

**UNIVERSIDAD MAZONICA DE PANDO**  
**ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS I NATURALES**  
**CARRERA DE BILOGIA**



**EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN PARA EL  
ESTABLECIMIENTO IN VITRO EN DOS VARIEDADES DE PIÑA  
*Ananas comosus L.* MD2 Y PUCALLPA A PARTIR DE MERISTEMOS  
APICALES**

*Tesis de Grado para Optar al Título de Licenciado en  
Biológicas*

**EJECUTOR:** Univ. Isrrael Muñoz Guzman

**TUTOR:** Ing. Gabriela Ancasi

**ASESOR:** Ing. Griseldo Carpio

**COBIJA - PANDO - BOLIVIA**

**2017**

**I**

**UNIVERSIDAD MAZONICA DE PANDO**  
**ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS I NATURALES**  
**CARRERA DE BILOGIA**

**TESIS DE GRADO**

La tesis de grado Titulada: “EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE  
DESINFECCIÓN PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* EN DOS VARIEDADES  
DE PIÑA *Ananas comosus L.* MD2 Y PUCALLPA A PARTIR DE MERISTEMOS  
APICALES

(HOJA DE APROVASION)

**AUTOR:** ISRRAEL MUÑOZ GUZMAN

**INICIO:** Octubre de 2015

**CONCLUSION:** Noviembre de 2017

TRIBUNALES

**APROBACION**

**FIRMA**

Ing. David Gómez Roca

---

Ing. Elizabeth Aguada Taborga

---

Lic. Julio Ricardo Montero Tonconi

---

**TUTOR**

Ing. Gabriela Ancasi Espejo

---

**ASESOR**

Ing. Griseldo Carpio

---

*A Dios  
por su gran fidelidad y  
su gran amor incondicional  
y a mi hija que fue el motor  
para seguir adelante*

## **Agradecimiento:**

### **Familia**

A mis padres Eduardo Muñoz Zurita y Maxima Guzman Heredia por brindarme su apoyo y respaldo en todo momento, a mis abuelos que me ayudaron a que siga adelante a mi mujer por el apoyo incondicional y a mi linda hija Yamilith Abril Muñoz Rojas que fue mi impulso y mi motor para que esto se vuelva realidad.

### **Financiadores e instituciones**

A la Universidad Amazónica de Pando (UAP) por el apoyo importante en el estudio y superación de todos nosotros los estudiantes, dándome la oportunidad de realizar este proyecto, mediante el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales brindando financiamiento y apoyo logístico para este proyecto.

### **Investigadores**

A mis asesores, Ing. Gabriela Ancasi Espejo. Por su apoyo y paciencia para la revisión de mi proyecto las cuales fueron importantes para el desarrollo y culminación de la misma y al Ing. Griceldo Carpio por su valioso aporte y criterio que me impulsaron a desarrollar y culminar la tesis.

A mis tribunales por dar revisión a mi proyecto de tesis, cuyo aporte fue importante para perfeccionar el mismo.

### **Docentes**

A todos mis docentes de la Universidad Amazónica de Pando, los cuales aportaron en su área con responsabilidad y esfuerzo a mi formación profesional durante todos los años de carrera.

### **Amigos**

Un agradecimiento general a todos mis compañeros de carrera que de una y otra manera fueron de motivación y apoyo.

## RESUMEN

La presente investigación fue realizada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando. El objetivo de estudio es que fueron evaluados los protocolos de desinfección para el establecimiento in vitro en dos variedades de piña (*Ananas comosus L.*) MD2 y Pucallpa a partir de meristemos apicales. Fueron seleccionadas y caracterizadas 20 plantas madres del CINTA (Centro Investigación de Nuevas Tecnologías de la Amazonia). Se empleó un diseño completamente aleatorio (DCA) con tres diferentes protocolos de desinfección. D1) Se desinfecto con una solución jabonosa durante 10 min, se aplicó NaClO al 5% por 5 min posteriormente se aplicado NaClO al 2% por 15 min y colocó en una NaClO al 1% por 15 min, D2) Se desinfecto con fungicida de 1.2 gr de Manzate, se dejó reposar por 1 hora. Luego se desinfectó con etanol al 70% por 20 segundos, luego NaClO al 5% por 10 min, posterior mente en NaClO al 2% por 10 min, D3) Se desinfecto con fungicida 6 g de Manzate para 100 L, por 6 hora sumergidas, luego se colocó con 6 g detergente para 1 L por 15 min por, se colocó en jabón líquido por 10 min y antioxidante (cisteína 30mg/l.). después a una solución de etanol al 70% por 20 segundos, luego se colocó con NaClO al 2% por 15 min y por ultimo NaClO al 0.5% por 10 min luego se insertaron los ex plantes en los frascos con medio de cultivo. Las variables evaluadas fueron: La sobrevivencia de los ex plantes, donde se observó la contaminación, yemas activas prendimiento del ex plante mortalidad y desarrollo del ex plante. Los resultados mostraron que, en la primera fase de establecimiento, la mejor respuesta para la sobrevivencia de los ex plantes (*Ananas comosus L.*), fue la desinfección dos y tres, que son aptos para ambas variedades (Pucallpa y MD2), para la sobrevivencia del ex plante bajo condiciones in vitro en laboratorio. Donde 33 ex plantes de piña tuvieron mayor sobrevivencia en la fase de desinfección. Los ex plantes que no se contaminaron tuvieron mayor desarrollo y menor grado de mortalidad.

## ABSTRACT

The present research was carried out in the laboratory of Plant Biotechnology of the Biological and Natural Sciences Area of the Amazonian University of Pando. The objective of the study was to evaluate the disinfection protocols for in vitro establishment in two pineapple varieties (*Ananas comosus L.*) MD2 and Pucallpa from apical meristems. 20 mother plants of the CINTA (Research Center of New Technologies of the Amazon) were selected and characterized. A completely randomized design (DCA) was used with three different disinfection protocols. D1) was disinfected with a soap solution for 10 min, was applied NaClO 5% for 5 subsequently min was applied NaClO 2% for 15 min and placed in a NaClO 1% for 15 min, D2) is disinfected with fungicide 1.2 g of Manzate, allowed to stand for 1 hour. Then disinfected with 70% ethanol for 20 seconds, then NaClO 5% for 10 min, back mind NaClO 2% for 10 min, D3) was disinfected with fungicide 6 g of Manzate to 100 L, for 6 hours submerged, then placed with 6 g detergent for 1 L for 15 min per, was placed in liquid soap for 10 min and antioxidant (cysteine 30 mg / l). then a solution of 70% ethanol for 20 seconds, then placed in 2% NaClO for 15 min and finally 0.5% NaClO for 10 min then the former ex plant inserted into the flasks with culture medium. The variables evaluated were: The survival of the explants, where the contamination was observed, active yolks pinning the ex plant mortality and development of the ex plant. The results showed that in the first phase of establishment, the best answer for the survival of the former ex plant (*Ananas comosus L.*) was disinfection two and three, which are suitable for both varieties (Pucallpa and MD2), for the survival of ex plant under in vitro laboratory conditions. Where 33 pineapple exporters had greater survival in the disinfection phase. Extracts that were not contaminated had a higher development and a lower mortality rate.

## INDICE GENERAL

I.	Caratula	
II.	Hoja de aprobación	
III.	Dedicatoria	
IV.	Agradecimiento	
V.	Resumen español	
VI.	Resumen ingles	
1.	INTRODOCCION.....	1
2.	OBJETIVO GENERAL.....	4
2.1.	Objetivo específico.....	4
2.2.	Hipótesis.....	4
3.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1.	Importancia del Cultivo.....	5
3.2.	Enfermedades y plagas de la piña.....	5
3.2.1.	Enfermedades.....	6
3.2.2.	Plagas.....	6
3.3.	Principales variedades comerciales.....	7
3.3.1.	Azucarón o Pucallpa.....	7
3.3.2.	Cayena Lisa.....	8
3.3.3.	Champaka F-153.....	8
3.3.4.	MD2.....	9
3.4.	Exportación de las variedades de estudio.....	9
3.4.1.	Variedad Híbrido MD2.....	9
3.4.2.	Variedad Pucallpa.....	10
3.5.	Demanda de plantines en Bolivia.....	10
3.6.	Propagación vegetativa.....	11
3.6.1.	Generalidades.....	11
3.6.2.	Propagación In Vitro.....	11
3.6.3.	Ex plante.....	11

3.6.4. Micropropagación.....	12
3.6.5. Etapas de la micro propagación in vitro.....	12
3.6.6. Oxidación.....	14
3.7. Contaminación in vitro.....	14
3.7.1. Tipos de contaminación en el medio.....	15
3.7.2. Problemas de contaminación <i>in vitro</i> en el medio.....	16
3.7.3. Desinfección.....	17
3.8. Importancia del hipoclorito de sodio, jabón comercial y etanol.....	17
3.8.1. Hipoclorito de sodio.....	17
3.8.2. El jabón comercial.....	18
3.8.3. Alcohol o etanol.....	18
3.8.4. Medios de cultivo.....	18
3.9. Mortalidad in vitro.....	19
3.10. Desarrollo del ex plante in vitro inicial.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. Ubicación política.....	20
4.1.1. Ubicación geográfica.....	20
4.2. Materiales.....	21
4.3. Reactivos que lleva el Medio de cultivo.....	22
4.4. Material vegetal a usar.....	23
4.5. Metodología.....	24
4.5.1. Identificación de planta madre y recolección de hijuelos .....	24
4.5.2. Desinfección de los hijuelos axilares de piña.....	25
4.5.3. Protocolos de desinfección.....	25
4.5.4. Preparación del medio de cultivo.....	28
4.5.5. Introducción de los ex plantas.....	29
4.5.6. Parámetro y registro de evaluación de los explantes.....	30
4.6. Diseño estadístico.....	33
4.6.1. Modelo estadístico.....	34
4.6.2. Variables de respuesta.....	34

4.6.3. Análisis y evaluación de datos.....	35
5. RESULTADOS .....	35
5.1. Contaminación de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.....	35
5.2. Yemas activas de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.....	37
5.3. Mortalidad de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.....	38
5.4. Prendimiento de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.....	40
5.5. Desarrollo de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.....	41
5.6. Coeficientes de relación de las variables de estudio.....	42
5.7. Tratamiento de las variables de estudio.....	43
6. DISCUSION.....	44
6.1. Contaminación.....	44
6.2. Mortalidad.....	45
6.3. Prendimiento.....	45
6.4. Desarrollo.....	46
6.5. Coeficientes de relación de las variedades.....	46
7. CONCLUSIÓN.....	47
8. RECOMENDACIONES.....	48
9. BIBLIOGRAFIA.....	49

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Los tres tipos de protocolos de desinfección para las dos variedades de piña (Ananas comosus L).....	26
<b>Tabla 2.</b> Preparación de solución stock medio MS Murashige y Skoog (MS).....	28
<b>Tabla 3.</b> Contaminación de los 6 tratamientos.....	31
<b>Tabla 4.</b> Promedio de yemas activas de los 6 tratamientos.....	31

