



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TRABAJO DE TITULACIÓN
Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS EN LA
ACLIMATACIÓN *EX VITRO* DE PIÑA (*Ananas
comosus* L. Merr) VAR PEROLERA”**

**AUTOR:
JORGE ARTURO FERNÁNDEZ VÉLEZ**

**TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN
ING. LILIANA COROZO QUIÑÓNEZ, PhD**

SANTA ANA – MANABÍ – ECUADOR

2021

DEDICATORIA

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

A mis padres Jorge Fernández y Maricela Vélez que han dedicado gran parte de su vida y esfuerzo, para ser un pilar fundamental en mi vida.

A mis hermanos quienes han estado en los duros momentos a mi lado y me han dado su apoyo que es necesario.

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 mi enamorada Lady Bello por su apoyo incondicional durante mis últimos pasos Universitarios.

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

A la Ing. Fátima Macías, por compartir experiencia profesional y tratar de que hiciera un excelente trabajo.

Y por último no menos importante al Ing. Boris Vásquez amigo, confidente y por su valiosa contribución en el desarrollo de esta investigación.

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ, Ph.D Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación **“EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS EN LA ACLIMATACIÓN *EX VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VAR PEROLERA”**, es trabajo original realizado por el estudiante **FERNANDEZ VELEZ JORGE ARTURO**, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ, Ph.D.

DIRECTORA DE TRABAJO

CERTIFICACIÓN DEL REVISOR DE TRABAJO

Ing. EDISSON WILFRIDO CUENCA CUENCA, Ph.D Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS EN LA ACLIMATACIÓN *EX VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VAR PEROLERA**”, es trabajo original realizado por el estudiante **FERNANDEZ VELEZ JORGE ARTURO**, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. EDISSON CUENCA CUENCA, Ph.D.

REVISOR DE TRABAJO

CERTIFICACIÓN DE LA COMISIÓN DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN

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. Presidente del tribunal de sustentación

Ing. Miembro del tribunal de sustentación

Ing. Miembro del tribunal de sustentación

DECLARACIÓN SOBRE DERECHO DE AUTOR

La responsabilidad de las ideas, resultados conclusiones de la presente investigación, corresponden únicamente al autor.

FERNANDEZ VELEZ JORGE ARTURO

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. MARCO TEÓRICO	11
3.1. Origen y taxonomía.....	11
3.2. Clasificación taxonómica.....	11
3.3. Descripción morfológica.....	11
3.3.1. Hojas.	11
3.3.2. Raíz.	11
3.3.3. Tallo.	12
3.3.4. Inflorescencia.	12
3.3.5. Fruto.	12
3.4. Variedades e híbridos de piña	12
3.4.1. Variedad “perolera”	12
3.4.2. Variedad “Cayena lisa”	12
3.4.3. Clon Champaka F-153	12
3.4.4. Híbrido “MD-2”	13
3.5. Cultivo de tejidos	13
3.5.1. Establecimiento.....	13
3.5.2. Multiplicación	13
3.5.3. Enraizamiento	14
3.5.4. Aclimatación	14
3.5.5. Micro invernadero.....	15
3.6. Sustratos empleados en la etapa de aclimatación <i>ex vitro</i>	16
4. METODOLOGÍA.....	11
4.1. Diseño de la investigación	11
4.1.1. Ubicación del ensayo	11
4.1.2. Material vegetal.....	11

4.1.3. Preparación de las vitroplantas.....	11
4.1.4. Propiedades químicas de los sustratos	11
4.1.5. Preparación de los sustratos	12
4.1.6. Tratamientos.....	13
4.1.7. Llenado de bolsas	14
4.1.8. Trasplante.....	14
4.1.9. Riego	14
4.1.10. Fertilización.....	14
4.1.11. Labores culturales	14
4.2. Definición de variables	15
4.2.1. Porcentaje de sobrevivencia.....	15
4.2.2. Número de hojas	15
4.2.3. Materia seca total	15
4.2.4. Índice de productividad del agua	15
4.3. Análisis de datos	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1. Porcentaje de sobrevivencia.....	16
5.2. Índice de productividad del agua	19
5.3. Número de hojas	21
5.4. Materia seca total	22
6. CONCLUSIONES.....	24
7. RECOMENDACIONES	25
8. ANEXOS.....	26
9. BIBLIOGRAFÍAS.....	30

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	
Preparación de los sustratos.....	13
Gráfico 2.	
Porcentaje de sobrevivencia.....	18
Gráfico 3.	
Índice de productividad del agua.....	21
Gráfico 4.	
Número de hojas.....	23
Gráfico 5.	
Materia seca de raíz y parte aérea.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.

Características químicas del suelo agrícola y arena de río.....12

Tabla 2.

Características químicas de los materiales orgánicos.....13

Tabla 3.

Sustratos empleados en la evaluación de la aclimatación ex vitro de dos tipos de explantes de piña (Ananás comosus L. Merr) var perolera”.....14

Tabla 4.

Prueba de T de Student de sobrevivencia, IPA, peso seco y numero de hojas de vitroplantas piña (Anana comosus L. Merr variedad Perolera), sembradas en diferentes sustratos.....39

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.

ANOVA de la variable sobrevivencia en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....26

ANEXO 2.

Comparación de medias de Puyones e Hijos de fruto en la variable sobrevivencia de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....26

ANEXO 3.

ANOVA de la variable índice de absorción de agua en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....27

ANEXO 4.

Comparación de medias de puyones e hijos de fruto en la variable eficiencia de absorción de agua de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....27

ANEXO 5.

ANOVA de la variable número de hojas en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....28

ANEXO 6.

Comparación de medias de puyones e hijos de fruto en la variable número de hojas de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....28

ANEXO 7.

ANOVA de la variable materia seca de raíz y parte aérea en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....29

ANEXO 8.

Comparación de medias de puyones e hijos de fruto en la variable materia seca de raíz y parte aérea de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*).....29

RESUMEN

La piña es una fruta tropical de importancia económica mundial, debido a la fragancia y dulzor de su fruto, lo que le da la aceptación por parte de los consumidores en el mundo, pero la falta de material de siembra adecuada limita su productividad. Se ha desarrollado una variedad de protocolos de micropropagación a lo largo de los años para abordar esta deficiencia. Aun así, la etapa final de micropropagación, es decir, la aclimatación, sigue siendo un desafío ya que las plántulas de piña crecen muy lentamente, sumado pérdidas en la etapa de aclimatación que son críticas en el proceso de micropropagación. Por ello esta investigación tuvo como objetivo evaluar diferentes sustratos en la aclimatación *ex vitro* de vitroplantas de piña (*Ananas comusus* L. Merr) variedad perolera. Se evaluaron dos tipos de explantes y 10 tratamientos (sustratos simples y compuestos) en cuatro repeticiones cada uno. Los sustratos utilizados fueron: Tierra de cacao, abono orgánico, arena de río, suelo agrícola. Las variables (porcentaje de sobrevivencia, índice de productividad de agua, número de hojas, materia seca total), se analizaron en experimentos independientemente. Se utilizó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA). Para el análisis de los datos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) mediante el T de Fischer al 5%, y la comparación de medias para las variables con significancia estadística se realizó con el Test LSD al 5%. Se presentaron altas tasas de supervivencia en los explantes provenientes de puyones con relación a los provenientes de hijos de fruto. En la variable eficiencia de absorción de agua, la prueba de T de Student mostró significancia estadística en 30% de los sustratos, siendo el Suelo agrícola (100%), Suelo agrícola + Arena + Abono orgánico (proporción 1:2:1) y Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:1:2) los que contribuyeron a esa significancia. Los puyones reportaron los mayores promedios (1,25 g/ml) en comparación con los hijos de fruto (1,18 g/ml). Comportamiento que fue similar en el número de hojas (Puyones 17,64 hojas /planta, hijos de fruto 15,14 hojas/plantas) y en el peso seco de la planta.

Palabras claves: cultivo *ex vitro*, vitroplantas, puyones, hijos de fruto

ABSTRACT

Pineapple is a tropical fruit of global economic importance, due to the fragrance, sweetness of its fruit and consumer acceptance worldwide, but lack of suitable planting material limits its productivity. A variety of micropropagation protocols have been developed over the years to address this deficiency. Even so, the final stage of micropropagation, i.e. acclimatisation, remains a challenge as pineapple seedlings grow very slowly, coupled with losses in the acclimatisation stage which are critical in the micropropagation process. Therefore, the aim of this research was to evaluate different substrates in the *ex vitro* acclimatization of pineapple (*Ananas comusus L. Merr*) vitroplants (*Ananas comusus L. Merr*) perolera variety. Two types of explants and 10 treatments were evaluated in four replicates each. Variables were analysed in independent experiments. A Completely Randomised Block Design was used. For data analysis, an analysis of variance test (ANOVA) was performed using Fischer's t-test at 5%, and the comparison of means for variables with statistical significance was performed using the LSD test at 5%. There were high survival rates in the explants coming from puyones in relation to those coming from fruit sons. In the water absorption efficiency variable, the Student's t-test showed statistical significance in 30% of the substrates, with agricultural soil (100%), agricultural soil + sand + organic fertiliser (1:2:1 ratio) and agricultural soil + cocoa soil + sand (1:1:2 ratio) contributing to this significance. The puyones reported the highest averages (1.25 g/ml) compared to the fruit sons (1.18 g/ml). This behaviour was similar for the number of leaves (Puyones 17.64 leaves/plant, fruit sons 15.14 leaves/plant) and plant dry weight.

