UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

ESCUELA DE AGRONOMÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRONÓMO

TEMA:

"MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VARIEDAD PEROLERA, A PARTIR DE MERISTEMOS APICALES"

AUTORES:

Cedeño Sánchez Gilbert Damián

Macías Pico José Daniel

TUTORA:

Ing. Liliana Corozo Quiñónez Mg. Sc.

REVISOR:

Dr. Eduardo Héctor Ardisana PhD.

SANTA ANA- MANABÍ- ECUADOR

2018

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Tema: "MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VARIEDAD PEROLERA, A PARTIR DE MERISTEMOS APICALES"

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Seguimiento y Evaluación, legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADA POR:

_____

Ing.
Fredy Santana Parrales Mg.EDS

_____

Ing.
Adriana del Carmen Celi Soto Mg.Sc.

_____

Ing.
Francisco Arteaga Alcivar Mg. Sc.

CERTIFICACIÓN

Ing. **Liliana Corozo Quiñónez** Mg. Sc**.** Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación **"MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VARIEDAD PEROLERA, A PARTIR DE MERISTEMOS APICALES"**, es trabajo original realizado por los estudiantes **CEDEÑO SÁNCHEZ GILBERT DAMIÀN** y **MACIAS PICO JOSÉ DANIEL,** el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. Liliana Corozo Quiñónez Mg. Sc.
TUTORA DE TESIS

CERTIFICACIÓN

Dr. **Eduardo Héctor Ardisana PhD**, Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación **"MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VARIEDAD PEROLERA, A PARTIR DE MERISTEMOS APICALES"**, es trabajo original realizado por los estudiantes **CEDEÑO SÁNCHEZ GILBERT DAMIAN** y **MACIAS PICO JOSÉ DANIEL,** el cual fue realizado bajo mi revisión.

Dr. Eduardo Héctor Ardisana PhD.
REVISOR DE TESIS

AUTORÍA

La responsabilidad de las ideas, resultados y conclusiones de la presente investigación, corresponden únicamente a los autores.

CEDEÑO SÁNCHEZ GILBERT DAMIAN

MACÍAS PICO JOSÉ DANIEL

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres José Cesar Macías Meza y Narcisa Gardenia Pico Parraga por su apoyo moral, consejos, comprensión, amor, en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos Cesar Javier, Johana Gardenia por estar siempre presentes y a mis compañeros de aula por estar ahí a largo de este trajinar.

Daniel

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por brindarme fuerza, paciencia y perseverancia, para culminar mis estudios académicos, a mis padres por darme la oportunidad de estudiar, los sabios consejos y el apoyo moral los cuales me motivaron a superar las circunstancias difíciles y enfrentarlos con principios éticos y morales.

A mis hermanos por complementar mi felicidad y ofrecerme su comprensión.

A mis profesores que integran la Facultad de Ingeniería Agronómica quiero agradecerles por cultivar mi intelecto, guiarme en el proceso de formación académica, brindarme su confianza y especialmente aquellos que me inculcaron la importancia de los valores durante el diario vivir.

A mi Directora de tesis Ing. Liliana Corozo Quiñónez Mg. Sc., quien me brindó su apoyo moral y la orientación necesaria con paciencia y profesionalismo, durante el desarrollo del proyecto.

A la Ing. Fátima Macías quien fue la mentora en el desarrollo de la investigación en el laboratorio, por su paciencia y cariño hacia nosotros.

Y por último no menos importante a la Ing. Marbelin del Valle, amiga, confidente y por su valiosa contribución en el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros por ofrecerme su amistad y compartir muchas experiencias durante la carrera.

Daniel

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a DIOS por permitirme llegar a culminar esta etapa profesional.

A mis padres Líber Cedeño y Alexandra Sánchez que han dedicado gran parte de su vida y esfuerzo, para ser un pilar fundamental en mi vida.

A mi hermana Patricia Cedeño quien ha estado en todo momento a mi lado y me ha dado el apoyo que he necesitado.

Damián

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por brindarme la oportunidad de encaminarme en esta profesión.

A mis padres y hermana, que con su paciencia y amor me guiaron en mis estudios y en mi vida.

A mí enamorada Génesis por su apoyo incondicional durante mis últimos pasos universitarios.

A nuestra directora de tesis la Ing. Liliana Corozo Quiñónez, quien siempre nos brindó ayuda y compartió sus conocimientos desde el inicio hasta la culminación de nuestro trabajo.

A la ing. Fátima Macías, por compartir su experiencia profesional y tratar de que hiciéramos un trabajo excelente.

A mi amiga Ing. Marbelin Del valle, por habernos aportado buenas ideas en la realización del presente trabajo.

A la Universidad Técnica de Manabí, en especial a la Facultad de Ingeniería Agronómica y a los docentes que estuvieron en mi formación profesional.

Damián

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo la multiplicación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L Merr) variedad Perolera utilizando dos tipos de hijuelos, yemas apicales (hijos de fruto) y yemas axilares (puyones), el cual se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí en el año 2017. La micropropagación se realizó en dos fases: establecimiento utilizando medio Murashige y Skoog, luego la fase de multiplicación de brotes en medio Murashige y Skoog suplementado con reguladores de crecimiento, el pH se ajustó a 5.8, en condiciones de humedad relativa de 70%, temperatura de 25±2ºC y un fotoperiodo 16/8. Los resultados obtenidos en la fase de establecimiento presentaron una elevada tasa de contaminación para los materiales estudiados, mostrando menor contaminación bacteriana en el caso de los puyones. Para el caso del tiempo de respuesta los hijos de fruto mostraron un crecimiento y desarrollo tardío al iniciar cambios visibles en los explantes, comparados con puyones los cuales mostraron cambios en menor tiempo. Durante la fase de multiplicación *in vitro*, la mejor respuesta con respecto al número promedio de brotes/explante se presentó utilizando 3 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA, con un promedio de 11,75 brotes por explante en ambos materiales.

Palabras claves: *piña, Bencilaminopurina, Acido Indolacético, yemas apicales, yemas axilares, micropropagacion*

SUMMARY

The objective of the study was the in vitro multiplication of pineapple (Ananas comosus L Merr) variety Perolera using the types of shoots apical buds (offspring of fruit) and axillary buds (puyones), which was performed in the laboratory of Biotechnology of the Faculty of Agricultural Engineering of the Technical University of Manabí in the year 2017. The micropropagation was carried out in two phases: establishment that uses environment and wildlife, then the multiplication phase of buds in the middle and supplementary with growth control, the pH was adjusted to 5.8, under conditions of relative humidity of 70%, temperature of 25 ± 2 ° C and a photoperiod 16/8. The results obtained in the packaging phase present a high contamination rate for the materials studied, showing less bacterial contamination in the case of the puyones. In the case of response time, the children of the food crop achieved late growth and development by initiating visible changes in the explants compared to changes in time in life. During the in vitro multiplication phase, the best response with respect to the average number of shoots / explant presented using 3 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} IAA, with an average of 11,75 shoots per explant in both materials.

Key words: pineapple, Benzylaminopurine, Indolaacetic acid, apical buds, axillary buds, micropropagation

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 1

2. PROBLEMÁTICA 3

3. ANTECEDENTES 4

4. JUSTIFICACIÓN 6

5. OBJETIVOS 7

5.1. Objetivo general 7

5.2. Objetivos específicos 7

6. MARCO REFERENCIAL 8

6.1. DESCRIPCIÓN TAXONOMICA 8

6.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN 8

6.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRICIONAL 8

6.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA 9

6.5. CULTIVARES DE IMPORTANCIA COMERCIAL 10

6.5.1. Variedad “Perolera” 11

6.5.2. Variedad “Cayena Lisa” 11

6.5.3. Clon Champaka F-153 11

6.5.4. Hibrido “MD-2” 11

6.6. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN 12

6.6.1. Propagación tradicional o vegetativa 12

6.6.2. Propagación *in vitro* 13

6.7. IMPORTANCIA DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA 13

6.8. ETAPAS O FASES DEL CULTIVO *IN VITRO* 14

6.8.1. Fase 1. Introducción 14

6.8.2. Fase 2. Multiplicación 15

6.8.3. Fase 3. Enraizamiento 15
6.8.4. Fase 4. Aclimatación 15
6.9. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO 15
6.9.1. Fuente de carbono 15
6.9.2. Nutrientes minerales 16
6.10. Desinfectantes 17
6.11. Condiciones ambientales 17
7. DISEÑO METODOLÓGICO 19
7.1. Ubicación del ensayo 19
7.2. Material vegetal 19
7.3. Metodología 19
7.3.1. Factores en estudio 20
7.3.2. Diseño experimental 20
7.3.3. Análisis estadístico 21
7.4. Manejo del ensayo 21
7.4.1. Establecimiento de ápices de piña de la variedad Perolera en laboratorio. 21
7.4.2. Respuesta del medio de cultivo para el desarrollo de los brotes *in vitro* 23
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 25
8.1. Pérdidas en el establecimiento 25
8.2. Tiempo de respuesta 27
8.3. Longitud de brotes 28
8.4. Diámetro de brotes 29
8.5. Número de brotes/explante 30
9. CONCLUSIONES 34
10. RECOMENDACIONES 35

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....36

12. ANEXOS 42

1. INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* L. Merr) pertenece a la familia de las Bromeliáceas, hallazgos arqueológicos según la FAOSTAT (2014,1) atribuyen su origen a un lugar no especifico de Sudamérica. Sin embargo, los estudios de diversidad sugieren que se originó entre Brasil, norte de Argentina y Paraguay y en los bordes meridionales del amazonas (Páez, 1998).

Es considerada como la segunda fruta tropical más importante del mundo después del mango (FAO 2014, 1). A nivel mundial, la mayor producción se concentra en el Sureste Asiático destacándose Filipinas con el 9.17%, Tailandia con 7.01%, Indonesia con el 6.72% y China con 6.91 %, en América, los principales países productores son Brasil con el 9.68 % y Costa Rica con 10.7 % (MAG 2015, 2).

Estadísticas del ministerio de Agricultura y Ganadería (2015) reportan que la producción a nivel nacional fue 263,521 T, con un rendimiento por hectárea de 44.28 T/ha. Cabe indicar que en Ecuador se siembran aproximadamente 5,951 ha, siendo las provincias con mayor área sembrada Santo Domingo de los Tsáchilas, Guayas y Los Ríos.

