

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMIA



MICROPROPAGACIÓN DE PIÑA (*ananas comosus* (L.) (Merr)).

POR:

PATRICIA HERNÁNDEZ ROSAS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO

DE:

INGENIERO EN AGROBIOLOGIA

Buenavista Saltillo, Coahuila, México.
Agosto del 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMIA

MICROPROPAGACIÓN DE PIÑA (*ananas comosus* (L.) (Merr)).

POR:
PATRICIA HERNÁNDEZ ROSAS

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN AGROBIOLOGIA

APROBADO POR:

PRESIDENTE DEL JURADO

M.C. LETICIA ESCOBEDO BOCARDÓ

ASESOR

ASESOR

M.C. FRANCISCA RAMÍREZ GODINA

M.C. RICARDO REQUEJO LÓPEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Agosto 2004

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	xxi
INDICE DE FIGURAS.....	xxii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	3
Objetivo específico.....	3
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	
Origen y distribución.....	5
Clasificación taxonómica.....	5
Descripción de la planta.....	6
Raíz.....	6
Tallo.....	7
Hoja.....	7
Pedúnculo.....	7
Flor.....	8
Fruto.....	8
Inflorescencia.....	8
Genética.....	9
Propagación asexual de la piña.....	9
Corona.....	9
Gallo.....	10
Clavo.....	10
Micropropagación.....	10
Proceso de la micropropagación.....	11
Fase 0 – Preparación de la planta madre.....	11
Fase 1 - Establecimiento del cultivo aséptico.....	12
Fase 2 – Proliferación de los brotes.....	12
Fase 3 – Enraizamiento.....	13
Fase 4 – Aclimatización.....	15
Ventajas de la micropropagación.....	16
Micropropagación de piña.	
Selección y mantenimiento del material vegetativo.....	16
Establecimiento del cultivo aséptico.....	17
Propagación masiva.....	18
Enraizamiento <i>in vitro</i>	20
<i>in vitro</i>	20
Medio de cultivo.....	21
Sales inorgánicas.....	

	pág.
Compuestos orgánicos.....	21
Carbohidratos.....	22
Vitaminas	22
Hormonas y reguladores de crecimiento.....	23
Auxinas.....	23
Citocininas.....	24
Giberelinas.....	24
Sostenes inertes.....	25
pH.....	
MATERIALES Y METODOS	26
Localización del experimento.....	
Características del laboratorio de Cultivos de Tejidos.....	26
Elección del material vegetativo	27
Establecimiento del cultivo aséptico.....	27
Propagación masiva.....	32
Enraizamiento <i>in vitro</i>	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Establecimiento del cultivo aséptico.....	34
Propagación masiva.....	36
Enraizamiento <i>in vitro</i>	39
CONCLUSIONES	42
RESUMEN	44
LITERATURA CITADA	47

INDICE DE CUADROS

Cuadro No	Pág.
1.	Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog..... 30
2.	Tratamientos de fitorreguladores evaluados en el establecimiento del cultivo aséptico del cultivar Champaka..... 30
3.	Tratamientos de fitorreguladores evaluados en la propagación masiva del cultivar de piña Champaka..... 32
4.	Tratamientos de fitorreguladores evaluados para el enraizamiento <i>in vitro</i> del cultivar de piña Champaka..... 33
5.	Análisis de varianza para porcentaje de brotación en piña cultivar Champaka en la etapa de establecimiento del cultivo aséptico 2004..... 34
6.	Comparación de medias, (Duncan 0.05), para porcentaje de brotación de piña cultivar Champaka, en la etapa de establecimiento del cultivo aséptico 2004 35
7.	Análisis de varianza para número de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004..... 36
8.	Comparación de medias (Duncan 0.05) para número de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004.... 38
9.	Análisis de varianza para longitud de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004..... 38
10.	Comparación de medias (Duncan 0.05) para longitud de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004..... 39
11.	Análisis de varianza para número de raíces de piña cultivar Champaka, en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> 2004..... 39
12.	Comparación de medias (Duncan 0.05) para número de raíces de piña cultivar Champaka en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> 2004..... 40
13.	Análisis de varianza para longitud de raíces de piña cultivar Champaka en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> 2004..... 40
14.	Comparación de medias (Duncan 0.05) para longitud de raíces de piña cultivar Champaka en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> 2004..... 41

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Pág.
	1. Proceso de desinfección, extracción y siembra del explante.....	29
	2. Preparación del medio nutritivo de Murashige y Skoog.....	31

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), es una planta monocotiledónea, herbácea, perenne, alógama, autocompatible de reproducción principalmente asexual. Es originaria de Sudamérica, concretamente de Brasil, donde la encontraron los colonizadores españoles y portugueses.

La piña es una especie de importancia económica dentro de la familia de las bromeláceas, recientemente se ha colocado entre los primeros lugares en la producción mundial y es preferida por los países de clima templado a donde se exporta (SIACON, SIAP, SAGARPA, 2003).

Al igual que el mango y la chirimoya, la piña es clasificada como una de las frutas más finas de los trópicos, es conocida y estimada en todo mundo, por su aroma exquisito, por su delicado sabor, por su grado de succulencia, por su contenido en bromelina (enzima que facilita la digestión de las proteínas) y por sus grandes propiedades nutritivas (energía, vitaminas, proteínas, minerales y agua).

Los principales productores mundiales de piña son: Tailandia (1'978,822 Tons.); Filipinas (1'619,860 Tons.); China (1'350,120 Tons.); Brasil (1'307'691 Tons.); India (1'100,000), para el año 2001 (SIACON, SIAP, SAGARPA, 2003).

En México en el año 2001 la superficie sembrada fue aproximadamente de 14,158 has con un promedio de rendimiento de 625,956 ton. donde los principales Estados productores fueron Veracruz (411,293 Tons.); Oaxaca (131,160 Tons.); Tabasco (59,880 Tons.); Nayarit (11,636 Tons.); y Chiapas (6,402 Tons.) (SIACON, SIAP, SAGARPA, 2003).

Su fruto es partenocárpico y generalmente produce polen y óvulos funcionales pero autoincompatibles, sin embargo, cuando ocurre la polinización cruzada natural o inducida son producidas de 2,000 a 3,000 semillas por fruto, las cuales tienen dificultad para germinar, lo que obstaculiza los programas de mejoramiento genético en esta especie.

Los problemas fitosanitarios más importantes en el cultivo de piña, lo constituyen las enfermedades causadas por hongos y bacterias, problemas que se ven favorecidos por la forma tradicional de propagar (coronas, brotes, chupones, renuevos etc), y por el mal manejo de material madre, lo que permite que las enfermedades se vayan transmitiendo de generación en generación.

Generalmente los propágulos se obtienen en aproximadamente 24 meses después de la siembra, el número de ellos depende del estado nutricional y de la variedad, si se desea la introducción a nivel comercial de una variedad, por ejemplo la cual produce dos propágulos por planta, se necesitarían alrededor de 30 años para tener suficiente material para sembrar una hectárea a partir de una planta. Es decir la propagación de piña mediante el método convencional requiere de mucho tiempo, para producir cantidades suficientes de una variedad recién liberada o material para pruebas experimentales (Guzmán, 1990).

La dificultad de desarrollar programas de mejoramiento genético indica la conveniencia de emplear el cultivo *in vitro* en esta especie. En la actualidad solo algunos países como Estados Unidos, Australia y Malasia han establecido tal metodología a escala comercial.

Un aspecto importante que debe ser considerado, es el contar con un método de propagación rápido para reproducir suficientes plantas de mejor calidad a fin de incrementar los rendimientos en el cultivo de piña en nuestro País.

El desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos ofrece una buena alternativa para la clonación masiva de material vegetativo de calidad seleccionada, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo establecer la metodología que permita la obtención y propagación de plantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr) variedad “ Champaka” a partir de yemas axilares de la corona.

Objetivo general

Determinar el proceso de micropropagación de piña (*Ananas comosus* (L) Merr) variedad Champaka, para obtener una mayor cantidad de plántulas en un período corto y con un alto grado de homogeneidad.

Objetivo específico

- Establecimiento del cultivo aséptico
 - Estimar diferentes concentraciones de fitorreguladores en el medio nutritivo para lograr el establecimiento del inóculo o explante.

- Propagación masiva *in vitro* o micropropagación
 - Evaluar las concentraciones adecuadas de fitorreguladores en el medio de cultivo, que generen un mayor número y calidad de brotes.

- Enraizamiento *in vitro*
 - Obtener las concentraciones adecuadas de fitorreguladores, para inducir a partir de propágulos la formación y desarrollo de raíces *in vitro*.

Hipótesis

- ♦ **Es posible establecer concentraciones de fitorreguladores eficientes para lograr el desarrollo de las fases de la micropropagación de piña variedad Champaka.**
- ♦ La producción por medio de micropropagación garantiza un mayor número de plántulas de piña en un corto período de tiempo.

