

13
29.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

**OBTENCION DE PLANTAS DE PIÑA
(Ananas comosus, (L) Merr) POR
CULTIVO IN VITRO A PARTIR DE
YEMAS AXILARES DE LA CORONA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

INGENIERO AGRICOLA

P r e s e n t a :

Marco Antonio Guzmán Noguera

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
CUADROS DEL APENDICE	V
RESUMEN	VI
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
1. Generalidades del cultivo de la piña	3
1.1. Origen y distribución	3
1.2. Habitat	3
1.3. Descripción botánica	4
2. Importancia y problemática de la piña	6
2.1. Usos	6
2.2. Países productores	7
2.3. Estados productores	9
2.4. Plagas y enfermedades	10
2.5. Variedades	11
3. Propagación vegetativa	13
3.1. Métodos convencionales	13
3.2. Cultivo de tejidos en piña	15
III. MATERIALES Y METODOS.....	21
1. Aspectos generales	21
1.1. Localización	21
1.2. Material vegetativo	21

2. Obtención de inóculos y establecimiento de cultivo aséptico	21
3. Transplante	23
4. Establecimientos de cultivos asépticos	24
4.1. Observaciones y variables a cuantificar	24
4.2. Diseño experimental	24
5. Multiplicación de propágulos	24
5.1. Observaciones y variables a cuantificar	24
5.2. Diseño experimental	26
6. Enraizamiento de brotes	26
6.1. Observaciones y variables a cuantificar	26
6.2. Diseño experimental	27
7. Condiciones de incubación	27
IV. RESULTADOS	28
1. Establecimiento de cultivos asépticos	28
1.1. Porcentaje de brotación	28
1.2. Número de yemas axilares	30
2. Multiplicación de propágulos	30
2.1. Número de yemas por inóculo	30
3. Enraizamiento de brotes	34
3.1. Porcentaje de enraizamiento	34
3.2. Número de raíces	37
V. DISCUSION	42
VI. CONCLUSIONES	48
VII. BIBLIOGRAFIA	50
APENDICE	56

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Principales países productores de piña	8
CUADRO 2. Principales Estados productores de piña	9
CUADRO 3. Principales plagas y enfermedades de la piña	10
CUADRO 4. Resultados del efecto de la benciladenina (BA) sobre la brotación de las yemas axilares de la piña (<u>Ananas comosus</u>) sembrados <u>in vitro</u> después de 42 días de incubación	29
CUADRO 5. Resultados de la prueba de Tukey para la comprobación de medias en la variable número de yemas en la etapa de brotación	29
CUADRO 6. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de medias en la variable número de yemas en la etapa de multiplicación	31
CUADRO 7. Tratamientos utilizados en la etapa de multiplicación de propágulos	32
CUADRO 8. Efecto de tres medios de cultivo y tres tamaños de brotes sobre el % de enraizamiento de los brotes durante el transcurso de 4 semanas de incubación	35
CUADRO 9. Resultados de las pruebas de Tukey para la comparación de medias en la variable número de raíces por brote a los 28 días de incubación	38

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1. Número promedio de yemas axilares obtenidos por pro
pábulos sembrados in vitro utilizando el medio MS
con diferentes tipos de soporte a los 42 días de
incubación 33
- FIG. 2. Efecto de tres medios de cultivo y tres tamaños de
brotes sobre el % de enraizamiento de los brotes
durante el transcurso de cuatro semanas de incuba
ción 36
- FIG. 3. Efecto de las auxinas ANA + AIB y de la concentra
ción de las sales inórganicas de Murashige y Skoog
sobre el enraizamiento de brotes de piña 39
- FIG. 4. Micropropagación de piña a partir de yemas axilares
de la corona. a). Establecimiento de cultivo asé-
ptico, b). Multiplicación, c). Enraizamiento,
d).- Adaptación en invernadero 40
- FIG. 5. Planta de piña (Ananas comosus) Obtenida in vitro
una vez transplantada a suelo de seis meses de
edad 41

APENDICE

- CUADRO 1A. Resultados del análisis de varianza realizados para la variable número de yemas por brote a los 42 días de incubación con BA 57
- CUADRO 2A. Resultados del análisis de varianza realizados para la variable número de yemas después de 42 días de incubación 58
- CUADRO 3A. Resultados del análisis de varianza realizado para la variable número de raíces después de 28 días de incubación 59

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo establecer la metodología in vitro que permita la obtención y propagación de plantas de piña (Ananas comosus (L) Merr), a partir de yemas axilares de la corona.

En el país, la piña alcanza rendimientos de alrededor de 44 ton/ha siendo menor que en otros países como E.U.A. (Hawaii), que supera las 80 to/ha y Puerto Rico con 60 ton/ha (FAO, 1983).

Estos bajos rendimientos son debidos principalmente a que las plantaciones se encuentran infestadas de una gran variedad de patógenos, además de la falta de material vegetativo con calidad seleccionada de lo cual resulta en un decremento gradual en su vigor, calidad y rendimiento.