La piña está clasificada como u na de las frutas más finas del trópico debido a sus características organolépticas y nutricionales, con gran variedad de alternativas para la industria, superada solamente por el durazno (Suarez 2011, 1).

Los últimos años en el país, las exportaciones de esta fruta han aumentado llegando a exportar en el año 2015 alrededor de 66,076 T. A pesar que estas cifras están por debajo de los principales exportadores como Holanda, Bélgica, Estados Unidos y Panamá. (MAG 2015, 3).

En el país, se cultivan diferentes variedades de piña, entre ellas se puede mencionar “Perolera”, siendo esta la de mayor comercialización en el mercado nacional.

Sin embargo, la producción de la misma se ve afectada por falta de material de calidad para la siembra, siendo la forma más común de propagar esta especie por medio de retoños o hijuelos, la misma que tiene la desventaja que en cada ciclo de cultivo disminuye la calidad, además se transmiten plagas y enfermedades de la planta madre y su multiplicación es muy lenta, lo que repercute en los bajos rendimientos y el aumento en los costos de producción (Pineda 2012, 175).

Los países productores de piña están implementando la técnica de micropropagación *in vitro* la cual tiene muchas ventajas con respecto al método convencional de propagación, entre ellas se puede mencionar: facilidad para la propagación masiva de plantas, obtención de material de calidad libre de enfermedades, intercambio de germoplasma sin peligro de diseminar plagas y enfermedades (Rocha y Treminio 2008, 2). Es por ello que esta técnica se convierte en una alternativa viable en la propagación de esta especie.

2. PROBLEMÁTICA

Siendo la producción agrícola muy variada en Ecuador, el cultivo de piña, constituye un rubro económico importante, esta fruta es muy apetecida por sus propiedades nutricionales y organolépticas a nivel local e internacional por tal motivo se requiere un aumento en la producción.

La propagación por el método convencional (vegetativo) de hijuelos y retoños que se utiliza, tiene una serie de inconvenientes entre ellos: disminución del rendimiento y calidad en cada ciclo de cultivo, la obtención de plantas desuniformes, diseminación de plagas y enfermedades transmitidas de la planta madre y dificultad para propagar masivamente (Pineda 2012, 175).

Los productores de piña tienen dificultad para cubrir las necesidades de plantas "hijos" para establecer nuevas plantaciones, para lo cual se estima que se requieren 30.000 plantas/ha. La carencia de plantas se debe a que la tasa de multiplicación es muy baja en forma natural; además esta vía de propagación propicia la diseminación de enfermedades. Dicha incidencia se traduce en pérdidas para los agricultores que invierten cantidades considerables de dinero para el manejo del cultivo (Mogollón *et al*., 2004, 16).

Cabe indicar que un cultivo comercial requiere de gran número de hijuelos por unidad de superficie, sin embrago por el método tradicional no se pueden obtener fácilmente. Los argumentos antes mencionados conllevan al planteamiento de la siguiente interrogante ¿Cómo multiplicar piña (*Ananas comosus* L. Merr) *in vitro* a partir de meristemos apicales para obtener plantas de calidad, libres de patógenos?

3. ANTECEDENTES

A principios del siglo XX, el científico alemán Haberlandt realizó los primeros estudios en cultivos *in vitro*, logrando colocar algunas células vegetales aisladas en un medio artificial con diferentes azucares, sales inorgánicas y aminoácidos (Garcidueñas 2013, 36). El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en aislar y mantener en un ambiente aséptico, una porción o explante de una planta para su cultivo bajo condiciones ambientales controladas, y en un medio nutritivo artificial con una composición química definida (Ramírez *et al*., 2012, 20).

Por otra parte, Mogollón *et al*., (2004, 15), con el propósito de propagar masivamente piña, *Ananas comosus* 'Queen Australia', multiplicaron *in vitro* brotes provenientes de ápices caulinares extraídos de hijos basales, obtuvieron resultados favorables a las ocho semanas, el número de brotes explante-1 (38,6) fue superior al usar 0,01 mg. L^{-1} de ANA + 1,0 mg. L^{-1} de BAP; también el número de brotes cuyo tamaño fue >1 cm (22,3) y de 0,5 a 1 cm (12,8) fueron mayores.

En otro estudio, Blanco *et al*., (2017, 8) propagaron *in vitro* plantas de piña, ecotipo amazónico Gobernadora, mediante embriogénesis somática (ES) y organogénesis adventicia (OA), concluyendo que el mayor número de vitroplantas (1,58 plantas/explante) se obtuvo del callo embriogénico inducido en medio Murashige Skoog (MS) con Picloram 10 mg.L^{-1} + Tidiazuron 2 mg.L^{-1}, transferido a MS sin hormonas. En el proceso organogénico, se obtuvo el mayor número de plantas/explante (5) por vía directa en MS con ácido naftalenoacético 5 mg. L^{-1} + bencilaminopurina 0,25 mg. L^{-1}, transferido a MS.

En Ecuador, se han realizado algunas investigaciones relacionadas con propagación *in vitro*, tal es el caso de Saucedo *et al*., (2008, 49), quienes desarrollaron un protocolo para el establecimiento, multiplicación, y enraizamiento *in vitro* de yemas axilares de retoños de corona de (*Ananas comosus* L. Merr), variedad Hawaiana y Champaka F-153. Para la proliferación de brotes la mejor concentración fue en un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con

3.5 y 4.0 mg L^{-1} de BAP en la var. Champaka y la var. Hawaiana con 3.5 mg L^{-1} de BAP obteniendo 8.67 brotes por explante.

Así mismo, Suarez (2011, 2) logró establecer el mejor origen de explante para introducir el material a micropropagar, utilizando yemas apicales y yemas axilares, siendo las yemas laterales las mejores, al tener menos contaminación bacteriana. Los explantes introducidos fueron multiplicados por dos tipos de corte, el longitudinal y el transversal, resultando el corte longitudinal el mejor para la obtención de mayor número de brotes con la mejor dosis de BAP la cual fue 2.5 mg L^{-1}, lo que generó más brotes y hojas por explante multiplicado.

En casos más específicos dentro de la provincia de Manabí, se han realizado algunas investigaciones sobre micropropagación utilizando reguladores de crecimiento, entre los que se destacan los realizados por Del Valle (2016, 6) quien evaluó la respuesta de la combinación de bencilaminopurina y ácido indolacético en la propagación *in vitro* de dos cultivares de plátano *Musa* AAB: Barraganete y Curaré, indicando que la mejor respuestas en cuanto al número promedio de brotes/explante se obtuvo al utilizar 3 mg L^{-1} BAP + 0,1mg L^{-1} AIA en ambos materiales.

Por su parte Suarez (2017, 3), estandarizó un protocolo para la obtención de explantes *in vitro,* además para obtener callos a partir de hojas cotiledonares en pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus)* y pitahaya roja (*Hylocereus undatus).* Ensayándose las siguientes combinaciones M1 (ANA 1mg. L^{-1} con BAP 0. 5mg.L^{-1}); M2 (ANA 1mg.L^{-1} y KIN 0. 3mg.L^{-1}); M3 (2,4-D 1.5mg. L^{-1} con BAP 0.5mg.L^{-1}); M4 (2.4-D 1.5mg.L^{-1} con KIN 0.3mg.L^{-1}) , obteniendo como resultado que para la regeneración de callos viables las mejores combinaciones hormonales fueron de los medios P1M1, P1M2 y P1M1, P2M2 para pitahaya amarilla y roja respectivamente.

4. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador, la piña se siembra como cultivo extensivo debido a la buena adaptación que presenta, generando fuente de trabajo en forma directa e indirecta, mejorando la economía del país. Así mismo, es considerada una fruta tropical con gran demanda a nivel nacional e internacional.

De las variedades cultivadas conocidas en Ecuador, la Variedad "Perolera" es la de mayor producción para el comercio interno, la variedad MD-2 está destinada principalmente a la exportación. A pesar de su importancia, en el país no existen trabajos realizados para mejorar la producción de estos materiales, los cuales por falta de materiales sanos de propagación están reduciendo su siembra en los campos; una forma eficiente y viable para retomar la producción de piña en la provincia de Manabí sería mediante la propagación *in vitro* (ASOPIÑA, 2017, 1).

Los productores requieren plantas sanas y de buenas características, lo cual no es fácil conseguir de forma tradicional, y sobre todo si se quieren sembrar grandes extensiones de terreno, por lo cual la multiplicación *in vitro* es una alternativa muy viable.

Nelson *et al*., (2015, 35) manifiesta que, dada la demanda comercial de este fruto y las limitaciones del cultivo convencional, se ha llegado a la búsqueda de nuevas técnicas de propagación de cultivo de tejidos vegetales para acelerar la producción masiva y obtener material de calidad para multiplicar.

5. OBJETIVOS

5.1.Objetivo general

Multiplicar piña (*Ananas comosus* L. Merr) *in vitro*, variedad Perolera, a partir de meristemos apicales.

5.2.Objetivos específicos

1. Desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de piña.
2. Determinar la mejor combinación de citoquininas y auxinas para la multiplicación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr).
3. Determinar la respuesta del mejor tipo de explante para la multiplicación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad "Perolera".

6. MARCO REFERENCIAL

6.1.DESCRIPCIÓN TAXONOMICA

La piña pertenece a la familia Bromeliaceae, la cual cuenta con 56 géneros y 2700 especies. Pertenece al género de las *Ananas* y especie *comosus*, es denominada comúnmente como piña, ananá, ananas, piña de agua (Ángel y González 2013, 24).

De acuerdo con Llanos (2015, 21), el género *Ananas* comprende distintas especies: *Ananas monsttrosus*, *A ananasoides*, *A. ananas*, *A. paraguazensis*, *A. lucidus*, *A. bracteatus*, *A. fritzmulleri* y *A. comosus* la cual es la única especia comestible y comercial.

6.2.ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Según Mogollón *et al*., (2004, 3), la piña (*Ananas comosus* L.) es una de las especies más importantes de la familia Bromeliaceae, de origen Sudamericano; se ha encontrado de manera natural al sur de Brasil, Norte de Argentina y Paraguay además en los bordes de la amazonia.