Key words: *ex vitro* culture, vitroplants, puyones, fruiting sons.

1. INTRODUCCIÓN

Ananas comosus L. Merr es una de las frutas tropicales más populares y deliciosas. Es apreciada por su pronunciado sabor y sus elementos nutritivos, se propaga vegetativamente a través de hijuelos, retoños o coronas (Pineda et al., 2012), sin embargo, estos materiales de propagación tienen limitaciones, entre ellas la transmisión de enfermedades, menos uniformidad e inadecuación para la producción comercial (d'Eeckenbrugge et al., 2003). La progresiva demanda de *Ananas*, ha provocado un incremento en la producción mundial, registrando 27 millones de toneladas en el año 2019, siendo los principales productores Costa Rica, Brasil, Filipinas, Tailandia e Indonesia; que representan cerca del 79 % de la producción mundial; correspondiendo 41,80% a Asia, 38,05% a América, 19,69% a África, y menos del 1% a Europa y Oceanía (FAO, 2019).

En Ecuador, la piña se produce durante todo el año, teniendo una temporada de mayor oferta en los meses de junio y julio, a causa del aprovechamiento de la época lluviosa (diciembre a abril) (Oviedo, 2015). Los Ríos, Guayas y Santo Domingo son las tres provincias donde se encuentra la mayor extensión de este cultivo y por ende representan la mayor parte de la producción nacional de cayena Lisa y Golden Sweet que son las principales variedades de piña cultivadas en el país (Fedexpor, 2016). Actualmente se exportan 100 contenedores semanales a los diferentes mercados de destino de la fruta, con una superficie de siembra de 2 500 Tn. Dada la demanda, la superficie se incrementó en el año 2019 a 4,805 hectáreas, con un total aproximado de 206,054 Tn (INEC, 2019)

La multiplicación de piña se realiza vegetativamente, siendo su crecimiento lento, lo que representa una baja rentabilidad al momento de realizar esta labor; por consiguiente, repercute en el abastecimiento de material vegetativo selecto para el establecimiento de cultivares, especialmente para los pequeños y medianos productores, los mismo que deben conformarse con los excedentes producidos por empresas privadas, que se encuentran en la capacidad de propagar el material que deseen. (Rodríguez et al., 2015)

Estas circunstancias han impulsado el uso de la micropropagación como instrumento biotecnológico, por sus grandes ventajas; como es: la obtención de material sano, con una alta producción y homogeneidad en el campo, en menor tiempo de forma masiva, con el empleo de material genético de calidad y de forma optimizada (Rodríguez et al., 2016).

Cabe indicar que, la obtención masiva de plantas a partir de la micropropagación incluye varias fases: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Siendo la última fase, la que comprende el paso de trasplantar las vitroplantas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, y corresponde a la etapa más crítica de la micropropagación porque, en este estadio, se pierden entre el 50 a 90 % de vitroplantas (Cedeño & Macías 2018).

Es por ello por lo que, el manejo de las vitroplantas en condiciones *ex vitro*, es determinante y fundamental para lograr la obtención de más de un 90% de supervivencia. Para ello la elección del material genético y el sustrato a considerar en etapa de aclimatación es importante para evitar pérdida de material vegetal. La elección del sustrato en el proceso de aclimatación es un mecanismo de gran importancia para la obtención de plántulas robustas y con el mayor porcentaje de supervivencia. Una vez seleccionado el sustrato de interés debe ser desinfectado con formaldehído al 3% por un plazo de 72 horas (Oviedo, 2015).

Las propiedades físicas son las más importantes en un sustrato, ya que, si son inadecuadas, difícilmente podrán mejorarse una vez establecido el cultivo, por lo que su previa selección es indispensable. Así mismo, dentro de las características físicas, la porosidad y la retención de humedad son las de mayor importancia en el crecimiento y

desarrollo de plantas en maceta. A diferencia de las propiedades químicas, que pueden ser modificadas a lo largo del cultivo, con el uso de fertilizantes (Calle, 2018).

Con estos antecedentes en esta investigación se pretende evaluar diferentes sustratos para lograr condiciones adecuadas y los cuidados que exigen las vitroplantas en la etapa de aclimatación.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar diferentes sustratos en la aclimatación *ex vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var Perolera.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los sustratos sobre los diferentes parámetros de crecimiento.
- Determinar las diferencias en la aclimatación con base al tipo de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var. perolera.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Origen y taxonomía

La piña, *Ananas comosus*; es nativa de América tropical y subtropical específicamente entre Uruguay y Brasil, pertenecen al reino vegetal, de la división de las monocotiledóneas, familia de las bromeliáceas. Actualmente se reconocen 56 géneros y aproximadamente 3346 especies, un representante de esta familia es la piña (Luther, 2010).

3.2. Clasificación taxonómica

Según Mahecha (2016) la clasificación taxonómica de la piña está dada de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Bromeliaceae

Subfamilia: Bromelioideae

Género: *Ananas*

Especie: *comosus*.

3.3. Descripción morfológica

3.3.1. Hojas. Son envolventes y están dispuestas en forma de espiral, se encuentran en un número de 70 a 80 por planta, los bordes de éstas pueden estar provistas de espinas o libres de éstas según la variedad (Sánchez, 2012).

3.3.2. Raíz. El sistema radicular de la planta de piña es muy superficial generalmente las raíces se localizan en los primeros 15 cm superiores al suelo, aunque pueden profundizarse hasta 60 cm o más. (Sandoval & Torres, 2011).

3.3.3. Tallo. Relativamente corto y grueso, tiene la forma de un mazo de consistencia carnosa y mide de unos 25 a 50 cm de altura y 2 a 8 cm en la parte superior (Garcidueñas, 2013).

3.3.4. Inflorescencia. Es una espiga que contiene de 100 a 200 flores, las flores inferiores preceden 2 semanas a las superiores, esto hace que la parte más baja sea más dulce (Sánchez, 2012).

3.3.5. Fruto. Es una infrutescencia que se desarrolla a partir de inflorescencia apical y está constituido por numerosos frutos sin semilla adheridos entre sí, para formar la piña como es conocida. El color de fruto puede variar desde el naranja al amarillo y para que sea sabroso debe madurar en la propia planta. (Baudoin et al., 2002)

3.4. Variedades e híbridos de piña

3.4.1. Variedad “perolera”

Es la variedad más común en Ecuador. Es una planta grande, con hojas cortas y medianas de color verde oscuro y bordes lisos. El fruto tiene forma cúbica, de color amarillo tanto la pulpa como la cáscara, es muy empleada en la agroindustria por el contenido de jugo (Fedexpor, 2016).

3.4.2. Variedad “Cayena lisa”

Es la variedad conocida como Hawaiana, el fruto es ovoide de 1,5 a 2,5 Kg. Presenta alto contenido de azúcar, aunque su acidez es alta según sus consumidores por lo que es conocida como la piña ácida. El tamaño de la planta varía entre 80 a 100 cm con 60 a 80 hojas sobre sus frutos (Garcidueñas, 2013).

3.4.3. Clon Champaka F-153

Es un clon puro de la variedad Cayena Lisa, es más resistente a enfermedades que las otras variedades, es una variedad con gran aceptación y alta demanda en los mercados de exportación. Se caracteriza por ser una planta más vigorosa, de color verde oscuro intenso poca productora de hijuelos, lo cual favorecen un mejor desarrollo de sus frutos (Sánchez, 2012).

3.4.4. Híbrido “MD-2”

Es un material de reciente introducción al país por su presentación, aroma, etc. Está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos. Sus hojas son de color verde generalmente sin espinas, fruta de hombros cuadrados sobre un pedúnculo corto y dos o más retoños, la pulpa es firme con una coloración amarillo intenso y muy aromática y tiene alto contenido de azúcares, sus flores son amarillas y el peso de la fruta alcanza hasta 3,2 Kg. (Sánchez, 2012).

3.5. Cultivo de tejidos

Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas (Castillo, 2004). Esta técnica consta de varias etapas:

3.5.1. Establecimiento

El explante a utilizar es acondicionado para promover la supervivencia dentro de un ambiente. Es una fase muy delicada desde el punto de vista de asepsia vegetal, los explantes deben ser limpiados y lavados 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).

3.5.2. 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 adicionada reguladores de crecimiento (Suarez, 2011).

3.5.3. Enraizamiento

En la fase de enraizamiento, se utilizan pequeñas plántulas individuales de un tamaño cercano a 2 cm, 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 (Olmos et al., 2010).

3.5.4. Aclimatación

Es el proceso en el cual un organismo individual se ajusta a un gradual cambio en su entorno (por ejemplo, un cambio en temperatura, humedad, fotoperiodo o pH), lo que le permite mantener el rendimiento en una amplia gama de condiciones ambientales. La aclimatación se produce en un período corto de tiempo (días a semanas) y dentro de toda la vida del organismo. La aclimatación de vitroplantas consiste en el paso de condiciones “in vitro”, a condiciones donde se desarrollarán para su cultivo, con el objetivo de que éstas superen las dificultades cuando son removidas del ambiente “in vitro”; de esta manera, se preparan para su trasplante definitivo. (Vilchez et al., 2007).