Yemas axilares a partir de la corona, se aislaron con un mínimo de tejido adyacente de más o menos 1 cm^3 , se sembraron in vitro en un medio de cultivo básico que contenía las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), 0.4 mg/l de tiamina, HCL, 100 mg/l de i-inositol, 3% sacarina y 0.8% de agar. Las condiciones de incubación fueron de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, in tensidad lumínica de 5000 lux y un fotoperíodo de 16 horas.

En la etapa de establecimiento de cultivo aséptico, las coronas se lavaron con detergente y agua. Posteriormente se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio al 10% producto comercial (cloralex) por 60 minutos, se aislaron las yemas axilares de la corona y de nuevo se su-

mergieron en la misma solución desinfectante por 30 minutos. Las yemas se enjuagaron con agua estéril y luego se sembraron in vitro en un medio de cultivo que contenía las sales inorgánicas de Murashige y Skoog diluidas al 50%. Transcurridos 8 días los cultivos aséptico se transplantaron a otro medio de cultivo y los contaminados y oxidados se desecharon. Se utilizaron diferentes concentraciones de bencil adenina (BA), la mejor respuesta para esta etapa se logró utilizando el medio básico con 1 mg/l de BA.

en la etapa de multiplicación de propágulos se logró la mejor tasa de proliferación utilizando 15 ml de medio líquido en frasco gerber en agitación a 120 r.p.m. complementado con 5.4 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) + 5.2 mg/l de ácido indolacético (AIA) + 2.1 mg/l de cinetina (KIN).

Los mejores porcentajes de enraizamiento se obtuvieron al colocar los brotes de 1 cm de longitud en el medio básico de Murashige y Skoog con 0.18 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 0.4 mg/l de ácido indolbutírico (AIB), obteniéndose hasta 13 raíces por brote. Los brotes sembrados en el medio básico sin auxinas mostraron menores porcentajes de enraizamiento desarrollando raíces muy delgadas y hasta de 5cm de longitud.

Al pasar las plantas de las condiciones del Laboratorio a condiciones de invernadero estas desarrollaron sin problema alguno.

La presente metodología permite elevar considerablemente la tasa

de multiplicación de piña, ya que se logra obtener hasta 34 brotes por inóculo sembrado durante 6 semanas de cultivo, pudiéndose producir hasta 2 millones de plantas en 12 meses a partir de un solo brote, en caso de que estos manifiesten una tasa de proliferación constante.

I. INTRODUCCION

En México, el cultivo de la piña ocupa aproximadamente una superficie de 14 mil hectáreas. Oaxaca ocupa el primer lugar entre los estados productores de piña en el país participando con el 40% de la producción nacional, siendo beneficiados aproximadamente 2000 productores.

a nivel internacional, México se encuentra entre los principales países productores, ocupando el sexto lugar. El ingreso de divisas representa además un renglón importante ya que en 1984, la exportación de este frutal generó 187,700,000 pesos.

En el país la piña alcanza rendimientos de alrededor de 44 ton/ha siendo menor que en otros países como E.U.A. (Hawaii), que supera las 80 ton/ha y Puerto Rico con 60 ton/ha (FAO, 1983).

Estos bajos rendimientos son debidos principalmente a que las plantaciones se encuentran infestadas de una gran variedad de patógenos, además de la falta de material vegetativo con calidad seleccionada, lo cual resulta en un decremento gradual en su vigor, calidad y rendimiento.

De tal manera que uno de los problemas fitosanitarios más importantes en el cultivo de la piña, lo constituyen las enfermedades causadas por hongos y bacterias, problemas que se ven favorecidos por la forma tradicional de propagación (coronas, brotes, chupones, renuevos, etc), y por la falta de cuidado en el manejo de material madre, lo cual permite que

las enfermedades se vayan transmitiendo de generación en generación.

Por lo anterior, es de primordial importancia contar con un método de propagación rápido para reproducir suficientes plantas de mejor calidad a fin de incrementar los rendimientos en el cultivo de la piña en nuestro país.

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

HIPOTESIS

- La presencia de una citocinina en el medio de cultivo promoviera la brotación de las yemas axilares.
- Una combinación de auxinas y citocininas aumentaran la proliferación de brotes.
- La presencia de auxinas en el medio de cultivo y un mayor tamaño de brote nos daran un mejor enraizamiento de brotes.

II. REVISION DE LITERATURA

1. Generalidades del cultivo de la piña

1.1. Origen y distribución

La piña (Ananas comosus (L) Merr) es originaria de América del Sur (J. W. Purseglove, 1972). Antes de la llegada de los españoles se extendía hasta las Antillas, México y Centroamérica.

Actualmente son muchos los países de regiones tropicales y sub-tropicales productores de piña, entre los principales se encuentran EUA. (Hawaii), Tailandia, Brasil, Formosa, México, Filipinas, Australia, Costa de Marfil y Guinea, que producen más de las dos terceras partes de la producción mundial (INRA, 1962).