REVISIÓN DE LITERATURA

El origen de la piña Origen y Distribución (*Ananas comusus* (L) Merr.), ostenta la distinción que se le ha conocido a todas las plantas alimenticias del mundo que fueron seleccionadas, desarrolladas y cultivadas por los habitantes prehistóricos y que llegaron hasta nosotros a través de civilizaciones primitivas (Ochse, 1982).

Además, la piña es uno de los frutos más importantes dados al mundo por el hemisferio occidental, específicamente América del Sur, de los Estados tropicales de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerai y Sao Paulo en Brasil; así como del Norte de Paraguay y Argentina; se encuentra en un vasto cuadrilátero situado entre los 15° y 30° de latitud sur y 40° y 60° de longitud Oeste, aunque actualmente se encuentra difundida en muchas regiones tropicales del mundo (IICA, 1983).

Clasificación taxonómica

La piña comercial según (Dalldorf, 1990) se clasifica de la siguiente manera:

División :Spermatophita

Clase: Monocotiledonea

Orden: Farinosae

Familia : Bromeliaceae.

Genero: *Ananas*

Especies : *comosus*

Descripción de la planta

Es una planta terrestre, rústica, con forma de roseta y de hojas largas, lanceoladas y rígidas que suelen presentar espinas en sus bordes; bajo condiciones naturales produce en un año y medio a dos, para lo cual desarrolla un tallo central erecto sobre el pedúnculo floral que al madurar origina un fruto múltiple. En el ápice del tallo se ubica el único punto de crecimiento activo del que surge la inflorescencia, una espiga de la que salen flores blancas o violetas. La cáscara es áspera y gruesa; interiormente la fruta presenta una carnosidad que es la parte comestible y la cual tiene un sabor que resulta muy agradable a la mayoría de los consumidores, (IICA,1983).

La planta de piña es herbácea, perenne, monocotiledónea y puede alcanzar una altura de 90 centímetros y extenderse lateralmente de 120 a 150 centímetros, (Ochse, 1982).

A continuación se describen las partes y órganos de la planta de piña:

Raíz

El crecimiento de la planta de piña se asocia a dos tipos de raíces que son las del suelo y las axilares o adventicias. El sistema de raíces del suelo proviene de la base del tallo, tiene una extensión lateral de uno a dos metros y penetra a profundidades de hasta 80 centímetros, a un cuando la mayoría se encuentra en los primeros 30 centímetros. Las raíces adventicias se desarrollan en las axilas de las

hojas, probablemente como respuesta a la acumulación de agua en la base de las misma por el rocío, lluvia o irrigación. Estas raíces absorben gran parte del agua y los agroquímicos aplicados por vía foliar, (Rebolledo *et. al.*, 1998).

En las piñas de propagación vegetativa, todas las raíces son adventicias y forman en la base del tronco, un sistema corto y compacto con numerosas raíces fuertes de ramificación escasa (SARH, 1992).

Tallo

El tallo es relativamente corto y grueso, tiene la forma de un mazo de consistencia carnosa y mide de 20 a 40 centímetros de longitud, en su base es angosto de 2 a 4 centímetros y justo debajo del ápice está su parte más ancha, de 6 a 8 centímetros de diámetro aproximadamente, con nudos muy cortos, de uno a diez milímetros entre ellos. Los meristemas producen de 70 a 80 hojas, a menos que la planta se induzca a florecer prematuramente (Rebolledo *et. al.*, 1998).

Hoja

Una planta adulta presenta de 70 a 80 hojas, dispuestas en espiral, formando una roseta en la cual los elementos jóvenes se encuentran en el centro (Rebolledo *et. al.*, 1998).

Pedúnculo

El pedúnculo es la prolongación del tallo que se desarrolla cuando la planta completa su crecimiento vegetativo, se manifiesta por un engrosamiento del tallo en su meristemo terminal, después de un período corto en el cual se había estrechado del pedúnculo, en el extremo apical se desarrolla la inflorescencia de la que dará origen al fruto (Rebolledo *et. al.*, 1998). El pedúnculo sostiene al fruto compuesto, rematado por una corona (SARH, 1992).

Flor

La flor individual de la piña está formada por verticilos de tres partes, sépalos, tres pétalos, dos grupos de tres estambres y un gineceo de 3 carpelos, cada flor tiene una bráctea inferior ancha y carnosa en la base, la que funciona con los tejidos de la flor y con el eje central de la inflorescencia, el ápice de la bráctea es agudo y duro, semejante al de las hojas en su aspecto externo. Los sépalos son cortos, anchos y de apariencia similar a la bráctea, (Rebolledo *et. al.*, 1998).

El número de flores por espiral varía mucho, se considera un total de 100 a 200 flores, en los ocho espirales que conforman el fruto compuesto, son autoestériles o puede producirse fecundación y formación de semillas por polinización cruzada con otras variedades o individuos fuera de tipo, lo cual es comercialmente indeseable, (SARH, 1992).

Fruto

El fruto se forma por partenocarpia natural, es decir, sin la fecundación del óvulo y por lo tanto sin la formación de la semillas, después de la antesis, todas las piezas florales contribuyen a formar frutos partenocarpios, los estambres y los pétalos se

marchitan. excepto el estilo, botánicamente el fruto es una sorosis, constituido por un eje carnoso o corazón, del cual parten las flores que son conceiscentes durante el desarrollo del fruto (Rebolledo *et. al.*, 1998).

Inflorescencia

El meristemo apical forma anormalmente una inflorescencia de muchas flores, unida cada una con una bráctea inferior, según el cultivar, el eje de la inflorescencia crece y se separa de la corona de hojas y está provisto por brácteas agudas o bien la inflorescencia como sentada en las hojas (Rebolledo *et. al.*, 1998).

Genética

La planta de piña presenta una reproducción prácticamente asexual; dentro de la misma variedad sus flores son autoestériles y por lo tanto no producen semilla.

La autoincompatibilidad disminuye a medida que las variedades se alejan mas genéticamente. Es altamente heterocigoto, con cromosomas pequeños, en donde el normal diploide es $2n = 2 \times 50$, triploide $2n = 3 \times 75$ como el clon Cabezona, o tetraploide $2n = 4 \times 100$ como el clon James Queen.

Propagación asexual de la piña

La propagación de la piña es asexual y para su establecimiento se utilizan brotes vegetativos que la misma planta emite en forma natural, los cuales se describen a continuación (Rebolledo *et. al.*, 1998).

Corona

Se localiza en la parte superior del fruto y es de hecho el meristemo apical de la planta; como el fruto se cosecha y se comercializa con la corona, este material solo esta disponible durante el período de actividad de las industrias procesadoras locales. Durante la selección deben desecharse las coronas muy pequeñas, aquellas que están sin cogollo y las múltiples.

Gallo

Se desarrollan a partir de yemas axilares del pedúnculo del fruto. Se producen en promedio dos por planta, aunque en la cosecha de los meses de mayo a julio se incrementan a cinco, debido a que la diferenciación floral de la planta madre ocurre en forma natural o inducida durante los meses de noviembre, diciembre y enero.

Clavo

Son los vástagos que se originan de las yemas axilares del tallo, es el tipo más abundante, se producen en promedio cuatro brotes por planta.

Los tres tipos de brotes difieren en su forma y en la longitud de su ciclo. En

condiciones normales, la corona requiere un promedio de 19 meses para fructificar, mientras que el gallo y clavo requieren 16 y 17 meses respectivamente.

Entre los principales problemas que se tienen son la producción y selección de plántulas que son destinadas para nuevas plantaciones, ya que las se encuentran infectadas de una gran variedad de patógenos, además de la deficiencia de material vegetativo de propagación, cuando se desea fomentar nuevas áreas, o introducir una nueva variedad (Guzmán, 1990)

Micropropagación

Micropropagar, es el proceso de multiplicar plantas *in vitro* a partir de un fragmento de una planta madre y del cual se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia (Hermosilla, 2003)

La micropropagación es la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos a la regeneración y propagación comercial de plantas enteras, es un desarrollo mas reciente que se ha convertido en una alternativa importante de lo métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies de plantas (Hartmann y Kester, 1999).

La micropropagación es la reproducción vegetativa de plantas *in vitro*. El desarrollo del cultivo *in vitro* se puede regular efectivamente con la aplicación de reguladores de crecimiento, como también optimizar las condiciones nutricionales y físicas de los cultivos. La efectividad de reproducción *in vitro* es mucho mayor que la

reproducción convencional (*in vivo*), por eso, en los procesos tecnológicos, se da preferencia al cultivo de yemas apicales, yemas axilares y cultivos nodales (Rivas,2001).

Tapia y Hepp (2004), mencionan las siguientes fases del proceso de micropropagación:

- Fase 0: Preparación de la planta madre.
- Fase 1: Establecimiento del cultivo aséptico
- Fase 2: Proliferación
- Fase 3: Enraizamiento.
- Fase 4: Aclimatación

Proceso de la micropropagación

FASE 0.- Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado.

FASE 1: Establecimiento del cultivo aséptico

Una vez escogida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos.

Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. Ya en condiciones de asepsia, se extraerán los explantes del material vegetal y

se pondrán en un medio de iniciación dentro de un tubo de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes.

