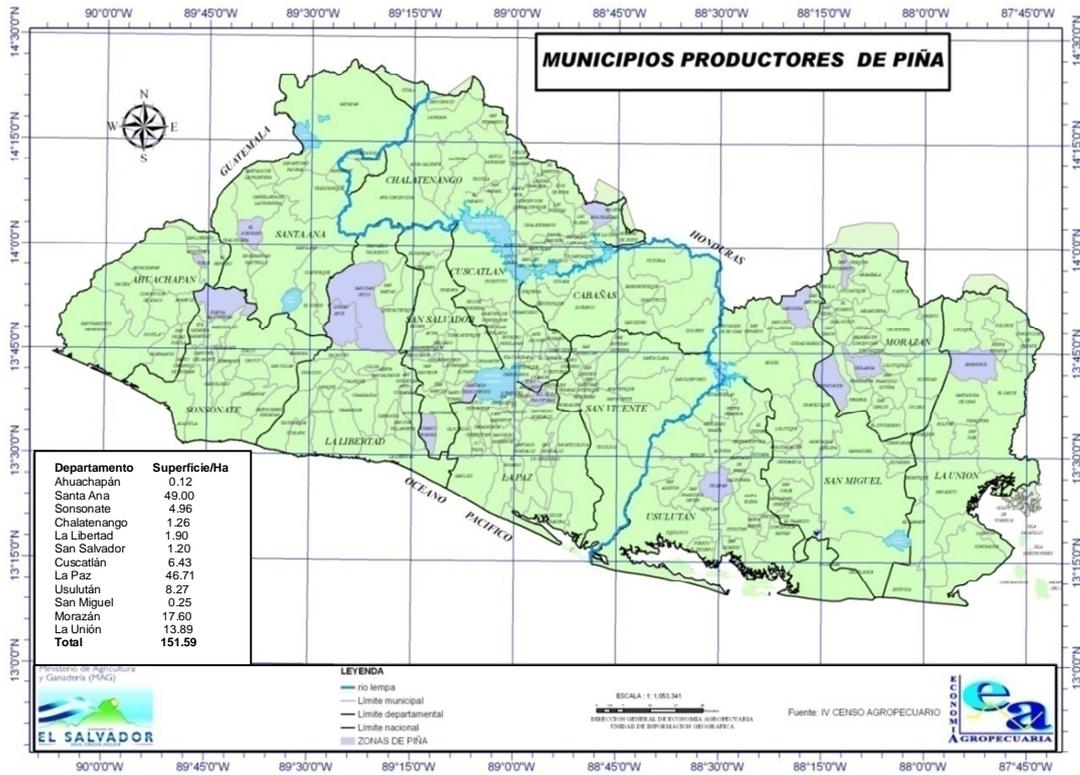
f	<p>The SAS System 00:32 Thursday, March 21, 2013 6</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LONRAIZ</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <p>Alpha 0.05  Error Degrees of Freedom 15  Error Mean Square 0.211554  Critical Value of Studentized Range 3.67338  Minimum Significant Difference 0.6898</p> <p>Means with the same letter are not significantly different.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tukey Grouping</th> <th>Mean</th> <th>N</th> <th>TRAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>2.2217</td> <td>6</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>2.0550</td> <td>6</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>2.0383</td> <td>6</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	2.2217	6	2	A	2.0550	6	3	A	2.0383	6	1
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT														
A	2.2217	6	2														
A	2.0550	6	3														
A	2.0383	6	1														
g	<p>The SAS System 00:32 Thursday, March 21, 2013 7</p> <p>The GLM Procedure</p> <p>Tukey's Studentized Range (HSD) Test for NUMRAIZ</p> <p>NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.</p> <p>Alpha 0.05  Error Degrees of Freedom 15  Error Mean Square 0.973889  Critical Value of Studentized Range 3.67338  Minimum Significant Difference 1.4799</p> <p>Means with the same letter are not significantly different.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tukey Grouping</th> <th>Mean</th> <th>N</th> <th>TRAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>6.9000</td> <td>6</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>6.7500</td> <td>6</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>5.7667</td> <td>6</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	A	6.9000	6	2	A	6.7500	6	3	A	5.7667	6	1
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT														
A	6.9000	6	2														
A	6.7500	6	3														
A	5.7667	6	1														
h	<pre> DATA FASE ACLIMATACION; INPUT REP TRAT LONEXPL LONRAIZ NUMRAIZ; CARDS; 1 1 6.25 1.22 3.40 2 1 7.23 2.34 6.00 3 1 6.91 1.59 6.10 4 1 8.58 2.06 7.20 5 1 9.77 2.89 6.00 6 1 8.15 2.13 5.90 1 2 9.83 2.26 7.00 2 2 9.40 1.60 6.30 3 2 8.57 2.43 7.00 4 2 8.80 2.45 7.50 5 2 8.13 2.79 7.50 6 2 8.08 1.80 6.10 1 3 7.08 1.85 6.00 2 3 7.26 1.76 5.50 3 3 7.53 2.22 6.10 4 3 7.57 2.40 7.40 5 3 7.16 2.38 7.80 6 3 6.79 1.72 7.70 PROC GLM; CLASS TRAT; MODEL LONEXPL LONRAIZ NUMRAIZ=TRAT; MEANS TRAT/TUKEY; RUN; </pre>																