1.2. Habitat

El cultivo de la piña tiene más éxito entre los 100 y 800 msnm en la mayor parte de los trópicos, puesto que la temperatura en esta elvación varía cercana al grado óptimo para el desarrollo, o sea de 21° a 27°C. Las plantas cesan su desarrollo entre los 10°C a 16°C y soportan temperaturas más bajas pero solo durante períodos cortos. Por otra parte, son susceptibles a daños por la transpiración y respiración excesiva a temperaturas muy arriba de los 27°C. Ya que producen frutos más grandes pero de baja calidad, además provocan daños por quemaduras en el fruto.

Como consecuencia de sus sistemas radicales poco profundos y escasos, las plantas de piña requieren cantidades relativamente altas de humedad, pero también que haya un drenaje adecuado. Por esta razón, los suelos arenosos, ricos en materia orgánica, de preferencia bastante ácidos (pH menor de 5.5.) y bajos en sales, son los considerados como los más adecuados. Algunas variedades pueden crecer mejor que otras en suelos arenosos y en ocasiones pueden requerir de una acidez más alta, bajo tales condiciones. Los suelos pesados generalmente se deben evitar principalmente debido a las dificultades que resultan para conseguir una aereación apropiada. El agua estancada o un espejo de agua excesivamente alto puede ocasionar la muerte casi inmediata a la planta; de ahí que resulta conveniente un terreno con buena pendiente, siempre y cuando no sea demasiado pronunciada (Ochse, et al 1980).

La densidad de plantación varía y en años recientes densidades tan altas como 60,000 plantas/ha han sido utilizadas para elevar rendimientos por producción de mayor número de frutos que son individualmente pequeños en comparación con aquellas de menores densidades, por ejemplo, una densidad de 64,000 plantas/ha rinden 118 ton/ha de fruta (Chaoa, et al, 1974).

1.3. Descripción botánica

La piña (Ananas comosus (L) Merr) pertenece a la familia Bromeliaceae, de la cual Bromelia es el género que la tipifica. La mayor parte de las 850 especies que forman la familia epifíticas, comprendiendo las plan

tas áreas que se encuentran creciendo en forma silvestre en las copas de los árboles, pero unas cuantas incluyendo el género Ananas son terrestres.

La piña es una monocotiledónea perenne que a pesar de su habitat terrestre, tiene muchas adaptaciones epífitas: un tallo corto y grueso generalmente menor de 30 cm de altura; un tanto carnoso, tieso en forma de artesa, hojas angostas, 60-120 cm de largo, con base abrazadora, márgenes espinosos aserrados y ápice puntiagudo. La planta entera forma una roseta más o menos plana por arriba que está bien adaptada para captar y retener rocío o lluvia, abajo de las capas epidérmicas de las hojas se encuentran celdas especializadas para almacenar agua. Las raíces son cortas, gruesas, con raíces capilares por toda su longitud y son desarrolladas y regeneradas constantemente de los nudos basales que se encuentran a lo largo del tallo.

Existe un solo punto de crecimiento activo localizado en el ápice del tallo, el cual se diferencia formando la inflorescencia, pero más tarde retoma su carácter vegetativo.

En esta especie, lo que llamamos fruto, es un agregado de frutos denominados botánicamente "sorosis", compuesta de 100 a más flores fusionadas y que es variable en tamaño, forma y sabor, es de color rojo, amarillo-anaranjado o verdoso y se forma en la parte superior de un pedúnculo grueso de 30-60 cm de altura. Se puede notar que la parte comestible del fruto consiste en un raquis muy engrosado que tiene fusionados los ovarios carnosos de las flores (Ochse, et al, 1980).

Cuando el fruto esta desarrollando unas pocas yemas axilares se alargan para formar ramas laterales llamadas brotes, los cuales si se dejan intactos se desarrollan en retoños, las ramas vegetativas llamadas chupones, los cuales son más delgados y tienen hojas más largas que los brotes, se originan de yemas sobre el tallo abajo del suelo, abajo de la inflorescencia las yemas en axilas de hojas cortas de pedúnculo se desarrollan para formar renuevos (Puersglove, 1972).

2. Importancia y problemática de la piña

2.1. Usos

La porción comestible que constituye cerca del 60% de fruto fresco contiene aproximadamente 85% de agua, 0.4 de proteínas, 14% de azúcar, 0.1% grasa y 0.5% de fibra.

El fruto es una buena fuente de vitamina A y B, el jugo contiene sobre base de peso fresco 75-83% de azúcar y 7-9% de ácido cítrico. El fruto también contiene bromelaina, una enzima proteolítica.

Los ésteres 3-metil propianato comprenden una fracción significativa de los componentes volátiles de la piña y han sido adaptados para su uso en saborizantes de piña. Varias lactonas aromáticas también han sido encontradas en la piña, en particular, la gama y delta octalactona y gamma nonalactona (Flath, 1980).