La función de esta etapa es establecer al explante en el medio de cultivo e inducir el desarrollo de brotes múltiples, lo cual puede implicar:

- A) Estimular la formación de brotes axilares
- B) Iniciar brotes adventicios en brotes, hojas, escamas, bulbos, escapos florales, cotiledones y material similar a la iniciación de formación de callo en superficies cortadas (Hartmann y Kester, 1999).

FASE 2: Proliferación de los brotes

Esta etapa conlleva al desarrollo de brotes adventicios y a la proliferación de yemas laterales, de manera que al final de esta fase se podría lograr el aumento en el número de propágulos prácticamente en forma exponencial (Tapia y Hepp, 2004).

Hartmann y Kester (1999), mencionan que durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados.

En esta etapa de multiplicación, de cada explante se ha formado un macollo de brotes que salen de una masa basal común expandida del tejido de tipo callo. Ahora esta estructura se divide en propágulos separados, que se transplantan a un medio de cultivo fresco (Hartmann y Kester, 1999).

El medio de proliferación es un medio inorgánico de Murashige y Skoog (1962) con un balance de concentraciones de citokininas/auxinas de 10/1. El pH del medio se ajusta a 5.8.

La transferencia consiste en tomar brotes y cortarlos con bisturí dividiéndolos en brotes individuales y meterlos en nuevo medio de proliferación. Así se pueden establecer ciclos de multiplicación cada 4 a 6 semanas. Este proceso se puede continuar mas o menos por un año. La tasa de multiplicación varía entre 2 y 8 dependiendo de la variedad. Cuando el número de brotes se eleva se separan para subcultivarlos en un medio apto para la formación de raíces. Lo cual forma la segunda etapa, la etapa de regeneración. (Laboratorio Micropropagacion de MUSA spp. Cultivo *in-vitro* pruducción, 2001).

FASE 3: Enraizamiento.

En esta etapa se usa un medio de regeneración. El mismo medio MS con un balance de concentraciones de citokininas/auxinas de 1/1, que promueva una prolongación del tallo y la formación de raíces. Esta etapa dura dos meses. En la última transferencia se pueden bajar las concentraciones de nutrientes en el medio MS y aplicar otra auxina para mejorar la formación de raíces, (Laboratorio Micropropagacion de MUSA spp. Cultivo *in-vitro* producción, 2001).

Los brotes obtenidos en la etapa anterior y que han experimentado crecimiento en elongación se incuban en medios de cultivo que promueven la formación de raíces. El enraizamiento puede ser *in vitro* o *ex vitro*, Los brotes obtenidos en la etapa anterior y

que han experimentado crecimiento en elongación se incuban en medios de cultivo que promueven la formación de raíces.

Para enraizar los explantos se utilizan principalmente dos métodos:

- Enraizamiento *in vitro*

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de proliferación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que contenga auxinas.

- Enraizamiento *ex vitro*

Los explantes se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril.

Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse (Tapia y Hepp, 2004).

FASE 4: Aclimatización

Dado que las plántulas obtenidas *in vitro*, carecen de adaptaciones morfológicas que les permitan el traspaso directo a las condiciones de campo, éstas deben ser

mantenidas por tiempos variables en invernaderos donde la temperatura, humedad relativa e intensidad lumínica sean estrictamente controladas.

Las plantas aclimatadas de muchas especies de importancia agrícola y forestal se han micropropagado comercialmente y son cultivadas bajo condiciones de campo con éxito.

Las plantas sanas de un tamaño de 7 cm, con raíces bien formada y por lo menos tres hojas verdes se pueden transferir al invernadero para aclimatarlas a las condiciones fuera del laboratorio. Las primeras semanas se meten las plantas debajo de plástico, con buenas condiciones de temperatura y fertirrigación, las plantas están listas para sembrarse en el campo después de 2 meses (Laboratorio Micropropagación de MUSA spp. Cultivo in-vitro producción, 2001).

Los explantes deben ser aclimatizadas a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Hermosilla, 2003).

Usando los métodos de micropropagación, los viveristas pueden rápidamente introducir genotipos selectos de plantas de su interés en cantidades suficientes como para tener un impacto en el mercado de plantas (Tapia y Hepp, 2004).

Ventajas de la micropropagación.

* La micropropagación permite a los propagadores operar durante todo el año con la producción programada en forma mas ajustada a las ventas.

* Permite controlar condiciones ambientales como luz, temperatura y humedad (Hartmann y Kester, 1999).

* Un explante puede ser multiplicado en varios miles de plantas en menos de un año. Una vez establecidos los cultivos se dispone de una fuente continua de micro-esquejes, que luego de enraizar se convierten en plantas "true-to-type", sin importar la estación del año, por lo tanto sin interrupción (Tapia y Hepp, 2004).

* Mayor rapidez en la introducción del producto debido a: Selección individual de plantas élite, altos coeficientes de propagación, uniformidad en las plantas producidas y elevadas producciones en espacios reducidos.

* Mayor calidad del producto: El valor del producto se incrementa como consecuencia de que se producen plantas libres de enfermedades y mejoramiento del fenotipo de las plantas (Tapia y Hepp, 2004).

Micropropagación de piña

Selección y mantenimiento del material vegetativo

De la planta de piña lo más utilizado como explante en el cultivo de tejidos es la corona (George, 1996; Dewald *et. al.*, 1988 y Zepeda y Sagawa, 1981)

El proceso inicia con la selección del material vegetativo, generalmente plantas adultas con las características deseables. Estas plantas seleccionadas se cuidan, proporcionándoles condiciones ambientales óptimas para su desarrollo, con un control estricto de plagas y enfermedades, para lo cual se mantienen en un invernadero con las condiciones adecuadas de temperatura, humedad relativa e intensidad lumínica, con lo que se logra el aprovechamiento máximo de las partes vegetativas (explantes) obteniendo con ello explantes de muy buenas características (sanos, turgentes, vigorosos); y además que se debe inducir a la planta para que se encuentre en crecimiento activo y no en estado de letargo (Hudson, 1987)

Guzmán (1990), recomienda mantener el material vegetativo seleccionado como planta madre en el invernadero, por un período de un mes, aplicándole Captan y Agrimicin 2 g/l, cada 8 días antes de cortar y sembrar los inóculos al medio de cultivo.

Establecimiento del cultivo aséptico

En la segunda etapa de micropropagación se reciben las partes vegetativas de la planta madre proveniente del invernadero, para tal actividad es necesario desinfectar dicho material con hipoclorito de sodio y algún otro fungicida o bactericida, las dosis de producto y tiempos de desinfección son de acuerdo al material vegetativo (Hudson, 1987).

Gutiérrez, *et. al.*, (1991), mencionan que en el proceso de implantación se obtienen porcentajes de contaminación del 5 al 10 %. Utilizan para ello dos desinfecciones, en cloro y en alcohol.

En la primera, los materiales deshojados y lavados se colocan en cloro, utilizando cuatro concentraciones (25, 50, 75 y 100% v/v de cloralex) con tres períodos

de tiempo (10, 15 y 20 minutos) y se enjuagan tres veces en agua destilada estéril, enseguida se extraen las yemas axilares y por inmersión se desinfectan en alcohol al 70 % durante un minuto, la última desinfección se realiza con cloralex en concentraciones de 25, 50 y 75% v/v por 15 minutos y se enjuagan tres veces con agua destilada estéril para ser sembradas en el medio de cultivo. Los resultados con bajo porcentaje de contaminación se logran con la concentración al 50% de cloralex durante 20 minutos en la primera desinfección, incluyendo las dos desinfecciones subsiguientes, en las que ya no importa la concentración.

Varios autores han utilizado el medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) adicionándole auxinas y citocininas para inducir la formación de brotes de piña.

Autor	Concentraciones de reguladores de crecimiento utilizado para inducir la formación de brotes de piña.
Mathews <i>et al.</i> (1976)	0.1 mg ^l ⁻¹ Ácido indolacético + 0.1 mg ^l ⁻¹ Benzilaminopurina
DeWald <i>et al.</i> (1988)	2 mg ^l ⁻¹ Ácido naftalenacético + 2 mg ^l ⁻¹ Benzilaminopurina
Fitchet (1990)	2 mg ^l ⁻¹ Ácido naftalenacético + 2 mg ^l ⁻¹ Ácido indolbutírico + 2 mg ^l ⁻¹ de Kinetina

Almeida et al. (1998) trabajó con brotes laterales de piña, utilizando concentraciones de IAA (2mg/l⁻¹) y BAP (0, 1, 2, 3, 4, o 5 mg/l⁻¹), donde los mejores resultados para la variedad de Perola fueron obtenidas con BAP en 2 y 1 mg/l⁻¹ para las etapas de establecimiento.

Propagación masiva

La tercera etapa de la micropropagación consiste básicamente en la generación de brotes, lo que se conoce como multiplicación. En esta etapa se pueden utilizar los mismos componentes del medio de cultivo, pero variando las proporciones de los reguladores de crecimiento.