<b>Tabla 5.</b> Mortalidad de los 6 tratamientos.....	32
<b>Tabla 6.</b> Prendimiento de los ex plantes de los 6 tratamientos.....	32
<b>Tabla 7.</b> desarrollo de los explantes en los 6 tratamientos.....	33
<b>Tabla 8.</b> variedad, tratamiento y repeticiones.....	33
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza de contaminación para el establecimiento in vitro de piña.....	35
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza de yemas activas para el establecimiento in vitro de piña.....	37
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza de mortalidad para el establecimiento in vitro de piña.....	38
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza de prendimiento para el establecimiento in vitro de piña.....	40
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza de desarrollo para el establecimiento in vitro de piña.....	41
<b>Tabla 14.</b> Coeficientes de correlación.....	42
<b>Tabla 15.</b> Grados de variables, contaminación, prendimiento, desinfección y mortalidad, numero de tratamientos y tipos de desinfecciones.....	43

#### **INDICE DE FIGURA**

<b>Figura 1.</b> Variedades “Pucallpa”.....	7
<b>Figura 2.</b> Variedad “Cayena lisa”.....	8
<b>Figura 3.</b> Variedad “Champaka F-153”.....	8
<b>Figura 4.</b> Variedades “MD2”.....	9
<b>Figura 5.</b> Ubicación geográfica del tema de investigación.....	20

<b>Figura 6.</b> Identificación de planta madre a) Variedad Pucallpa; b) Variedad MD2.....	24
<b>Figura 7.</b> Recolección de material vegetal hijuelos axilares de piña; a) Recolección de brotes o hijos de MD2; b) Recolección de brotes o hijos Pucallpa.....	24
<b>Figura 8.</b> Reducción y desinfección de hijuelos; a) Reducción de los hijuelos y retirando las hojas; b) lavado de los hijuelos de piña.....	25
<b>Figura 9.</b> a) Preparación de las soluciones madres; b) preparación de MS Murashige y Skoog (MS); c) tubos de ensayo con medio de cultivo.....	29
<b>Figura 10.</b> a) introduciendo de los ex plantes; b) Ex plante de una semana; c) ex plantes de tres semanas.....	30
<b>Figura 11.</b> Contaminación para el establecimiento in vitro de piña.....	36
<b>Figura 12.</b> Mortalidad para el establecimiento in vitro de piña.....	39
<b>Figura 13.</b> Prendimiento para el establecimiento in vitro de piña.....	40
<b>Figura 14.</b> desarrollo para el establecimiento in vitro de piña.....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

La especie *Ananas comosus* L. más conocida como la piña, pertenece a la familia de las Bromeliáceas, es una planta herbácea perenne cultivada por su fruto fragante y dulce, considerado como un cultivo de gran importancia a nivel mundial por sus propiedades culinarias y medicinales. Se propaga vegetativamente por brotes laterales presentando un porcentaje de multiplicación muy lento. (FAO, 2008).

La piña es la tercera fruta tropical más importante en la producción mundial después del plátano y cítricos (FAO, 2008). El 70% de la piña producida en el mundo es consumida como fruta fresca en el país de origen, aunque también se consume procesada en mermeladas, yogures y enlatados.

La piña es una de las frutas más apreciadas, por sus cualidades de sabor, textura y aroma sin dejar de mencionar sus valiosas propiedades nutritivas y curativas. Aparte de su dulzura, la piña es abundante en potasio, yodo y vitaminas A, B y C. Contiene un 85% de agua, hidratos de carbono y fibra, y provee grandes beneficios nutricionales y de salud. Es excelente para las dietas adelgazantes. Impide la agregación plaquetaria, con lo cual evita que la sangre se coagule y, de esa manera, previene las embolias y los infartos del corazón (CANAPEP, 2017).

El comercio de la piña está orientado, a los principales países desarrollados tales como Estados Unidos, Japón y la Comunidad Económica Europea; en las últimas décadas la, producción mundial de piña ha crecido a una tasa media anual de 1.9% pese a la ocurrencia de fenómenos económicos y climáticos adversos (COVECA, 2002).

La producción mundial de piña en el 2008, de acuerdo con las cifras publicadas por FAO el 25 de mayo del 2010 sumo 19.166.560 toneladas métricas con un área total de 848.140 hectáreas. Los rendimientos globales son de 22,6 tm/ha, siendo Brasil el mayor productor con cerca de dos millones y medio de toneladas. Indonesia por su parte, es el país que muestra mayor rendimiento en 61,2 tm/ha. La producción de piña

en Costa Rica, según estos datos alcanzo 1,624.568tm en 33.134 ha cosechas, lo que se maneja a nivel de campo en este país, son muy superiores, siendo para las fincas de producción exportable, de hasta 125 tm/ha. (FAO, 2008).

En Bolivia la producción de piña se encuentra concentrada en la región tropical del departamento de Cochabamba, santa cruz, Beni, y con menor escala Chuquisaca pando y la paz, con rendimiento variable, en función de la densidad y del cultivar (Bolivia, 2012).

En los últimos años la piña en Bolivia está dando buenos resultados. El 2016 se ha tenido cerca de 3.500 hectáreas de producción, el 2017 la producción aumento a 4.250 hectáreas de producción. La piña ha genera en el mercado local, en agroindustrias y exportaciones cerca de 20 millones de dólares. A medida que va aumentando la producción de piña, incrementa el número de familias productoras de 2.500 a 3.000 familias en este rubro porque tiene un buen precio a nivel local, a nivel de las exportaciones y de la agroindustria. (Bolivia, 2012).

La piña en Bolivia tiene demanda interna y externa por tal razón el gobierno ha dotado platines de piña a los productores que, a la producción de piña, con el fin de cubrir las demandas internas y externa del país (Bolivia, 2012).

Las exportaciones de la piña han demostrado un crecimiento considerable a los países de argentina, chile, Perú, Dinamarca, Italia, Uruguay, Costa Rica y Colombia. Los departamentos que están exportando son Cochabamba (2,9 millones kg), La Paz (35 mil kg) y Santa Cruz (1,3 mil kg) (Bolivia, 2012).

Los productores pandinos no se dedican a la producción extensiva de piña por la falta de platines, de buena calidad, por tal razón se debe implantar tecnología moderna como una de las alternativas para suplir esta gran demanda de platines es el uso de

herramientas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* ya que permite la producción masiva de plantas libres de organismos fitopatógenos y se constituye en una herramienta para el mejoramiento genético (Roux *et al.* 2002)

Según Canchignia *et al.* (2008) el cultivo de tejidos vegetales define como el conjunto de técnicas destinadas a lograr cultivos de órganos, tejidos, células, e incluso protoplasmas, en medios de cultivos artificiales, bajo condiciones asépticas. Una de sus aplicaciones más exitosas es la propagación masiva o micropropagación, cuyas ventajas son: altas tasas de multiplicación, plantas genéticamente uniformes, sanas, que se obtienen en tiempo y espacio reducidos.

La micropropagación *in vitro* consta de diferentes fases (establecimiento, multiplicación enraizamiento y aclimatación). En la fase de establecimiento del cultivo *in vitro* es la más crítica porque se trabaja con material vegetativo de campo que tienen contaminantes más comunes que son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente, por lo cual es importante la etapa de la desinfección para la obtención de ex plantas en condiciones de asepsia (Alicia Castillo, 2004).

Cruz *et al.* (1998) indica que existen técnicas de desinfección que permitan lograr mayores índices de establecimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*. Dentro de las sustancias utilizadas en la desinfección del material vegetal se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) y bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), donde el hipoclorito de sodio ha sido el compuesto más frecuentemente usado por varios investigadores con buenos resultados para la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal, a concentraciones y tiempos diferentes. Este producto es efectivo, económico y de fácil adquisición.

Por ser el cultivo *in vitro* una herramienta que nos permite obtener plantas saneadas en un tiempo corto, y como punto de partida es necesario determinar un protocolo de desinfección para la micropropagación de los cultivares de piña, que mejorará la

capacidad de producción comercial, puesto que el empleo de vitroplantas manejadas con un alto grado de asepsia garantizará el cultivo de plantas libres de patógenos, a la vez que los productores medianos y pequeños podrán contar con material de propagación en desarrollo, crecimiento, producción y calidad.

## **2. OBJETIVOS GENERAL**

Evaluar los protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* en dos variedades de piña (*Ananas comosus* L.) MD2 y Pucallpa a partir de meristemas apicales.

### **2.1. Objetivo específico**

- Evaluar el grado de contaminación en fase de establecimiento.
- Evaluar el desarrollo del explante en la fase de desinfección.
- Evaluar la correlación entre las variables.

### **2.2. Hipótesis**

A partir de estas observaciones se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis alternativa (Ha)

- Existe diferencia significativa entre los protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* en dos variedades de piña (*Ananas comosus* L.) MD2 y Pucallpa a partir de meristemas apicales.

Hipótesis nula (Ho)

- No existe diferencia significativa entre los protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* en dos variedades de piña (*Ananas comosus* L.) MD2 y Pucallpa a partir de meristemas apicales.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Importancia del Cultivo

La piña es un cultivo de mucha importancia entre las frutas tropicales, ocupa un lugar preferencial, siendo los principales productores de esta fruta Hawaii, las Filipinas y Formosa, su origen es sudamericano, de la amazonía y Orinoquia, de donde se extendió por todo América y el mundo (Méndez, 2003).

La piña es la fruta tropical de mayor demanda en el mundo por su agradable sabor y aroma, así como su contenido en vitaminas c, b1, b6, ácido fólico y minerales como el potasio, la hacen altamente demandada en los diversos mercados. Su origen se identificó en la región tropical de Mattogroso, Goiás, Minas Gerais y São Paulo en Brasil, así como del Norte de Paraguay y Argentina, distribuida por Cristóbal Colón por todo el mundo (Banco Central de Honduras (BCH, 2013).

La piña es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne perteneciente a la familia Bromeliaceae compuesta de 46 géneros y 2.000 especies aproximadamente, pertenece al género *Ananas* y especie *comosus*, a esta especie corresponden todos los cultivares, variedades e híbridos de uso comercial originaria de las zonas tropicales de Brasil. (Banco Central de Honduras (BCH, 2013).

Esta planta no se reproduce sexualmente con fines comerciales, el sistema de propagación se da a través de retoños o hijuelos, entre los que tenemos: “la corona, que se localiza sobre la parte posterior del fruto; los hijos basales que se forman en la base del fruto, los hijuelos del tallo que se desarrollan a partir de yemas axilares y los retoños que se originan en la base del tallo y por su proximidad al suelo presentan raíces” (AGRONEGOCIOS).

## **3.2. Enfermedades y plagas de la piña**

La piña exige cuidados químicos y culturales para evitar ser infestada e infectada por plagas y enfermedades. El control de estas enfermedades representa un gran porcentaje de la inversión en el cultivo comercial. Las enfermedades y plagas más comunes y agresivas en el cultivo de piña son las que se mencionan a continuación (AGRONEGOCIOS).

### **3.2.1. Enfermedades**

#### **Pudrición del cogollo (*Erwinia carysanthemi*)**

La pudrición del cogollo es una bacteria ocasiona una pudrición acuosa mal oliente, de color café claro que se inicia en la base de las hojas centrales de la roseta, que causa su desprendimiento suavemente. El borde de las hojas una toma un color verde oscuro seguido de una parte clorótica.