Nota: f) Prueba de Tukey para la variable longitud promedio de raíz cm (LONRAIZ); g) Prueba de Tukey para la variable número promedio de raíces (NUMRAIZ); h) Introducción de la base de datos para la fase de aclimatación.

Cuadro A-8. Análisis de presupuesto parcial para la fase de aclimatación de la investigación titulada evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananás comosus* L. Merr.) variedad Golden.

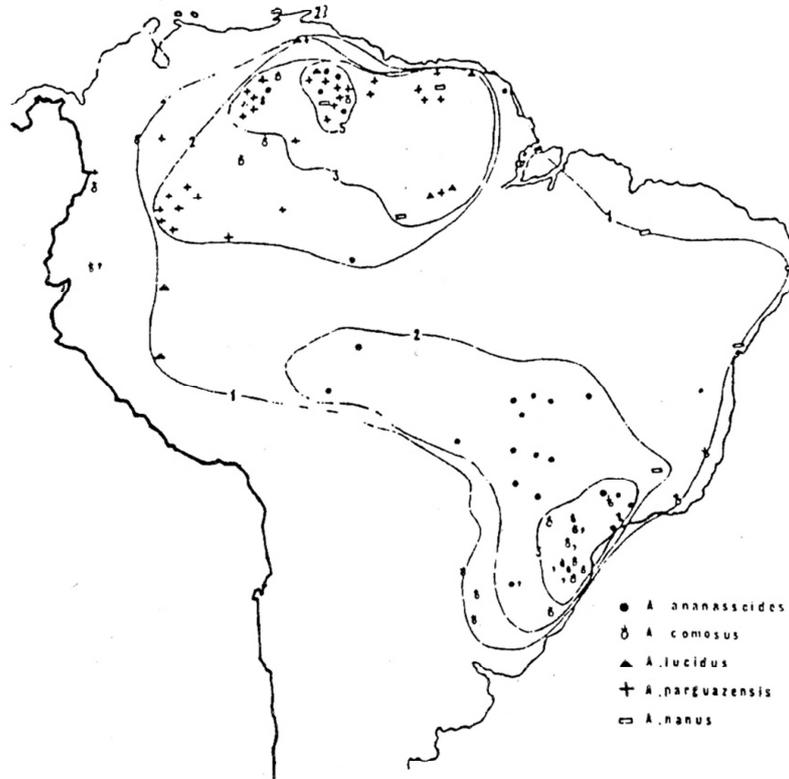
<b>1. Rendimientos.</b>	<b>T0 (Testigo MSS)</b>	<b>T1 (SIT 5 min.)</b>	<b>T2 (SIT 10 min.)</b>
Rendimiento medio.	60	60	60
Rendimiento ajustado.	54	54	54
Beneficios brutos de laboratorio.	18.90	18.90	18.90
<b>2. Costos \$ USSD/Trat.</b>			
Bandeja negra de 200 celdas.	0.37	0.37	0.37
Mezcla para germinación BM-2.	0.93	0.93	0.93
Regadera plástica 2 gal.	0.26	0.26	0.26
Agua potable m <sup>3</sup> .	0.02	0.02	0.02
Mano de obra.	5.77	5.77	5.77
<b>3. Total de costos.</b>	<b>7.35</b>	<b>7.35</b>	<b>7.35</b>
<b>4. Beneficios netos.</b>	<b>11.55</b>	<b>11.55</b>	<b>11.55</b>

Figura A-1. Municipios productores de piña en El Salvador.