Por su parte, Delgado et al., (2015, 154), señalan que fue vista originalmente en 1943 por Europeos, aunque antes de la conquista era cultivada desde muchos siglos atrás por los indígenas de Mesoamérica y las Antillas, pasando por Paraguay hasta las costas de Perú, Colombia y Venezuela.

La piña fue distribuida desde la era prehispánica abarcando toda el área de América del sur y central, luego fue llevada hasta África por los portugueses y de ahí se distribuyó a todos los pases del trópico (Ángel y González 2013, 24).

6.3.IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRICIONAL

En la actualidad, estudios realizados por Blanco *et al*., (2017, 8), manifiestan que *Ananas comosus* es una de las especies tropicales de mayor importancia comercial de la familia Bromeliaceae, debido a la fragancia y dulzor de su fruto, así como a la gran aceptación que tiene la fruta por parte de los consumidores en todo el mundo, de la misma manera Rodríguez *et al*., (2016, 41) menciona que es una especie de gran

demanda comercial, haciendo que la fruta esté acaparando la atracción del consumidor en los últimos años.

La importancia del cultivo está en aumento, gracias a su potencial en el mercado como fruta en fresco, materia prima para procesos agroindustriales y productos de exportación (Mogollón *et al*., 2004, 3). Además, fue considerada en la conquista por su aroma, excelente sabor y profuso aspecto como el "Rey de los frutos coloniales" (Delgado *et al.*, 2015, 154).

Según reportes de FAOSTAT (2014, 1), la piña ha tenido un incremento notable desde aproximadamente tres décadas, lo que probablemente puede atribuirse a la aceptación que ha tenido en la población mundial, a tal punto de convertirse en la segunda fruta tropical más importante después del mango.

Cabe mencionar, que el fruto de la piña tiene un alto valor nutritivo, suministrando vitamina (C, B1, B6 y E), minerales (Potasio, Magnesio, Yodo, Cobre y Manganeso), es excelente fuente de fibra, hidratos de carbono, baja en sodio, libre de grasas saturadas y colesterol, además es un alimento altamente digestivo debido a la enzima bromelina (Molina, *et al.*, 2013, 5).

6.4.DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Es una planta herbácea, monocotiledónea y perenne. La planta adulta llega a una altura entre 1-2 metros (Garcidueñas 2013, 11).

El sistema radicular es muy superficial, las raíces no superan los 60 cm. de profundidad bajo el suelo. El tallo está cubierto por hojas lanceoladas las que están en forma envolvente predispuestas en forma de espiral, con alrededor de 70 a 80 hojas por planta (Jiménez, 2005, 5).

El tallo tiene una forma de bastón, de unos 25 a 50cm de altura y 2-5cm de ancho en la base y entre 5-8 cm en la parte superior. Es recta y erecta, pero se curva ligeramente en el momento en que comienza a salir un hijuelo (Garcidueñas 2013, 12). En el ápice del tallo se ubica el meristemo en donde se forman las hojas durante la fase

vegetativa y al terminar su crecimiento se diferencia para establecer una especie de inflorescencia y luego desarrollar un fruto múltiple (Cáceres 2012, 9).

Según Llanos (2015, 22) las hojas son un tipo de conducción, retención y depósito de reservas. Las hojas son largas y delgadas en una especie de lanza, aproximadamente de 30 a 80cm y 1cm de diámetro por hojas. Los tonos van de verde claro a verde rojizo, según la variedad. Sin embargo, la hoja más importante es la llamada hoja "D" que es la hoja más joven la cual se conoce por ser la más larga y estar ubicada en el ancla del tallo.

El pedúnculo es una prolongación del tallo en donde se sostiene el fruto, el tamaño y grosor tienen importancia para sostener los frutos, por lo que la forma del mismo incide en la calidad del fruto, ya que, si esta es larga y delgada, la planta se va hacia un lado y los frutos presentan quemaduras de sol y corona deformada (Cáceres 2012, 9).

La inflorescencia tiene entre cien y doscientas flores distribuidas en forma de espiral, unificadas en el eje central, (en el caso de la floración está presente alrededor entre treinta y sesenta días después de haber salido la flor) (Cuéllar y Sornoza 2015, 78).

El fruto presenta forma tubular, globosa o como pirámide. Su peso varia de 0.9 – hasta 2.5 kilogramos, en promedio mide 30 cm. de altura, el color de su pulpa es amarillo o blanco y depende de la variedad (Llanos 2015, 23).

6.5. CULTIVARES DE IMPORTANCIA COMERCIAL

Según Saucedo *et al*., (2008, 49), las principales variedades cultivadas en Ecuador están representadas por la Hawaiana, La Nacional y la Champaca F-153.

La primera variedad cultivada en el Ecuador en 1980 fue la Cambray (Perolera), la cual a pesar de sus buenas características no es competitiva en el mercado exterior. Tiempo después (1991) la empresa PROEXANT introdujo la Cayena Lisa, la cual era más competitiva en el mercado internacional debido a su textura, menor peso y agradable sabor. Sin embargo, el "boom" de la piña se dio a inicios del 2000 con la

introducción de la variedad “Golden Sweet”, ambas de origen Costarricense (Suárez 2011, 7).

6.5.1. Variedad “Perolera”

Denominada Cambray (Milagreña), es una variedad originaria de Brasil, su fruto es destinado al consumo interno como fruta fresca, su pulpa es blanca por lo cual es poco apreciada para la industria (Garzón 2016, 25).

El tamaño de la planta es mediano, con hojas verde oscuro, erguidas y espinosas. El fruto es pequeño a mediano entre 0.9 – 1.6 kg, es de forma ovoide cuando es pequeño y cónico cuando madura, es verde con un color amarillo en el centro de los ojos maduros. La pulpa es suave y jugosa con un exquisito aroma (Garcidueñas 2013, 20).

6.5.2. Variedad “Cayena Lisa”

Es la variedad conocida como Huwaiana, el fruto es ovoide de 1,5 a 2.5 Kg. Presenta alto contenido de azúcar, aunque su acidez es alta según los consumidores por lo que es conocida como la piña ácida. La planta presenta un tamaño que varía entre 80 a 100cm de alto y con 60 a 80 hojas sobre su fruto (Garcidueñas 2013, 20).

6.5.3. Clon Champaka F-153

Es un clon puro obtenido de la variedad Cayena Lisa, es recomendado por su resistencia a enfermedades comparado con otras variedades, por sus características es una variedad con gran aceptación y demanda para los mercados externos (Llanos 2015, 17).

6.5.4. Hibrido “MD-2”

Es un hibrido introducido en muchos países gracias a su distintivo aroma y sabor además por su presentación. Esta descrita como una fruta de lujo en los mercados de exportación (Llanos 2015, 17).

6.6. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN

La piña presenta un sistema de reproducción asexual alógamo y funcional y por otra parte un sistema de propagación vegetativo dominante y eficaz. (Delgado *et al.*, 2015, 154).

Según Millones (2011, 8), la propagación asexual es la de mayor aceptación entre los agricultores y en esta se emplean partes vegetativas como:

Chupón producido a partir de yemas ubicados bajo en nivel del suelo

Retoño intermedio "hapa", entre el brote del tallo y el bulbillo, que se desarrolla a partir de yemas axilares situadas en el punto de conjunción entre el pedúnculo y el tallo pero que con frecuencia en la práctica no se distingue del brote del tallo.

Ramas en forma de hojas, formadas a partir de las yemas axilares

Vástago originado fuera del pedúnculo bajo la base del fruto

Coronas formadas de la parte superior del fruto.

6.6.1. Propagación tradicional o vegetativa

La piña, tiene incompatibilidad reproductiva la cual se ve expresada por la abstención en el momento en que empieza el crecimiento del tubo polínico en el estilo, por lo que la propagación se realiza de forma vegetativa (Pineda *et al*., 2014, 136).

La propagación tradicional se efectúa colocando bajo tierra para que enraícen las coronas formadas encima del fruto, las cuales pueden estar enteras o en secciones longitudinales, o en su defecto por los brotes laterales que salen en el tronco de la planta. La disposición de material vegetal para plantaciones mediante este método tiene el inconveniente de que apenas se obtienen de 10 a 13 plantas por cada ciclo de cultivo de 18 meses, para el caso de la corona se demora 13 años en producir la cantidad suficiente de material vegetal para sembrar una hectárea siempre y cuando sea dividida en cinco partes cada corona (García 2006, 20).

6.6.2. Propagación *in vitro*

Según Zometa, *et al*., (2015, 80) los objetivos que persigue la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* son varios, entre los cuales podemos destacar, obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas, conservación e intercambio de germoplasma. Además, los estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines, también la bioconversión y producción de compuestos útiles e incremento de la variabilidad genética.

Pineda *et al*., (2012, 176) manifiestan, que el éxito de esta técnica empleada en escala comercial para la obtención de una alta tasa de supervivencia de las plantas, depende de la habilidad de transferir las plantas a condiciones *ex vitro*, etapa limitante cuando los cultivos *in vitro* se pasan al invernadero con la finalidad de aclimatar las plántulas.

El cultivo de tejidos permite aislar una proporción de la planta llamada explante a la cual se le darán condiciones artificiales en un laboratorio para permitir que sus células se desarrollen, expresando las características de la planta originaria, basados en la teoría de la totipotencia celular (Rojas *et al*., 2004, 8).

6.7. IMPORTANCIA DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA

Según García *et al*., (2012, 189) el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (micropropagación) es una herramienta biotecnológica para la regeneración y multiplicación masiva de diversas especies, en tiempos relativamente cortos y que ha tenido mucho éxito en el cultivo *in vitro* de piña.

Mogollón *et al*., (2004, 16) manifiestan que es significativa la importancia que tienen las técnicas de cultivo *in vitro* por la serie de ventajas que nos proporcionan, entre las cuales destaca, la reproducción de un gran número de plantas en tiempo muy reducidos, debido a que la multiplicación de la piña por el método tradicional es muy lenta, además se obtienen plantas libres de plagas y enfermedades y con buena calidad genética que pueden ser ofrecidas a los agricultores.

Se han efectuado trabajos sobre propagación *in vitro* en piña desde finales de la década de los 80, basados en muchos casos, en la ruptura de la latencia de las yemas apicales y laterales preexistentes, además del efecto de auxina y citoquina sobre la brotación de esas yemas (Pineda *et al*., 2012, 175). Por otro lado, Saucedo *et al*., (2008, 49) quienes trabajaron con las variedades Hawaiana y Champaca, del mismo modo ambos grupos lograron la supresión de latencia de yemas axilares de plantas adultas, utilizando los mismos regladores de crecimiento en una porción 4:1 auxina: citoquinina.