#### **Podredumbre del corazón (*Phytophthora parasitica y cinnamomi*)**

Se caracteriza por la pudrición en la planta, específicamente de la raíz, el cuello del tallo y fruto. Ataca en los meses más lluviosos. Se nota por un amarillo miento en las hojas, las cuales se desprenden fácilmente produciendo un olor fétido. El sistema radical disminuye y presenta descomposición.

#### **Wilt (*Mealybug wilt*)**

Enfermedad causada por un virus transmitido por la cochinilla cuando emigran de una planta enferma a otra sana. Los síntomas visuales son: enrojecimiento progresivo de las hojas más viejas, los bordes del limbo se abarquillan y el ápice se curva hacia abajo, las hojas pierden turgencia, se resecan y toma un color rojo amarillento, se presenta pudrición de las raíces, y el fruto es poco desarrollado y sin sabor.

### **3.2.2. Plagas**

#### **Cochinilla (*Dysmoccus brevipes*) y (*Pseudococcus brevipes*)**

Este es un insecto pequeño, de forma ovalada, algo aplanado y de cuerpo blando, se halla cubierto de un polvo seroso y blanquecino, con filamentos laterales de igual color. Succiona sabia tanto de la raíz como del tallo debajo y sobre el suelo donde se encuentran colonias en simbiosis con hormigas. Las poblaciones altas de este insecto causan amarilla miento y retardo del crecimiento. Este insecto es transmisor del virus de la marchitez de la piña conocido como "Wilt".

#### **Gallina ciega (*Phyllophaga spp*)**

La larva de este insecto causa daños al sistema radicular al alimentarse de este lo que provoca crecimiento raquítico de la planta.

#### **Barrenador (*tecla basalides*)**

En el fruto, la larva de este lepidóptero causa huecos o cavidades de las que emanan exudaciones gomosas y además son la entrada de bacterias y hongos como *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* que causan en la pulpa de la fruta una coloración negra conocida corrientemente como clavo de la piña.

### **3.3. Principales variedades comerciales**

#### **3.3.1. Azucarón o Pucallpa**

Es una planta muy rústica resistente a la sequía con fruto en forma cónica y peso entre 1.5 a 5 libras, con pulpa de color amarillo intenso y muy jugoso. (Figura 1) Sus hojas son duras, de color verde con diversas espinas en el borde y el fruto de ojos muy pronunciados por lo que no se recomienda para la industrialización. Su fruto se destina exclusivamente al consumo local como fruta fresca.



Figura 1. Variedades “Pucallpa”

### 3.3.2. Cayena Lisa

También conocida como hawaiana, es apta para procesamiento y consumo fresco, es una de las principales variedades de exportación. (Figura 2) Las plantas pueden llegar a medir 1.20 m, solo tienen espinas en la punta de sus hojas; la fruta es cilíndrica, grande y con un peso aproximado de 3.5 - 7 libras, con ojos pequeños, pulpa amarilla, con poca fibra, muy jugosa y de excelente sabor. La parte externa del fruto es de color amarillo rojizo al madurar. Es una variedad bastante susceptible a enfermedades (la marchitez roja, pudrición de cogollo/raíz y nematodos), pero se han desarrollado clones resistentes a algunas de ellas (BCH, 2013).

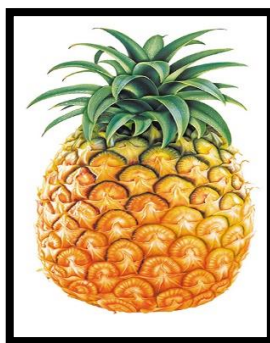


Figura 2. Variedad “Cayena lisa”

### 3.3.3. Champaka F-153

Surgió por selección de la Cayena Lisa en la India y evaluada en Hawaii. (Figura 3) Es una fruta de buen sabor, jugosa y de pulpa color amarillo pálido. Los frutos son grandes con un peso aproximado de 3 - 6 libras. El color de hojas es verde medio con coloraciones azul morado y rojizas en el centro (BCH, 2013).



Figura 3. Variedad “Champaka F-153”

### 3.3.4. MD2

También conocida como la Golden o Dorada, es un cultivar híbrido derivado de la Cayena Lisa originaria de Hawaii. (Figura 4) La planta es de rápido crecimiento que resulta en un ciclo de producción más corto; la fruta es muy dulce y jugosa, y es de color verde amarillento, la pulpa es firme con una coloración amarillo intenso, muy aromática y tiene alto contenido de azúcares, sus flores son amarillas y el peso de la fruta alcanza hasta 7 libras, las hojas solo tienen espinas en las puntas y son de color

verde esmeralda. Es susceptible a la marchitez roja, pudrición del cogollo/raíz, pudrición negra, bacteriosis, y nematodos, es también susceptible a los cambios climáticos induciendo a la flor prematura (BCH, 2013).



Figura 4. Variedades “MD2”

### **3.4. Exportación de las variedades de estudio**

#### **3.4.1. Variedad Híbrido MD2.**

Es una híbrido de reciente introducción al país que, por su presentación y aroma, está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos, siendo la variedad más cultivada en la actualidad. Es una planta de crecimiento rápido y rápida obtención de fruta comercial, ganando a la variedad Champaka hasta tres meses en el período de maduración. La pulpa es firme con alta pigmentación, diferente a los clones de Cayena lisa (EARTH, 2004). Según la (FAO, 2008) el comercio de piña fresca en el mundo se ha transformado en los últimos quince años como quizá no ha sucedido con ninguna otra fruta fresca en tan corto plazo y de una manera tan evidente. Y es que, a partir de 1996, año en que se introdujo el cultivar MD2, piña dorada o Golden como también se la conoce, el interés por esta fruta ha crecido vertiginosamente y su demanda de triplicado desde la puesta en escena de este híbrido y los países q exportan esta piña son: costa rica, honduras. Filipinas Guatemala, ecuador, Panamá Brasil.

### **3.4.2. Variedad Pucallpa**

La producción de esta variedad de piña en Bolivia se encuentra concentrada en la región tropical del departamento de Cochabamba, Santa Cruz, Beni, generando economía en el mercado local, en agroindustrias y exportaciones, lo cual se trabaja produciendo por hectárea 20.000 por costo de producción 1300 \$ y su rendimiento es de 28 tn (Bolivia, 2012).

### **3.5. Demanda de plantines en Bolivia**

La piña en Bolivia tiene demanda interna y externa por tal razón el gobierno ha dotado plantines de piña a los productores, con el fin de cubrir las demandas internas y externa del país (Bolivia, 2012).

Las exportaciones han demostrado un crecimiento considerable a los países de argentina, Chile, Perú, Dinamarca, Italia, Uruguay, Costa Rica y Colombia. Los Departamentos de estas exportaciones son Cochabamba (2,9 millones kg), La Paz (35 mil kg) y Santa Cruz (1,3 mil kg). (Bolivia, 2012).

### 3.6. Propagación vegetativa

#### 3.6.1. Generalidades

Se define como la reproducción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas), siendo así que cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características según sean las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes, sanidad, etc.); las células no diferenciadas que los conforman tienen la información genética y las propiedades fisiológicas de producir una nueva planta con iguales características de la planta madre, propiedad conocida como *totipotencia* (Rojas, *et al.*, 2004).

La propagación vegetativa tiene tres variantes la primera **la propagación por partes vegetativas**, la segunda es **la propagación por injertos** y la tercera es **la propagación in vitro** en la cual células o pequeñas partes de tejidos u órganos son cultivados en condiciones controladas de laboratorio. La propagación vegetativa es una técnica que ha adquirido gran importancia en la multiplicación masiva de plantas y la conservación de especies en peligro de extinción o amenazadas (Vásquez *et al.*, 1997).

#### 3.6.2. Propagación *In Vitro*

El cultivo de tejidos es ampliamente utilizado para la producción de plantas ornamentales y con enorme potencial en plantas tropicales como la yuca, la palma de aceite, el plátano, la piña, la papaya, etc. El cultivo de tejidos consiste en aislar una porción de la planta, a la cual se le llamará *ex plante*, y proporcionarle artificialmente, en un laboratorio, las condiciones físicas y químicas que requiera, para que las células expresen su potencial; los principios en los que se fundamenta la técnica son el de *totipotencialidad* y regulación hormonal (Rojas *et al.*, 2004).

### 3.6.3. Explante

El término ex plante se define como un fragmento de una planta (célula, tejido u órgano; el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.), que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo. La elección de un ex plante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Blanca Indacochea, 2017).

### 3.6.4. Micropropagación

La micropropagación abarca una serie de técnicas de cultivo en un medio estéril de distintos segmentos (ex plantas) de la planta, a los que se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas con el fin de regenerar plantas enteras (Flores, 1998; Alvarenga, 2001). De esta forma se puede utilizar como explante el cotiledón, tallo, hoja, raíz, meristemas, yemas axilares, embriones, inflorescencias, pétalos, óvulos y el polen (Montero, 2001).

La micropropagación se ha constituido es una técnica muy eficiente para producir plantas enteras fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre de la que derivaron, libres de plagas y enfermedades (Flores, 1998; Montero, 2001).

Durante el desarrollo de los tejidos, estos pueden tomar dos rutas alternas en cuanto a su diferenciación a partir de las cuales se pueden desarrollar las diferentes técnicas de propagación in vitro (Alatorre 2002; Montero, 2001).

**Organizado:** se inicia mediante órganos que siguen su crecimiento manteniendo sus características estructurales.

**Desorganizado:** se comienza con fragmentos u órganos que producen tejidos sin estructura definida (callo) a partir de los cuales se forman embriones o brotes adventicios para la regeneración de plantas.

### 3.6.5. Etapas de la micropropagación *in vitro*

En general la micropropagación *in vitro* es una técnica de laboratorio, que sigue diferentes fases o etapas (Raya *et. al.*, 2009).

- 0: Selección y Preparación de la planta madre
- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 2: introducción del material seleccionado *in vitro*
- 3: Multiplicación de brotes
- 4: Enraizamiento
- 5: Aclimatación

#### **Etapas 0: selección planta madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener ex plantas con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo Alicia, 2004).

Krikorian (1991), menciona que el estado fisiológico de la planta madre y la edad de ex plantas influyen en la morfogénesis. Mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (los meristemas apicales y axilares han sido muy exitosos). La posición de las yemas es un factor importante. (Los meristemas apicales y axilares han sido muy exitosos). La posición de las yemas es un factor importante.

## **Etapa 1: Desinfección**

Consiste en el acondicionamiento del ex plante para garantizar su supervivencia en el laboratorio. Es la fase más importante desde el punto de vista aséptico, donde se debe evitar al máximo los problemas de contaminación y de oxidación que pueden causar la muerte del explante. Dependiendo del tejido sembrado esta etapa comprende a partir del ex plante la formación inicial de callo o el crecimiento del meristemo (Raya *et. al.*, 2009).

**Preparación del explante:** La preparación del ex plante consiste en seleccionar la planta y la parte de la planta que dará origen al material, se limpia y lava cuidadosamente, luego se elimina parte del tejido externo y posteriormente se procede a la desinfección superficial.