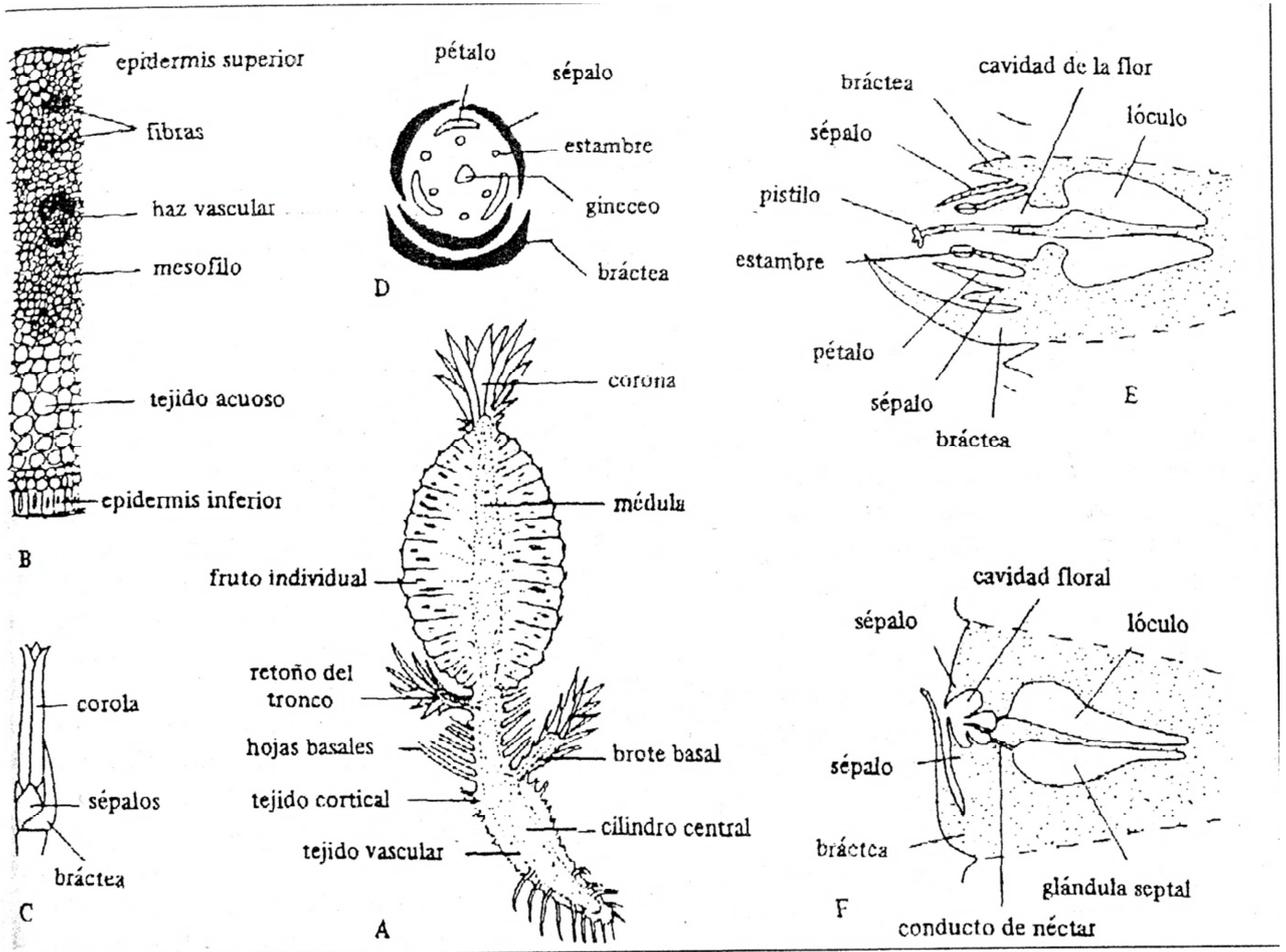
Fuente: Economía Agropecuaria en base a datos del IV Censo Agropecuario 2007-2008.

Figura A-2. Distribución de especies del género *Ananas*.



Fuente: Avilán *et al.*, 1988.