Para la etapa de multiplicación se utilizan las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), complementándolas con vitaminas y reguladores de crecimiento en donde el objetivo es la brotación múltiple (Hudson, 1987)

Cordeiro et al. (1999) utilizaron el medio MS (1962) suplementado con vitaminas, 30 g l^{-1} de sacarosa y 4.5 g l^{-1} de agar para la propagación masiva del cultivar Champaka, agregando solo Benzilaminopurina (BAP) en dosis diferentes de 0.05, 0.5, 1 y 2 mg l^{-1} , donde los mejores resultados los obtuvo a los 75 días con el tratamiento compuesto de 0.5 mg l^{-1} de BAP.

Almeida et al. (1998) colocó plántulas de piña obtenidas del establecimiento del cultivo aséptico en un medio MS suplementado con 40 g l^{-1} de sacarosa, 7 g l^{-1} de agar y benzilaminopurina, en concentraciones de 0, 1 y 2 mg l^{-1} para inducción de la proliferación de brotes, encontrando con 1 mg l^{-1} de benzilaminopurina, la mejor respuesta.

Ramírez y Santana (1986), establecieron yemas de piña de la variedad Española Roja en diferentes medios de cultivo, con auxinas y citocininas, en donde la combinación de ácido naftalenacético (ANA) y kinetina en concentraciones de 1.0 y 2.0 mg l^{-1} respectivamente, resultaron adecuadas para el desarrollo de la morfogénesis. Con esto comprueban la alta capacidad de regeneración con alrededor de 40 plantas por yema en el segundo subcultivo.

Guzmán (1990), encontró al utilizar yemas axilares de la corona, que el medio adecuado para multiplicación es el de Murashige y Skoog adicionado con 5.4 mg l^{-1} de ácido naftalenacético, 5.2 mg l^{-1} de ácido indolacético y 2.1 mg l^{-1} de kinetina.

Enraizamiento *in vitro*

La cuarta etapa de la micropropagación aprovecha los brotes diferenciados de la etapa anterior, colocándolos en un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas, vitaminas y reguladores de crecimiento de modo que dichos brotes emitan raíces, en esta etapa se debe lograr también el desarrollo de estomas funcionales y del aparato fotosintético, además de lograr su pre-acondicionamiento para incrementar su resistencia a la deshidratación (Hudson, 1987).

Gutiérrez *et al.* (1991), evaluaron diferentes concentraciones de ácido indolacético (0, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 y 2.0 mg/l⁻¹) con y sin carbón activado (500 mg/l), las que complementaron al medio nutritivo MS a 50% en la etapa de enraizamiento *in vitro* de piña. En los resultados se concluyó que no es necesaria la incorporación de ácido indolacético ni carbon activado para el enraizamiento *in vitro*.

Almeida (1998) después de la etapa de proliferación llevó las plántulas a un medio MS sin reguladores de crecimiento, obteniendo con ello buenos resultados.

Medio de cultivo

El medio de cultivo tiene dos funciones principales: la primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuado de los explantes aislados y los propágulos subsiguientes y la segunda función es dirigir el crecimiento y desarrollo mediante control hormonal. Las clases primarias de hormonas son auxinas y citocininas, pero en situaciones específicas se utilizan las giberelinas y el ácido abscísico; el control se realiza por:

Las vitaminas mas utilizadas son tiamina (de 0.1 a 0.5 mg/l), el ácido nicotínico (0.5 mg/l) y la piridoxina (0.5 mg/l), para la mayoría de los vegetales. En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol, a razón de 100 mg/ l, y también se agrega en forma rutinaria. Todas estas son solubles en agua y se deben preparar como soluciones concentradas, listas para diluirse 100X en la solución final (Hartmann y Kester, 1999).

Hurtado y Merino (2000), mencionan que la única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivo de órganos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos.

Hormonas y reguladores de crecimiento

Se define como los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denominan reguladores y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierik, 1990.)

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales:

a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberilinas.

b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico

c) Etileno.

Todos ellos actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta (Fitorreguladores, Universidad Politécnica de Valencia, 2003.)

Auxinas

Las auxinas generalmente producen elongación celular expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990).

Las auxinas actúan a nivel génico al reprimir la expresión de los genes, activan las proteínas transportadoras de iones hidrógeno (H^+) de la célula a la pared celulósica, como resultado de este movimiento, la pared celular se acidifica y esto activa una enzima de la pared celular que rompe los enlaces cruzados entre las cadenas de celulosa.

Esto permite que las moléculas se deslicen entre sí al aumentar la turgencia sobre la pared celular (Fitorreguladores, Universidad Politécnica de Valencia, 2003.)

Citocininas

Las citocininas tienen un intervalo amplio de efectos regulatorios. Promueven la división celular y el efecto tiene lugar con concentraciones tan bajas como 5×10^{-11} M; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo

estimular en muy bajas concentraciones (5×10^{-8} M) la iniciación del crecimiento de las raíces laterales; además inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas; actúan en el retraso de la senescencia, en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo.

Las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo las mas comunes: kinetina, BA, 2ip, PBA. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina en concentraciones elevadas ($1-10 \text{ mg l}^{-1}$) pueden inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Las citocininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical, también retardan el envejecimiento (Pierik, 1990).

Giberelinas

Este grupo de compuestos no se utiliza generalmente en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas. Las giberelinas generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990.)

La elongación celular causada por las giberelinas podría ser confundida con el mismo efecto auxínico (Hurtado y Merino, 2000)

Sostenes inertes

El agar es un derivado de una alga marina, que se usa como agente gelificante en la mayor parte de los medios nutritivos.

El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene la capacidad para gelificar los medios, resulta con facilidad, el componente mas caro de los medios nutritivos sólidos.

El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener el agua (a mayor concentración de agar, mayor fuerza con el que el agua es retenida) y absorbe compuestos. El tipo de agar también afecta al crecimiento y desarrollo. Cuanto mayor es la calidad y la pureza del agar, mejor gelifica (Pierik, 1990).

pH

Se conoce poco la influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo *in vitro*. Se supone que el pH en el rango 5,-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), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo pueden presentarse las siguientes complicaciones.

- *El agar pierde su rigidez

- *Algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar.

- *La vitamina B₁ y el ácido pantoténico se hacen menos estables

- *Se retarda la absorción de iones amonio (Pierik, 1990).**

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo Localización del experimento se llevó acabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Características del Laboratorio de Cultivo de Tejidos

El laboratorio esta conformado por 4 áreas

a) Área de preparación de medios

Cuenta con el siguiente equipo: balanza analítica, balanza granataria, potenciómetro, microondas y refrigerador.

b) Área de lavado

Es el área donde se lava el material cuenta con el siguiente equipo: autoclave, destilador y de ionizador de agua

c) Área de siembra

El área de siembra cuenta con una campana de flujo laminar que permite trabajar bajo condiciones de total esterilidad.

d) Área de incubación

Cuenta con aparatos de aire acondicionado y anaqueles con lámparas de luz de día donde se pueden controlar la temperatura, intensidad lumínica y fotoperíodo.

Elección del material vegetativo

Se utilizaron yemas apicales de piña (*Ananas comusus* M.) variedad Champaka, proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo, Loma Bonita, Veracruz.

Las plantas madres fueron colocadas en invernadero y permanecieron ahí durante dos meses.

Establecimiento del cultivo aséptico

Este proceso se partió de coronas que se llevaron al laboratorio y se lavaron en agua corriente, se deshojaron y se tallaron suavemente con detergente y una gota de tween. Posteriormente se transfirieron a la campana de flujo laminar donde se procedió a su desinfección para lo cual los tallos fueron colocados en alcohol al 70% v/v por espacio de 60 segundos, se enjuagaron con agua destilada, luego se colocaron en cloro al 20% v/v por 18 minutos y finalmente se enjuagaron en agua estéril tres veces por un minuto.(Figura 1). Una vez desinfectado el material vegetal se procedió a la extracción de las yemas del tallo con un bisturí. Se utilizó un medio basal de Murashige y Skoog (1962) (Cuadro 1), al que se agregaron diversas concentraciones de bencilaminopurina y ácido naftalenacético, que constituyeron los tratamientos (Cuadro 2). La preparación del medio MS agregando ANA a concentraciones de 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg^l⁻¹ y BAP a concentraciones de 0, 0.5, 1.0, 2. mg^l⁻¹ se muestra en la Figura 2, se ajustó el pH a 5.7, y se colocaron 20 ml de medio nutritivo por frasco de “Gerber” y se esterilizaron en la autoclave a una temperatura 121°C por 20 minutos. Una vez esterilizado el medio, se procedió a sembrar 2 explantes por frasco.

Los frascos se taparon y se sellaron con parafilm, se pasaron al cuarto de incubación, con temperatura de 25 ± 2 °C, luminosidad de 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas. A las cuatro semanas se determinó el porcentaje de brotación, el cual se transformó utilizando la fórmula \sqrt{x} para la realización de esta prueba se utilizó el diseño completamente al azar con 4 repeticiones, donde cada plántula representó una repetición. Además se realizó una prueba de Duncan 0.05 para comparación de medias.