## **Etapa 2 introducción del explante**

La incisión del explante se debe hacer todo dentro de la cámara de flujo y con todo el material esterilizado; después que el tejido esté lavado se puede colocar unos segundos sobre un papel filtro para que se seque un poco, luego se procede al aislamiento del explante que deseamos cultivar (embrión, meristemo, etc.) y lo introducimos en el medio destinado para su desarrollo en esta etapa.

### **3.6.6. Oxidación**

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.) (Ortega, 2008).

Frecuentemente, el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos procedentes de plantas, como el caso de la mayoría de las especies frutales, se ve impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos (Dalal, M. A.; Sharma, B. B. y Srinivasa, 1992).

### **3.7. Contaminación *in vitro***

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, virus). El ambiente generado por explante, medio de cultivo en condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos, pero compiten con el *ex plante* por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus, por lo que, en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se refiere al cultivo donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias (Blanca Indacochea, 2017).

#### **3.7.1. Tipos de contaminación en el medio**

Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los *ex plantes* y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio (Blanca Indacochea, 2017).

La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos

importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos (Blanca Indacochea, 2017).

**Contaminaciones de bacterias en el medio de cultivo:** Las contaminaciones de bacterias en la micro propagación in vitro son de varios géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) (Blanca Indacochea, 2017).

La presencia de microorganismos es un serio problema que afecta su cultivo in vitro (Quintero, 1997; Jiménez, 1998). El ex plante inicial constituye la fuente principal de contaminación, propiciado quizás, por las características anatómicas propias de las especies.

Varios son los métodos que se emplean para la eliminación de contaminantes microbianos durante el cultivo in vitro de plantas. Se han empleado con tales fines métodos físicos, biológicos y químicos (Leifert, 1994). Dentro de este último, el uso de sustancias antimicrobianas, en particular antibióticos, ha resultado adecuado en los casos en que se identifica el microorganismo presente y se evalúa su susceptibilidad.

**Contaminaciones de hongos en el medio de cultivo:** Las contaminaciones de hongos en la micro propagación in vitro son filamentosas (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) están frecuentemente en los cultivos. Es conveniente inspeccionar visualmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico – los cultivos en forma periódica (por lo menos semanalmente). También se pueden realizar pruebas con medios de cultivo diferenciales y test bioquímicos específicos (Blanca Indacochea, 2017).

### **3.7.2. Problemas de contaminación *in vitro* en el medio**

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, virus). El ambiente generado por explante medio de cultivo condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos, pero compiten con el ex plante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus, por lo que, en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos. (Blanca Indacochea, 2017).

### **3.7.3. Desinfección**

Para la desinfección de yemas de diferentes partes de la planta, se han empleado básicamente productos mercuriales y clorados, con un tratamiento previo o a la vez con algún tipo de detergente. El producto más usado es el bicloruro de mercurio, así: 0.1 % del producto por dos minutos (Poh y Khoon, 1975); al 0.1 % y por tres min y enjuague de las yemas con agua destilada estéril (Matllews y Rangan, 1979).

El cloro es usado principalmente como hipoclorito de sodio (NaClO), así: al 0.5% por 60 min, más tres gotas de "Tween" a la corona, luego al extraer las yemas, se realiza una desinfección al 0.05 % por 20 min (Zepeda, 1981); NaClO al 2.62% por 20 min, más tres gotas de "Tween" (a la corona), luego se sumerge en etanol al 70% por 1 min y por último se extraen las yemas en una cámara de flujo laminar y se sumergen en NaClO al 1.31 %, por 15 min obteniéndose un 10% de contaminación pero solo un 5% en la supervivencia de las yemas de la corona (Gutiérrez, 1988).

Efectuando también desinfección doble corona, yema, (García, 1984) empleó un cloro comercial, no especificado, al 1,2% por 20 min a la corona, y al 0,8% por 10 min sobre las yemas, obteniendo un 16% de contaminación.

Drew (1980); Rarnirez (1984) y Santos, Pinto y Rodríguez (1984) han descrito protocolos de desinfección de la corona de la piña, usando previamente cualquier tipo de surfactante como detergentes y etanol; con el fin de facilitar la penetración de los productos desinfectantes.

### **3.8. Importancia del hipoclorito de sodio, jabón comercial y etanol.**

#### **3.8.1. Hipoclorito de sodio**

El hipoclorito de sodio es un compuesto químico altamente oxidante, que suele ser llamado también cloro o lejía. Su fórmula química es NaClO. Sus características químicas hacen que el hipoclorito de sodio sea un agente eficaz en la eliminación de ciertos virus, bacterias y microorganismos, sin embargo, no es tan eficaz ante hongos. Por su capacidad de desinfección es utilizado en diferentes ámbitos, desde el hogar hasta en hospitales y la industria (QUIMINET, 2011).

#### **3.8.2. El jabón comercial**

El jabón además de limpiar las superficies contaminantes, debe a su vez, eliminar las células muertas, elimina los hongos bacterias y agentes externos. De hecho, muchos expertos consideran que no utilizar un jabón apropiado para la piel, puede descompensar su pH, resecarla, hacer que pierda su elasticidad, o volverla más grasa de lo normal (QUIMINET, 2011).

### **3.8.3. Alcohol o etanol**

Es un desinfectante que se lo puede utilizar en diferentes concentraciones para su uso, lo podemos encontrar a concentración del 96%, para eliminar un gran porcentaje de bacterias, hongos en superficies y en la piel, para evitar futuras enfermedades en seres humanos, animales y plantas (QUIMINET, 2011).

### **3.8.4. Medios de cultivo**

EL medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. Para dar una idea de la cantidad de formulaciones disponibles, George *et al.* (2008), luego de revisar más de 3.000 trabajos científicos describen en dos tomos (casi 1.000 páginas en total) más de 2.000 medios de cultivo. También dos empresas multinacionales ofrecen para la venta más de 60 medios cada una, listos para su utilización especialmente en la micropropagación comercial de plantas. Los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- Una fuente de carbono
- Nutrientes minerales
- Sustancias vitamínicas
- Sustancias reguladoras de crecimiento
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)

### **3.9. Mortalidad in vitro**

La mortalidad de ex plantas in vitro se debe la intoxicación de agentes internos (oxidación) y agentes externos (contaminación). Asimismo (Pierik, 1987), indica el exceso de agentes químicos (NaClO; CaClO) provoca la intoxicación del explante *in vitro* provocando la mortalidad.

### 3.10. Desarrollo del explante *in vitro* inicial

Borges *et al.* (1998), indica que la inmersión de los ex plantes en 1,5% de NaClO durante 10, min tuvo un efecto significativo optimo sobre el crecimiento y desarrollo de las hojas de las vitroplantas. Asimismo, Según (Ramírez, Villalobos *et al.*, 2004) indica que Las altas concentraciones de NaClO y tiempos muy prolongados (mayores a 20 min) inhiben el desarrollo del explante, dependiendo el tipo de especie.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación política

La investigación se llevó a cabo en el Departamento Pando Ciudad de Cobija Provincia Nicolás Suarez, en la Universidad Amazónica de Pando.

#### 4.1.1. Ubicación geográfica

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, ubicado en el campus universitario.

Geográficamente se encuentra ubicada a 11° 01´ 59,20’’ latitud sur y 62° 45´ 31,13’’ de longitud oeste, cuenta con una temperatura promedio de unos 23°C a 26°C.



Figura 5. Ubicación geográfica del tema de investigación

## 4.2. Materiales

Los equipos y materiales utilizados fueron los siguientes:

<b>MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO</b>	<b>MATERIAL DE CAMPO</b>	<b>MATERIAL DE GABINETE</b>	<b>MATERIAL DE DESINFECCIÓN Y ASEPSIA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitador magnético.</li> <li>• Autoclave.</li> <li>• Balanza analítica.</li> <li>• Cámara de flujo laminar de aire.</li> <li>• microondas.</li> <li>• pH metro.</li> <li>• Frascos de vidrio para almacenar soluciones (250, 500 ml).</li> <li>• Frascos ámbar con tapa rosca de (500, 1000 ml).</li> <li>• Cajás petri.</li> <li>• Provetas (10, 50, 100 ml).</li> <li>• Tubos de cultivo.</li> <li>• Vasos de precipitación (25, 50, 100 y 1000 ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caretilla</li> <li>• Azadón</li> <li>• Machete</li> <li>• Material vegetal de piña</li> <li>• Huincha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Portátil</li> <li>• Lápiz</li> <li>• Cuadernos</li> <li>• Reglas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua destilada esterilizada.</li> <li>• Alcohol etílico al 96% y 70%.</li> <li>• Hipoclorito de sodio.</li> <li>• Jabón</li> <li>• Ace (comercial)</li> <li>• Manzate o acrobac</li> <li>• Algodón</li> <li>• Bisturi</li> <li>• Mechero de alcohol</li> <li>• Papel aluminio</li> <li>• Pinzas</li> </ul>

### 4.3. Reactivos que lleva el Medio de cultivo

#### a) Macronutrientes 10 x (g/l)

- $\text{KNO}_3$  nitrato de potasio
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nitrato de amonio
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  cloruro de calcio
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sulfato de manganeso

#### b) Fosfato 10 x (g/l)

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fosfato de potasio
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  fosfato de sodio

#### c) Micronutrientes 100 x (g/l)

- $\text{H}_3\text{BO}_3$  ácido bórico
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  sulfato de manganeso
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sulfato de Zin

#### d) Micronutrientes 1000 x (g/l)

- KI yoduro de potasio
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  molibdeno de sodio

#### e) Micronutrientes 10.000 x (g/l)

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sulfato de cobre
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  cloruro de cobalto

#### f) EDTA - Fe (g/100ml)

- $\text{Na}_2$ - EDTA Ethalenidiaminetetracetic
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sulfato de hierro

**g) Vitaminas 1000 x (mg/100ml)**

- Tiamina – HCL
- Myo - inositol

**h) Hormonas (mg/100ml)**

- 6 - BAP bencil amino purina
- AIB Acido indol butírico

**i) Gelificantes (g/l)**

- Agar agar

**j) Fuente de energía (g/l)**

- Azúcar

**4.4. Material vegetal a usar:**

- Variedad de piña MD2 (Hibrido)
- Variedad de piña Pucallpa

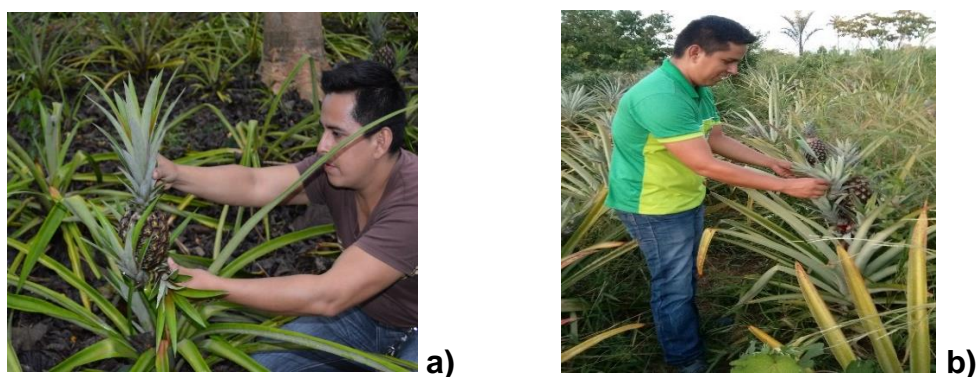
## 4.5. Metodología

### 4.5.1. Identificación de las plantas madre y recolección de hijuelos

Se realizó la identificación de la planta madre de piña tomando en cuenta características generales como ser mejor calidad, tamaño uniformidad y buen porte fitosanitario (figura 6), luego se realizó la recolecta de los hijos axilares (figura 7), una vez seleccionadas y recolectadas se llevó al laboratorio para su reducción, limpieza y desinfección.