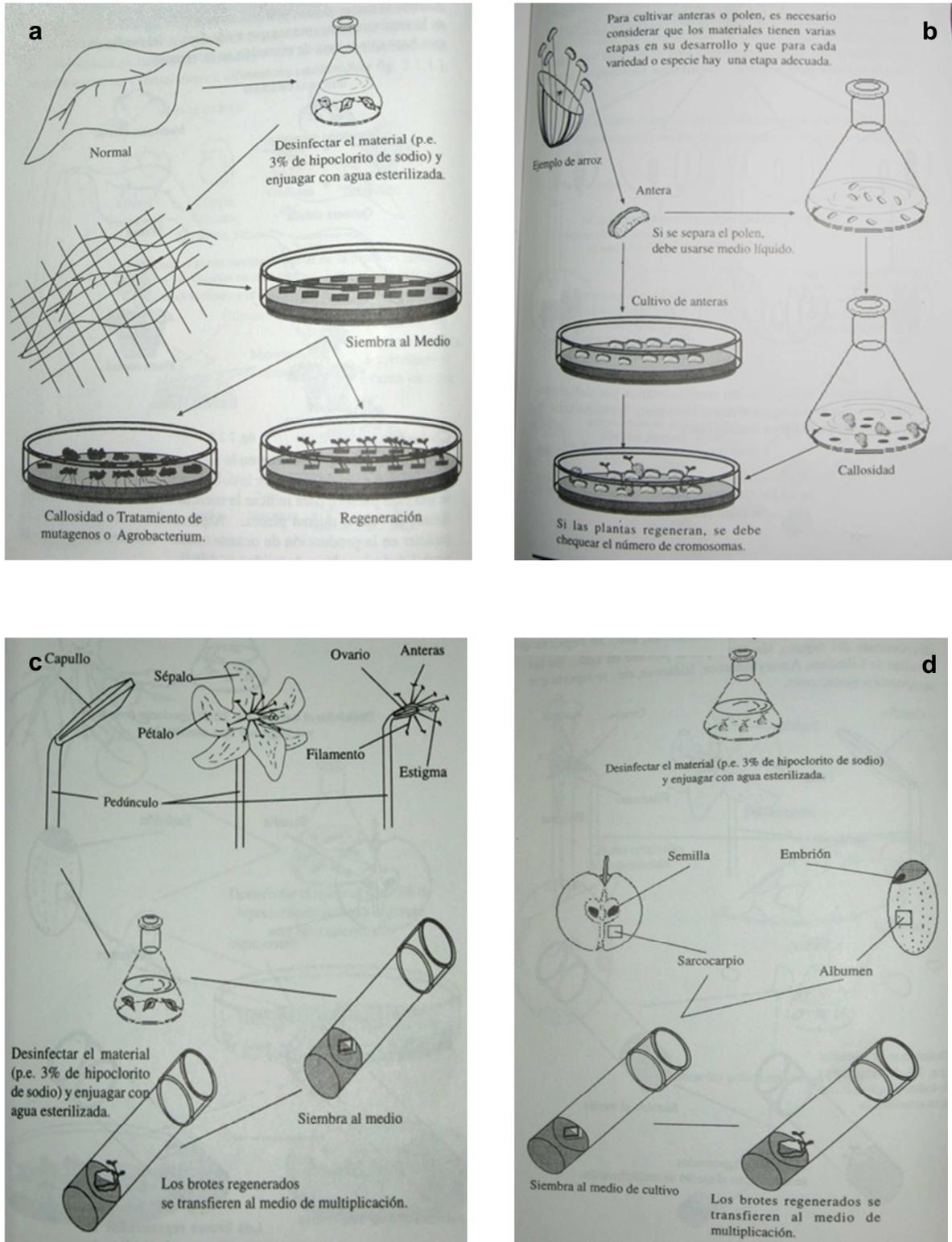
Figura A-3. *Ananas comosus*.



Nota: a) Corte longitudinal de la planta; b) estructura de la hoja; c) Flor; d) diagrama floral; e) corte longitudinal de la flor; f) corte longitudinal de fruto individual.

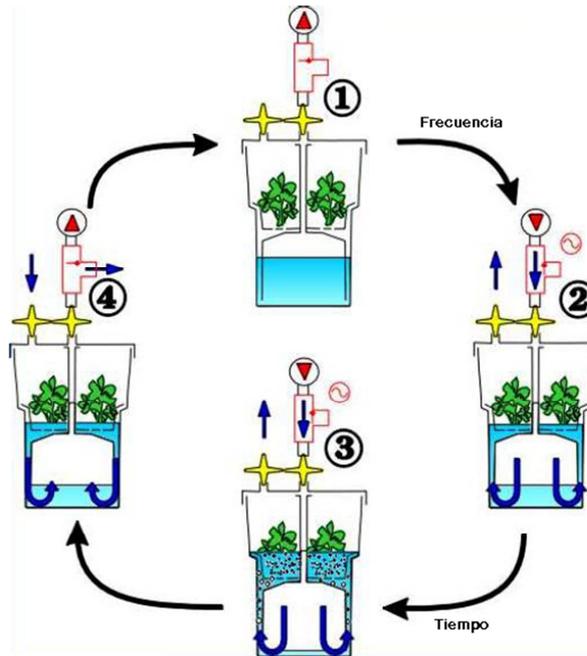
Fuente: León, 2000.

Figura A-4. Técnicas que se utilizan para la micropropagación de plantas.



Nota: a) Cultivo de segmento de hojas; b) Cultivo de anteras o polen; c) Cultivo de flor; d) Cultivo de sarcocarpio o albumen. Fuente: Usui Kanji *et al.*, 1996.