Mogollón *et al*., (2004, 15) indican que algunas variedades como "Queen Australia" requerían concentraciones de citoquininas cien veces mayor que la de auxinas. Sin embargo, las investigaciones de García *et al*., (2008) muestran que obtuvieron un alto porcentaje de multiplicación de brotes de piña Española Roja utilizando concentraciones iguales de auxinas y citoquininas pero utilizando el sistema de inmersión temporal. Así mismo Blanco *et al*., (2011, 437), trabajaron con variedades autóctonas del Amazona Venezolano, resaltaron la importancia de la concentración de tiamina y el pH del medio de cultivo para el proceso de la ruptura de la latencia de las yemas.

6.8. ETAPAS O FASES DEL CULTIVO *IN VITRO*

La micropropagación se puede dividir en varias fases. Se prepara el material a propagar, se desinfecta, se siembra en un medio de cultivo, se incuba en condiciones apropiadas, empiezan a multiplicarse antes de ser enraizado y posteriormente llevado a climatizarse en un invernadero.

El procedimiento según algunos autores se divide de la siguiente manera:

6.8.1. Fase 1. Introducción

El explante a utilizar es acondicionado para promover la supervivencia dentro de un ambiente de asepsia. Es una fase muy delicada desde el punto de vista de asepsia para reducir los problemas de contaminación. Una vez seleccionado el material vegetal, es limpiado y lavado con cuidado, para eliminar el material exterior la

desinfección se realiza primero fuera y luego dentro de la cámara de flujo laminar y se introduce en el medio de cultivo para su desarrollo (Suarez 2011, 17).

6.8.2. Fase 2. Multiplicación

En esta etapa el objetivo primordial es mantener y aumentar el número de brotes por explante inoculado. Además los medios de cultivo tienen en su composición adicionado reguladores de crecimiento (Olmos *et al*., 2010, 354).

6.8.3. Fase 3. Enraizamiento

En la fase de enraizamiento, se utilizan pequeñas plántulas individuales de un tamaño cercano a 2cm, para esta fase los explantes que resultaron de la fase anterior (multiplicación) son transferidos a un nuevo medio de cultivo el cual estará libre de hormonas o en su defecto que solo contengan algún tipo de auxinas (Quillay 2011, 22).

6.8.4. Fase 4. Aclimatación

En esta fase se realiza el traslado de las plantas propagadas *in vitro* en suelos ricos en nutrientes, hacia un área cubierta. Además, está fase es muy crítica por lo que es mejor tener cantidades industriales para obtener cantidades elevadas de sobrevivencia y bajos costos de producción. Las plantas al salir del laboratorio son altamente ineficientes, por lo que son heterótrofas, con grandes espacios intracelulares y bajo número de estomas además de otras limitaciones (Ruiz 2000, 18; Ajila 2014 ,9).

6.9. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Generalmente los medios de cultivo se componen de compuestos que aportan; minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, fuente de carbono y agentes gelificantes (Ángel y González 2013, 30).

6.9.1. Fuente de carbono

Por lo general se utiliza como fuente de carbono la sacarosa (2 a 5%) es el azúcar más utilizado, esta puede ser reemplazada por glucosa (Wampash *et al*., 2011, 28).

6.9.2. Nutrientes minerales

Los medios de cultivo por lo general deben aportar los macro y micronutrientes que son indispensables en el crecimiento de plantas en su estado natural como potasio, azufre, nitrógeno, fosforo, hierro, calcio, magnesio en concentración de milimolares; por otro lado, el manganeso, cloro, zinc, yodo, boro, cobalto, cobre y molibdeno utilizados en concentraciones micromolares (Albarracín 2012, 203).

6.9.2.1.Vitaminas

Son las encargadas de realizar una serie de reacciones catabólicas en el individuo, aunque son requeridas en pequeñas concentraciones; de todas las vitaminas del complejo B usadas (Tiamina-HCI, B1; Acido Nicotinico, B6 y Piridoxina-HCI, B12) son necesarias y de ellas apenas la Thiamina es indispensable en el medio para las reacciones metabólicas (Ángel y González 2013, 30).

6.9.2.2.Agente gelificante

Este componente es usado exclusivamente para medios semisólidos, por lo general se utiliza agar (0.6% a 1.0%). Aunque en el mercado se encuentran otros gelificantes fáciles de utilizar y con iguales resultados (Wampash *et al*., 2011, 29).

6.9.2.3.Sustancias reguladoras de crecimiento

En la micropropagación se utilizan generalmente citoquininas y auxinas. Lo de mayor relevancia en tomar en cuenta es mantener un equilibrio entre ellas mismas (Quillay 2011, 24).

Las auxinas son las principales en los medios de cultivo, estas promueven el crecimiento de callos, en suspensiones celulares, de órganos (ápices y meristemos). Su principal función es regular la morfogénesis, especialmente cuando está en un equilibrio con las citoquininas (Taíz y Seieger 2006, 322). Por su parte Quillay (2011, 23), manifiesta que las auxinas son usadas con el fin de promover la división celular y

la diferenciación de las raíces, además de indicar que en el mercado las principales fuentes de auxinas son:

IAA (Ácido indolacético); NAA (Ácido naftalenacético);
IBA (Ácido indolbutírico); 2,4-D (2,4- Ácido diclorofenoxiacético), etc.

Según (Ajila 2014 ,5), el AIA se forma en forma natural en las plantas, pero en el caso de los medios se añade en concentraciones de 0,01- 10 mg/l-1.

Las citoquininas son adicionadas al medio de cultivo para incitar la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos, así como de órganos (Quillay 2011, 24). Generalmente los compuestos más usados como fuente de citoquininas son:

Cinetina; BA (6-Benciladenina); BAP (6-Bencilaminopurina);
2iP (N-Isopentenilaminopurina); Zeatina.

Las giberelinas son usadas para promover el desarrollo de embriones adventicios. Generalmente entre las giberelinas en el mercado se prefiere usar GA3 (Quillay 2011, 24).

6.10. Desinfectantes

Los desinfectantes más utilizados son hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrogeno (H2O2), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl2). El alcohol se utiliza habitualmente al 70% usándolo en combinaciones con otros desinfectantes (Quillay 2011, 20).

6.11. Condiciones ambientales

Luz. - en los cuartos de cultivo es generada por lámparas fluorescentes de 1000 a 4000 lux de iluminación. El tiempo de prolongación de la luz va a depender en cierta medida de la especie, ya que existen especies que requieren más luz y otras solo horas de oscuridad para la formación de yemas (Lucero 2013, 6)

Humedad relativa. - dentro del cuarto de cultivo debe mantener una humedad que oscila entre 70 a 80%, dentro de la cámara a mayor humedad aumentara la proliferación de microorganismos patogénicos (Toro, 2004, 17).

Temperatura. - dentro de los cuartos de cultivo la temperatura debe mantenerse entre 22 a 25°C, aunque dependerá de la especie a cultivarse (Ajila, 2014, 7).

pH. - es importante mantener un pH equilibrado en valores que van entre 5,5 y 5,8, valores bajos de pH causan inconsistencia de AIA (auxina) (Toro, 2004, 18).

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Ubicación del ensayo

El presente ensayo se realizó durante los meses de julio a diciembre del 2017, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí.

7.2. Material vegetal

El material utilizado, consistió en puyones (hijos axilares), e hijos del fruto (hijos apicales) de plantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.), colectados de una plantación comercial establecida en la parroquia El Rosario del cantón El Empalme provincia del Guayas (Figura 1).

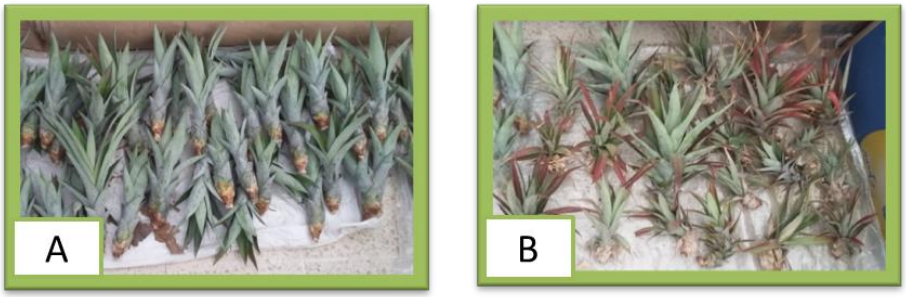

Figura 1. A) Material de propagación (Puyones). B) Material de propagación (Hijos de fruto).

7.3. Metodología

Para el establecimiento del material de piña *in vitro*, se utilizó la metodología descrita por Blanco *et al*., (2011, 438).

7.3.1. Factores en estudio

Factor A: Origen de materiales

A1. Puyones
A2. Hijos de frutos

Factores B: Dosis de hormonas

B1 = Testigo
B2= 2.0mg L^{-1} BAP+ 0.3 mg L^{-1} AIA
B3= 3.0mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA
B4= 3.5 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA
B5= 4.0 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA

7.3.2. Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al azar (DCA), en arreglo factorial (2X5), el mismo que incluyó 10 tratamientos (combinaciones de origen de material por dosis de hormonas) y 3 repeticiones, (tabla 1)

Tabla 1. Factores en estudio

ORIGEN DE MATERIALES (A)		DOSIS DE HORMONAS (B)	
A1	Puyones	**B1**	Testigo
A2	Hijos de fruto	**B2**	2.0mg L^{-1} BAP+ 0.3 mg L^{-1} AIA
		B3	3.0mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA
		B4	3.5 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA
		B5	4.0 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA

7.3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento ANOVA en el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20 y la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05\%$).