**Figura 6.** Identificación de planta madre: a) Variedad Pucallpa; b) Variedad MD2.



**Figura 7.** Recolección de material vegetal hijuelos axilares de piña: a) Recolección de brotes o hijos de MD2, b) Recolección de brotes o hijos Pucallpa

#### 4.5.2. Desinfección de los hijuelos axilares de piña

Se trasladó los hijuelos al laboratorio de biotecnología vegetal del Área de Ciencias Biológicas y naturales de la UAP, para luego reducir su tamaño y realizar las tres desinfecciones correspondientes (figura 8).

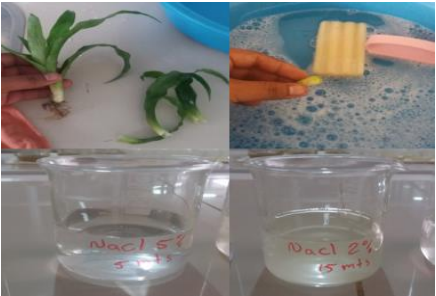

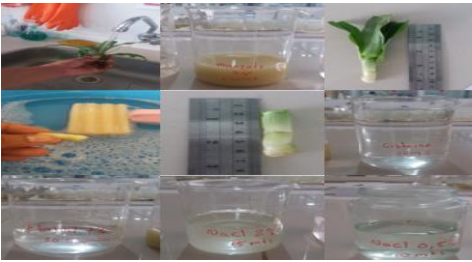


Figura 8. Reducción y desinfección de hijuelos; a) Reducción de los hijuelos y retirando las hojas; b) lavado de los hijuelos de piña

#### 4.5.3. Protocolos de desinfección

Se utilizaron tres tipos de protocolos de desinfección en los chupones y yemas axilares de la planta madre que se distribuyó en el laboratorio, se realizó las desinfecciones utilizando hipoclorito de sodio, jabón comercial, etanol y algunos agroquímicos que serán utilizados para la desinfección de hongos y bacterias.

Tabla 1. Los tres tipos de protocolos de desinfección para las dos variedades de piña (*Ananas comosus* L.)

Medio de cultivo	Descripción
<p><b>D1</b></p> 	<p>NaClO al 5% por 5 min y luego se enjuago tres veces con agua esterilizada.</p> <p><b>Cámara de flujo laminar</b></p> <p>se NaClO al 2% por 15 min, posteriormente se enjuago tres veces con agua estéril y por último se colocó en una NaClO al 1% por 15 min (Hector A. Blanca F. Teresa E. Vargas y Eva de Darcia 2011.)</p>
<p><b>D2</b></p> 	<p>Se desojaron los hijuelos hasta llegar a un cierto tamaño, luego se redujo a 2 cm x 7cm; se lavó estos ex plantes con jabón líquido y se desinfecto, frotando con un cepillo de dientes, luego se enjuago con agua potable. En el recipiente se colocó agua potable con 1.2 g de Manzate, se dejó reposar por el lapso de 1 hora, se enjuago 3 veces con agua potable quedando listos los ex plantes.</p>
<p><b>D3</b></p> 	<p>Se escurrió por 2 horas, luego se cortó para reducir su tamaño a 10 cm de largo y, luego se trasladó al laboratorio, en conjunto se lavó los hijuelos</p> <p><b>Cámara de flujo laminar</b></p> <p>NaClO al 2% por 15 min, para después pasarla a una solución de NaClO al 0.5% por 10 min, y luego se insertaron los ex plantes en los frascos con medio de cultivo (Gabriela Eugenia Agila Celi 2014).</p>

#### 4.5.4. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon las sales propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962) como medio basal.

Tabla 2. Preparación de solución stock medio MS Murashige y Skoog (MS) (1962)

<b>Soluciones stock</b>	<b>CANTIDAD (mg/g/L)</b>	<b>Medio de cultivo (ml)</b>
<b>a. Macronutrientes 10 x (g/l)</b>		
KNO <sub>3</sub> nitrato de potasio	19.0 g	100 ml
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> nitrato de amonio	16.5 g	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O cloruro de calcio	4.4 g	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O sulfato de manganeso	3.7 g	
<b>b. Micronutrientes 100 x (g/l)</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ácido bórico	0.62 g	10 ml
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O sulfato de manganeso	1.69 g	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O sulfato de zin	0.86 g	
<b>c. Vitaminas 1000 x (mg/100ml)</b>		
Tiamina – HCL	0.01 mg	10 ml
Myo- inositol	1 g	
<b>d. Hormonas (mg/100ml)</b>		
6 - BAP bencil amino purina	0.02 mg	10 ml
AIB Acido indol butírico	0.0123 mg	10 ml
<b>e. Gelificantes (g/l)</b>		
Agar agar	8 g	8 g

Una vez preparado el medio de cultivo, se distribuyó en los tubos de ensayo, y se taparon con sus respectivas tapas, sellado con parafil, luego se esterilizó en autoclave. (Figura 9).



Figura 9. a) Preparación de soluciones madre, b) Preparación de MS Murashige y Skoog (MS), c) Tubos de ensayo con medio de cultivo

#### 4.5.5. Introducción de los explantes

La introducción se realizó en las cámaras de flujo laminar donde se introdujo los explantes de piña en cada tubo de ensayo totalmente esterilizado (figura 10), para luego trasladarlos con sumo cuidado y delicadeza, a la sale de crecimiento donde la temperatura se controló con 27 C° al igual que la iluminación se controló con 16 horas luz y 8 de oscuridad, para luego ser evaluadas.



Figura 10. a) Introducción de los explantes de piña MD2 y Pucallpa b) Explante de una semana, c) Explantes de tres semanas.

#### **4.5.6. Parámetro y registro de evaluación de los explantes**

En los tres tipos de desinfecciones, se evaluaron las siguientes variables:

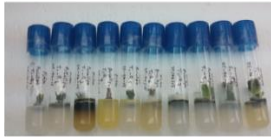
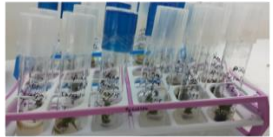

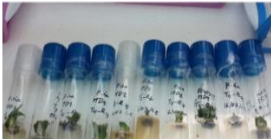
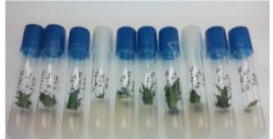

- a. Contaminación
- b. Yemas activas
- c. Mortalidad
- d. Prendimiento
- e. Desarrollo de los brotes meristemáticos

a. **Contaminación:** se realizó un seguimiento semanal y se observaron grado de contaminación de los explantes introducidos *in vitro*. de acuerdo a la escala de Mamani, (1993).

1= Planta no contaminada

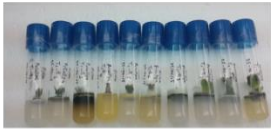
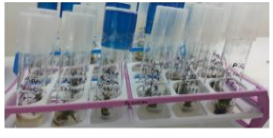
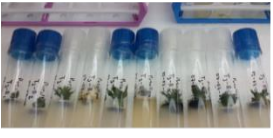

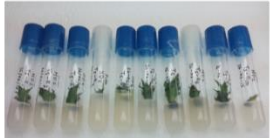

2=Planta contaminada

Tabla 3. Contaminación de los 6 tratamientos

T1	T2	T3
		
T4	T5	T6
		

b. **Yemas activas:** se realizó observaciones diarias en los explantes introducidos y se observaron los cambios de pigmentación, crecimiento, alargamiento en el transcurso del tiempo.

Tabla 4. Promedio de yemas activas de los 6 tratamientos

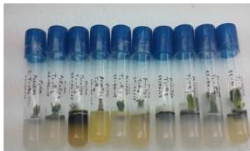
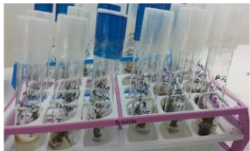
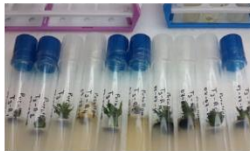
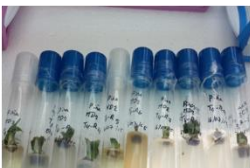
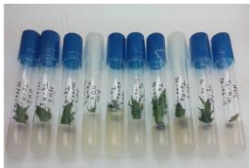
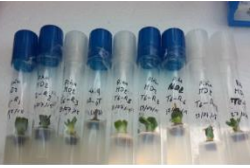
T1	T2	T3
		
T4	T5	T6
		

c. **Mortalidad:** se observó semanal mente los síntomas de oxidación, contaminación y muerte del explante introducidos *in vitro* de acuerdo a la escala de Mamani, (1993).

1 = Planta viva

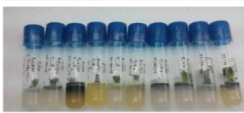




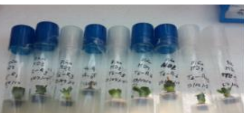
2 = Planta muerta (oxidación, contaminación)

Tabla 5. Mortalidad de los 6 tratamientos

T1	T2	T3
		
T4	T5	T6
		

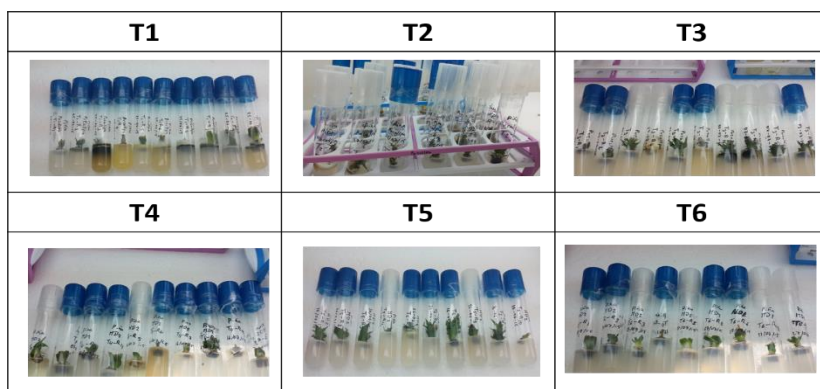
d. **Prendimiento del explante:** Se realizó un seguimiento de 60 días para la observación de los explantes, para ver el comportamiento y cambios que realizó en el prendimiento del medio de cultivo.

Tabla 6. Prendimiento de los explantes de los 6 tratamientos

T1	T2	T3
		
T4	T5	T6
		

- e. **Desarrollo del explante:** en los primeros 15 a 20 días se presentaron cambios en los explantes como: pigmentación de las hojas, hojas nuevas y alargamiento e hinchazón del explante.