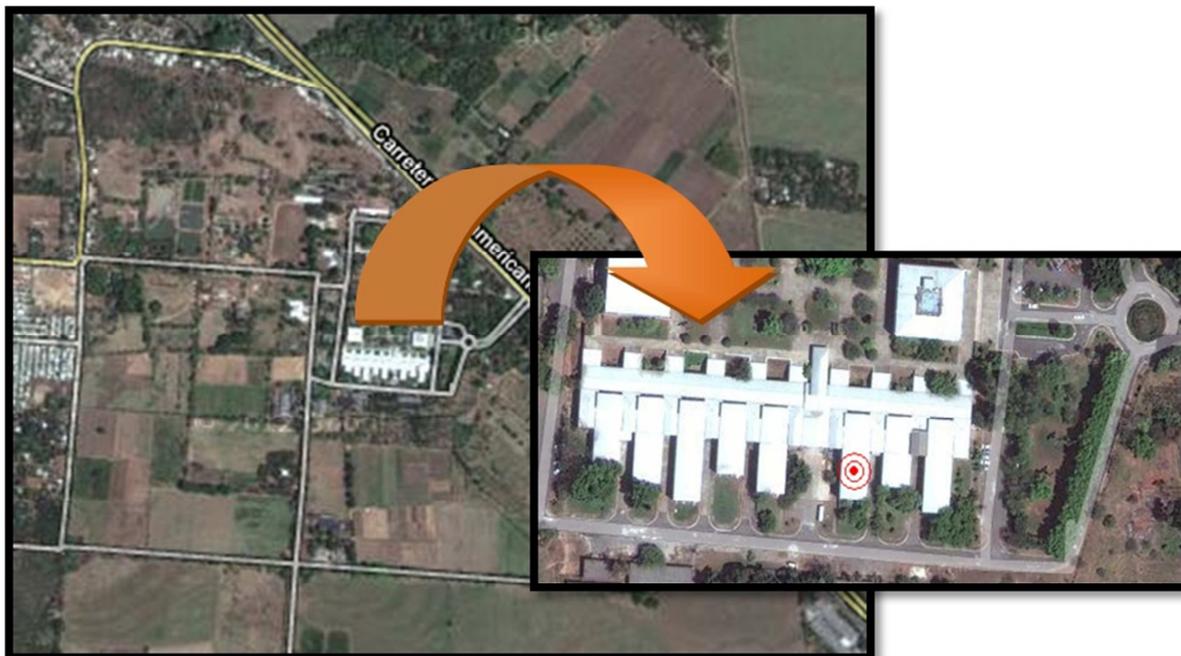
Figura A-5. Diseño y funcionamiento del RITA ®.



Nota: 1) Explantes emergidos; 2) Ascenso del medio; 3) Explantes sumergidos; 4) Descenso del medio.

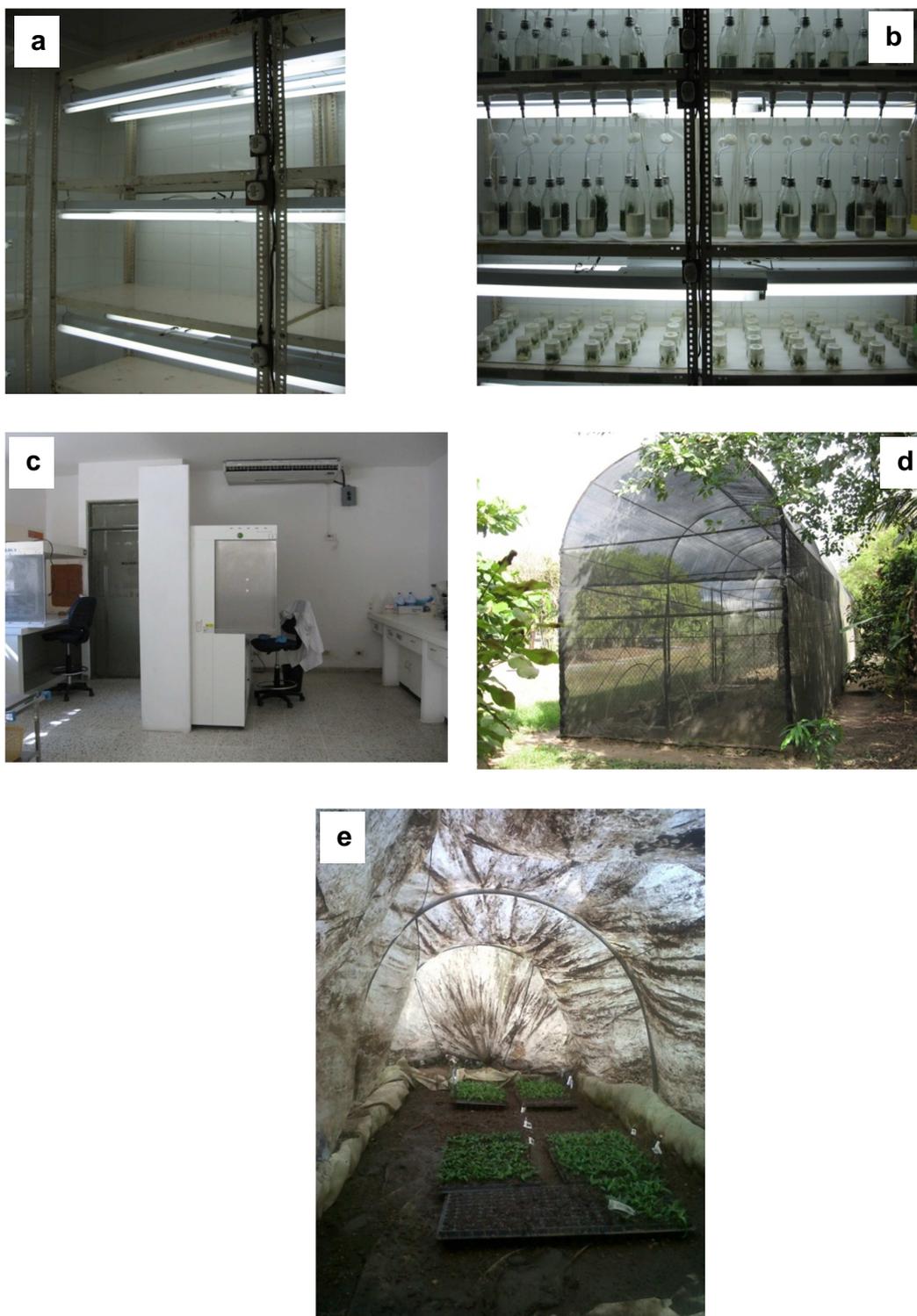
Fuente: CIRAD, Citado por González 2012.