La piña se come como dulce de fruta en los trópicos y subtrópicos y la mayoría del cultivo comercial de piña es usado en la elaboración de conserva en los países productores, el fruto también se hace mermelada y se usa además como fruto cristalizado y congelado.

Las plantas producen una fibra fuerte y sedosa que se usa para fabricar tela fina llamada pina en las Filipinas, en Taiwan también se usa para artillería. En el sureste de Asia los frutos jóvenes inmaduros se utilizan como abortivos. Una forma variegada con rayas verdes, amarillas y rosas se cultivan como ornamental.

por otro lado los desperdicios del enlatado están encontrando uso como aditivo para el ensilado (residuos vegetales semifermentados para alimentar ganado vacuno) y como una fuente de alcohol, azúcar, vinagre y productos similares (Comisión Nacional de Fruticultura, 1974).

2.2. Países productores de piña

La producción Mundial de piña ha mostrado un incremento constante a través de los años. Mucho del incremento se debe a la expansión de la industria de la piña en países en desarrollo.

Los principales países productores de piña son: Tailandia, Filipinas, Brasil, India, U.S.A., México, Costa de Marfil, China, Sudáfrica, Malasia, Ecuador, Australia, Kenia y Colombia (FAO, 1983). Cuadro 1

Cuadro 1. Principales países productores de piña.

P A I S	PRODUCCION (miles) TON.
TAILANDIA	1,439
FILIPINAS	1,300
BRASIL	841
INDIA	660
USA	549
MEXICO	400
COSTA DE MARFIL	350
CHINA	295
SUDAFRICA	237
ECUADOR	234
MALASIA	160
AUSTRALIA	102
KENIA	100
COLOMBIA	96

Anuario estadístico de producción, FAO, 1983.

2.3. Estados productores de piña.

México se encuentra entre los principales países productores de piña, ocupando el sexto lugar a nivel internacional.

Los principales estados productores son: Oaxaca, Veracruz, Nayarit, Tabasco y Jalisco (SARH, DGEA, 1984). Ver cuadro 2.

Cuadro 2. Principales estados productores de piña.

ESTADO	SUPERFICIE Ha	PRODUCCION Ton.	RENDIMIENTO Kg/ha
OAXACA	6.454	380,598	58,971
VERACRUZ	6.454	291,272	48,184
NAYARIT	783	11,152	14,243
TABASCO	420	25,200	60,000
JALISCO	300	16,500	55,000

SARH, DGEA, 1984.

2.4. Plagas y enfermedades.

Uno de los principales problemas a los cuales se enfrenta el cultivo de la piña, es a la incidencia de plagas y enfermedades. Cuadro 3.

Cuadro 3. Principales plagas y enfermedades de la piña.

P L A G A S	
Nombre común	Nombre científico
Piojo o chinche Harinoso	<u>Dysmicoccus brevipes</u> (Cockerell), Ferris
Barrenador del fruto	<u>Thecla basilides</u> (Geyer)
Rata de campo	<u>Sigmodon hispidos</u> (Say)
ENFERMEDADES	
Marchitez por piojo arenoso	<u>Dysmicoccus brevipes</u> (Cockerelle), Ferris
Pudrición de la corona	<u>Phytophthora parasitica</u> (Dast)
Pudrición del cogollo	<u>Phytophthora cinnamoni</u> (Rands)
Pudrición de la base de los retoños y frutos	<u>Thielaviopsis sispaduxa</u> (Deseynes)
Fruto manchado	<u>Erwinia ananas</u> (Linford)
Proredumbre del fruto en la planta	<u>Erwinia carotovora</u> (Jones)

VAZQUEZ PEÑA, A, 1981.

2.5. Variedades comerciales de la piña.

Existe diversidad de variedades conocidas en todo el mundo y un gran número de ellas han sido cultivadas, pero desde el punto de vista comercial pueden ser clasificadas de acuerdo a sus características en los grupos siguientes (Samuels, G., 1970):

1. Grupo Cayena: las hojas son lisas con pocas espinas cerca de la punta (punta espinosa), son de color verde oscuro y de tamaño variable, fruto cilíndrico con ligero ausamiento y con las hojas planas, peso de 2.3 kg en promedio; la corteza es naranja intenso y la pulpa es de amarillo pálido, dulce y ligeramente ácido, con poca fibra y textura ligeramente succulenta.

Esta variedad presenta algunas desventajas; fruto muy delicado por lo que su manipulación después de la cosecha debe ser muy cuidadoso; produce muy pocos hijuelos y con ello muy poco material de propagación lo que dificulta su cultivo (Gajón, 1974).

2. Grupos Spanish: hojas espinosas, forma del fruto globosa con grandes ojos profundos; el peso del fruto es de 0.9 a 1.8 kg; corteza rojo-naranja fuerte, pulpa amarillo pálido con sabor ácido picante y textura fibrosa, los miembros de este grupo se cultivan para la exportación y consumo en fresco.