Tabla 7. Desarrollo de los explantes en los 6 tratamientos



#### 4.6. Diseño estadístico

El diseño que se empleó para el trabajo de investigación es completamente al azar con 10 repeticiones, por lo tanto el número de unidades experimentales será de  $2 \times 3 \times 10 = 60$ . Con un arreglo bifactorial distribuidos completamente al azar con un arreglo combinatorio. Las variables a evaluar son los siguientes:

Tabla 8. Variedad, tratamiento y repeticiones.

Variedad	Tratamiento Tipos de desinfección	Repeticiones
V1	D 1	V1 D1 = r 10
	D 2	V1 D2 = r 10
	D 3	V1 D3 = r 10
V2	D 1	V2 D1 = r 10
	D 2	V2 D2 = r 10
	D 3	V2 D3 = r 10

Los factores de varianza en estudio son:

- 3 tipos de desinfección: D1, D2 y D3
- 2 variedades de piña

#### 4.6.1. Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + E_k + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Media general

$B_i$  = Efecto del i-ésimo bloque o repetición

$T_j$  = Efecto de la j-ésima de variedad

$E_k$  = Efecto del k-ésimo tipos de protocolos

$I.j.k$  = Efecto de la interacción

$\epsilon_{ijkl}$  = Error experimental

#### 4.6.2. Variable de respuesta

Las variables de respuesta a evaluar, en los tres tipos de desinfección son:

- a) Contaminación
- b) Yemas activas
- c) Mortalidad
- d) Prendimiento
- e) Desarrollo de los brotes meristemáticos

### 4.6.3. Análisis y evaluación de datos

De acuerdo al modelo estadístico definido se realizó un análisis estadístico para probar hipótesis acerca de los efectos fijos y comparaciones de medias, mediante contrastes para determinar los tipos de desinfección adecuadas según las concentraciones, con el programa Asistat con una probabilidad de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Contaminación de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.

Tabla 9: Análisis de varianza de contaminación para el establecimiento *in vitro* de piña.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>
<b>Factor 1</b>	2	0.61667	3.1121 ns
<b>Factor 2</b>	1	0.01667	0.0841 ns
<b>Intr.*fator</b>	2	1.51667	7.6542 **
<b>Error</b>	54	0.19815	
<b>C.V%</b>	29.35		

C.V.= Coeficiente de Variación      \*\*=Significativo al 95% ns= No Significativo

El análisis de varianza para la contaminación por efecto de los tratamientos (Tabla 9) muestran que existieron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Esto significa que los tratamientos aplicados para la contaminación tuvieron un efecto diferente significativo entre los seis tratamientos. El coeficiente de variación (C. V.) fue de 29.35%.

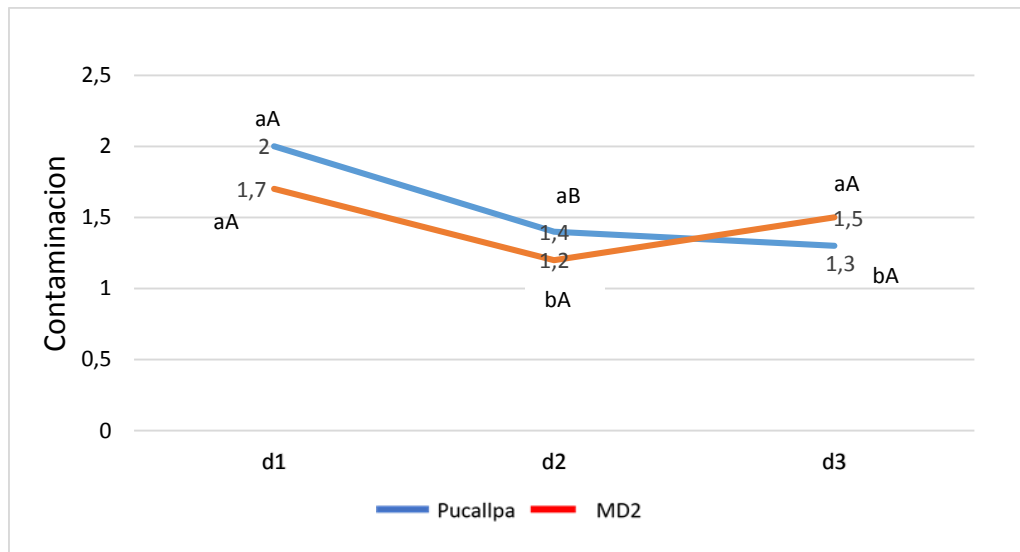


Figura 11. Contaminación para el establecimiento in vitro de piña.

Cuando realizamos la interacción de contaminación entre variedades de piña y los tipos desinfecciones, observamos que las desinfecciones 2 y desinfección 3 son aptos para la variedad Pucallpa con menor contaminación estadísticamente de (1.3) y (1.4) a diferencia de la desinfección 1 que estadísticamente es superior (2). Asimismo, para la variedad MD2 la desinfección 2 es la mejor, estadísticamente menor (1.2), a diferencia de los otros tratamientos 1 y 3 que fueron estadísticamente superiores (1.7 a 1.5) (figura 11).

## 5.2. Yemas activas de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.

Tabla 10: Análisis de varianza de yemas activas para el establecimiento in vitro de piña.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>
<b>Factor 1</b>	2	0.06667	0.4337 ns
<b>Factor 2</b>	1	0.15000	0.9759 ns
<b>Intr.*fator</b>	2	0.20000	1.3012 ns
<b>error</b>	54	0.15370	
<b>C.V%</b>	33.13		

C.V.= Coeficiente de Variación      \*\*=Significativo al 95%   ns= No Significativo

El análisis de varianza para la variable yemas activas por efecto de los tratamientos (Tabla 10) muestran que no existieron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Esto significa que los tratamientos aplicados para yemas activas todas resultaron ser iguales entre los seis tratamientos. El coeficiente de variación (C. V.) fue de 33.13.

### 5.3. Mortalidad de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.

Tabla 11: Análisis de varianza de mortalidad para el establecimiento in vitro de piña.

FV	GL	CM	F
Factor 1	2	0.51667	2.4261 ns
Factor 2	1	0.15000	0.7043 ns
Intr.*fator	2	0.95000	4.4609 *
error	54	0.21296	
C.V%	29.15		

C.V.= Coeficiente de Variación      \*\*=Significativo al 95% ns= No Significativo

El análisis de varianza para la variable mortalidad por efecto de los tratamientos (Tabla 11) muestran que existieron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Esto significa que los tratamientos aplicados para la contaminación tuvieron un efecto diferente entre los seis tratamientos. El coeficiente de variación (C. V.) fue de 29.15%.

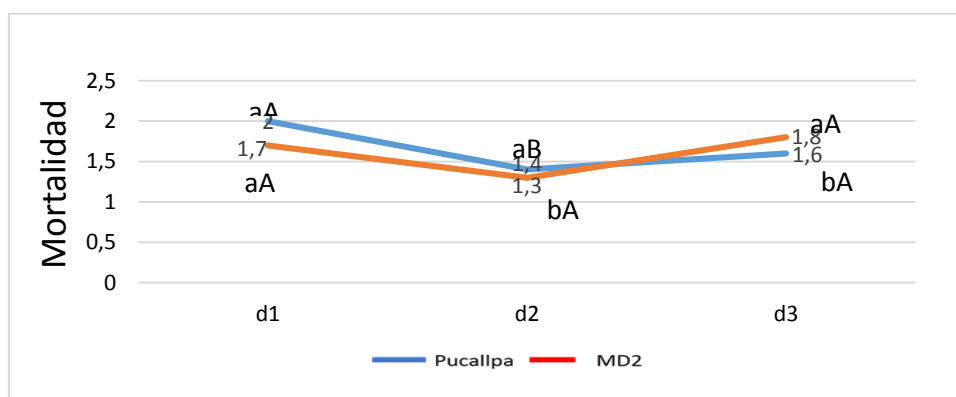


Figura12. Mortalidad para el establecimiento in vitro de piña

Cuando realizamos la interacción de la variable de mortalidad entre variedades de piña y tipos de desinfección, observamos que la desinfección 2 es óptimo para la variedad MD2 con menor mortalidad estadísticamente con 1.3 a diferencia de la desinfección 1 y 2 que estadísticamente es superior a 1,7 y 1,8 Asimismo, para la variedad Pucallpa las mejores desinfecciones fueron 2 y 3 que estadísticamente menores (1.4 y 1.6), a diferencia de la desinfección 1 estadísticamente superiores con (2). (figura 12).

#### 5.4. Prendimiento de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.

Tabla 12: Análisis de varianza de prendimiento para el establecimiento in vitro de piña.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>
<b>Factor 1</b>	2	0.51667	2.7900 ns
<b>Factor 2</b>	1	0.26667	1.7900 ns
<b>Intr.*fator</b>	2	1.01667	5.4900 **
<b>error</b>	54	0.18519	
<b>C.V%</b>	25.82		

C.V.= Coeficiente de Variación      \*\*=Significativo al 95%   ns= No Significativo

El análisis de varianza para el prendimiento por efecto de los tratamientos (Tabla 12) muestran que existieron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Esto significa que los tratamientos aplicados para la contaminación tuvieron un efecto diferente entre los seis tratamientos. El coeficiente de variación (C. V.) fue de 25.82%.

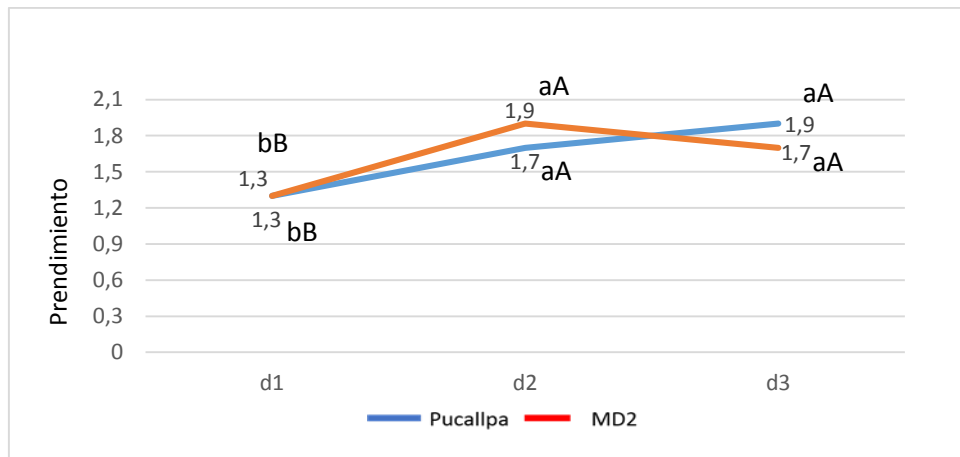


Figura 13. Prendimiento para el establecimiento in vitro de piña

Cuando realizamos la interacción de la variable prendimiento observamos que la desinfección 2 y la desinfección 3 son aptos para las dos variedades Pucallpa y MD2, se observa que para la variedad MD2 estadísticamente el grado de prendimiento es superiores a (1.9 y 1.7) eso significa que la desinfección 2 y 3 son óptimas para el prendimiento, a diferencia de la desinfección 1 que se observa estadísticamente que el grado de prendimiento es menor a (1.3) Asimismo, para la variedad Pucallpa el mejor grado de prendimiento estadísticamente es mayor a (1.7 y 1,9), para la desinfección 2 y 3 a diferencia de las desinfecciones 1 que tuvo un menor grado de prendimiento de (1,3).( Figura 13)

### 5.5. Desarrollo de las dos variedades de estudio MD2 y Pucallpa.

Tabla 13: Análisis de varianza de desarrollo para el establecimiento in vitro de piña.