Figura A-6. Localización del Laboratorio de Biotecnología del CENTA.



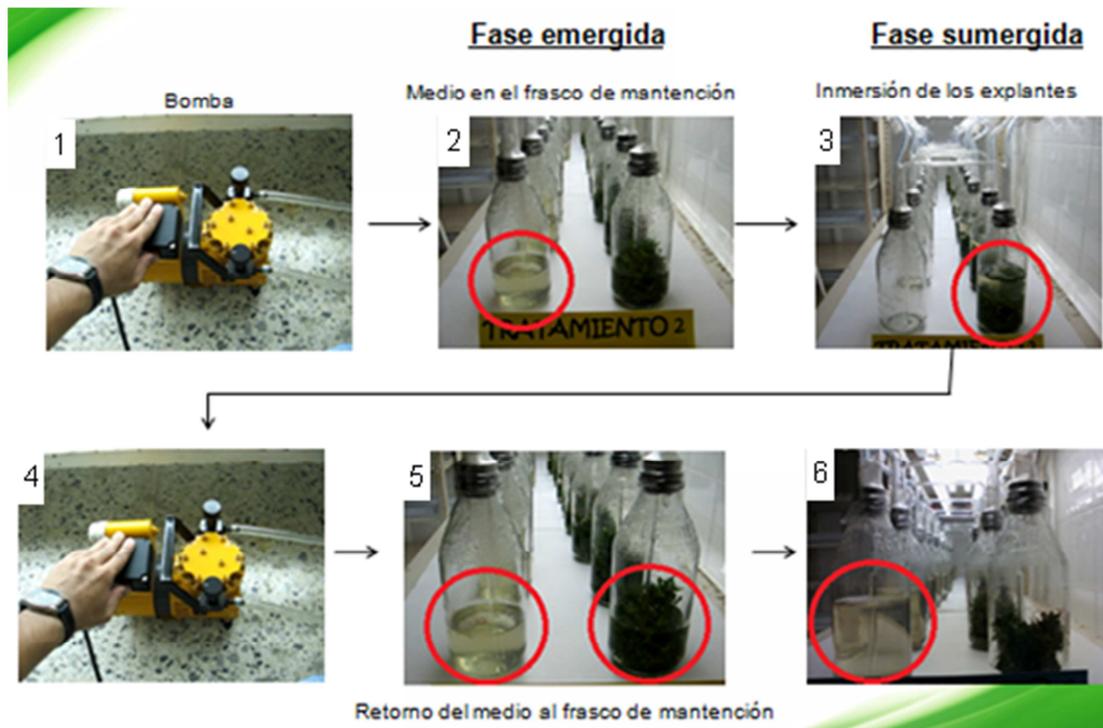
Fuente: Elaboración propia con base a datos de Google Maps, 2013.