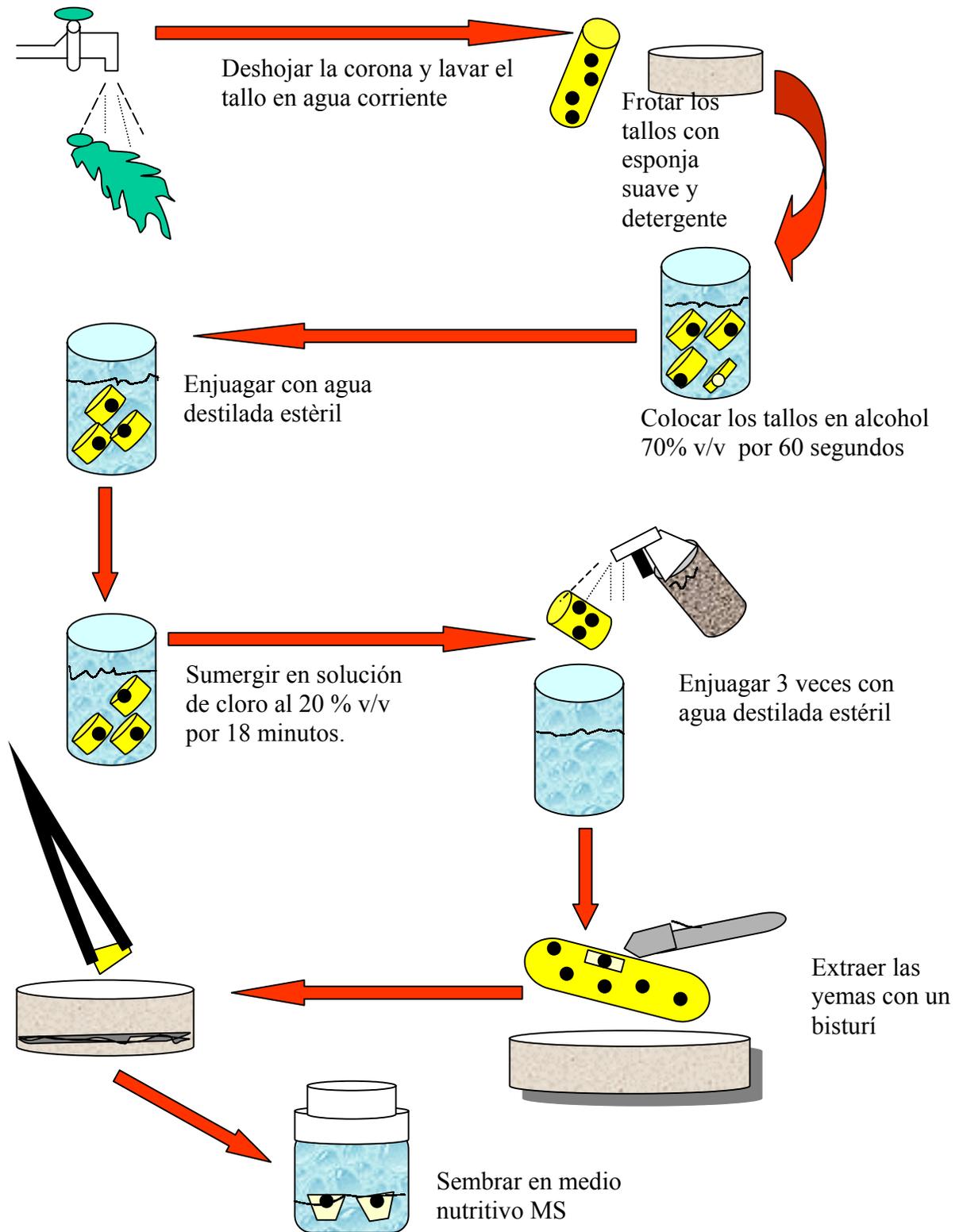


Figura 1. Proceso de desinfección, extracción y siembra del explante.

Cuadro 1. Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog

Macronutrientes	Gramos litro ⁻¹
NH ₄ NO ₃	16.5
KNO ₃	19
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.3217
KH ₂ PO ₄	1.7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7
Micronutrientes	
KI	0.0083
H ₃ BO ₃	0.062
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.12
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.086
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025
Na ₂ EDTA	0.373
FeSO ₄ ·7H ₂ O(°T)↑	0.278
Vitaminas	
Inositol	1
Ac. Nicotínico	0.005
Piridoxina HCL	0.001
Tiamina HCL	0.02
Glicina	
Carbohidratos	
Sacarosa	30
Solidificante	
Agar	7
pH	5.7

Cuadro 2. Tratamientos de fitorreguladores evaluados en el establecimiento del cultivo aséptico del cultivar Champaka.

T		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BAP		0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1	2	2	2	2	
ANA	mg l⁻¹	0	0.5	1	2	0	0.5	1	2	0	0.5	1	2	0	0.5	1	2	2
AIB																		2
KIN																		2

ANA, Ácido naftalenacético; BAP, Benzilaminopurina; AIB, Ácido Indolbutírico; KIN

Kinetina

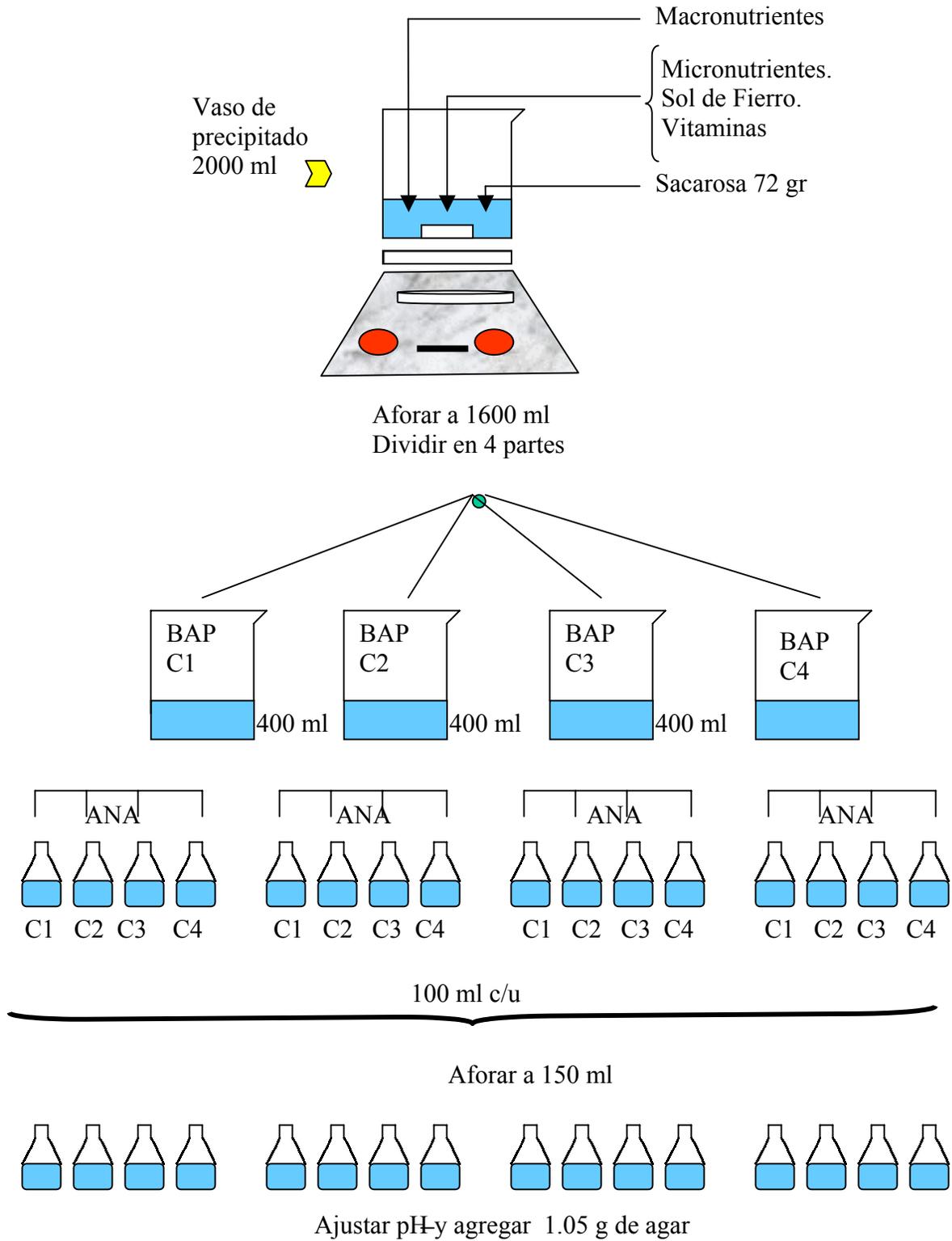


Figura 2. Preparación del medio nutritivo de Murashige v Skoog.

Propagación masiva

Una vez establecido el cultivo, los explantes no contaminados se transfirieron a un medio MS con ANA a concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3 mg^l⁻¹ y BAP a concentraciones de 0, 0.25, 0.50, 1.0 mg^l⁻¹ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos de fitorreguladores evaluados en la propagación masiva del cultivar de piña Champaka.