7.4. Manejo del ensayo

7.4.1. Establecimiento de ápices de piña de la variedad Perolera en laboratorio.

- **Selección y preparación del material proveniente del campo**

Se utilizó hijos de la base del fruto y puyones (hijos de las bases del tallo) a los cuales se eliminaron las hojas (Figura 3A), posteriormente se cortó la base que rodea la yema quedando reducido a un tamaño de 5 cm aproximadamente, luego se colocó en un vaso de precipitación y se lavaron con jabón líquido durante 4 minutos y se procedió a enjuagar con abundante agua (Figura 3B). Estos explantes se sumergieron en una solución de 10 ml/L^{-1} de un fungicida-bactericida (*Phyton* -Sulfato Pentahidratado de cobre) en combinación con *Benlate* (0.20 g/L) durante una hora (Figura 3C). Luego de transcurrido ese tiempo el material fue colocado en otro vaso de precipitación y se llevaron a condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar) para una nueva desinfección, dentro de la cámara el material vegetal se colocó en frascos esterilizados, donde fueron sumergidos en una solución de etanol al 70% por 10 segundos y por último se llevaron a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.5% y gotas de Tween-20 durante 20 minutos, luego de este lapso se enjuagaron por tres ocasiones con agua esterilizada (Figura 3D).

Figura 3. Limpieza y desinfeccion de material de campo: A) Hijos de fruto (izquierda) Puyones (derecha). B) Secion de apices de 5 cm aproximadamente. C) Inmersión en solucion de fungicida-bactericida. D) Enjuague de los explantes.

- **Implantación de los explantes**

Con la finalidad de seleccionar los explantes libres de contaminación, previo a la siembra en los tratamientos en estudio los explantes se colocaron en el medio Murashige y Skoog (1962) básico (Figura 4A), en tubos de ensayo tapados y sellados con plástico para embalaje (Figura 4B). Se evaluó el porcentaje de contaminación y sobrevivencia a los 7 y 15 días después de la siembra (DDS).

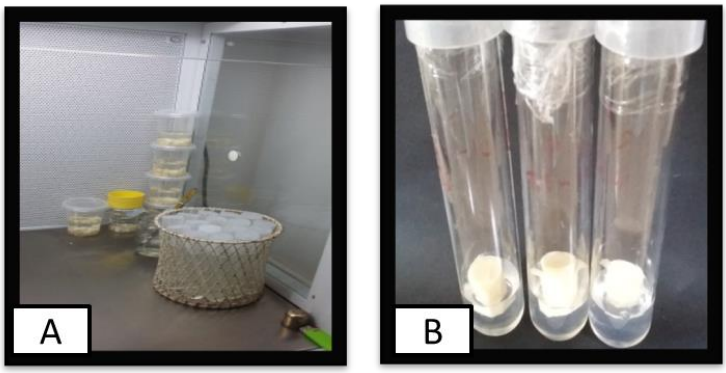

Figura 4. Implantacion de los explantes: A) tubos de ensayo con medio de cultivo. B)tubos de ensayo con medio de cultivo, tapados y sellados.

7.4.1.1.Variables analizadas

- **Perdidas en el establecimiento**

Se evaluó el número de explantes contaminados por bacterias y hongos, así como también aquellos que presentaron necrosis por oxidación fenólica. Las evaluaciones se realizaron, a los 7 DDS y 15 DDS.

- **Tiempo de respuesta**

El tiempo de respuesta se evaluó al observar cambios en la coloración y aparición de las primeras hojas de los explantes sembrados. Esta variable se registró desde el momento del establecimiento hasta los 15 DDS.

7.4.2. Respuesta del medio de cultivo para el desarrollo de los brotes *in vitro*

- **Multiplicación de brotes**

Los pequeños explantes se transfirieron al nuevo medio de multiplicación cada seis semanas (subcultivo) hasta el cuarto subcultivo (Figura 5). En cada una de las fases del cultivo, realizada la siembra, el material vegetativo se mantuvo en cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una temperatura de 26 $\pm$ 2 grados centígrados.

Para el desarrollo de la investigación se utilizó; cámara de flujo laminar, autoclave, refrigerador, potenciómetro, balanza analítica, estufa de secado, planchas de agitación, marcador, pinza, bisturí, beakers, erlenmeyer, tubos de ensayo, goteros, mechero, soluciones buffer, papel aluminio, papel kraf, material de vidrio y plástico, alcohol (70% y 90%), hipoclorito de sodio (cloro comercial), sales minerales, vitaminas, fuente de carbono, fitoreguladores del crecimiento, entre otros insumos.

Figura 5. Micropropagación de brotes (subcultivos): cada 6 semanas

7.4.2.1. Variables evaluadas

- **Número promedio de brotes emitidos**

Se contabilizaron por tratamiento, el número de nuevos brotes emitidos a partir del brote inoculado, esta actividad se realizó cada seis semanas hasta el final del periodo de multiplicación.

- **Longitud de brotes**

Por cada tratamiento se midió la longitud de 4 brotes por repetición, dando un total de 12 brotes tomados al azar. Dichas evaluaciones se realizaron cada seis semanas. Esta variable se midió con un calibrador y en condiciones de cámara de flujo.

- **Diámetro de brotes**

Al mismo tiempo que se mide la longitud se midió el diámetro de 12 brotes emitidos por tratamiento, se utilizó un calibrador

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1.Pérdidas en el establecimiento

La sobrevivencia de los explantes fue relativamente baja, en el caso de los Puyones el porcentaje de sobrevivencia fue de 38,8 de los explantes iniciales, sin embargo el 24,8% de explantes procedentes de hijos de fruto no presentaron contaminación. Cabe mencionar que no se presentó necrosis por oxidación fenólica en los explantes.

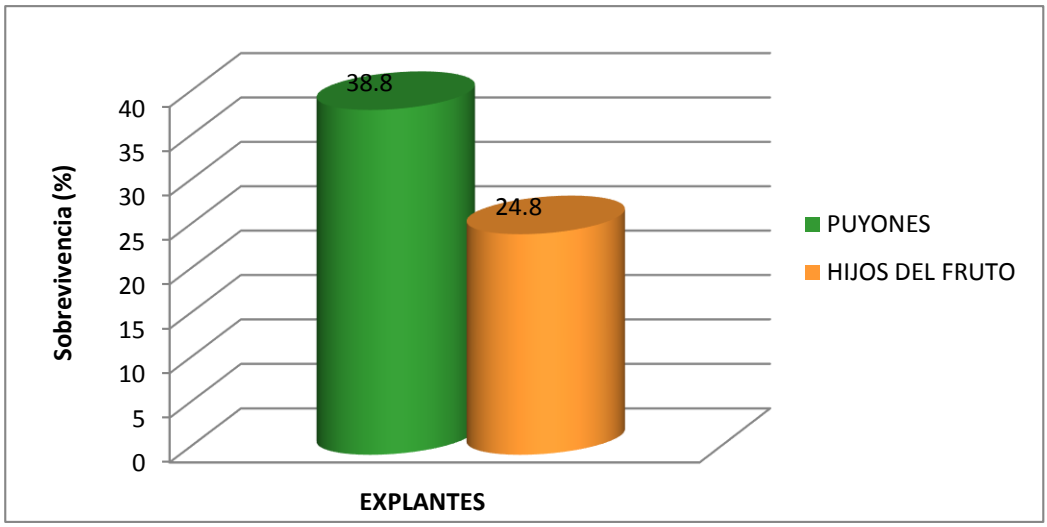

Grafico 1. Sobrevivencia de explantes de Piña (Hijos de fruto y Puyones) en condiciones *in vitro* durante la fase de establecimiento expresado en porcentajes.

Los resultados mencionados corresponden al periodo de 15 días desde el momento de la siembra (Gráfico 1).

Siendo este porcentaje inferior a lo reportados por Ajila (2014) quien utilizando explantes de piña "Hibrido MD-2" y un protocolo de desinfección más exhaustivo, desde el momento que se extrajo de la planta madre los explantes, obtuvo 40% de sobrevivencia para los explante, esto puede deberse a que el material vegetal fue sumergido en dos tanques de 200 lt cada uno por 6 horas, los mismos que contenían un fungicida con amplio espectro (Benlate).

Se debe considerar que, para obtener altos porcentajes de sobrevivencia, se debe establecer como punto de partida, la desinfección de los explantes, criterio que

coincide con lo mencionado por Ruíz (2000), el mismo que indica que la planta madre tiene que ser minuciosamente desinfectada por lo que de ello dependerá el inicio de explantes sanos y libres de patógenos.

La contaminación causada por bacterias y hongos se presentó en ambos tipos de explantes en la fase de establecimiento. (Grafico 2). En el caso de las bacterias, los explantes procedentes de puyones e hijos de fruto presentaron el 52 % y 66,4% de contaminación respectivamente. La presencia de hongos fue menor en los Hijos de fruto (8,8%), que en el caso de los puyones (9,2%).

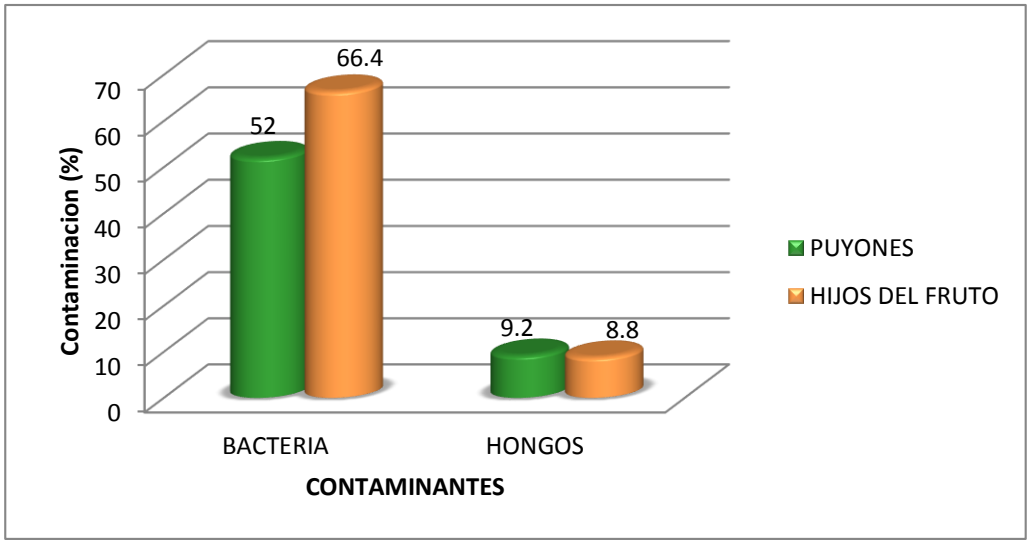

Grafico 2. Factores de pérdida de explantes de Piña (Hijos de fruto y Puyones) en condiciones *in vitro* durante la fase de establecimiento expresado en porcentajes.