FV	GL	CM	F
Factor 1	2	0.95000	4.5804 *
Factor 2	1	0.26667	1.2857 ns
Intr.*fator	2	0.81667	3.9375 *
error	54		
C.V%	30.36		

C.V.= Coeficiente de Variación      \*\*=Significativo al 95% ns= No Significativo

El análisis de varianza para el desarrollo por efecto de los tratamientos (Tabla 13) muestran que existieron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Esto significa que los tratamientos aplicados para la contaminación tuvieron un efecto diferente entre los seis tratamientos. El coeficiente de variación (C. V.) fue de 30.36%.

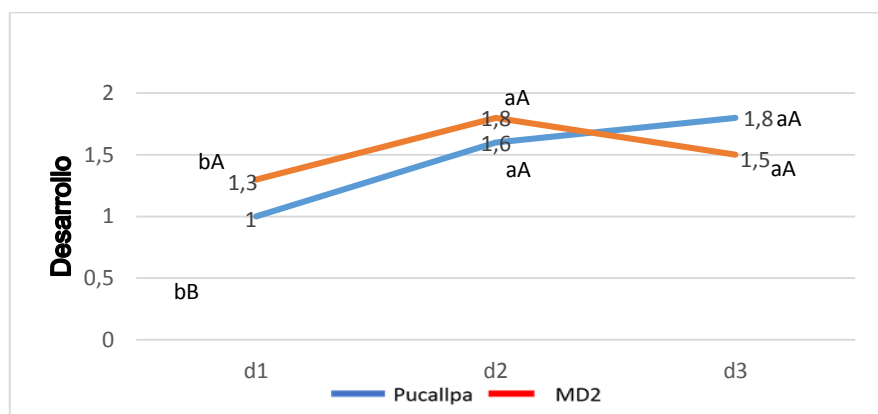


Figura 14. Desarrollo para el establecimiento in vitro de piña

Cuando realizamos la interacción de la variable de desarrollo entre variedades de piña y tipos de desinfecciones observamos que las desinfecciones 2 y 3 son aptos para ambas variedades Pucallpa y MD2. Para la variedad Pucallpa se observa el que la desinfección 3 y la desinfección 2 tienen mayor grado de desarrollo estadísticamente de (1.8) y (1.6) a diferencia de la desinfección 1 que tiene menor desarrollo estadísticamente de (1). Asimismo, para la variedad MD2 el mejor grado de desarrollo estadísticamente es mayor a (1.8), fue la desinfección 2 a diferencia de las desinfecciones 1 y 3 que tuvieron un menor grado estadísticamente a (1,3 a 1.5) (figura 14).

### 5.6. Coeficientes de relación de las variables de estudio.

Tabla 14. Coeficientes de correlación

VA/AV	CON	DES	MOR	PER
CON	1	-0.9092 *	0.90443*	0.7142ns
DES	*	1	-0.8578	0.8357
MOR	*	*	1	-0.5966
PREN	ns	ns	Ns	1

CON=Contaminación, DE=desarrollo del ex plante MOR= Mortalidad, PER=prendimiento

De acuerdo a los coeficientes de correlación (Tabla 14) para los protocolos de desafección para las dos variedades de piña, la variable de contaminación tuvo una correlación alta y negativa con las variables de desarrollo del ex plante y una correlación alta y positiva con la variable de mortalidad. Esto significa que los ex plantes que tuvieron mayor contaminación presentaron menor desarrollo del ex plante y tuvieron mayor grado mortalidad. Asimismo, la variable de mortalidad esta correlacionado negativa y altamente con la variable de desarrollo del ex plante, esta significa que a menor desarrollo del ex plante mayor mortalidad del ex plante.

### 5.7. Tratamiento de las variables de estudio.

**Tabla 15.** Grados de variables, contaminación, prendimiento, desinfección y mortalidad, numero de tratamientos y tipos de desinfecciones

Nº	DES	VAR	Nº DE EXP	CON	PRE	DES	MOR
1	d1	Pucallpa	0	0	0	0	0
2	d2	Pucallpa	7	1	1	2	1
3	d3	Pucallpa	7	1	1	2	1
4	d1	MD2	3	1	1	2	1
5	d2	MD2	8	1	1	2	1
6	d3	MD2	8	1	1	2	1

**DES**=Desinfecciones, **VAR**=Variedades, **NRO DE EXP**=Numero, **CON**=Contaminación, **PRE**=Prendimiento, **DES**= Desarrollo, **MOR**=Mortalidad.

De los 60 ex plantes in vitro introducido en la fase de establecimiento con las diferentes desinfecciones aplicadas, 33 ex plantes in vitro pasan a la siguiente fase de multiplicación.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Contaminación

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos *in vitro* se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del ex plante a su medio, así como por las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como ex plante (Mroginski y Roca, 1991).

Esto fue evidente en la presente investigación, ya que cuando se introdujo material proveniente de campo, hubo altos porcentajes de contaminación, *in vitro*. Alonso y Gómez (2002), Recalde y Bastidas, (2007), menciona que la contaminación, más que matar a los ex plantas directamente, invade el cultivo haciendo que el ex plante no sea apto para su micro propagación. Existen varios compuestos químicos que se utilizan para la desinfección en la fase establecimiento en cultivo *in vitro*, entre ellos el hipoclorito de sodio (NaClO). En la presente investigación se utilizó el NaClO en concentraciones de 0.5 %- 2% respectivamente en diferentes tiempos (menores a 15 min), donde se obtuvo el 70% de ex plantas sin contaminación para la variedad Pucallpa. Asimismo, se pudo observar que para la variedad MD2 obtuvo menor contaminación con concentraciones de 2% - 5% de NaClO durante 10 min.

La concentración y el tiempo de exposición al desinfectante están relacionados tanto a la especie como al tipo de ex plante, siendo el hipoclorito de sodio uno de los más utilizados, ya que se considera gentil con el tejido vegetal. Araya (2000), menciona que a mayor concentración y tiempo de exposición al NaClO, menor porcentaje de contaminación. Asimismo (Ramírez y Villalobos *et al.* 2004), menciona que a altas concentraciones de NaClO y tiempos muy prolongados (mayores a 20 min) inhiben el crecimiento del ex plante, dependiendo el tipo de especies. También se pudo observar en la investigación presente que la utilización de fungicida manzate con 1.2 g/l fue óptimo para ambas variedades en el momento de la desinfección. Según okabe, (2007)

quien indica que el material prometiente de campo debe desinfectarse con fungicida para bajar la incidencia del patógeno endógeno. Según (Mroginski y Roca, 1991). Indica que existen diversas técnicas para el control de la contaminación in vitro, tales como el uso de fungicidas y antibióticos. Asimismo, Acosta *et al.* (2005), Indican que la aplicación de fungicidas comerciales, combinando fungicidas preventivos de contacto Mancozeb (10 g/l) controlan las contaminaciones in vitro. En la presente investigación se utilizó mancozeb como previa desinfección obteniendo resultados óptimos

## **6.2. Mortalidad**

Según Bhojwani y Razdan, (1983), indica tener cuidado con la dosis del desinfectante y el tiempo de inmersión seleccionados, pues todos los desinfectantes son tóxicos para el tejido. En presente investigación se observó que en tiempos prolongados de desinfecciones mayores a 20 min los ex plantas de piña de ambas variedades MD2 Y Pucallpa tuvieron mayor mortalidad que con tiempos menores a 15 min. Según (Ramirez y Villalobos *et al.* 2004) indica que Las altas concentraciones de NaClO y tiempos muy prolongados (mayores a 20 min) inhiben la sobrevivencia. Asimismo María Claudia Sánchez Cuevas y José Luis Salaverría, (2004) indican que las Concentraciones más altas de NaClO o períodos de inmersión más prolongados causaron necrosis en el tejido.

## **6.3. Prendimiento**

Según (Cynthia Llanos, 2015) indica que para la introducción y desafección de yemas de piña in vitro es adecuado utilizar bajos porcentajes lejía (NaClO) en tiempos intermedios de ex poción a concentraciones bajas, asegurando la limpieza sin dañar las células de las yemas, permitiendo su prendimiento y proliferación. En la presente investigación se puedo observar que a concentraciones de 0.5 % - 2% NaClO respectivamente en diferentes tiempos (menores a 15 min), se obtuvo mayor

prendimiento de ex plante de piña en un 80%. Asimismo menciona (Ramírez y Salazar, 1997), que en tiempos de exposición en NaClO al 5,25% mayores a 8 min, produjo el oscurecimiento de los ex plantas. En la presente investigación se observó el oscurecimiento de ex plante en un 20% al ser sometida en altas concentraciones de NaClO en 5% durante 5 min.

#### **6.4. Desarrollo**

Según (Ramírez y Villalobos *et al.*, 2004), indica que las altas concentraciones de NaClO y tiempos muy prolongados (mayores a 20 min) inhiben el desarrollo del ex plante, dependiendo el tipo de especie. En otra investigación (Enriques Suarez, 2011). Indica que los ex plantas de piña de yemas laterales para la micropropagación in vitro, en la fase de establecimiento obtuvo menor contaminación y mayor desarrollo con combinación de fungicida y concentraciones bajas de NaClO en tiempos reducido. En la presente investigación se utilizó yemas e hijuelos laterales de piña de las variedades Pucallpa y MD2 para la micro propagación in vitro, para desinfectar se utilizó fungicida manzate y NaClO con concentraciones de 2% - 5% en tiempos reducidos de 10 min para ambas concentraciones donde se obtuvo menor contaminación y mayor desarrollo del ex plante. Asimismo, Borges *et al.* (2009), indica que la inmersión de los ex plantas en 1,5% de NaClO durante 10, min tuvo un efecto significativo optimo sobre el crecimiento y desarrollo de las hojas de las vitroplantas.

#### **6.5. Coeficientes de relación de las variables**

En otra investigación para la propagación de piña, realizada por (Llanos, 2015). Observo que durante la desinfección que a menor contaminación mayor proliferación. Así mismo en otro estudio (Luna, 2016), menciona que las contaminaciones es un problema que no permite el desarrollo del ex plante, causando efectos fitotoxicos en cuanto al engrosamiento ocasionando la muerte del ex plante. En la investigación se observó que a mayor contaminación menor desarrollo y mayor muerte del ex plante.