T		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BAP	mg ^l ⁻¹	0	0	0	0	.25	.25	.25	.25	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1
ANA		0	0.1	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.3

ANA, Ácido naftalenacético; BAP, Benzilaminopurina.

La siembra se realizó en condiciones de asepsia absoluta en la campana de flujo laminar, a las plántulas procedentes de la etapa de establecimiento de cultivo aséptico, se les eliminaron hojas y restos de raíces, cuidando que llevaran yemas laterales. Se colocaron dos por frasco con medio MS suplementado con las concentraciones combinadas de BAP y ANA antes mencionado. Una vez sembrados los frascos se trasladaron a condiciones ambientales controladas en el área de incubación, con temperatura de 25 ± 2 °C, intensidad lumínica de 1000 lux y fotoperíodo de 12 horas.

A los 60 días después de la siembra se evaluó el número de brotes y longitud de brotes por explante, midiendo con papel milimétrico cada brote a través de una caja petri.

Para la realización de esta prueba se utilizó el diseño completamente al azar con 6 repeticiones donde cada plántula representó una repetición. Además se realizó una prueba de Duncan para comparación de medias.

Enraizamiento *in vitro*

Los brotes bien diferenciados fueron transferidos a un medio MS suplementado con auxinas y citocininas a concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0, 0.01, 0.02, 0.03 mg/l⁻¹ respectivamente, solos y combinados que constituyeron los tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos de fitorreguladores evaluados para el enraizamiento *in vitro* del cultivar de piña Champaka.

T		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BAP	mg/l ⁻¹	0	0	0	0	.01	.01	.01	.01	.02	.02	.02	.02	.03	.03	.03	.03
ANA		0	0.1	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.3

ANA, Ácido naftalenacético; BAP, Benzilaminopurina.

La siembra de las plántulas se realizó bajo condiciones de asepsia absoluta, en la campana de flujo laminar, donde se eliminaron raíces y hojas amarillas para después colocar una plántula por cada frasco. Se trasladaron a condiciones ambientales controladas en el área de incubación, con temperatura de 25 ± 2 °C, luminosidad de 1000 lux y un fotoperíodo de 12 horas. Para el análisis de los datos colectados en esta etapa se empleó un diseño completamente al azar con siete repeticiones, donde cada repetición fue representada por una plántula. Se realizó además una prueba de Duncan para comparación de medias. Las plántulas se cambiaron cada 21 días a medio fresco durante 60 días.

Los parámetros que se evaluaron en la etapa de enraizamiento *in vitro* fueron: longitud de raíces y número de raíces por planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de Establecimiento del cultivo aséptico. establecimiento del cultivo aséptico, el análisis de varianza para porcentaje de brotación transformado con la fórmula \sqrt{x} marcó alta significancia para los tratamientos, lo que indicó que provocaron diferentes porcentajes de brotación (Cuadros 5)

Cuadro 5. Análisis de varianza para porcentaje de brotación en piña cultivar Champaka en la etapa de establecimiento del cultivo aséptico 2004.

FV	GL	SC	CM	FC	Pr > F	N
Tratamientos	16	4114.49	257.16	2.70	0.0036	**
Error	51	4852.99	95.16			
Total	67	8967.48				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, FC="F" calculada, N=Nivel de significancia, * =Significativo, ** =Altamente significativo.

La prueba de Duncan para comparación de medias correspondiente al porcentaje de brotación (Cuadro 6) colocó como mejores tratamientos al 17, (2 mg l⁻¹ ANA + 2 mg l⁻¹ AIB + 2 mg l⁻¹ KIN), seis (0.5 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ ANA), cinco (0.5 mg l⁻¹ de BAP y 0 de ANA) y 16 (2 mg l⁻¹ de BAP y 2 mg l⁻¹ ANA) todos ellos con un promedio de 37 % de brotación. Los tratamientos con más bajo porcentaje de brotación fueron el 13 (2 mg l⁻¹ de BAP y 0 mg l⁻¹ de ANA) y ocho (0.5 mg l⁻¹ de BAP y 2 mg l⁻¹ de ANA), con promedio de 14% de brotación. Como se puede observar, en general los porcentajes de brotación fueron bajos, como en el caso del trabajo desarrollado por Gutiérrez (1991) donde encontró un porcentaje de brotación de 25% en los cultivares de piña que estableció.

Otro aspecto que influyó para este bajo porcentaje fue la difícil desinfección de las yemas en donde existió un porcentaje importante de contaminación (20%), problema que también observó Fitchet (1990), en los cultivares de piña Queen y Smooth.

En cuanto a las concentraciones de reguladores probados, los resultados difieren con los reportados por Almeida et al. (1998), quien trabajó con brotes laterales de la piña utilizando concentraciones de IAA (2 mg/l⁻¹) y BAP (0,1,2,3,4 o 5 mg/l⁻¹), donde los mejores resultados para la variedad de Perola fueron obtenidos con 2 y 1 mg de BAP para las etapas de establecimiento y proliferación, mientras que este tratamiento para el cultivar Champaka provocó un bajo porcentaje de brotación.

Cuadro 6. Comparación de medias (Duncan 0.05) para porcentaje de brotación de piña cultivar Champaka, en la etapa de establecimiento del cultivo aséptico 2004.

T	17	6	5	16	10	2	7	4	11	9	1	12	3	14	15	8	13
%	37.3	37.3	37.3	37.3	34.0	30.8	30.8	30.8	27.5	27.5	27.5	20.6	20.6	20.6	20.6	13.7	13.7
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A						
G					B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B		
									C	C	C	C	C	C	C	C	C

T=Tratamientos, %=Porcentaje de brotación, G=Grupos.

Dentro de los mejores tratamientos para porcentaje de brotación se encontraron los que tenían concentraciones similares de cada regulador; tratamientos 6 (0.5 mg⁻¹ ANA y BAP), 11 (1 mg⁻¹ ANA y BAP) y 16 (2mg⁻¹ ANA y BAP) esto coincide con lo encontrado por otros autores al trabajar con el establecimiento del cultivo aséptico de piña y que se mencionan a continuación:

Mathews, *et. al.* (1976) 0.1 mg l⁻¹ de BAP y 0.1 mg l⁻¹ de ANA; Dewald, *et. al.* (1988) 2 mg l⁻¹ de BAP y 2 mg l⁻¹ de ANA y Fitchet (1990) 2 mg l⁻¹ de ANA, 2 mg l⁻¹ de AIB y 2 mg l⁻¹ de KN.

Propagación masiva

Para iniciar esta segunda etapa se utilizaron los mejores tratamientos de porcentaje de brotación. Puesto que los tratamientos que resultaron superiores en esta evaluación no fueron suficientes, se realizó otra siembra en la cual únicamente se involucró a los mejores tratamientos para incrementar el material necesario y establecer la fase de propagación masiva.

A continuación se describe el análisis de varianza y la comparación de medias (Duncan, 0.05) para la etapa de propagación masiva cultivar Champaka correspondiente al número de brotes y longitud de brotes por plántula.

Con el análisis de varianza para número de brotes se detectaron diferencias altamente significativas para tratamientos(Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza para número de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F	N
Tratamientos	15	59.96	4.00	5.42	0.0001	**
Error	80	59.00	0.74			
Total	95	118.96				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, FC="F"calculada, N=Nivel de significancia, * =Significativo, ** =Altamente significativo.

Las comparaciones de medias (Duncan, 0.05), (Cuadro 8), indican que los mejores tratamientos el 13 (1 mg l⁻¹ de BAP sin ANA) que produjo 4.3 brotes por plántula el tratamiento nueve (0.5 mg l⁻¹ de BAP sin ANA) con 3.5 brotes por plántula. Y el tratamiento 5 (.25 mg l⁻¹ de BAP sin ANA) con 3.3 brotes por plántula.

La tendencia que se observó fue que los tratamientos que contenían BAP sin la presencia de ANA, presentaron un comportamiento superior a los otros tratamientos, obteniéndose con ellos mayor número de brotes por plántula. El tratamiento que mostró el menor número de brotes con un promedio de un brote por plántula, fue el 8 (0.25 de BAP y 0.3 mg l⁻¹ de ANA).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Hudson, (1989), para la etapa de multiplicación se utilizaron las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), complementándolas con vitaminas y reguladores de crecimiento en donde el objetivo fue la brotación múltiple.

Almeida *et. al.* (1998) propusieron que para la inducción a la proliferación de brotes las plántulas deben ser sometidas a un medio MS suplementado con 40 g l⁻¹ de sacarosa, 7 g l⁻¹ de agar y benzilaminopurina, en concentraciones de 0, 1 y 2 mg l⁻¹ encontrando como mejor opción el medio nutritivo MS complementado con 1 mg l⁻¹ de benzilaminopurina, y en el trabajo realizado se encontró que el mejor medio nutritivo MS requiere ser suplementado con las mismas concentraciones de agar y benzilaminopurina que aplicó Almeida y colaboradores excepto en sacarosa, en vez de ser suplementado con 40 g l⁻¹ en este fue de 30 g l⁻¹.