La planta es vigorosa, produce muchos hijuelos y por lo tanto

se propaga fácilmente; posee mayor resistencia que la Cayena lisa. Cultivares: Red Spanish, Green Slenagor, Singapore Spanish, Castilla y Cabezo na.

3. Grupo Queen: hojas espinosas, fruto cónico, ojos profundos, peso de 0.5-1.5 kg corteza amarilla y pulpa amarilla profundo, dulce y menos ácido que la Cayena. Resiste bien el transporte. Cultivares: Queen Mc. Gregor, Natal, Ripley y Alexandria.

4. Grupo Abacaxi: hojas espinosas, fruta de forma cónica y peso de 1.4 kg en promedio. La corteza es amarilla y la pulpa es de amarillo pálido a blanca, dulce, suave y succulenta. Los frutos no se procesan bien y resisten bien la exportación, pero se cultivan en gran cantidad en Brasil para el consumo en fresco. Cultivares: Perola, Sugar Loaf, Papelon, Abakka, Venezolana y Amarella.

5. Grupo Maypure: hojas completamente lisas con "silvido" (márgenes doblados). Frutos de forma cilíndrica oboides a cilíndricos, peso de 0.8-2.9 kg y tiene una corteza de amarillo a naranja oscuro con pulpa blanca a amarillo profundo. Es más dulce que la Cayena y fibrosa pero suave y succulenta. Cultivares: Maypure, Bumunguesa, Piamba, D' Marquita, Rowdon, Perolera y Montelirio.

Si el cultivo se dedica para productos de exportación se eligan variedades resistentes a largos viajes cuyos frutos maduren parejo para

tener volumen de frutos según la demanda.

En este caso también debe tenerse en cuenta la variedad preferida por el mercado y si ésta es propensa al desarrollo de muchos hijuelos, tienen el inconveniente de disminuir en tamaño sus frutos; en cambio, las que producen pocos, especialmente en el tallo y corona producen frutos de gran tamaño, como ocurre en la variedad "Cayena lisa" (Gajón, 1974).

3. Propagación vegetativa.

3.1. Métodos convencionales.

Excepto en trabajos de mejoramiento, la piña es siempre propagada vegetativamente usando el método siguiente:

- a). Chupones: Se originan a partir de yemas abajo del nivel del suelo
- b). Brotes: Los cuales son ramas frondosas a partir de yemas en las axi las de las hojas
- c). Renuevos: Los cuales nacen del pedúnculo justo abajo o en la base del fruto
- d). Hapas: Los cuales son brotes producidos en la base del pedúnculo
- e). Coronas: A partir de la parte superior del fruto
- f). Tocones: Consistiendo de plantas enteras después que el fruto ha si do cosechado y a partir del cual la base del tallo, raíces, hojas y pedúnculo han sido removidas

Todas estas formas de material de plantación tiene considerable

resistencia a la disección y pueden almacenarse durante varias semanas antes de la plantación, el tiempo tomado al momento de la producción depende del tipo de propágulo usado, es de 15-18 meses (Macroskig, 1939; Purseglove, 1972).

El suministro de material a plantaciones comerciales por este sistema tiene el gran inconveniente de que únicamente se obtienen unas 10-13 plantas por ciclo de cultivo de 18 meses y se tarda, a partir de la corona, 13 años en producir suficiente material para sembrar una hectárea iniciando con una planta simple.

Cualquiera de estos métodos se pueden utilizar para la propagación de la piña, sin embargo, las yemas obtenidas de la corona producen plantas más uniformes que las yemas tomadas de otras partes de la planta y además fructifican más temprano y tienen rendimientos superiores (SIV, 1941).

Este problema ha sido parcialmente solucionado mediante métodos de propagación empleando segmentos de tallos de plantas maduras (Macluskie, 1939), lo que supone una mejora de propagación de la piña y ha sido empleado en todos los países productores (Tkatchenco, 1974, Evans, 1952, Nambiar, 1955; Wang y colaboradores, 1958, Cattoni, 1961; Py y Estanove, 1954, Collins, 1960). Modificaciones de este método fueron introducidas por Brown (1953) al emplear discos de tronco de una pulgada de diámetro.

Otro método más moderno de propagación es de hoja yema, descrito por Seow y Wee (1970) en Malasia y por Clark y col. en el Pineble Research Institute of Hawaii cortando del tronco de la corona las yemas axilares unidas a su correspondiente hoja. Empleando las variedades Española roja y Cayena lisa, se obtiene una producción que dependerá del número de hojas de la corona (de 32 a 56 plántulas a partir de la corona de 100 hojas).

La cantidad de plántulas que se pueden obtener por este sistema es de un 50-60% de las hojas que posea la corona, de los cuales condiciones idóneas (esterilización del sustrato, desinfección óptima de la hoja yema, tipo de sembrado, etc.) sobrevive un 80%, que a los seis meses de cultivo pueden pasar a tierra y a los 18 meses dar fruto. Este sistema es comparativamente superior a los anteriores, ya que se obtienen unas 25 plantitas de la corona, además de los 10-13 hijos aproximadamente que genera la planta madre a los 18 meses.