## 7. CONCLUSIÓN

Sobre la base de los objetivos planteados y los resultados obtenidos se llegaron a las siguientes conclusiones:

- De las dos variedades de piña evaluadas bajo tres protocolos de desinfección para el establecimiento in vitro, presento que la desinfección dos y tres son aptos para ambas variedades (Pucallpa y MD2) para la sobrevivencia del ex plante bajo condiciones in vitro en laboratorio.
- Para los seis tratamientos sonetitos para el grado de contaminación se concluye que la desinfección dos es apta para ambas variedades Pucallpa y MD2 con menor grado de contaminación estadísticamente de 1.3 y 2.
- Para la variable de desarrollo del ex plántate en la fase de desinfección, se concluye que utilizando la desinfección dos para la variedad MD2 obtuvo mayor desarrollo del ex plante estadísticamente de 1.8. Para la variedad Pucallpa la desinfección dos y tres son aptas para el desarrollo del ex plante estadísticamente (1,3 a 1.5).
- Para los seis tratamientos 33 ex plantes de piña exhibieron mayor sobrevivencia en la fase de desinfección. Los ex plantes que no se contaminaron tuvieron mayor desarrollo y menor grado de mortalidad. Asimismo, los ex plantes con menor desarrollo presentaron mayor grado de mortalidad. Pasan a la siguiente fase.

## **8. RECOMENDACIONES.**

- Realizar un pre tratamiento a las plantas madres que son recolectadas de campo.
- Trabajar con plantas que se encuentran en invernaderos cuya sanidad es controlada.
- Desinfectar cuidadosamente la planta cuando se realiza la desinfección en laboratorio.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- AGRONEGOCIOS.** Guía técnica para el cultivo de piña. Ministerio de Agricultura y Ganadería – Gobierno de El Salvador. (en línea). Consultado. <http://www.agronegocios.gob.sv/comoproducir/guias/pina.pdf> Acceso: 05/03/2015; 08:35 pm.
- ALATORRE, C.F. 2002.** Estudio morfogénico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona* Schiede obtenido *in vitro*. Tesis. Bach. Agr. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México. 86 p.
- ARAYA E 2000.** Establecimiento y multiplicación *in vitro* de jaúl (*Alnus acuminata*) [tesis licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología.
- ACOSTA, M.; ALVARADO. Y.; CRUZ, M.; LEIVA, M. Y DELGADO, L 2005.** Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de *Eucalyptus grandis* Manejo integrado de plagas y agroecología, vol. 75, p. 60-63.
- ALONSO-GÓMEZ M 2002.** Biotecnología aplicada a la mejora de *Pelargonium* [tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.; p. 142.
- BOLIVIA (2012).** Perfil de mercado para la *piña* –Istituto Boliviano de comercio exterior (IBCE) consultado 8 de noviembre 2013. Disponible en: [http://ibce.org.bo/images/estudios\\_mercado/perfil\\_mercado\\_pina.pdf](http://ibce.org.bo/images/estudios_mercado/perfil_mercado_pina.pdf).
- BHOJWANI, S. S. AND M. K. RAZDAN. 1983.** Plant Tissue Culture. Theory and Practice. Elsevier. New York. 235 p.
- BOGADO F; VERA BRAVO C; AYALA P; SANSBERRO P; LUNA C.** Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*.

- BANCO CENTRAL DE HONDURAS (BCH). 2013.** Sistemas Automatizados de Captura y Generación de Estadísticas Económicas.
- BLANCA INDACOCHEA 2017.** Las técnicas de cultivo *in vitro* y *ex vitro* de células y tejidos vegetales pp 14-15.
- CANCHIGNIA et al., 2008.** Alternativas para la propagación *in vitro* de plátano variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). Unidad de Investigación Científica y Tecnológica, Facultad de Ciencias Universidad de Quevedo. Ciencia y Tecnología.
- CANAPEP, 2017.** Cámara Nacional de Productores y Exportación de Piña, propiedades de la piña. P 1. Consulta: <https://canapep.com/propiedades-de-la-pina> 2016 05/10/2017.
- CYNTHIA ISABEL LLANOS BUENDIA 2015.** Micropropagación *in vitro* de piña, ananas comosus (L.) Merr var. md2 (bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal 50p.
- COVECA. 2002.** Comisión veracruzana de comercialización agropecuaria. Gobierno del Estado de Veracruz, México.
- CASTILLO, ALICIA. 2004.** Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA, Las Brujas, Uruguay. Disponible en la red.
- DREW, R.A. 1980.** Pineapple tissue culture Udiquald for rapid multiplication. En: Queensland Agricultural Journal. Vol. 106, No. 5 p. 447-451.
- DALAL, M. A.; SHARMA, B. B. Y SRINIVASA, M. 1990.** Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. Scientia Hort, 1992, vol. 51, p. 35-41.

- DE LA CRUZ, G., BORGES, M., AGUILERA, N., SABORIT, G., LABRADA, M. 1998.** Multiplicación acelerada del ñame (*Dioscorea alata* L.) en condiciones *in vitro*. Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba, p. 8.
- EARTH, 2004.** Perfil de Producto Piña. Centro para la formación empresarial. EARTH, Limón, Costa Rica. P. 23.
- FLORES, V. 1998.** La planta: Estructura y función. 2ª ed. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 504 pp.
- FAO 2008.** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: Consultado:  
<http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch33s/AE614s01.htm>.
- GABRIELA EUGENIA AGILA CELI 2014.** Interacción de Hormonas Vegetales utilizados en la fase de establecimiento *in vitro* en explantes de piña (*Ananas comosus* L.) híbrido MD2. p, 11.
- GUTIERREZ E., M.A. 1988.** Efecto de la Benciladenina, ácido indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de la piña *Ananas comosus* L. Merry cultivar "cayana lisa" México, 70 p. Tesis (Maestría en Ciencias, Especialista en Fruticultura). Centro de Fruticultura Chapingo. Colegio de Postgraduados.
- GARCIA, G. 1984.** Propagación de la piña americana *Ananas comosus* por cultivo de tejidos *in vitro*. En: XOBA, Revista de Agricultura. Vol. 4, No. 2 p. 20-33.
- GEORGE EF.; HALL MA. DE KLERK, G. 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. 3ra Ed. Springer, The Netherlands. 501 p.

**HECTOR A. BLANCO F. TERESA E. VARGAS Y EVA DE DARCIA 2011.**

Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región Amazónica mediante cultivos de yemas axilares y apicales. 438 p.

**JIMÉNEZ, E 1998.** Cultivo de ápices y meristemos. En: Pérez, JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. pp. 45-56. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara.

**JIMÉNEZ, J. 1999.** Cultivo de la piña. Manual práctico para el cultivo de piña de exportación. 1ª ed. Cartago, Editorial tecnología de Costa Rica. P. 217.

**KRIKORIAN, A.D. 1991.** Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 41-78.

**LEÓN, S.; ARENAS, L.; VILORIA, Z 1997.** Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo in vitro de guayabo (*Psidium guajava* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ), vol. 14, p. 43-55.

**LEIFERT, C, MORRIS C, WAITES W 1994.** Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-144.

**MROGINSKI, L. A. Y W. M. ROCA. 1991.** Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. In: W. M. Roca y L. A., Mroginski. (EDS). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. P 19-40.

**MARIA, CLAUDIA, SÁNCHEZ, CUEVAS. JOSÉ, LUIS, SALAVERRÍA, 2004.** Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) Revista UDO Agrícola 4 (1): 21-26. 2004.

- MÉNDEZ, J. 2003.** Apoyo de ingresos Locales Guatemala CAP. Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional/ Guatemala.
- MARKS, T. Y SIMPSON, S. 1990.** Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. J. of Hort. Sci., vol. 65, p. 103-111.
- MAMANI, P. 1993.** Comportamiento Morfológico y Fisiológico de dos clones de papa sometida a estrés hídrico pp. 33-34.
- MATHEWS, V. and RANGAN, T.S. 1979.** Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. En: Scientia Horticulurae. Vol. II p. 319-328.
- MONTERO, W. 2001.** Estudio morfogénico e histológico de *Echinacea purpurea in vitro*. Tesis para optar Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 60 pp.
- OKABE, K. 2007.** Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales (volumen 2) Informe final. ICTA (Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícola). Voluntarios Japoneses en Cooperación Técnica con el Extranjero (JOCV). Bárcena. Guatemala. P. 90.
- ORTEGA, E. 2008.** Fisiología del estrés. Curso de posgrado, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. P. 105.
- PAULL, R. E. 1997.** Pineapple. Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. Mitra, S.K. (ed.). New York. CAB International. P. 291-323.
- POH, T. and KHOON, C.B. 1975.** Tissue culture of pineapple. P. 51-58. En: Natural Plant Tissue Culture Symposium. Malasia: Kuala Lumpur.
- PIERIK, R. L. M. 1987.** In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 343 p.

- QUINTERO, W, MAS G, SANTOS R, LEÓN S, CASTRO C, BRACHO B 1997.** Efecto de la temperatura y tiempo de inmersión en el control de la contaminación de yemas apicales de Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, cultivadas *in vitro*. En resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas. pp. 101. Maracaibo, Venezuela.
- QUIMINET, 2011.** Información y Negocios Segundo a Segundo. Consulta. <http://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-hipoclorito-de-sodio-2555821.htm> Acceso: 28/05/2015; 08:40 pm.
- ROJAS, S; GARCÍA, J; ALARCON, M. 2004.** Propagación asexual de plantas. CORPOICA, Ministerio de agricultura y Desarrollo rural de Colombia, PRONATTA. Colombia.
- RAYA MONTAÑO, YURIXHI A.; VILLEGAS MONTER, ÁNGEL; ARELLANO OSTOA, GREGORIO 2009.** Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 32. Núm. 2. Abr. – Jun.. Pp 111-117. Sociedad Mexicana de Fitogenética. A.C. México.
- REY, ET; AL. 1978.** Micro propagación *in vitro* de Ananas comosus Híbrido MD2. 26 p.
- RECALDE, BASTIDAS, CA; 2007.** Establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de nepeta hederácea variegata [tesis licenciatura]. Universidad Politécnica Militar. Ecuador;. P. 92.
- RAMIREZ VILLALOBOS M, LINDORF H 2004.** García E. Cambios morfo anatómicos del ápice del vástago en banano CIEN BTA-03 y su parental Williams bajo condiciones *in vitro*. Rev Fac Agron (LUZ); 28 (Suppl 1): S62-72.
- RAMÍREZ, M. Y E. SALAZAR. 1997.** Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Rev. Fac. Agrom. (LUZ). 14: 497-506.

**ROSELL CH Y VILLALOBOS, VM 1990.** Fundamento teórico-práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO.

**JP, PANIS ROUX N, TOLOZA A, BUSOGORO B, SROSSE H, LEPOIVRE P, ET AL 2002.** Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. In: Jacome, L.; P. Lepoivre.; D. Marin; R. Ortiz.; R. Romero and J. Escalant (EDS). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José, Costa Rica. 20-23 May 2002, p. 239-50.

**VÁSQUEZ, C.; OROZCO, A.; ROJAS, M.; SÁNCHEZ, E.; CERVANTES, V. 1997.** La reproducción de plantas: semillas y meristemas. Fondo de Cultura Económica. México.

**ZEPEDA, C; SAGAWA, Y. 1981.** *In vitro* propagation of pineapple. Hortscience P.16:495.