Es el cambio gradual de las condiciones ambientales; en el caso concreto, es la transferencia de las plántulas de un ambiente aséptico cerrado a un vivero o campo, con menor humedad relativa y mayor intensidad de luz. Pero antes de realizar el traslado, es necesario conocer algunos aspectos sobre la planta propagada *in vitro* (Ortiz, 2000).

El uso de cubiertas plásticas usadas como barrera o cubierta en el proceso de aclimatación permiten reducir el efecto de deshidratación de las vitroplantas por parte del viento, así como la reducción de la pérdida de agua en el sustrato; estas infraestructuras permiten la obtención de plantas de vid aclimatadas durante un lapso de tres semanas con cubierta y una sin ella, con una humedad del 68 – 75% (Thomas, 1998).

A esto se suman los daños mecánicos ocasionados a las raíces; la modificación en las condiciones nutricionales, dado que las plantas deben pasar de un estado heterótrofo a un estado autótrofo, con diferentes niveles de nutrientes y la modificación en las condiciones de asepsia, ya que en esta etapa las plantas pueden quedar expuestas al ataque de microorganismos saprofitos y eventualmente fitopatógenos (Gonzales., et al 2002).

Para la obtención de plantas perfectamente adaptadas al medio ambiente, la etapa de aclimatación se ha dividido en dos fases: la fase de endurecimiento y la fase de vivero; en donde las vitroplantas son sometidas a diferentes condiciones que ayudaran en su adaptación; la importancia de este proceso se verá reflejado al finalizar la etapa, donde se obtendrán plantas con un bajo porcentaje de mortalidad, libres de plagas y enfermedades, y al momento de ser trasplantadas al campo donde presentarán un excelente potencial de desarrollo y producción (Oviedo, 2015).

Según Pierik (1990), las plantas cultivadas *in vitro* tienen generalmente la cutícula escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa (90-100 %), cuando se transfiere la planta al suelo, esto produce una transpiración cuticular extra ya que la humedad del aire en estas condiciones es mayor en relación, a las condiciones *in vitro*.

La aclimatación puede realizarse permitiendo a las plantas *in vitro* habituarse de la forma gradual a una humedad. El mayor porcentaje de pérdidas de plántulas producidas *in vitro* ocurre en su fase de transferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente exterior, casi todo el esfuerzo invertido durante el cultivo de tejidos se perdería si las plantas que se regeneran de esos tejidos mueren cuando intentan desarrollarse en un ambiente que inicialmente puede resultar desfavorable (Orellana, 1997).

Relativamente más baja, como la que encontrara *ex vitro*, el desarrollo del mecanismo de cierre estomático es un componente muy importante de la aclimatación (Pierik, 1990). Cuando un gran número de plántulas es aclimatado, es necesario establecer un buen sistema de nebulización, pero cuando son pequeños grupos, pueden utilizarse los “mini invernaderos”, o el uso de bolsas plásticas; también se ha hecho uso de micorrizas para remover el enraizamiento, mientras que algunas especies son fáciles de trasplantar al suelo (Orellana, 1997).

3.5.5. Micro invernadero

El uso de micro invernaderos en la producción agrícola se ha incrementado en las últimas dos décadas. El objetivo principal de un micro invernadero es producir altos rendimientos fuera de las temporadas de cultivo, lo que es posible al mantener la

temperatura óptima en cada etapa del cultivo (Orozco, 2012). Esto, como resultado, tiene un impacto significativo en el periodo de cultivo, calidad y cantidad de los productos (Sandoval et al., 2011).

Es uno de los factores de gran importancia dentro del ámbito de la aclimatación de vitroplantas al medio externo; se han realizado un sinnúmero de investigaciones con el fin de determinar los elementos que influyen dentro de este proceso, tales como: material genético, humedad relativa, tipo de sustrato, luminosidad, temperatura, déficit de humedad en el sustrato; son unos de los limitantes encargados de determinar el porcentaje de supervivencia al finalizar la etapa de aclimatación (Villalobos et al., 2012).

3.6. Sustratos empleados en la etapa de aclimatación *ex vitro*

Se entiende por sustrato a todo material natural, de síntesis o residual, mineral, u orgánico, que depositado en un recipiente de forma pura o mezclado, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, brindándole soporte y evitando su volcamiento; así mismo tiene como función mantener una adecuada relación aire/ solución nutritiva, para brindar a la raíz y por ende a la planta el suficiente oxígeno, agua y nutrientes necesario para su desarrollo (Baracaldo et al., 2010).

También se lo puede definir como el medio en el cual las raíces pueden crecer y a la vez servir como soporte a la planta, puede estar compuesto por un solo material o la mezcla de varios. Un sustrato apropiado para el desarrollo de las plantas debe mostrar una alta capacidad de retención de agua, buen drenaje y una buena aireación (Avella et al., 2015); ya que la calidad de las plántulas obtenidas dependerá en gran parte del sustrato utilizado y de sus características físico – químicas (Ortiz, 2000).

Las propiedades físicas son las más importantes en un sustrato, ya que, si son inadecuadas, difícilmente podrán mejorarse una vez establecido el cultivo, por lo que su previa selección es indispensable (Baracaldo et al., 2010). así mismo, dentro de las características físicas, la porosidad y la retención de humedad son las de mayor importancia en el crecimiento y desarrollo de plantas en maceta.

Un sustrato ideal debería poseer una porosidad total del 85 %, una porosidad de aireación mínima de 20% del volumen total del medio, con el fin de que garantice un

adecuado intercambio de gases, de lo contrario se producirían deficiencias de oxígeno que limitan la respiración adecuada de las plantas, disminuyendo la absorción de agua y nutrientes, un 40 – 60% de capacidad de retención de humedad y una densidad aparente alrededor de 0,22 g/cm³ , evitando así el volcamiento de las plantas (Cerrato, 2013).

La elección del sustrato en el proceso de aclimatación es un mecanismo de gran importancia para la obtención de plántulas robustas y con el mayor porcentaje de supervivencia. Una vez seleccionado el sustrato de interés debe ser desinfectado con formaldehído al 3% por un plazo de 72 horas (Infoagro, 2010).

Orozco (2012), menciona que la siembra del material a aclimatar se realiza en una combinación de sustratos asépticos de origen natural o artificial que permitan el crecimiento de cada planta en condiciones ambientales controladas. Las raíces deben tener aireación, disponibilidad de agua y sostén mecánico para un mejor desarrollo.

El empleo de un medio compuesto por tierra negra y arena lavada en una proporción 1:1, con vitroplantas de 6 cm de altura aproximada; después de un lapso de tres meses permite el 100% de supervivencia, y plantas cuya altura varía entre 9 y 15 cm (Oviedo, 2015)

Otros estudios efectuados en vitroplantas de piña “Pérola”, reportan un 95% de supervivencia empleando sustratos como: Suelo 100%, compost 100% y (suelo 50% + compost 50%); alcanzando plantas aclimatadas con las siguientes características: altura (8,26 cm, 15,63 cm, 13,30 cm), número de hojas comprendidas entre (10,1, 17,16, 16,33), y raíces de (8,90 cm, 12,46 cm, 12,67 cm) en función de cada sustrato respectivamente (Moreira, 2006).

Al utilizar como sustrato suelo, cáscara de café y arena en relación 1:2:1, respectivamente, permite más del 90% de supervivencia en plantas de piña Smooth cayenne en un periodo de dos meses y medio, con plantas con un promedio de 12,0 hojas y 8,55 raíces de longitud 5,78 cm aproximadamente, así mismo al mezclar suelo, arena y cáscara de café bien descompuesta en una relación 2:1:1, proporciona del 90 a 95% de supervivencia, dependiendo del tipo de agente gelificador utilizado durante el proceso de la micro propagación (Ayenew et al., 2012).

Estudios realizados en plantas de piña Perola micropropagadas, donde se han evaluado diferentes factores, tales como el tamaño de las plantas a aclimatar y la composición del sustrato (compost orgánico y arena en proporción 5:1), se ha determinado que independientemente del sustrato empleado, se puede obtener un 93,8% de supervivencia, cuando los brotes aclimatados son de más de 7 cm de altura. (Baudoin, 2002). A diferencia con la variedad MD2 en la que, empleando sustratos como arena, permiten un 50% de supervivencia y 75% con el uso de arena y peatmoss (sustrato a base de musgo sphagnum) en una relación (1:1) (Al-Taha HA, 2013).

Así mismo, con empleo de sustratos como la turba se reporta el 100% de supervivencia en un lapso de 80 días para *B. Zebrina* (Luther, 2010) y en un periodo de ocho semanas para *Ananas comosus*, con vitroplantas de 8 – 12 cm de longitud, un promedio de 6 - 8 hojas y buen sistema radicular; además con el uso de plantmax y una mezcla (a base de Bagaso de caña + torta de filtro), en un lapso de 150 días, permiten obtener plantas de piña aclimatadas, con un promedio de 12,0 y 13,6 hojas respectivamente (Avella et al., 2015).

4. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de la investigación

4.1.1. Ubicación del ensayo

La investigación se realizó durante los meses de junio a diciembre del 2019, en la Facultad de Ingeniería Agronómica (FIAG) de la Universidad Técnica de Manabí, localizada geográficamente a 01°09' de latitud sur 80°21' de longitud oeste con una altitud de 60 msnm.