De todas formas, es insuficiente a la hora de planear una reconversión y no solo en lo concerniente a la producción de material, sino también a la selección de los clones más rentables de cada zona.

3.2. Cultivo de tejidos en piña

Dentro de los métodos de propagación vegetativa está, la técnica

de cultivo de tejidos, cuya aplicación resulta considerablemente ventajosa en la clonación de plantas comparadas con el uso de los métodos convencionales, ya que permite acelerar las tasas de multiplicación en menor tiempo (Murashige, 1974).

Murashige (1978) menciona 3 categorías generales del cultivo de tejidos vegetales relacionados a actividades agrícolas: a). métodos in vitro, que aplican a hibridación, desarrollo de variedades y otras modificaciones genéticas de plantas de cultivo; b). establecimiento de plantas libres de patógenos específicos; c). incremento de la propagación clonal.

De acuerdo a Minocha (1980) hay tres formas comunes en la técnica de cultivo de tejidos para la propagación vegetativa de diferentes plantas:

I. Embriogénesis

II. Organogénesis

III. Yemas axilares

El éxito en la rápida multiplicación a través de la micropropagación de orquídeas y otras especies hortícolas, sugiere que esta técnica es absolutamente ventajosa cuando numerosas plantas de calidad deseable son requeridas. Consecuentemente varios intentos se han hecho para utilizar el método de micropropagación in vitro a partir de organogénesis y yemas axilares para la rápida propagación clonal de piña.

Aghiw y Beauchesne (1960) obtienen pocas plantas a partir de segmentos cultivados in vitro. Mapes (1973) señala parcial éxito, ya que numerosas plántulas de piña (Ananas comosus (L) Merr) Var. Cayena lisa y cuerpos parecidos a protocormos se produjeron a partir de ápices cuando una combinación de la técnica de ápice en orquídeas y el método de callos para la organogénesis fue aplicada secuencialmente. Inicialmente, inóculos de ápices de tallo, tallo y ápice de raíz fracasaron al cultivarse en 42 diferentes medios. Cuerpos meristemáticos como protocormos y plántulas se produjeron a partir de ápices de tallo preagitados en un medio basal de MS más 30 ppm de adenosina y 200 ppm de adenina.

Lakshmi Sita et al (1974) son capaces de producir plantas utilizando vástagos jóvenes de la variedad Kem de 1-1.5 meses de edad, el medio estuvo compuesto por las sales sugeridas por Knudson para las semillas de orquídeas. Varios compuestos como AIA, cinetina, ANA y agua de coco se adicionaron al medio, con 1 ppm de ANA como suplemento fue el mejor, sobre el cual el meristemo inoculado desarrolló racimos de espesas hojas y raíces. Las plantas se subcultivaron en un medio de la misma constitución y después de 12 semanas, éstas desarrollaron robustas plantas que posteriormente se pasaron a macetas.

Mathews y Rangan (1979) señalan la formación de plántulas múltiples a partir de cultivo de yemas laterales de piña, las plántulas se obtuvieron de las yemas axilares usualmente dormantes extraídas de la corona y cultivadas en un medio de MS (1962) suplementado con AIA + AIB+ KIN. La agitación de los vasos de cultivo durante el cultivo incrementó significativamente el número de brotes múltiples formados. Un triple incremen

to en el número de brotes múltiples por cultivo en comparación con cultivos estacionarios fue observado. Los brotes múltiples cuando se aislaron y transfirieron a un medio fresco de la misma composición con agitación continua, otra vez desarrollaron brotes múltiples. Este ciclo puede repetirse varias veces resultando en un gran número de plantas. Los brotes cuando se transfieren al medio de MS conteniendo bajas concentraciones de ANA y AIB, desarrollaron raíces y crecieron plántulas que posteriormente fueron transferidas a suelo.

Cultivos de callos se establecieron también a partir de plántulas obtenidas in vitro, logradas de las yemas laterales de un cultivar comercial, cultivadas en un medio conteniendo sales de MS+ ANA+ AIB + K fueron utilizados para la iniciación de callos. Yemas brotadas con 4-6 hojas se extirparon y cultivaron en un medio MS con varias concentraciones de auxinas (AIA, AIB, ANA y 2, 4 D), citocininas (BA y K) y extractos naturales tales como agua de coco. Los brotes se colocaron sobre papel filtro, resultando mejor el medio MS fortalecido con caseína hidrolizada, agua de coco y ANA, tales cultivos de callos cuando se transfirieron a un medio desprovisto de cualquier regulador de crecimiento generaron plántulas (Mathews and Rangan, 1981). Explantes de hojas extirpadas de plántulas in vitro también desarrollaron un callo capaz de regenerar plántulas (Mathews and Rangan, 1982). Las observaciones de Wakasa et al (1979) son un poco similares a aquellas de Mapes (1972). Varios explantes tales como simcarpio joven, yemas axilares de los chupones o renuevos, pequeñas coronas en cultivo produjeron una masa similar a un protocolo que creció vigorosamente y subsecuentemente se diferenció en plántulas.