Cuadro 8. Comparación de medias Duncan 0.05 para número de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004.

T	13	9	5	14	10	11	6	4	1	16	2	12	7	15	3	8
No.	4.3	3.5	3.3	3.0	2.7	2.5	2.3	2.2	2.2	2.2	2.2	2.0	1.7	1.7	1.3	1.3
	A	A	A													
		B	B	B	B	B										
			C	C	C	C	C									
				D	D	C	D	D	D	D	D	D				
					E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		
						F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

T=Tratamientos, No=Número de brotes.

El análisis de varianza para longitud de brotes (Cuadro 9), no mostró significancia para los tratamientos, esto se debe a que los valores registrados de longitud de brotes fueron estadísticamente iguales.

Cuadro 9. Análisis de varianza para longitud de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F	N
Tratamientos	15	1.67	0.11	1.75	0.0568	ns
Error	80	5.08	0.06			
Total	95	6.75				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, FC="F" calculada, N=Nivel de significancia, * =Significativo, ** =Altamente significativo.

En la prueba de comparación de medias (Cuadro 10), para longitud de brotes, el tratamiento 15 (1 mg l⁻¹ de BAP y 0.2 mg l⁻¹ de ANA) estuvo dentro de los mejores con un centímetro de longitud. El tratamiento con menor longitud de plántula fue el 13 (1 mg l⁻¹ de BAP) con 0.5 cm. Sin embargo Cordeiro *et. al.*, (1999) encontró en el cultivar Champaka que los mejores tratamientos en número de brotes BAP (1.0 mg l⁻¹ y 0.5 mg l⁻¹ respectivamente) alcanzaron una longitud de 3 y 4 centímetros.

Es importante indicar que el tratamiento nueve se ubicó dentro de los mejores tanto para número de brotes como para longitud de brotes.

Cuadro 10. Comparación de medias (Duncan 0.05) para longitud de brotes de piña cultivar Champaka en la etapa de propagación masiva 2004

T	15	1	3	7	2	4	12	8	9	16	10	14	11	6	5	13
Cm	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.5
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
							C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

T=Tratamientos, L=Longitud de brotes.

Enraizamiento *in vitro*

En la etapa de enraizamiento *in vitro* del cultivar Champaka se realizaron dos análisis de varianza, uno para número de raicillas por planta y el otro para longitud de raicillas, además de la comparación de medias (Duncan, 0.05).

El análisis de varianza para número de raicillas mostró diferencia altamente significativas entre tratamientos (Cuadro 11), lo que indicó que las dosis utilizadas influyeron en gran medida en el número de raíces por planta.

Cuadro 11. Análisis de varianza para número de raíces de piña cultivar Champaka, en la etapa de enraizamiento *in vitro* 2004.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F	N
Tratamientos	15	300.92	20.06	3.79	0.001	**
Error E.	96	508.00	5.29			
Total	111	808.92				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, FC="F" calculada, N=Nivel de significancia, * =Significativo, ** =Altamente significativo.

Dentro de los mejores tratamientos según la prueba de comparación de medias de Duncan (Cuadro 12), se encontraron al tratamiento tres (0.2 mg^l⁻¹ de ANA sin BAP) con un promedio de 9.9, raicillas por planta y al tratamiento dos (0.1 mg^l⁻¹ de ANA sin BAP) con un promedio de 9.1 raicillas por planta; los resultados más pobres se obtuvieron con el tratamiento nueve (0.05 mg^l⁻¹ de BAP sin ANA) con un promedio de 4.7 raicillas por planta. Por lo tanto los tratamientos con ANA pero sin BAP generaron los mejores resultados.

Cuadro 12. Comparación de medias Duncan 0.05 para número de raíces de piña cultivar Champaka en la etapa de enraizamiento *in vitro* 2004.

T	3	2	4	7	12	6	14	16	11	1	15	10	8	5	13	9
No	9.9	9.1	9.0	8.6	8.6	8.1	7.7	7.3	6.3	5.7	5.7	5.7	5.7	5.4	4.9	4.7
	A	A	A	A	A	A	A	A								
			B	B	B	B	B	B	B							
G				C	C	C	C	C	C	C	C	C	C			
						D	D	D	D	D	D	D	D	D		
							E	E	E	E	E	E	E	E	E	
								F	F	F	F	F	F	F	F	F

T=Tratamientos, No=Número de raíces, G=Grupos.

El análisis de varianza para longitud de raicillas mostró alta significancia entre los tratamientos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de varianza para longitud de raíces de piña cultivar Champaka, en la etapa de enraizamiento *in vitro* 2004.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	Fc	Pr > F	
Tratamientos	15	48.73	3.25	14.25	0.001	**
Error E.	96	21.89	0.23			
Total	111	70.62				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, FC="F" calculada, N=Nivel de significancia, * =Significativo, ** =Altamente significativo.

La prueba de medias de Duncan 0.05 para longitud de raíces (Cuadro 14), indicó que el mejor tratamiento fue el número uno (sin reguladores de crecimiento) presentando una longitud promedio de 2.9 cm.

Los tratamientos con menor longitud de raicillas fueron: 11 (0.02 mg l⁻¹ de BAP y 0.2 mg l⁻¹ de ANA), cuatro (0 mg l⁻¹ de BAP y 0.3 mg l⁻¹ de ANA), 8 (0.01 mg l⁻¹ de BAP y 0.3 mg l⁻¹ de ANA) y 16 (0.03 mg l⁻¹ de BAP y 0.3 mg l⁻¹ de ANA) todos con longitud menor de un centímetro.

El tratamiento dos (1 mg l⁻¹ de ácido naftalenacético sin benzilaminopurina) para longitud de raicillas se ubicó dentro del tercer grupo y dentro de los mejores tratamientos para número de raicillas.

Cuadro 14. Comparación de medias Duncan 0.05 para longitud de raíces de piña cultivar Champaka en la etapa de enraizamiento *in vitro* 2004.

T	1	5	9	2	6	13	3	7	10	15	12	14	16	8	4	11
L	2.9	2.3	2.1	1.8	1.7	1.7	1.4	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.5
G	A															
		B	B													
			C	C	C	C										
				D	D	D	D									
							E	E	E	E	E	E				
								F	F	F	F	F	F	F	F	F

T=Tratamientos, L=Longitud de raíces, G=Grupos.

Varios autores han obviado los fitorreguladores en la etapa de enraizamiento *in vitro*, obteniendo con ello buenos resultados, (Gutiérrez *et. al.*, 1991; Almeida *et. al.*, 1998 y Guzmán, 1990), esto debido a que las plántulas inician la elaboración de sus propios reguladores de crecimiento y la necesidad de reguladores externos entre los cultivares es mínima.

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

1. El establecimiento del cultivo aséptico se logró utilizando un medio MS suplementado con reguladores de crecimiento. Los mejores tratamientos fueron el 17 (2 ANA +2 AIB +2 KIN) con un porcentaje de 37.3, el 6 (0.5 BAP +0.5 ANA) con un porcentaje de 37.3, el 5 (0.5 BAP + 0 ANA) con un porcentaje de 37.3 y el 16 (2 BAP + 2 ANA) con un porcentaje de 37.3. de yemas que formaron brotes; en general, todos los tratamientos presentaron bajos porcentajes de formación de brotes. Esto se logró transformándose con la fórmula \sqrt{x} .
2. En la etapa de propagación masiva del cultivar de piña Champaka los parámetros a evaluar fueron: número de brotes y longitud de brotes. Los mejores tratamientos para el número de brotes fueron el 13 (1 mg l⁻¹ de BAP sin ANA) con 4.3 brotes por planta y el 9 (0.5 mg l⁻¹ de BAP sin ANA) con 3.5 brotes por planta. Los mejores tratamientos para longitud de brotes fueron el tratamiento 15 (1 mg l⁻¹ de BAP y 0.2 mg l⁻¹ de ANA) con un centímetro de longitud y el 1 sin reguladores de crecimiento obteniendo una longitud de 0.9 cm.
Es importante indicar que el tratamiento nueve se ubicó dentro de los mejores tanto para número de brotes como para longitud de brotes.
La tendencia que se observó fue que los tratamientos que contenían BAP sin la presencia de ANA, presentaron un comportamiento superior a los otros tratamientos, obteniéndose con ellos mayor número de brotes por plántula.

3. En la etapa de enraizamiento *in vitro* del cultivar Champaka, los parámetros a evaluar fueron: número de raíces y longitud de raíces. Los mejores tratamientos para el número de raíces fueron el 3 (0.2 mg^l⁻¹ de ANA sin BAP) con 9.9, raicillas y el 2 (0.1 mg^l⁻¹ de ANA sin BAP) con 9.1 raicillas. Los mejores tratamientos para longitud de raíces fueron: el 1 (sin reguladores de crecimiento) con 2.9 cm. y el 5 (mg^l⁻¹ .01 de BAP sin ANA) con 2.3 cm.