4.1.2. Material vegetal

El material utilizado, consistió en vitroplantas obtenidas de puyones (hijos axilares) e hijos del fruto (hijos apicales) de planta de piña (*Ananás comosus* (L) Merr.), variedad Parolera con un promedio de 5,77 cm de altura y 4,34 hojas/plántulas, con un sistema radicular desarrollado, obtenidas previamente del laboratorio de cultivo de tejidos de la FIAG.

4.1.3. Preparación de las vitroplantas

Las vitroplantas se retiraron de los envases, y las raíces fueron lavadas con abundante agua hasta eliminar completamente los residuos de agar. Posteriormente estas plántulas se llevaron a la casa malla para ser colocadas en bolsas plásticas de 1 Kg de volumen conteniendo cada uno los diferentes tratamientos (Tabla 1).

4.1.4. Propiedades químicas de los sustratos

El suelo agrícola que se empleó presenta características equilibradas de arena, limo y arcilla con contenido de materia orgánica (MO), pH, nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) (Tabla 2). En relación, a los materiales orgánicos, la tierra de cacao empleada se obtuvo mediante la descomposición de hojas, ramas y frutos de plantas de cacao con tierra agrícola, mientras que el abono orgánico es un fertilizante proveniente del compostaje de la gallinaza procedente de los galpones de producción de huevos que bajo un estricto y controlado proceso de secado y sanitización, es transformado en un producto de uso agrícola de alta calidad. Se utilizó un tratamiento testigo con arena de río con la finalidad de contrastar el efecto químico y físico de cada uno de los sustratos evaluados (Tabla 2).

Tabla 2. Características químicas del suelo agrícola y arena de río

Sustrato	pH	M.O.	NH ₄ [±]	P	K	Ca	Mg
		(%)	mg kg ⁻¹		meq 100g ⁻¹		
Suelo Agrícola	6,4	1,4	16	13	0,8	10	2.1
Arena de río	7,1	1,8	24	38	1,1	11,6	1,32

Fuente: Laboratorio de análisis químicos y físicos de muestras de suelo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2019).

Tabla 3. Características químicas de los materiales orgánicos

Sustrato	pH	M.O.	N	P	K	Ca	Mg
		%					
Tierra de cacao	6,8	53.5	1,8	0,8	1,7	1,3	0,4
Abono orgánico	7,3	41,5	1,6	0,4	1,1	1,1	0,5

Fuente: Laboratorio de análisis químicos y físicos de muestras de suelo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2019).

4.1.5. Preparación de los sustratos

Para la preparación del sustrato se utilizó: arena de río, tierra agrícola, abono orgánico y tierra de cacao y se realizó la limpieza y mezcla de los sustratos en proporciones volumétricas (Gráfico 1):

- En primer lugar, la arena de río fue tamizada para eliminar restos vegetales y gravas (piedras mayores a 5 mm).
- En el caso de la tierra se usaron dos tipos de cernidores: el primero permitía el paso de partículas con diámetros menores de 5 mm y el segundo partículas más finas menores a 5 mm. Posterior a ello se realizó la mezcla correspondiente con la ayuda de una pequeña pala.



Gráfico 1. Preparación de sustratos empleados para la siembra de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus*)

4.1.6. Tratamientos

Los tratamientos empleados en esta investigación incluyen los diferentes sustratos evaluados, los mismos que se detallan a continuación:

Tipo de explante	No	Combinación (tratamiento)	Proporción en volumen (%)				Proporción
			Suelo agrícola	Tierra de cacao	Arena	Abono orgánico	
Puyones (P1)	1	P1S1			100		
	2	P1S2	100				
	3	P1S3		100			
	4	P1S4				100	
	5	P1S5	50		25	25	2:1:1
	6	P1S6	25		50	25	1:2:1
	7	P1S7	25		25	50	1:1:2
	8	P1S8	50	25	25		2:1:1
	9	P1S9	25	50	25		1:2:1
	10	P1S10	25	25	50		1:1:2
Hijos de fruto (P2)	1	P2S1			100		
	2	P2S2	100				
	3	P2S3		100			
	4	P2S4				100	
	5	P2S5	50		25	25	2:1:1
	6	P2S6	25		50	25	1:2:1
	7	P2S7	25		25	50	1:1:2
	8	P2S8	50	25	25		2:1:1
	9	P2S9	25	50	25		1:2:1
	10	P2S10	25	25	50		1:1:2

Tabla 1. Sustratos empleados en la evaluación de la aclimatación *ex vitro* de dos tipos de explantes de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var perolera”.

4.1.7. Llenado de bolsas

Para establecer las plántulas en el sustrato se usaron bolsas plásticas color negro de 1 kg, las cuales se llenaron con la mezcla de sustrato hasta $\frac{3}{4}$ partes de su volumen.

4.1.8. Trasplante

Las plántulas fueron transferidas a los diferentes tratamientos. Cada plántula se sembró y se introdujo hasta la parte del nivel del cuello y luego se cubrió el orificio con el mismo sustrato y se realizó presión suavemente para que sostenga a la plántula.

4.1.9. Riego

Siete días después del trasplante (DDT), las vitroplantas se mantuvieron en condiciones de alta humedad en las hojas, para evitar problemas de deshidratación (se mantuvo la humedad en el follaje mediante riegos con atomizador cada hora con una duración de 30 segundos cada vez) y baja intensidad luminosa. A los 30 DDT se disminuyó la frecuencia de los riegos al follaje, regándolas a partir de ese momento una vez al día durante otros 20 días. Posteriormente las plantas ya no recibieron riego con atomizador, pero sí los riegos a nivel del sustrato espaciados cada dos días.

4.1.10. Fertilización

Las primeras cuatro semanas, se aplicó semanalmente una solución nutritiva MS/2 según la formulación de Murashige y Skoog (1962). Posteriormente, cada ocho días se fertilizó con macronutrientes y micronutrientes. Se aplicó un fertilizante rico en fósforo y se alternó con fertilizante completo (macro y micronutrientes). Se utilizaron fertilizantes foliares porque esto se asimilan mejor por las hojas debido a que su sistema radicular no a su etapa máxima de desarrollo. La fertilización se suspendió cuando las plántulas adquirieron las características deseadas, es decir, cuando desarrollaron hojas funcionales a los 60 días después del establecimiento de las plántulas al sustrato.

4.1.11. Labores culturales

Las labores culturales consistieron en el control de malezas, riego, fertilización, monitoreo de las variables y demás cuidados que exigió el cultivo.

4.2. Definición de variables

4.2.1. Porcentaje de sobrevivencia

A los 10 días después de la siembra en las bolsas de plástico, se contaron las plantas muertas en cada unidad experimental.

4.2.2. Número de hojas

Semanalmente se evaluaron por observación visual, la emisión de una nueva hoja durante el tiempo de aclimatación.

4.2.3. Materia seca total

Se seleccionaron la parte radicular y aérea luego se colocaron en estufa por 48h a 70°C, posteriormente se pesaron hasta llegar a su peso constante.

4.2.4. Índice de productividad del agua

El objetivo de esta variable fue determinar cuántos gramos de materia seca se producen por cada ml de agua aplicado. Se calculó mediante la fórmula propuesta por Broa et al. (2013) para calcular el índice de productividad del agua

$$IPA = \frac{R (g)}{CTAA (L)}$$

Dónde:

IPA= índice de productividad del agua

R= biomasa generada

CTAA = cantidad total de agua aplicada

4.3. Análisis de datos

En la investigación se evaluaron dos tipos de explantes y 10 tratamientos en cuatro repeticiones cada uno. Las variables se analizaron en experimentos independientemente. Se utilizó un Diseño de Bloques Completamente al Azar teniendo un total de 60 unidades experimentales. Las unidades experimentales estuvieron conformadas por 10 vitroplantas, haciendo un total de 600 vitroplantas por los 20 tratamientos en los dos tipos de explante (puyones e hijos de fruto). Para el análisis de los datos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) mediante el T de Fischer al 5%, y para la separación de medias entre los tratamientos se usó el Test LSD al 5%, en el software estadístico InfoStat profesional 2018.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Porcentaje de sobrevivencia

La aclimatación de plántulas micropropagadas de piña var. Perolera, resultó en términos generales en altas tasas de supervivencia (Tabla 4), el 100% de los tratamientos, mostraron más del 70% de supervivencia y se observó que los sustratos tuvieron un efecto significativo a los 10 DDT ($P < 0,001$). Las vitroplantas que provenían de puyones (P1) mostraron en promedio los índices de sobrevivencias más altos (93.88%) en relación con los provenientes de hijos de fruto (89,63%).

Los resultados de la prueba t de Student para dos muestras con un nivel de significancia del 95%, muestran en la variable sobrevivencia significancia estadística en el 70% de los tratamientos. Mientras que los tratamientos que únicamente contenían suelo agrícola y abono orgánico, así como la mezcla de suelo agrícola + tierra de cacao + arena (2:1:1) no mostraron significancia estadística (Tabla 4).

La sobrevivencia de las vitroplantas depende de la transferencia exitosa y el establecimiento en condiciones *ex vitro*, porque influyen de manera directa muchos factores como: la humedad relativa, el nivel de irradiación, déficit de agua debido a la pobre conductividad hidráulica de las raíces y la baja conexión raíz-tallo (Fila et al., 1998).