Wakasa (1979) observa muchas variantes entre las pláculas regeneradas en relación a espinas, color de hojas y densidad del follaje. La frecuencia y distribución de estas variantes parece estar relacionada a la fuente del inóculo. Mientras el síncarpio y renuevos desarrollaron variantes en alta frecuencia, la corona y yemas axilares los hicieron así solo en una pequeña cantidad.

Zepeda y Sagawa (1981) han señalado también la formación de brotes laterales de piña utilizando el medio MS con 25% de agua de coco, subcultivados después de 2 semanas en el medio MS con las sales diluidas a la mitad con 25% de agua de coco y finalmente colocadas en el medio de MS con las sales diluidas y suplementado con BA. Ellos sugieren que al menos 5000 plántulas pueden ser producidas en 12 meses a partir de una simple corona.

Panetier y Lanand (1976) estiman que puede ser posible producir 2 millones de plantas a partir de una simple corona en 2 años. Drew (1980) señala que el mejor material para disección es el de yemas axilares localizadas en la base de las hojas. Solo un porcentaje de esas yemas crecen así que es mejor obtener las yemas a partir de material de crecimiento activo como renuevos y chupones, ya que las partes de arriba (coronas) pueden usarse, pero el % de yemas sobrevivientes puede ser tan bajo como un 10%. La multiplicación se incrementa cuando el medio es cambiado y se vence la dominancia del brote para así estimular el desarrollo de yemas múltiples, esto se logra cortando a través de la yema apical y produciendo dos partes iguales, siendo posible producir 100,000 plantas a partir de un brote en 12 meses.

Tingwenpuh et al (1975) obtienen plantas de piña a partir de tejidos extirpados de callo conteniendo yemas laterales, los cuales fueron cultivados sobre medio basal sólido (macroelementos de Vacin y Went y microelementos de Murashige y Skoog), complementado con AIA y cinetina en concentraciones de 1 ppm. El número de yemas emergidas del tejido depende de la variedad y del vigor de la planta donadora.

Srinivash Rad et al (1980), obtienen la regeneración de plántulas en callos de embriones híbridos (Kem y Queen) de piña. Un promedio de 10-25 plantas se obtuvieron a partir del callo de un embrión híbrido.

La técnica de cultivo de tejidos debe usarse con precaución en cuanto a que a veces hay dificultad en la producción de plantas tipo. Algunas plantas obtenidas a través de cultivo de tejidos han mostrado variación genética y la incidencia de plantas aberrantes se han observado que se incrementa con repetidos subcultivos así como mantener el material -- in vitro por mucho tiempo Jeanne et al (1974).

III. MATERIALES Y METODOS

1. Aspectos generales

1.1. Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia, en la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Edo. de México.

1.2. Material vegetativo

Para la realización del presente trabajo se utilizaron "coronas" de planta de piña (Ananas comosus (L) Merr) de la variedad Cayena lisa".

Las coronas utilizadas provinieron de materil quince días después de haber cosechado, posteriormente se tuvo este material en el invernadero por un período de un mes, aplicandoseles cpatan y agrimicín 2 gr/l cada ocho días, antes de cortar y sembrar los inóculos en el medio de cultivo.

2. Obtención de inóculo y establecimiento del cultivo aséptico

Para su desinfección, los tallos (coronas) son desprovistos de todas las hojas, posteriormente se lavan con agua y detergente comercial.

En seguida los tallos se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al .6%, utilizando para ello el producto comercial cloralex diluido al 10%, durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se procede a lavar el tallo con agua destilada y esterilizada tres veces.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico Wild M5 a 40x se identificaron las yemas axilares y con un bisturí y pinzas se aislaron éstas con un mínimo de tejidos adyacente de $\pm 1 \text{ cm}^3$. Una vez extraídas las yemas, éstas se sumergieron nuevamente en una solución de hipoclorito de sodio al .6%, utilizando para ello el producto comercial cloralex diluido al 10% durante 30 minutos.

Finalmente las yemas se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada, colocándolas en cajas Petri con agua estéril para evitar su deshidratación. A partir de la desinfección de las yemas en hipoclorito de sodio, el material vegetativo se manejó bajo condiciones asépticas en una cámara de aire de flujo laminar filtrado.

Los instrumentos de disección tales como bisturí y pinzas se sumergieron en alcohol al 96% y se flamearon antes del corte y siembra de cada inóculo en el medio de cultivo.

Primeramente se realizó una presiembra, utilizándose tubos de ensayo (150 x 25 mm) conteniendo 5 ml de medio de cultivo que contenía las sales inorgánicas de Murashige y Skoog diluidos al 50%, transcurridos 8 días las yemas contaminadas y oxidadas se desecharon y los cultivos

asépticos se transplantaron a otro medio de cultivo, bajo condiciones asépticas.