Figura A-7. Instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.



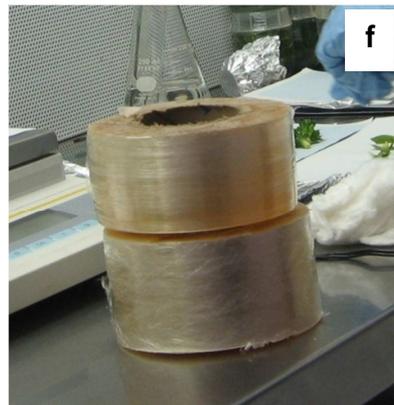
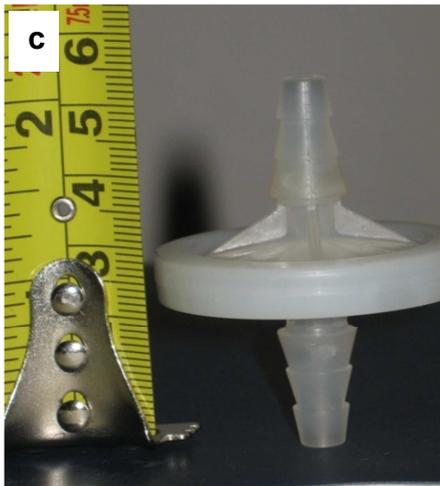
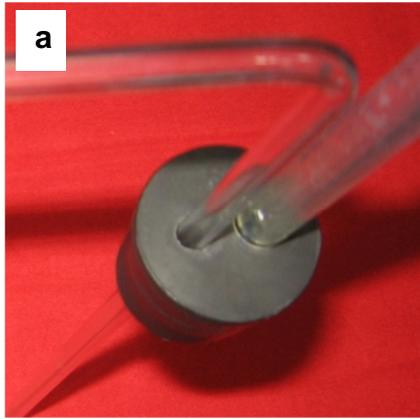
Nota: a) Cuarto de crecimiento; b) Estante utilizado para el establecimiento de los tratamientos en el cuarto de crecimiento; c) Cuarto de micropropagación; d) Macrotunel; e) Microtunel utilizado como propagador.

Figura A-8. Diseño y funcionamiento del Sistema de Inmersión Temporal.



Nota: 1) Activar bomba SARTORIUS; 2) Fase emergida, entrada de presión de aire al frasco de mantención del medio; 3) Fase sumergida, los explantes son inmersos en el medio de cultivo; 4) cambio de dirección de la bomba; 5) salida de la presión de aire en el frasco de los explantes; 6) retorno del medio al frasco de mantención.

Figura A-9. Descripción del Sistema de Inmersión Temporal.



Nota: a) Tapón de hule No. 6; b) Varilla de vidrio para la circulación de aire; c) Filtro de aire microporo de 0.2  $\mu$ ; d) Varilla de vidrio para la circulación del medio líquido; e) Bomba de vacío Sartorius ®; f) Plastic wrap para el sellado de frascos.

Figura A-10. Cámara de flujo laminar.



Figura A-11. Instrumentos y materiales estériles.



Figura A-12. Autoclave y otros utensilios al interior.

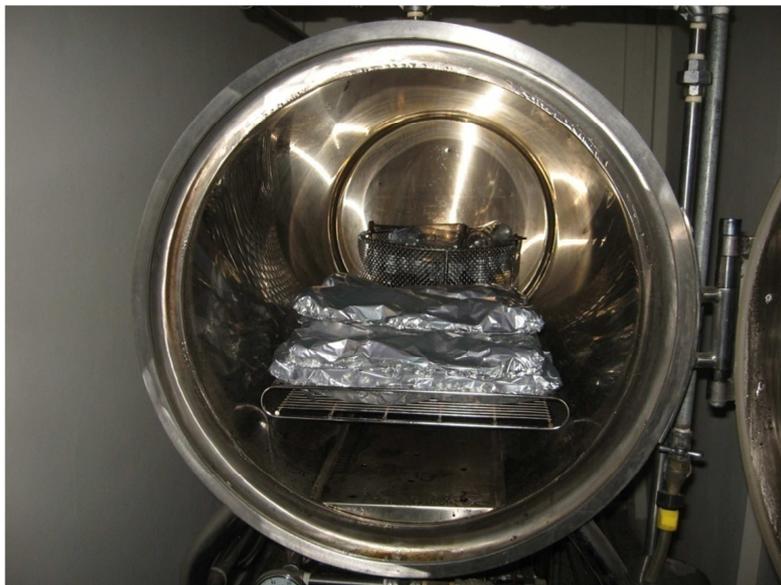


Figura A-13. Siembra de explantes para ambos métodos en fase de multiplicación.