Los resultados del análisis de varianza realizado muestra que existe diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($P < 0,05$) en los puyones como en los hijos de fruto. (Anexo 1). En el Grafico 2, Anexo 2 se observan las medias de los tratamientos estudiados, así como el orden de mérito de estas, según análisis de Duncan, en el caso de los puyones, los tratamientos que incluyen Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena de río (1:2:1), Suelo agrícola + Arena de río + Abono orgánico (1:1:2/ 2:1:1/ 1:2:1), Abono orgánico (100%) presentaron valores superiores a 95% de supervivencia ubicándolos como los mejores tratamientos para la sobrevivencia de las vitroplantas de piña, los cuales no difieren entre sí, pero si del resto de tratamientos.

En relación, a los hijos de fruto (P2), la sobrevivencia en todos los tratamientos fue inferior a la reportada en puyones, sin embargo, el tratamiento que incluyó 100% de Abono orgánico reportó el porcentaje más alto (97,4%) seguido de los tratamientos que incluían Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena de río (proporciones 2:1:1 / 1:1:2), mostraron porcentajes de 93,70 y 93,16 % respectivamente.

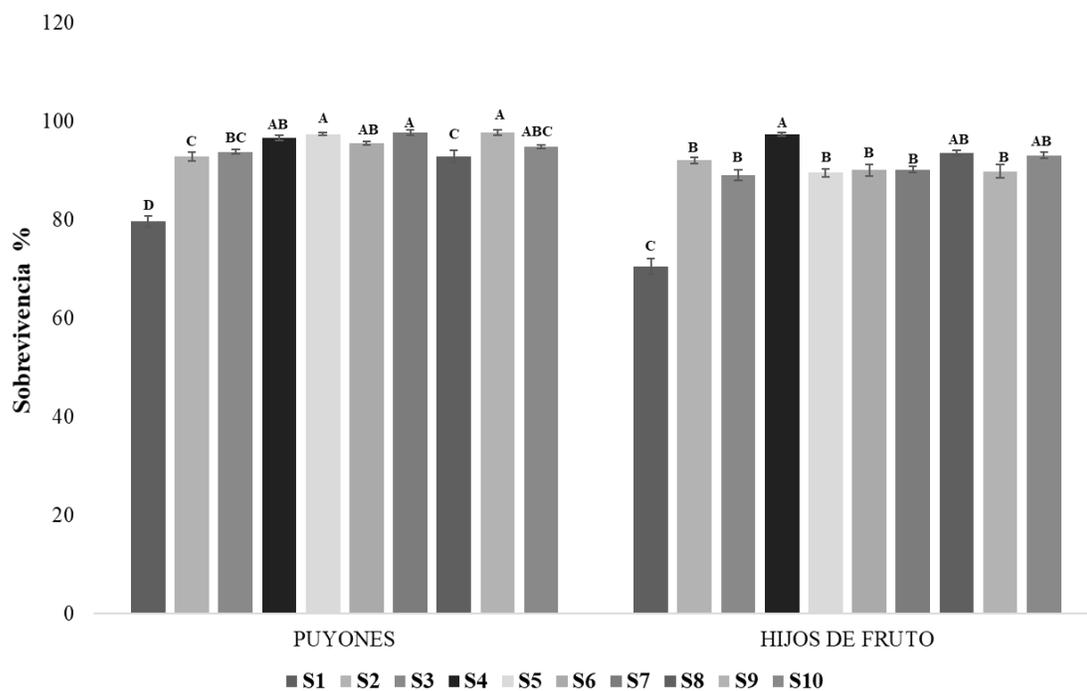


Gráfico 2. Valores promedios de los sustratos empleados en la aclimatación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var Perolera. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

La aclimatación presenta un desafío en el caso de la piña, ya que las plantas crecen a un ritmo muy lento durante este proceso, lo que aumenta el tiempo necesario para liberar las plantas sumado a las implicaciones de costos asociadas (Gonzalez-Rodríguez et al., 2013; Gonzales et al., 2011; Yanez et al., 2000). Por ello el empleo de sustratos para promover una aclimatación más rápida y eficiente resulta una estrategia muy beneficiosa, considerando que en varias investigaciones se ha incluido el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno (Mengesha et al., 2013) y modificaciones en el suministro de luz, riego y fertilización (Soto et al., 2020; Rodríguez-Escriba et al., 2015-2016).

Tabla 4. Prueba de T de Student de sobrevivencia, IPA, peso seco y numero de hojas de vitroplantas piña (*Anana comosus* L. Merr variedad Perolera), sembradas en diferentes sustratos.

Sustratos		S1	T	S2	T	S3	T	S4	T	S5	T	S6	T	S7	T	S8	T	S9	T	S10	T
Sobrevivencia (%)	Puyones	79,0	**	92,9	NS	93,9	**	96,6	NS	97,5	**	95,6	**	97,7	**	92,9	NS	97,8	**	94,9	*
	Hijos de fruto	70,0		92,1		89,1		97,4		89,6		90,1		90,2		93,7		89,9		93,2	
IPA (g/L)	Puyones	1,6	**	1,2	NS	1,0	NS	1,2	NS	1,4	**	1,1	NS	1,1	NS	1,3	NS	1,4	NS	1,2	*
	Hijos de fruto	1,2		1,1		1,0		1,1		1,1		1,2		1,0		1,2		1,4		1,4	
Peso seco (g/planta)	Puyones	4,3	**	2,3	**	1,1	NS	1,2	NS	1,9	**	1,4	NS	1,2	NS	2,6	NS	3,0	NS	1,4	*
	Hijos de fruto	1,6		0,9		1,0		0,9		1,2		1,5		1,1		1,8		3,5		3,3	
Número de hojas	Puyones	19,2	**	17,2	**	14,8	NS	17,2	NS	15,2	NS	16,8	NS	18,8	**	19,2	NS	17,2	*	20,8	NS
	Hijos de fruto	17,2		15,2		15,2		17,2		16,0		16,8		16,0		18,8		18,8		19,2	

***IPA: Índice de productividad del agua (g/L)**

Los altos índices de sobrevivencia en las vitroplantas de piña son muy favorables, puesto que, las pérdidas en la etapa de aclimatación son críticas en el proceso de micropropagación (Segovia et al., 2002).

Considerando que la principal causa de muerte de plantas micropropagadas al ser trasplantadas a condiciones *ex vitro*, es por desecación que sufren debido a la pérdida de agua foliar y la absorción reducida de la misma por parte del sistema radical durante la primera semana (Preece y Sutter, 1991), los sustratos combinados que incluían suelo agrícola (P1S5, P1S7 y P1S9) y abono orgánico (P1S4) permitieron obtener los porcentajes de supervivencia superiores al 96,00 %, por lo que se les puede atribuir que tuvieron una gran capacidad de retención de humedad, así como la disponibilidad de nutrimentos y agua disponible para la planta.

Resultados similares obtuvieron Moreira et al. (2006) utilizando 11 sustrato (suelo, estiércol de ganado, Plantmax y compost orgánico) mezclados e individualmente, con vitroplantas de piña variedad Perla de 6 cm de altura aproximada; las mismas que alcanzaron aproximadamente el 95% de supervivencia para todos los tratamientos.

5.2. Índice de productividad del agua

Los resultados de los análisis del índice de productividad del agua mostraron diferencia estadística en los sustratos empleados (Anexo 3). La prueba de T de Student muestra significancia estadística en 30% de los sustratos, siendo el Suelo agrícola (100%), Suelo agrícola + Arena + Abono orgánico (proporción 1:2:1) y Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:1:2) los que contribuyeron a esa significancia (Tabla 4). Los puyones reportaron los mayores promedios, produciendo 1,25 g de materia seca por cada litro de agua agregado en comparación con los hijos de fruto (1,18 g/L).

En puyones, los sustratos que mejor absorción de agua reportaron fueron: Suelo agrícola (100%) y Suelo agrícola + Arena + Abono orgánico (proporción 2:1:1) y Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:2:1) con 1.57, 1.36 y 1.36 g/L respectivamente. Mientras que los hijos de fruto los sustratos Suelo agrícola (100%) y Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 2:1:1, 1:2:1 y 1:1:2) con 1.41, 1.40 y 1.24 g/L respectivamente reportaron los promedios más altos. Sustratos que

estadísticamente no difieren entre ellos, pero si del resto de sustratos (Gráfico 3, Anexo 4). Resultados que podrían estar relacionados con la aseveración de Mengesha et al. (2013), quien sugiere que la mezcla que tiene más materia orgánica (abono orgánico y tierra de cacao) e igual proporción de suelo agrícola y arena de río mejora la aireación y reduce la retención de agua permitiendo el crecimiento de la raíz, lo que conduce a una mejor tasa de supervivencia, disponibilidad de nutrientes y agua y por ende mejor rendimiento de la planta.

Basantes (2010), manifiesta que la piña una vez que ha acumulado sus reservas acelera sus procesos fisiológicos para dar como resultado una mayor acumulación de masa verde, producto de la mayor absorción de agua y división celular que conduce a un mayor crecimiento por número y alargamiento celular, que lleva un mayor desarrollo vegetativo, que se refleja en una alta capacidad fotosintética que induce a un cambio metabólico vegetal a floral.