Suarez (2011, 62) logró establecer el mejor origen de explante, utilizando hijos de fruto y puyones, siendo los puyones los mejores, al tener menos contaminación bacteriana. El mayor porcentaje de contaminación por hongos se produjo en las puyones con el 15% y el mayor porcentaje de contaminación por bacterias fue en hijos de fruto con un 30%.

El tipo de contaminación presentada en este ensayo probablemente se deba a la falta de asepsia en el momento de la desinfección y manipulación dentro de la cámara

de flujo laminar. Roca y Mroginski (1991, 9), ratifican lo mencionado, considerando que el origen de la presencia de agentes contaminadores son los explantes, el aire, el medio y el investigador. Entre otras causas la habilidad que tiene una persona para evitar contaminación externa, lo que influye en la eventual presencia de patógenos en el tejido (Rojas *et al*, 2004).

Los hijos de fruto están más cubiertos que los puyones por lo que no garantiza una desinfección óptima de patógenos, según lo comenta Garita y Gómez (2000) en su ensayo sobre micropropagación de piña.

8.2.Tiempo de respuesta

En la fase de establecimiento al evaluar el tiempo de respuesta, los primeros siete días, los explantes que obtuvieron mayor respuesta fueron los puyones con un 37,2% con respecto a los hijos de fruto, su respuesta fue de 34%. Cabe mencionar que en la primera semana luego de establecidos, en los explantes se presentó la mayor cantidad de respuesta, mientras que en la segunda semana dicha variable se redujo para ambos casos (puyones 31,2% e hijos de fruto 28,4%). Sin embargo, algunos explantes no presentaron cambios, en el caso de hijos de fruto fue mayor (37,6%) que para los puyones (31,6%) (Gráfico 3).

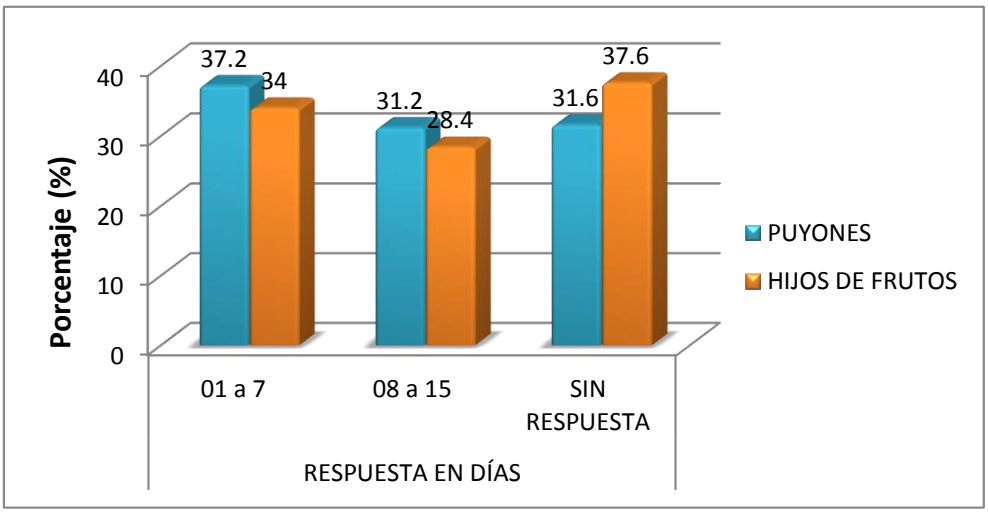

Gráfico 3. Tiempo de respuesta de explantes de Piña (Hijos de fruto y Puyones) en condiciones *in vitro* durante la fase de establecimiento expresado en días.

La respuesta que presento el material puyones en laboratorio, coincide con lo que sucede en el campo, los puyones presentan respuesta en menor tiempo y produce más rápido, en comparación con los hijos de fruto. Esto puede suceder porque los puyones son una parte vegetativa más precoz y de tejido más diferenciado (ASOPIÑA, 2017).

8.3.Longitud de brotes

El análisis de varianza (Anexo 1) muestra diferencias estadísticas significativas correspondientes a las dosis, de manera que el mejor promedio se obtuvo al utilizar 3.5 mg L^{-1} BAP + 0,3 mg L^{-1}AIA con una altura promedio de 1,23 cm en ambos materiales en comparación con las otras dosis utilizadas (Gráfico 4).

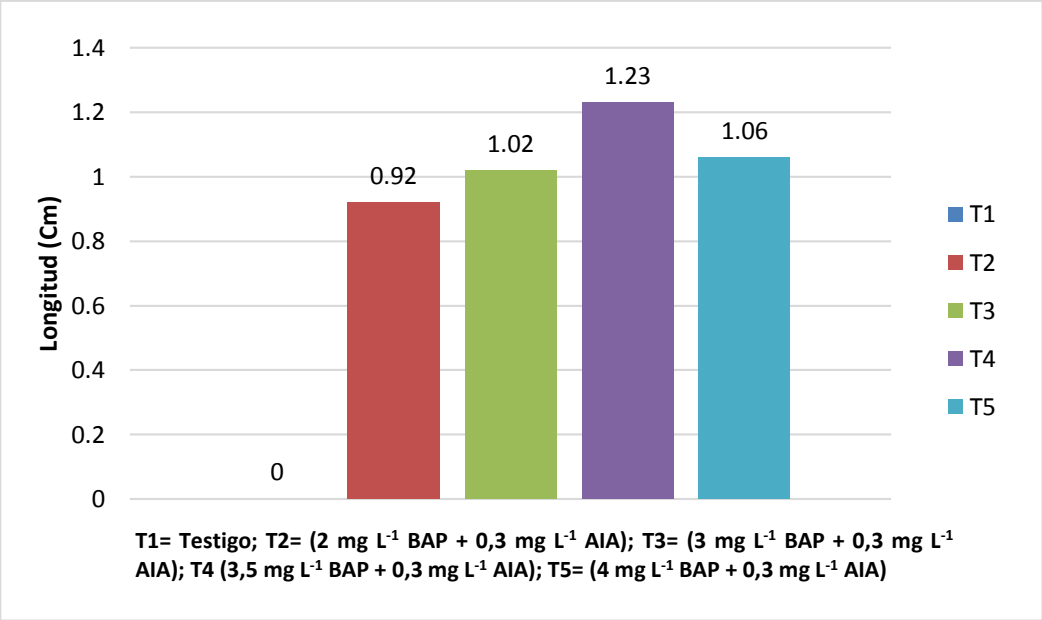

Grafico 4. Influencia de la dosis de hormonas en la longitud de los brotes, en la fase de multiplicación.

Cabe mencionar que una investigación realizada por Mogollón *et al*., (2008), utilizando ápices caulinares de hijos axilares y basales de la variedad Española Roja de piña, reportó en la fase de Multiplicación la mayor longitud de brote (1,06 cm) empleando la dosis de 1,0 mg L^{-1} BAP + 0,01 mg L^{-1} ANA.

En la investigación ya mencionada el promedio de longitud de brote fue inferior a lo reportado en nuestro ensayo, lo cual puede deberse a que ellos utilizaron otra variedad y concentraciones hormonales inferiores, esto demuestra que cada especie vegetal tiene requisitos particulares de nutrición y condiciones ambientales propias en su crecimiento y desarrollo.

Esto concuerda con lo reportado por Dottin (2000,11) quien manifiesta que el balance apropiado está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de las especies y del tipo de explante.

8.4.Diámetro de brotes

En el análisis de varianza (Anexo 2) muestra diferencias estadísticas significativas correspondientes a la dosis, con lo que respecta a la interacción dosis por material no hubo diferencia significativa. Es así que la mejor concentración de hormonas para los materiales estudiados fue 3.5 mg L^{-1} BAP + 0,3 mg L^{-1} AIA con un promedio de 0,48 cm (Grafico 5).

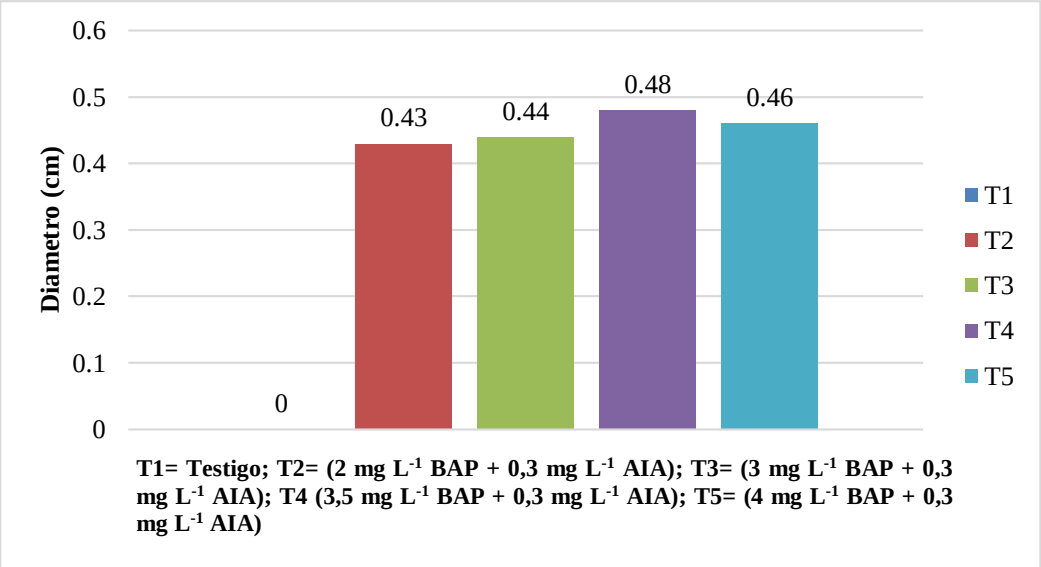

Grafico 5. Influencia de la dosis de hormonas en el diámetro de los brotes, en la fase de multiplicación.

Del Valle (2016, 51) quien evaluó la respuesta de las combinaciones de bencilaminopurina y ácido indolacético, en la propagación *in vitro* de dos cultivare de plátano *Musa AAb:* Barraganete y Curare, indicando que la mejor dosis de hormonas para los dos materiales fue (4mg/L BAP + 0.3 mg/ L AIA) con una media de 0.43 cm de diámetro.