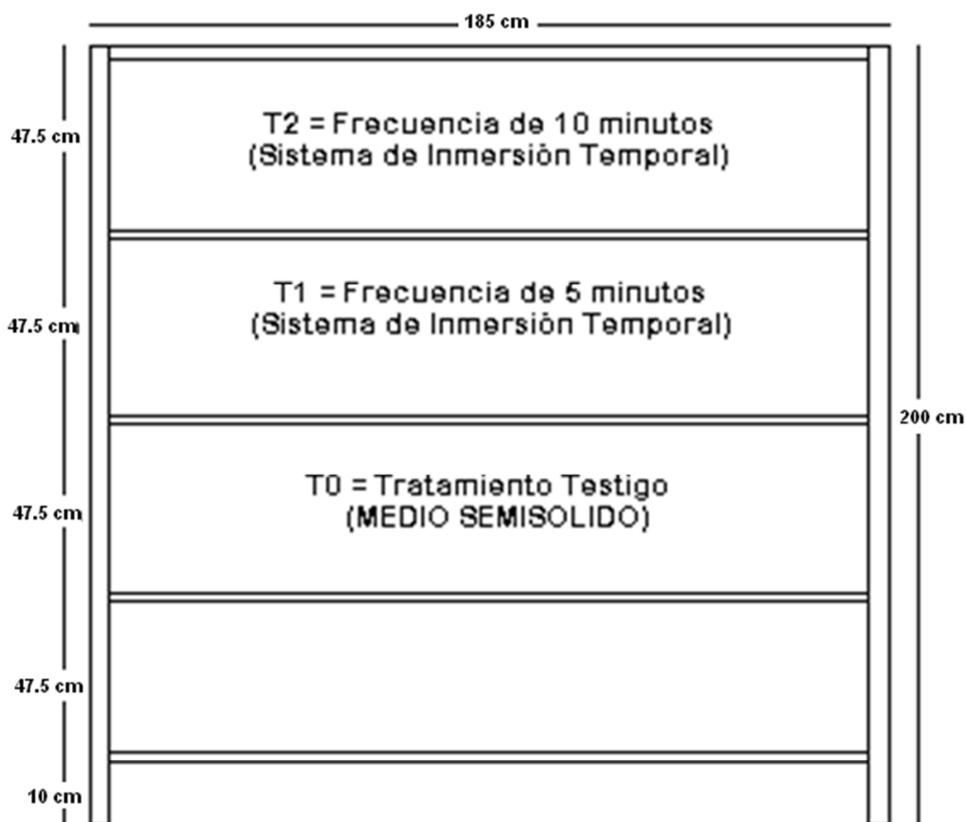


Figura A-14. Fase de aclimatación para ambos métodos.



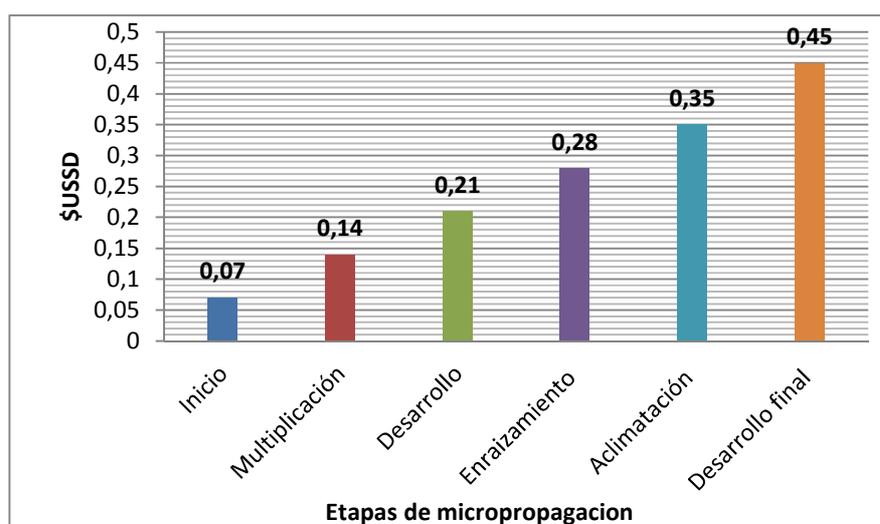
Nota: a) Lavado de vitroplantas; b) Siembra de vitroplantas; c) Mantenimiento de las vitroplantas; d) Trasplante de vitroplantas a bolsas de polietileno.

Figura A-15. Distribución de los tratamientos en estudio.



Fuente: Elaboración propia.

Figura A-16. Grafico de los costos para las diferentes etapas de micropropagación.



Fuente: Elaboración propia.