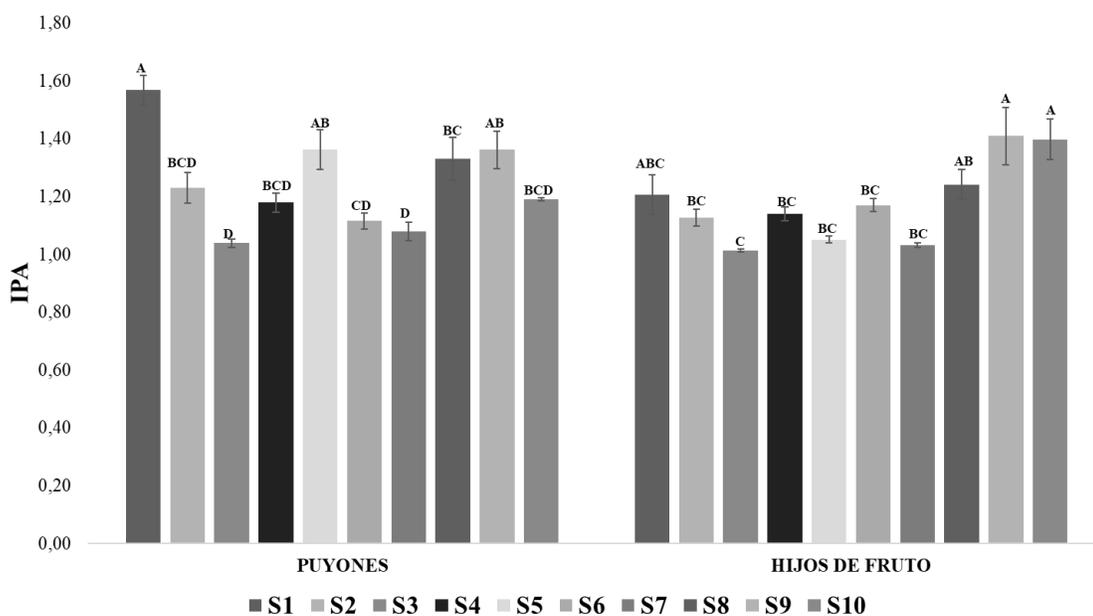


Gráfico 3. Valores promedio del índice de productividad de agua de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var Perolera sembradas en diferentes sustratos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

5.3. Número de hojas

En relación, al número de hojas por plántulas, se pudo apreciar diferencias significativas en los sustratos empleados durante las seis semanas de evaluación ($P < 0,001$). Los puyones mostraron los mayores promedios de números de hojas (17,64), en relación, a los hijos de fruto (15,14) (Grafico 4).

Los resultados de la prueba T de Student (Tabla 4) muestra significancia estadística en el 40% de los tratamientos. Los sustratos simples y combinados que contribuyeron a esa significancia fueron: Suelo agrícola (100%), Tierra de cacao (100%), suelo agrícola + arena + abono orgánico (1:1:2), suelo agrícola + tierra de cacao + arena (1:2:1). Mientras que el resto de los sustratos no mostraron significancia estadística, incluyendo simples y combinados.

El análisis de varianza según Duncan muestra diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($P < 0,05$) así como también en los puyones y en los hijos de fruto (Anexo 5). El grafico 4 Anexo 6. representa la media de los tratamientos estudiados. En el caso de los puyones, el sustrato simple que mejor respuesta mostró fue Suelo agrícola (100%), mientras que en los combinados: Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:1:2/ 2:1:1) y Suelo agrícola + Arena + Abono orgánico (proporción 1:1:2) reportaron 20,80 – 19,20 – 19,20 y 18,80 hojas/planta respectivamente, los cuales no difieren estadísticamente entre ellos, pero si del resto de sustratos, siendo estos tratamientos los que indujeron a la aparición del mayor número de hojas.

En cuanto a los hijos de frutos, con los sustratos combinados Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:1:2/ 1:2:1 y 2:1:1) se obtuvieron los mayores números de hojas/planta (19,20 – 18,80 y 18,80 respectivamente) mientras que los sustratos simples presentaron promedios inferiores (Gráfico 4).

Los resultados observados en esta variable podrían estar relacionados con las características físicas y químicas que se obtuvo en las diferentes mezclas (sustratos) gracias al aporte de nutrientes del suelo agrícola (N, K, P) y a la incorporación del abono orgánico y tierra de cacao que, en conjunto con las condiciones climáticas favorables,

permitieron el desarrollo fenológico de la piña. Mientras que la arena de río según el análisis químico realizado presenta menos nutrientes que el resto de los sustratos.

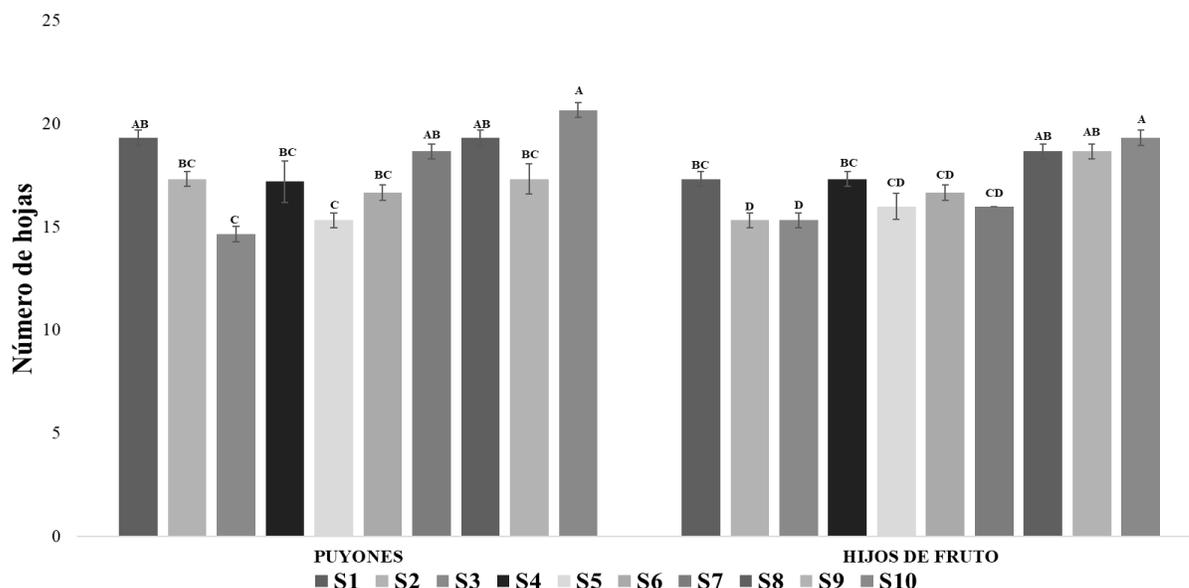


Gráfico 4. Valores promedio del número de hojas de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var Perolera sembradas en diferentes sustratos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Resultados que estarían en concordancia con los reportados por Atawia et al. (2016), quienes obtuvieron en promedio 6,55 hojas en 30 días de evaluación en una mezcla de turba más arena (2:1) en vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne), mientras que Mendonça et al. (2017), obtuvieron resultados superiores a los 270 días de aclimatación, con 19,2 y 20,6 hojas promedio para los cultivares 'Vitória' e 'Imperial', respectivamente, en un sustrato compuesto por tierra y estiércol de cabra (1:1 v/v). Por otra parte, Villalobo et al. (2012), indicaron que durante los 30 primeros días de evaluación de vitroplantas de piña variedad MD2 no hubo diferencias significativas en algunas variables entre ellas, número de hojas.

5.4. Materia seca total

La masa seca total tuvo efecto significativo en el 40% de los sustratos evaluados. El Suelo agrícola (100%) y la Tierra de cacao (100%) como sustratos simples y el Suelo agrícola + Arena + Abono orgánico (proporción 2:1:1 y Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:1:2) como sustratos combinados fueron los que contribuyeron a

esa significancia estadística, mientras que el resto de los sustratos no fueron estadísticamente significativos según la prueba de T de Student (Tabla 4). (Anexo 7).

El gráfico 5, Anexo 8 muestra mayores promedios en puyones de materia seca durante las semanas evaluadas (1,93 g), en comparación con los hijos de frutos (1,39 g). En puyones el sustrato compuesto únicamente por Suelo agrícola (100%) reportó el mayor promedio de materia seca total (4,34 g), a pesar de que los sustratos combinados Suelo agrícola + Arena + Abono orgánico (proporción 2:1:1) y Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 1:2:1 y 2:1:1) también mostraron valores altos con promedios de 2,96 g, 2,80 y 2,62 g. Mientras que los hijos de fruto, los sustratos que contenían Suelo agrícola + Tierra de cacao + Arena (proporción 2:1:1, 1:2:1) fueron los que mostraron los mayores promedios de peso seco (3,48 g y 3,30 g) difiriendo estadísticamente del resto de sustratos.