Confirmando lo ya dicho, cada especie vegetal tiene requisitos particulares de nutrición y condiciones ambientales propias en su crecimiento y desarrollo, por tal razón se obtienen diferentes resultados en los ensayos ya mencionados.

Además los resultaos obtenidos ratifican lo reportado por Norberto (2007, 136) quien manifiesta que un balance hormonal entre auxina y citoquinina es la clave para mantener una proporcionada división celular y el crecimiento de la región meristematica presente en las yemas que a su vez ayudan a la proliferación de brotes. De la misma manera Hoyos et al (2008, 99), expresan que las auxinas tienen la capacidad de producir un ensanchamiento celular.

8.5.Número de brotes/explante

El análisis de varianza determinó que se presentaron diferencias altamente significativas en las dosis mientras que la interacción no mostró significancia (Anexo 3), siendo la mejor dosis para ambos materiales 3 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA, con 11,75 brotes por explante (Grafico 6).

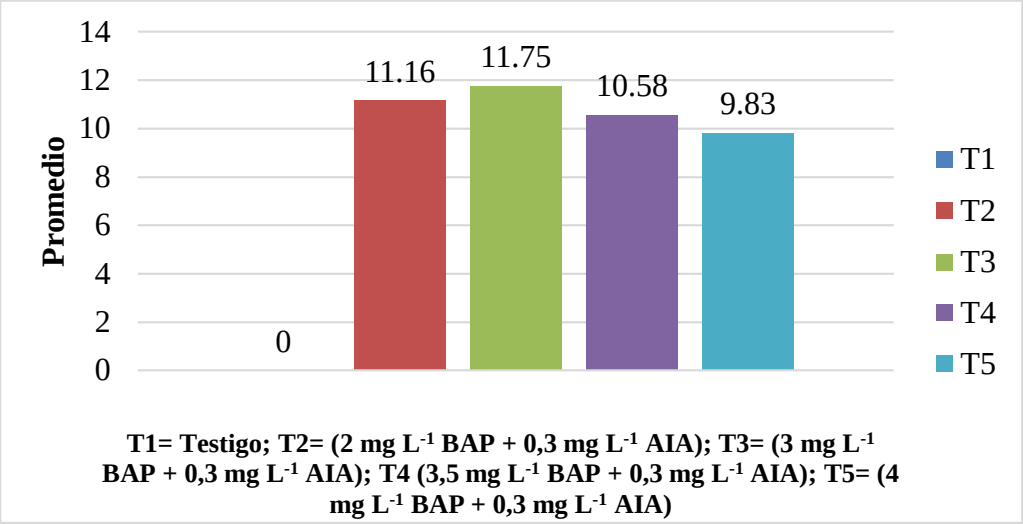

Grafico 6. Numero de brotes en ambos materiales, en la fase de multiplicación

De la misma manera, los resultados obtenidos en este ensayo, coinciden con los reportados por Saucedo *et al*., (2008, 49) quienes realizaron la propagación clonal *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merr) Variedades Champaka y Hawaiana obteniendo como resultado que para la proliferación de brotes en la fase de multiplicación la mejor concentración, fue en un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con 3.5 y 4.0 mg L^{-1} de BAP en la Var. Champaka con un promedio de 9.75 brotes y la Var. Hawaiana con 3.5 mg L^{-1} de BAP con un promedio 8.67 brotes.

Mientras que, los datos obtenidos por Saucedo *et al*., (2008) difirieren de los obtenido en nuestra investigación, debido a que, para este ensayo se consideró la adición de auxina en la fase de multiplicación obteniendo mejores resultados, afirmando lo manifestado por Daquinta *et al*., (1998, 79), quienes mencionan que la aplicación de auxina al medio de multiplicación incide directamente en el número de brotes, puesto que al haber un balance de citoquinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada y se inhiba el enraizamiento, estimulando la brotación.

Según Tórrez (1981,19) para lograr la proliferación de los brotes axilares y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en la base de las hojas, es necesaria la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical. Así mismo, manifiestan que el uso de citoquininas es generalizado en los medios de propagación, y que la concentración varía en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes.

De acuerdo con González *et al.*, (1999,25) la iniciación del crecimiento de piña implica el rompimiento de la latencia de las yemas axilares o laterales, y este hecho está en dependencia de las sustancias inductoras como las auxinas y citoquininas que se encuentren presentes en el explante a propagar. Al mismo tiempo indican que es necesario un balance apropiado en el medio de cultivo entre auxinas y citoquininas para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas.

Esto concuerda con lo manifestado por Dottin (2000,11) quien manifiesta que el balance apropiado está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de las especies y del tipo de explante.

Por su parte Barceló *et al.* (1995,13) señalan que la concentración de citoquinina endógena es usualmente muy baja en los ápices, debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que es esencial la aplicación exógena en los medios de cultivo para los procesos de división celular y para la citocinesis (división del citoplasma para formar dos células hijas).

En el estudio realizado por Montiel y Villalba (2008, 15) usando la concentración de 2mg L^{-1} BAP, pero adicionándole 1 mg L^{-1} de ANA en la variedad Cayena se obtuvieron 11 brotes/explante y con la misma dosis en la variedad Golden Sweet se presentaron 7 brotes/explante.

Estos resultados fueron superiores a los encontrados por Miranda (1996, 107), que obtuvo una media de 11 brotes por explante al cabo de 60 días, utilizando medio

de cultivo MS líquido estacionado, adicionando 1 mg L^{-1} de ANA + 1 mg L^{-1} de BAP, en la fase de multiplicación, para la variedad Cayena Lisa.

Mogollón *et al*., (2004, 3), trabajando con brotes de piña de la variedad Queen Australia, utilizando medio MS líquido con la adición de 0,01 mg L^{-1} de ANA + 1 mg L^{-1} de BAP y colocados en una mesa agitadora a 30 rpm, obtuvieron una media de 39 brotes por explante, al cabo de ocho semanas de inoculación.

El establecimiento y posterior desarrollo de la piña está en relación con el rompimiento de la latencia de los meristemos. Acción que se favorece con la ayuda de sustancias activadoras como las auxinas y citoquininas, por lo que un balance entre ellas en el medio de cultivo favorecerá la formación de plántulas a partir de pequeños ápices, yemas o meristemos (González *et al*., 1999,26).

9. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un protocolo para el establecimiento *in vitro* de piña.

2. Las evaluaciones realizadas con respecto a la longitud de los brotes en condiciones de laboratorio muestran que el mejor promedio se obtuvo al utilizar 3.5 mg L^{-1} BAP + 0,3 mg L^{-1} AIA con una altura promedio de 1,23 cm en ambos materiales en comparación con las otras dosis utilizadas. En el caso de la variable diámetro de brotes se determinó que la mejor concentración de hormonas para los materiales estudiados fue 3.5 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA con un promedio de 0,48 cm. El mayor número promedio de brotes/explante lo presento la dosis de 3 mg L^{-1} BAP + 0.3 mg L^{-1} AIA con 11,75 brotes por explante.

3. El análisis de varianza no muestra diferencias estadísticas significativas en los materiales utilizados y en las interacciones de los factores.

10.RECOMENDACIONES

1. Establecer algún protocolo de desinfección diferente sería muy favorable para trabajos posteriores.

2. Evaluar otras combinaciones entre BAP y AIA ya que en esta especie no se han probado rangos muy amplios en cuanto a hormonas.

3. Realizar las fases de enraizamiento y aclimatación de las plántulas para así saber las condiciones que completen el proceso de propagación.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarracín, C. 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 de pregrado, Universidad Politécnica del Ejército.

Ajila, G. 2014. "*Interacción de hormonas vegetales utilizadas en la fase de establecimiento in vitro en explantes de piña (Ananas comosus L), Hibrido MD-2*". Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala.

Ángel, Jenny y Jorge González. 2013. "*Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (Ananas comosus L. Merr.) variedad Golden*". Tesis de maestría, Universidad de El Salvador.

ASOPIÑA (Asociación de productores de piña del Ecuador). 2017. "*Cultivo de piña*"

Barceló; Nicolás, Sabatar y Sánchez. 1995. Fisiología Vegetal. Ciencia y Técnica. Ediciones Pirámide S.A. 7ma ed. Madrid, ES. P 120- 320.

Blanco, Héctor, Teresa Vargas, y Eva de García. 2011. "*Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales*". Interciencia, N° 6: 437-440

Blanco Héctor, Teresa Vargas y Eva de García. 2017. "*Regeneración in vitro de plantas de piña (Ananas comosus) ecotipo amazónico Gobernadora*". Revista Colombiana de Biotecnología, N°6: 8.

Cáceres, E. 2012. "*Mejoramiento de la producción del cultivo de la piña mediante sistemas Agroforestales en el Distrito de Perené- Chanchamayo*".

Cuéllar, Juan y Carlos Sornoza. 2015. "*Multiplicación in vitro de piña MD-2 (Anannas comosus (L.) Merr) haciendo uso de fertilizantes comerciales*". Producción Agropecuaria y desarrollo sostenible, N°1 :78.

Daquinta María, Cisneros A, Rodríguez Y, Escalona M, Pérez M, Luna I y Borrot C. 1998. "*Propagación in vitro de la piña (Ananas comosus (L.) Merr*.)". Tesis Doctoral, Universidad de Ciego de Avila, Cuba.

Dottin, M. 2000. "Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) " . Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas, Cuba. 119p.

Delgado, Hernando y Laura Arango. 2015. "*Caracterización morofoagronómica de genotipos de piña (Ananas spp.) en un suelo de terraza alta de Villavicencio*". ORINOQUIA - Universidad de los Llanos - Villavicencio, Meta. Colombia, No 2: 154

Del Valle, Marbelin. 2016 *"Efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en plátano (Musa AAB) cv. barraganete y curaré mediante cultivo in vitro de tejidos".* Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Manabí.

FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2014. Base de datos estadísticos de la FAO.

García, R. 2006. "*Propagación de la piña Americana, (Ananas comosus) por cultivos de tejidos "in vitro*". Departamento de biología, Centro de ciencias del Mar. Universidad Politécnica de las Palmas, ULPGC.