Por lo tanto los tratamientos con ANA pero sin BAP generaron los mejores resultados.

El tratamiento dos (1 mg^l⁻¹ de ácido naftalenacético sin benzilaminopurina) para longitud de raicillas se ubicó dentro del tercer grupo y dentro de los mejores tratamientos para número de raicillas.

RESUMEN

La piña (*Ananas comosus* (L). Merr.), es la especie de mayor importancia económica dentro de la familia de las bromeláceas, recientemente se ha colocado entre los primeros lugares en la producción mundial y es preferida por los países de clima templado a donde se exporta.

Los principales problemas que se tienen para la producción y selección de plántulas que son destinadas para nuevos cultivos se asocian con la forma tradicional de propagación (coronas, brotes, chupones, renuevos etc.), la cual es lenta; los propágulos se obtienen en aproximadamente 24 meses después de la siembra, sabiendo que cada planta produce 2 propágulos por planta, se necesitan aproximadamente 30 años para tener suficiente material y sembrar una hectárea a partir de una planta, además de que son atacadas por enfermedades causadas por hongos y bacterias, que se transmiten de generación en generación.

Es decir, la propagación de piña mediante el método convencional requiere de mucho tiempo, para producir cantidades suficientes de una variedad recién liberada o material para pruebas experimentales.

El desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos ofrece una buena alternativa para la clonación masiva de material vegetativo, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo establecer la metodología que permita la micropropagación de plantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr) de la variedad “Champaka” a partir de yemas de la corona.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos perteneciente al Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN; se partió de plantas madre de piña proporcionadas por el INIFAP del Estado de Veracruz que fueron colocadas en invernadero durante 2 meses. Para iniciar con la etapa de establecimiento

de cultivo aséptico la corona fue deshojada, lavada y desinfectada con cloro al 20% y después con alcohol al 70% y enseguida fueron extraídas bajo condiciones de asepsia absoluta las yemas apicales, colocándolas en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento de ANA(0, 0.5, 1, 2). y BAP(0, 0.5, 1, 2) formando 16 combinaciones y como tratamiento 17 (2ANA+ 2AIB + 2KIN). De las yemas que lograron brotar pasaron a la etapa de propagación masiva para la multiplicación de brotes, los cuales fueron sembrados a un medio de Murashige y Skoog (1962) con diversas concentraciones de BAP(0, .25, 0.5, 1) y ANA(0, 0.1, 0.2, 0.3)

Las plántulas obtenidos en la etapa de micropropagación se colocaron en medio de cultivo MS adicionado con ANA(0, 0.1, 0.2, 0.3) y BAP(0, .01, .02, .03) formando 16 combinados para promover la formación de raíces.

Se utilizó un diseño completamente al azar, donde los tratamientos correspondieron a las diferentes concentraciones de BAP (bencilaminopurina) y de ANA (ácido naftalenacético), probados en cada etapa de micropropagación.

En la etapa de establecimiento de cultivo aséptico el porcentaje de brotación, se transformó con la formula \sqrt{x} , los mejores tratamientos fueron el 17, (2 ANA + 2 AIB y 2 KIN) mg l^{-1} de cada uno de ellos, seis (0.5 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} ANA), cinco (0.5 mg l^{-1} de BAP y 0 de ANA) y 16 (2 mg l^{-1} de BAP y 2 mg l^{-1} ANA) todos ellos con un promedio de 37 % de yemas que generaron brotes, en general todos los tratamientos presentaron bajos porcentajes de formación de brotes.

En la etapa de propagación masiva, para número de brotes y longitud de brotes, el tratamiento 13 (1 mg l^{-1} de BAP sin ANA) con 4.3 brotes por planta y el 9 (0.5 mg l^{-1} de BAP sin ANA) con 3.5 brotes por planta, es decir, para mayor número de brotes se requirió de la aplicación de BAP sin ANA.

En cuanto a la variable longitud de brotes el tratamiento 15 (1 mg l^{-1} de BAP y 0.2 mg l^{-1} de ANA) fue superior al resto con un centímetro de longitud y el 1 sin reguladores de crecimiento con 0.9 cm de longitud de brotes.

La tendencia que se observó fue que los tratamientos que contenían BAP sin la presencia de ANA, presentaron un comportamiento superior a los otros tratamientos, obteniéndose con ellos mayor número de brotes por plántula.

En la etapa de enraizamiento *in vitro*, para el número de raíces, los tratamientos superiores fueron el tres (0.2 mg l^{-1} de ANA sin BAP) con 9.9, raicillas y dos (0.1 mg l^{-1} de ANA sin BAP) con un promedio de 9.1 raicillas por planta, mientras que para la longitud de raíces el mejor tratamiento fue el número uno (sin reguladores de crecimiento) con 2.9 cm. y el 5 (mg l^{-1} 0.01 de BAP sin ANA) con 2.3cm

LITERATURA CITADA

- Almeida W.A.B., A.P. de Matos, A. da S. Souza. 1998. Effects of Benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L) MERR.). Acta Horticulturae 425:450-453
- Cordeiro S. J., R. M. Valaderez, G.C. Alves, J.B. Cacao, D. Correia, A.C. Teixeira 1999. Efeito das citocininas thidiazuron e Benzilaminopurina na multiplicacao de gemas *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* cv Cayenne Champac) Fortaleza:Embrapa-CNPAT
- Dalldorf E.F.,1990. Plant Selection: Multiple tops in Smooth cayenne pineapple. Farming in south Africa. Pineapple.C-2.
- Dewald MG, Moore, WB Sherman and HM Evans. 1988. Production of pineapple in vitro. Plant Cell Reports. 7:535-537.
- Fitchet M. 1990. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapples. Acta Horticulturae 275:261-266.
- Gutiérrez. E. M. A., Villegas M. A., Rodríguez A. J y López P. M. C. 1991. Efecto de benziladenina, ácido indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de piña. Agrociencia; Serie Fitociencia; Vol. 2; Num. 2; Abril – Junio. Pp. 127 y 128.
- Guzmán. N. A. 1990. Micropropagación vegetal en México. FIRA; Boletín informativo, No 217; Vol. XXII; Pp. 23 – 30.
- George E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology. 2nd Edition. British Library Edington England. Pp 4 –7
- Hartmann T.H. Y Dale E. Kester. 1999 propagación de plantas. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.
- Hudson. T. H. 1987. Propagación de plantas. Principios y practicas; Tercera edición en español de la cuarta en Ingles; Editorial CECSA; México D. F. Pp. 596-601.
- Hurtado M. y Merino, M. E.- 2000. Cultivos de tejidos vegetales. Editorial trillas, S.A de C. V. México, Argentina, España, Colombia pp. 232.
- IICA 1983. La piña. Estación experimental el “recreo”. Serie publicación miscelánea No. 443. SIN-0534-5391. Nicaragua.
- Mathews V. H., T. S. Rangan and S. Narayanaswamy. 1976. Micro-propagation of *Ananas sativus* in vitro. Pflanzenphysiol. 79:450-454

Ochse J.J.-1982.- Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial limaza, S.A. Balderas 95, primer piso México 1, DF.

Pierik R.L.M. 1990. Cultivos in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-prensa. 28001, Madrid.

Ramírez A.L. y N. Santana 1986. . Obtención de brotes múltiples en yemas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) En la variedad española roja. Cultivos Tropicales. 8(4): 3-6.

Rebolledo M.,A.; D.E. Uriza A. Y L. Rebolledo M.- 1998 Tecnología para la producción de piña en México. Folleto técnico Inifap, Cirgc. Campo Experimental Papaloapan, Veracruz 159 p.

SARH, 1992. Frutales tropicales y subtropicales. Editorial Trillas. México 52-63

Zepeda C. and Sagawa. 1981 in vitro propagation of pineapple. Hort Science 16:495.

Fitorreguladores, Universidad Politécnica de Valencia 2003.

Disponible en:

http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_14.htm

Tapia, V. M., Ruperto Heep.G. © 2002-2004 Universidad de Concepción, Campus. Chillan, Facultad de Agronomía

Disponible en:

<http://www.chillan.udec.cl/~agronomi/prodvegetal/labs/biotecnologia.html>

Hermosilla. F. H.- 2003 Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Forestales Departamento de Sivicultura. Ingeniería Forestal

Disponible en:

<http://www.monografiass.com/monografiass/EypFIFZuplwUPORRc.php#MICRO>

Laboratorio Micropropagacion de MUSA spp. Cultivo in-vitro producción 2001.

Disponible en:
<http://www.unanleon.edu.ni/~vitro/laboratorio.htm#LafasedeAclimatizacion#L>

**Rivas W. L. 2001.- Czech University of Agriculture Prague - Institute of Tropical-
and-Subtropical-Agriculture**

Disponible en:

http://www.czu.cz/struktura/itsz/ktsp/ktsppages/os_stranky/eloywww/Cultivodetejidos.htm

***SIACON, SIAP, SAGARPA* 2003. Comisión Veracruzana de Comercialización**

Agropecuaria.

disponible en:

<http://www.coveca.gob.mx/documentos/pinha.pdf>