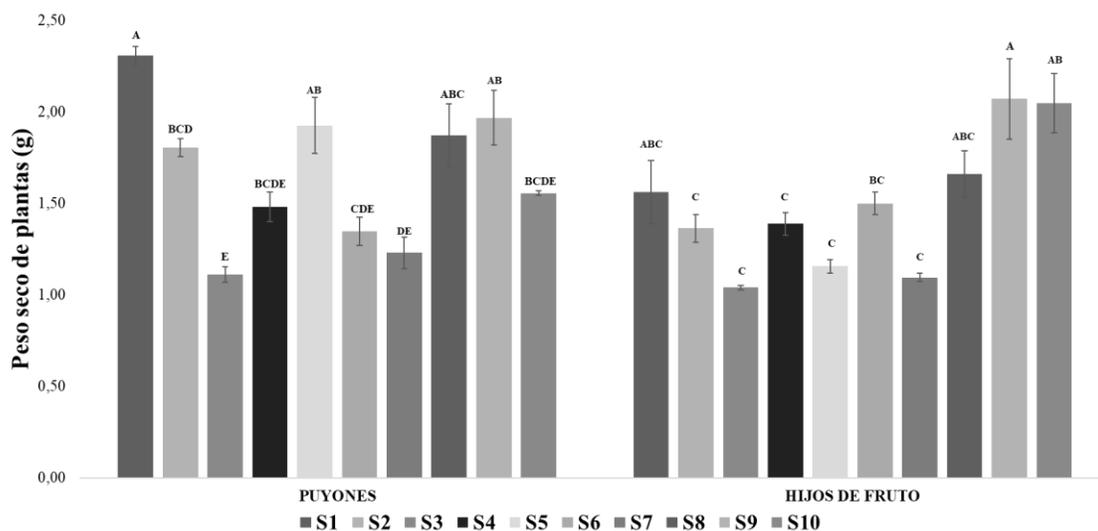


Gráfico 5. Valores promedios de la materia seca total de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) var Perolera sembradas en diferentes sustratos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Vargas et al. (1998) experimentaron con varios sustratos y reguladores de crecimiento en vitroplantas de piña *Ananas comosus* (L.) Merr, concluyendo que, para el peso seco, los promedios mayores se lograron cuando se aplicó ácido indol butírico a las vitroplantas sembradas en el sustrato arena. Mientras que Mengesha et al. (2013) reportaron diferencias significativas para las vitroplantas de piña sembradas en dos sustratos diferentes: una mezcla de suelo + cáscara de café + arena (proporción 1:2:1) y otro sustrato a base de turba (Jiffy-7). Aparentemente, el sustrato Jiffy-7 mostró valores medios más altos en casi todos los parámetros de crecimiento incluyendo al peso seco total.

6. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos propuestos y resultados obtenidos se concluye que:

- 1) Los sustratos cuyo contenido nutricional está basado en materia orgánica, mejoran los niveles de sobrevivencia y la estimulación en el desarrollo de las vitroplantas de piña durante la etapa de aclimatación.

- 2) Los explantes provenientes de puyones mostraron mejor respuesta en cuanto a la sobrevivencia, materia seca total, número de hojas e índice de productividad de agua en la aclimatación *ex vitro* en relación, a los provenientes de hijos de frutos.

7. RECOMENDACIONES

- 1) Evaluar el comportamiento de las vitroplantas de piña con los sustratos simples y compuestos con relación al desarrollo vegetativo y rendimiento.
- 2) Emplear sustratos a base de materia orgánica para asegurar la sobrevivencia de las vitroplantas en etapa de aclimatación *ex vitro*.
- 3) Emplear sustratos a base de materia orgánica con reguladores de crecimiento para mejorar el sistema radicular y obtener plantas con características morfológicas bien desarrolladas.

8. ANEXOS

Anexo 1. ANOVA de la variable sobrevivencia en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1303,74	13	100,29	42,75	<0,0001
Repetición	14,33	4	3,58	1,53	0,2150
SUSTRATO	1289,41	9	143,27	61,06	<0,0001
Error	84,46	36	2,35		
Total	1388,20	49			

Hijos de fruto

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2307,19	13	177,48	34,85	<0,0001
repetición	0,67	4	0,17	0,03	0,9978
SUSTRATO	2306,52	9	256,28	50,32	<0,0001
Error	183,36	36	5,09		
Total	2490,55	49			

Anexo 2. Comparación de medias de Puyones e Hijos de fruto en la variable sobrevivencia de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,26352

Error: 2,3462 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.			
9	97,82	5	0,69	A		
7	97,74	5	0,69	A		
5	97,46	5	0,69	A		
4	96,63	5	0,69	A	B	
6	95,58	5	0,69	A	B	C
10	94,92	5	0,69	A	B	C
3	93,88	5	0,69		B	C
2	92,94	5	0,69			C
8	92,86	5	0,69			C
1	79,69	5	0,69			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Hijos de fruto

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,80847

Error: 5,0933 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.			
4	97,44	5	1,01	A		
8	93,70	5	1,01	A	B	
10	93,16	5	1,01	A	B	
2	92,15	5	1,01		B	
7	90,24	5	1,01		B	
6	90,13	5	1,01		B	
9	89,87	5	1,01		B	
5	89,62	5	1,01		B	
3	89,08	5	1,01		B	
1	70,55	5	1,01			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 3. ANOVA de la variable eficiencia de absorción de agua en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,19	13	0,09	7,83	<0,0001
repeticion	0,04	4	0,01	0,76	0,5579
SUSTRATO	1,15	9	0,13	10,97	<0,0001
Error	0,42	36	0,01		
Total	1,61	49			

Hijos de fruto

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,98	13	0,08	7,21	<0,0001
repeticion	0,11	4	0,03	2,62	0,0509
SUSTRATO	0,87	9	0,10	9,25	<0,0001
Error	0,38	36	0,01		
Total	1,36	49			

Anexo 4. Comparación de medias de puyones e hijos de fruto en la variable eficiencia de absorción de agua de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23040

Error: 0,0117 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.				
1	1,57	5	0,05	A			
5	1,36	5	0,05	A	B		
9	1,36	5	0,05	A	B		
8	1,33	5	0,05		B	C	
2	1,23	5	0,05		B	C	D
10	1,19	5	0,05		B	C	D
4	1,18	5	0,05		B	C	D
6	1,11	5	0,05			C	D
7	1,08	5	0,05				D
3	1,04	5	0,05				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Hijos de fruto

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21799

Error: 0,0105 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.				
9	1,41	5	0,05	A			
10	1,40	5	0,05	A			
8	1,24	5	0,05	A	B		
1	1,21	5	0,05	A	B	C	
6	1,17	5	0,05		B	C	
4	1,14	5	0,05		B	C	
2	1,13	5	0,05		B	C	
5	1,05	5	0,05		B	C	
7	1,03	5	0,05		B	C	
3	1,01	5	0,05			C	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5. ANOVA de la variable número de hojas en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	159,64	13	12,28	8,52	<0,0001
repeticion	2,12	4	0,53	0,37	0,8300
SUSTRATO	157,52	9	17,50	12,14	<0,0001
Error	51,88	36	1,44		
Total	211,52	49			

Hijos de fruto

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	103,04	13	7,93	10,62	<0,0001
repeticion	3,52	4	0,88	1,18	0,3366
SUSTRATO	99,52	9	11,06	14,81	<0,0001
Error	26,88	36	0,75		
Total	129,92	49			

Anexo 6. Comparación de medias de puyones e hijos de fruto en la variable número de hojas de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,55774

Error: 1,4411 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.			
10	20,80	5	0,54	A		
8	19,20	5	0,54	A	B	
1	19,20	5	0,54	A	B	
7	18,80	5	0,54	A	B	
9	17,20	5	0,54		B	C
2	17,20	5	0,54		B	C
4	17,20	5	0,54		B	C
6	16,80	5	0,54		B	C
5	15,20	5	0,54			C
3	14,80	5	0,54			C

Hijos de fruto

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,84107

Error: 0,7467 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.				
10	19,20	5	0,39	A			
8	18,80	5	0,39	A	B		
9	18,80	5	0,39	A	B		
1	17,20	5	0,39		B	C	
4	17,20	5	0,39		B	C	
6	16,80	5	0,39			C	D
7	16,00	5	0,39			C	D
5	16,00	5	0,39			C	D
2	15,20	5	0,39				D
3	15,20	5	0,39				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7. ANOVA de la variable materia seca de raíz y parte aérea en puyones e hijos de fruto de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	77,18	13	5,94	8,34	<0,0001
Repetición	2,41	4	0,60	0,85	0,5056
SUSTRATO	74,78	9	8,31	11,67	<0,0001
Error	25,64	36	0,71		
Total	102,82	49			

Hijos de fruto

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,53	13	0,50	8,66	<0,0001
Repetición	0,64	4	0,16	2,75	0,0429
SUSTRATO	5,90	9	0,66	11,29	<0,0001
Error	2,09	36	0,06		
Total	8,62	49			

Anexo 8. Comparación de medias de puyones e hijos de fruto en la variable materia seca de raíz y parte aérea de las vitroplantas de Piña (*Anana comosus Merr*)

Puyones

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,79797

Error: 0,7121 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.					
1	4,34	5	0,38	A				
9	2,96	5	0,38	A	B			
5	2,80	5	0,38	A	B			
8	2,62	5	0,38	A	B	C		
2	2,27	5	0,38		B	C	D	
10	1,42	5	0,38		B	C	D	E
4	1,22	5	0,38		B	C	D	E
6	0,84	5	0,38			C	D	E
7	0,54	5	0,38				D	E
3	0,24	5	0,38					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Hijos de fruto

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,51321

Error: 0,0580 gl: 36

SUSTRATO	Medias	n	E.E.					
9	2,07	5	0,11	A				
10	2,05	5	0,11	A				
8	1,66	5	0,11	A	B			
1	1,56	5	0,11	A	B	C		
6	1,50	5	0,11		B	C	D	
4	1,39	5	0,11		B	C	D	
2	1,36	5	0,11		B	C	D	
5	1,16	5	0,11		B	C	D	
7	1,09	5	0,11			C	D	
3	1,04	5	0,11				D	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

9. BIBLIOGRAFÍAS

AL-TAHA, H. A. (2013). Effect of Different Treatments on Regeneration, Growth and Acclimatization of Ananas Plantlets Produced By Plant Tissue Culture 2-Application Effect of Culture Media and Urea Fertilizer on Growth and Acclimatization of In vitro Propegated Pineapple (Ananas Comosus. L. Meer. cv. Del Mont Plantlet. *Tikrit Journal for Agricultural Sciences*, 13(1).