García, Eva; Héctor Blanco; Adriana Pineda; Teresa. Vargas 2012. "*Micropropagación masiva de plantas de piña (Ananas comosus L. Merr.) de la variedad amazónica Tabë Canä, vía cultivo de yemas y por embriogénesis somática*". Memorias del Instiutode Biologia Experimental:Universidad Central de Venezuela, Vol. 6: 189.

Garcidueñas, J. 2013 "*Caracterización morfológica y molecular de piña Ananas comosus (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro*". Tesis de maestría, Universidad de Chapingo.

Garzón, J. 2016. "*Establecimiento y manejo de un cultivo de pila en la sede de ña sociedad de ingenieros agrónomos del llamo en Villavicencio*" Tesis de pregrado, Universidad de los Llanos.

González, Rodríguez y Escalona.1999. "Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización de plántulas de piña y caña de azúcar". En: Biotecnología vegeta, libro de reportes cortos. 5to coloquio Internacional de Biotecnología vegetal (IBP). Santa Clara, CB. P 174-175.

Hoyos, José, Críspulo Perea y Renaldo Velasco. 2008. "*Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormona en la micropropagación del plátano dominico Hartón (Musa AAB Simmonds)*". Facultad de Ciencias Agropecuarias, No. 2: 99-100.

Jiménez, R. 2005. "*Respuestas morfogénicas de la piña (Ananas comosus) en diferentes sistemas de cultivo un vitro"*. Tesis de pregrado, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Llanos, C. 2015. "*Micropropagación in vitro de piña, Ananas comosus (L) Merr Var. MD-2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal*". Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lucero, J. 2013. "*Establecimiento de tres medios de cultivo para la fase de enraizamiento in vitro de anturio (Anthurium andreanum)*". Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.

MAG. (Ministerio de Agricultura Y Ganadería). 2015. Boletín situacional Piña.

Millones, C. 2011. "*Desarrollo de técnicas de cultivo in vitro para la micropropagación de plantas de pila (Ananas comosus L. Merr.) ecotipo Santa Rosa provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas*". Universidad. Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. N° 1: 8.

Miranda, L. 1996. "*Poliaminas e micropropagacado abacaxixeiro (Ananas comosus L. MERR.) cv. Smooth cayenne*." Tesis de maestría, Instituto de Biociencias de Botucatu. UEP.

Mogollón, N., J Díaz y N Hernández. 2004. "*Multiplicación clonal y enraizamiento in vitro de Ananas comosus L. (Queen Australia*)". Revista de la Facultad de Agronomía, N° 4: 3, 15-16.

Molina, Jenny y Jorge González. 2013. "*Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (Ananas comosus L. merr.) Variedad Golden*". Tesis de pregrado, Universidad de El Salvador.

Montiel M y Villalba N. 2008. "*Tasa de multiplicación de dos variedades de Piña (Ananas comosus L. Merrill); Cayena Lisa y Golden Sweet, utilizando medios sólido y líquido en cultivo in vitro*". Investigación Agraria, N° 1: 15.

Murashige, T y Skoog F. 1962. "*A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*". Physiol. Plant. 15:477

Nelson, B, P Asare, y Junior, A. 2015. "*In vitro Growth and Multiplication of Pineapple under Different Duration of Sterilization and Different Concentrations of Benzylaminopurine and Sucrose*". Biotechnology, N° 1: 35.

Norberto, Carlos, Orlando Pretel, Wilson Reyna y Doris Mercado. 2007. "*Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacetico en la micropropagación in vitro de yemas de Dianthus caryophyllus L. clavel*". Revista Med. Vallejiana, N° 2: 136.

Olmos, Sofía, Gabriela Luciani y Ernestina Galdeano. 2010. "*Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y mejoramiento Vegetal*". In: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBISTEIN, C.; HOPP, E. y MROGINSKI, L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria): Colombia: 354.

Páez, M.G. 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de Ananas spp. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 42:128-132.

Pineda, Adriana, Teresa Vargas, Marcia Escala y Eva de García. 2012. "*Organogénesis in vitro en piña "española roja" y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso*". Bioagro, N° 3: 175-176.

Pineda, Adriana., Teresa Vargas y Eva de García. 2014. "*Regeneración de Ananas comosus (L.) merr, ecotipo tabë känä, mediante organogénesis indirecta*". Bioagro, N° 3: 136.

Quillay, N. 2011. "*Determinación de la capacidad embriogénica de babaco (Vasconcelleae x heilborni) a partir de óvulos y hojas multiplicadas in vitro vía embriogénesis somática*". Tesis de maestría, Universidad Técnica de Ambato.

Ramírez, Hernando, María Guevara y Roosevelt Escobar. 2012. "*Cultivo de tejidos vegetales: conceptos y prácticas*". Universidad Nacional de Colombia. Cali, Colombia.

Roca, W. y Mroginski, L. 1991. "*Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales, in Cultivo de tejidos en la agricultura*". Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia.

Rocha, Raquel y Santiago Treminio. 2008. *"Embriogénesis somática en reproducción in vitro del cultivo de piña (Ananas comosus L. Merr) cultivar MD-2".* Trabajo de Diplomado, Universidad Nacional Agraria, Managua (Nicaragua).

Rodríguez, Romelio, Rosa Becquer, Yaima Pino, Dariel López, Rene Rodríguez, Gustavo Gonzales, Roberto Izquierdo y Justo González. 2016. "*Producción de frutos de piña (Ananas comosus (l.) Merr.) MD-2 a partir de vitroplantas*". Cultivos Tropicales, Vol. 37:41

Rojas Salvador; Jairo García y Melva Alarcón. 2004. "*Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazonias*". Corpoica, Colombia.

Ruiz, B. 2000. *"Efectos del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de AnthuBriu mandreanum L*". Tesis de pregrado, El Zamorano, Honduras.

Saucedo, Silvia, Luis Ramos, Edgar Varas y Fred Carmigniani. 2008. "*Propagación clonal in vitro de piña (Ananas comosus L. Merr) variedades Champaka y Hawaina*". Ciencias y Tecnología, N°1: 49

Suárez, F. 2011. "*Micropropagación in vitro de piña (Ananas comosus L. Merril) hibrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales*". Tesis de pregrado, Escuela Politécnica del Ejército.

Suarez, M. 2017. *"Establecimiento y callogénesis in vitro de pitahaya amarilla Hylocereus megalanthus (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer y pitahaya roja Hylocereus undatus. (Haw.) Britton & Rose".* Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Manabí.

Taíz, L y Seiger, E. 2006. "*Fisiología Vegetal*". Volumen II. Colección ciencias experimentales. Ed, III. Publicado, Universitat Jaume. p 322.

Toro, M. 2004. "*Establecimiento de protocolos para regeneración in vitro de cerezo dulce (Prunusavium) var. Lambert*". Tesis de pregrado, Universidad Católica de Temuco, Chile.

Tórrez y Vásquez. 1981. Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo Editorial Puebla y Educación. Plaza, Ciudad de la Habana. P 362-371.

Wampash Galo, Guido Nieves y Freddy Barriga. 2011. "*Implementación, adecuación y valoración de un sistema de climatizado, para el área de incubación del laboratorio de micropropagación del campus Juan Lunardi cantón Paute, provincia del Azuay*". Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana.

Zometa, Juan y Carlos Vargas. 2015. "*Multiplicación in vitro de piña MD-2 (Ananas comosus (L.) Merril) haciendo uso de fertilizantes comerciales*". Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible, Vol 4: 80

12. ANEXOS

Anexo 1. ANOVA realizado para evaluar la longitud de los brotes en ambos materiales de los tratamientos durante la fase de multiplicación.

Pruebas de los sujetos inter-sujetos					
Variable dependiente: longitud de brotes					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	6,207[a]	9	,690	13,527	,000
Intersección	21,539	1	21,539	422,448	,000
Materiales	,001	1	,001	,013	,911
Dosis	5,683	4	1,421	27,864	,000
Materiales * dosis	,524	4	,131	2,570	,069
Error	1,020	20	,051		
Total	28,766	30			
Total corregida	7,227	29			
a. R cuadrado = ,859 (R cuadrado corregida = ,795)					

DHS de Tukey			
Variable dependiente: longitud de brotes			
Dosis	N	Subconjunto	
		1	2
Testigo	6	,0000	
2mg	6		,9217
3 mg	6		1,0200
4 mg	6		1,0650
3,5 mg	6		1,2300
Sig.		1,000	,166
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.			
Basadas en las medias observadas.			
El término de error es la media cuadrática (Error) = ,051.			

Anexo 2. ANOVA realizado para evaluar el diámetro de los brotes en ambos materiales de los tratamientos durante la fase de multiplicación.

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Diametro de brotes					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,083[a]	9	,120	36,692	,000
Intersección	3,982	1	3,982	1214,074	,000
materiales	,021	1	,021	6,342	,020
dosis	1,002	4	,251	76,401	,000
materiales * dosis	,060	4	,015	4,569	,009
Error	,066	20	,003		
Total	5,131	30			
Total corregida	1,149	29			
a. R cuadrado = ,943 (R cuadrado corregida = ,917)					

DHS de Tukey			
Variable dependiente: Diameto de brotes			
dosis	N	Subconjunto	
		1	2
testigo	6	,0000	
2mg	6		,4367
3 mg	6		,4433
4 mg	6		,4617
3,5 mg	6		,4800
Sig.		1,000	,688
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.			
Basadas en las medias observadas.			
El término de error es la media cuadrática(Error) = ,003.			

Anexo 3. ANOVA realizado para evaluar el número promedio de brotes/explante en ambos materiales durante la fase de multiplicación.

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Numeró promedio de brotes					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	584,000[a]	9	64,889	9,359	,000
Intersección	2253,333	1	2253,333	325,000	,000
Materiales	,033	1	,033	,005	,945
dosis	575,417	4	143,854	20,748	,000
Materiales * dosis	8,550	4	2,137	,308	,869
Error	138,667	20	6,933		
Total	2976,000	30			
Total corregida	722,667	29			
a. R cuadrado = ,808 (R cuadrado corregida = ,722)					

DHS de Tukey			
Variable dependiente: Numeró promedio de brotes			
dosis	N	Subconjunto	
		1	2
Testigo	6	,0000	
4 mg	6		9,8333
3,5 mg	6		10,5833
2mg	6		11,1667
3 mg	6		11,7500
Sig.		1,000	,717
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.			
Basadas en las medias observadas.			
El término de error es la media cuadrática(Error) = 6,933.			