Atawia, A., Abd El-Latif, F., El-Gioushy, S., Sherif, S. & Kotb, O. (2016). Studies on Micropropagation of Pineapple (Ananas comosusL.). *Middle East Journal of Agriculture Research*, 5(2), 224-232.

Avella, J., Valenzuela, A., González, M. Q., Gómez, A. M. & Gamboni, S. L. (2015). Aprovechamiento residuos biomasa de produccion de piña (Ananas comosus) en el Municipio de Aguazul Casanare. *Unión temporal Tecnologías de la Información y las Comunicaciones-TICSON*, 14, 62.

Aynew, B., Mengesha, A., Tadesse, T. & GebreMariam, E. (2012). Ensete ventricosum (Welw.) Cheesman: a cheap and alternative gelling agent for pineapple (Ananas comosus var. smooth cayenne) in vitro propagation. *Journal of microbiology, Biotechnology and food Sciences*, 9(5), 640-652.

Baracaldo A, Ibagué A, Flórez V, Chaves B. (2010) Crecimiento en clavel estándar cv. Nelson, en suelo y en sustratos. *Bragantia*. Colombia, 69(1):1–8.

Basantes, E. (2010). Producción y Fisiología de Cultivos con énfasis en la fertilidad del suelo. *Quito, Ecuador: Imprenta La Unión*.

Baudoin, W., Grafiadellis, M., Jiménez, R., La Malfa, G., Marínez-García, P., Nisen, A. & Garnaud, J. (2002). El cultivo protegido en clima mediterráneo: Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 90.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA*, 8.

Calle Arias, L. X. (2018). “*Comportamiento agronómico del cultivo de col morada (Brassica oleracea), sembrada en varios sustratos orgánicos en la zona de Babahoyo*” (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2018).

Cedeño, G. & Macias, J. (2018). Multiplicación in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merry) variedad perolera, a partir de meristemos apicales. *Faculta de Ingeniería Agronómica-UTM*.

Cerrato, I. (2013). *Estudio de mercado para la comercialización de piña MD2*. Secretaria de agricultura y ganaderia.

d’Eeckenbrugge, G. C., Leal, F. & Bartholomew, D. (2003). Morphology, anatomy and taxonomy. The pineapple: botany, production and uses, 13-32

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2019). FAOSTAT Database. Agriculture holdings cultivated for the production of crops. Statistics Division (ESS).

FEDEXPOR. (2016). Futas tropicales de mayor demanda exportable. *Revista de la Federación de Exportadores del Ecuador*, 13-67.

Fila, G., Ghashghaie, J., Hoarau, J. & Cornic, G. (1998). Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. *Physiologia Plantarum*, 102(3), 411-418

Garcidueñas Paz, J. A. (2013). *Caracterización morfológica y molecular de piña Ananas comosus (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro/por José Alfredo Garcidueñas Paz* (No. Tesis CD-330.).

Gonzalez-Rodriguez, R. M., Serrato, R., Molina, J., Aragon, C. E., Olalde, V., Pulido, L. E. & Lorenzo, J. C. (2013). Biochemical and physiological changes produced by *Azotobacter chroococcum* (INIFAT5 strain) on pineapple in vitro-plantlets during acclimatization. *Acta physiologiae plantarum*, 35(12), 3483-3487.

González, R., Laudat, T., Arzola, M., Méndez, R., Marrero, P., Pulido, L. E. & Lorenzo, J. C. (2011). Effect of *Azotobacter chroococcum* on in vitro pineapple plants’

growth during acclimatization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(3), 387-390.

González, C., Beovides, Y., Román, M. I., Xiqués, X., Florido, M., Lara, R. M. & Acosta, R. (2002). Detección de variabilidad genética en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante estudios isoenzimáticos y de proteínas totales. *Biología*, 16(1), 42-49.

INEC. (2019). *Superficie de siembra y producción del cultivo de la piña en el Ecuador*. Quito, Ecuador: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.

Infoagro (2010). Tipos de sustratos para el cultivo de piña. *Revista Ecuatoriana Infoagro*, Pág. 13-19

Luther, H. E. (2010). An alphabetical list of bromeliad binomials, ed. 12: 1–45. *The Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Garden*.

Mahecha Guzmán, R. E. (2016). *Aproximación de la cáscara de la piña (Ananás comosus) para el desarrollo de una bebida endulzada con stevia* (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química).

Mengesha, A., Ayenew, B. & Tadesse, T. (2013). Acclimatization of in vitro propagated pineapple (*Ananas comosus* (L.), var. smooth cayenne) plantlets to ex vitro condition in Ethiopia.

Mendonça, V., de Medeiros Mendonça, L., Pereira, E., Leite, G., da Costa, J. & de Medeiros, F. (2017). The growth and nutrition of pineapple (*Ananas comosus* L.) plantlets under different water retention regimes and manure. *African Journal of Agricultural Research*, 12(21), 1852-1860.

Moreira, M. A., Carvalho, J. G. D., Pasqual, M., Fráguas, C. B., & Silva, A. B. D. (2006). Efeito de sustratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(5), 875-879.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-97.

Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E., Levitus, G., Echenique, V. & Rubinstein, C. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Capítulo, 1*, 353-362.

Orellana, M. A. (1997). *Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (Swietenia macrophylla, King) Development of an in vitro culture system for mahogany (Swietenia macrophylla, King) nodal explants* (No. Thesis O66d). CATIE, Turrialba (Costa Rica).

Orozco, F. (2012). Establecimiento del protocolo de micropropagación de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Quito. *Obtenido de Escuela Politécnica del Ejército*.

Ortiz, R. (2000). Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. *La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*.

Oviedo López, R. G. (2015). *Efecto de diferentes sustratos en la etapa de aclimatación ex vitro de piña ananas comosus l merr var md2* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).

Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores

Pineda, A., Vargas, T., Escala, M. & de García, E. (2012). Organogénesis in vitro en piña “española roja” y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro*, 24(3), 175-186.

Preece, J. & Sutter, E. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In *Micropropagation* (pp. 71-93). Springer, Dordrecht.

Rodríguez, R., Becquer, R., Pino, Y., López, D., Rodríguez, R. C., Lorente, G. Y. & González, J. L. (2016). Producción de frutos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) MD-2 a partir de vitroplantas. *Cultivos Tropicales*, 37, 40-48.

Rodríguez-Escriba, R. C., Rodríguez-Cartaya, I. D., Lorente, G. Y., López, D., Izquierdo, R. E., Borroto, L. S. & González-Olmedo, J. L. (2016). Efecto del déficit hídrico sobre cambios morfo-fisiológicos y bioquímicos en plantas micropropagadas de piña MD-2 en la etapa final de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, 37, 64-73.

Rodríguez-Escriba, R. C., Rodríguez, R., López, D., Lorente, G. Y., Pino, Y., Aragón, C. E. & González-Olmedo, J. L. (2015). High light intensity increases the CAM expression in “MD-2” micro-propagated pineapple plants at the end of the acclimatization stage. *American Journal of Plant Sciences*, 6(19), 3109.

Sandoval, I. A. & Torres E. E., (2011). Guía Técnica del Cultivo de la Piña. *Programa MAGCENTA-FRUTALES. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal: Enrique Álvarez Córdova (El Salvador)*, pp 4, 6, 12-14.

Sánchez, A. (2012). Manual para la Producción de una piña de calidad.

Segovia, R., Bedoya, A., Triviño, W., Ceballos, H., Gálvez, G. & Ospina, B. (2002). Metodología para el endurecimiento masivo de ‘vitroplantas’ de yuca. B. Ospina y H. Ceballos, 572-583.

Soto, G., Lorente, G., Mendoza, J., Báez, E. D., Lorenzo, C. M., Rodríguez, R. & Baez, E. L. (2020). Growth of pineapple plantlets during acclimatisation can be monitored through automated image analysis of the canopy. *The EuroBiotech Journal*, 4(4), 223-229.

Suárez, F. (2011). Micropropagación in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. *Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador*.

Thomas, P. (1998). Humid incubation period and plantlet age influence acclimatization and establishment of micropropagated grapes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(1), 52-56

Vargas, H., Martínez, O. & Corchuelo, G. (1998). Reguladores de crecimiento y sustratos naturales para la aclimatación de vitro-plántulas de piña *Ananas comosus* (L.) Merr. *Agronomía Colombiana*, 15(2 y 3), 163-171.

Vilchez, J., Ramírez, E., Villasmil, M., Albany, N., de Sierralta, S. L. & Molina, M. (2007). Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* L.) Burm. f): efectos del sustrato. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 24, 57-61.

Villalobo, A., González, J., Santos, R. & Rodríguez, R. (2012). Morphophysiological changes in pineapple plantlets [*Ananas comosus* (L.) merr.] during acclimatization. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(6), 624-630.

Yanes, P. E., González, O. J., & Sánchez, R. R. (2000). A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Pineapple News*, 7, 24.