Las yemas de cultivos asépticos se sembraron en tubos de ensaye (150 x 25 mm) conteniendo 25 ml de medio de cultivo preparado de la forma siguiente: se emplearon las sales inórganicas de Murashige y Skoog suplementado con 0.4 mg/l de tiamina, 100 mg/l de i.inositol, 3% de sacarosa, el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con HCl. IN o NaOH, más 0.8% de agar como gelificante.

La esterilización del medio se realizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 1.5 Kg/cm² de presión durante 15 minutos.

Después de sembrar los inóculos en el medio de cultivo, los tubos fueron tapados con tapones de polipropileno y entre el tubo y el tapón se colocó alrededor una cinta de parafilm.

3. Transplante

Las yemas se transplantaron a tubos de ensaye (150 x 25 mm) conteniendo el medio básico con las sales inórganicas de Murashige y Skoog, 0.4 mg/l de tiamina, 100 mg/l de i.inositol, 3% sacarosa, 0.8% de agar y reguladores de crecimiento, el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 .

Los tratamientos con reguladores de crecimiento constó de tres etapas establecidas en el orden siguiente:

- a). Establecimiento de cultivos asépticos
- b). Multiplicación de propágulos
- c). Enraizamiento de brotes

4. Establecimiento de cultivos asépticos

4.1. Observaciones y variables a cuantificar

Para la brotación de yemas se probó el medio de cultivo de Murashige y Skoog, complementado con benciladenina, producida por Sigma Chemical Company; en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y 5 mg/l cada tratamiento constó de 20 repeticiones.

La variable observada durante esta etapa fue la siguiente: % de brotación.

4.2. Diseño experimental

Con los datos tomados en la última semana se hizo el análisis de resultados de esta variable mediante la transformación de datos, utilizando un diseño completamente al azar, para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey.

5. Multiplicación

5.1. Observaciones variables a cuantificar

La etapa de multiplicación de propágulos tuvo como principal objetivo obtener la formación de yemas axilares en los brotes.

Los brotes obtenidos en el establecimiento de cultivos asepticos se transplantaron al medio de MS complementado con 5.4 mg/l de ácido nafenacético (ANA), 5.2 mg/l de ácido indolacético (AIA) y 2.1 mg/l de tinetina (K). Después de haberse realizado pruebas de comparación en el Laboratorio, señaladas como mejor por la literatura y determinandose así las mejores concentraciones de reguladores, estudiandose los factores siguientes:

1. 0.8% de agar
2. 0.2 % gelritte
3. 10 ml de medio líquido en frasco Gerber de 100 ml en agitación a 120 rpm
4. 15 ml de medio líquido en frasco Gerber de 100 ml, en agitación a 120 rpm
5. 20 ml de medio líquido en frasco Gerber de 100 ml, en agitación a 120 rpm
6. 20 ml de medio líquido estacionario, en frasco Gerber con puente Heller
7. 20 ml de medio líquido estacionario en frasco Gerber con puente Heller modificado

Se utilizaron 10, 15, 20 ml de medio de cultivo para observar el

efecto de la cantidad de medio sobre brote y así determinar la mejor.

En cada tratamiento se utilizaron 20 repeticiones, la variable a observar durante esta etapa fue: número de brotes por inóculo.

Con los datos de las variables estudiados, obtenidos en la última semana de observación de cada subcultivo se obtuvo la media aritmética y el error estándar de la media para construir cuadros y graficas.

5.2. Diseño experimental

Con los datos obtenidos de la variable número de brotes por inóculo, tomados en la última semana se hizo el análisis de varianza mediante un diseño factorial en completamente al azar. Para la comparación de medias se empleo la prueba de Tukey.

6. Enraizamiento de brotes

6.1. Observaciones y variables a cuantificar

Para la etapa de enraizamiento de brotes se utilizaron los tratamientos siguientes: a). medio MS con las sales diluidas al 50%; b). MS con sales al 50% + ANA (0.18 mg/l) + AIB (0.4 mg/l); c). MS con las sales al 100% + ANA (0.18 mg/l) + AIB (0.4 mg/l), utilizando tres diferentes longitudes de brotes en cada uno de los factores estudiados:

a). Brote chico (0.5 cm)

b). Brote mediano (0.7 cm)

c). Brote grande (1.0 cm)

Durante esta etapa se tomaron datos semanales hasta la cuarta semana y se estudiaron las variables siguientes: porcentaje de enraizamiento y número de raíces.

Con los datos obtenidos en la última semana de observación de la variable % de enraizamiento y número de raíces, se obtuvo la media aritmética y el error estándar de la media.

6.2. Diseño experimental

Con los datos de la última semana de las variables % de enraizamiento y número de raíces se hizo el análisis de varianza mediante un diseño factorial completamente al azar.

Para la comparación de la media se empleó la prueba de Tukey.

7. Condiciones de incubación

Las etapas de brotación, multiplicación de propágulos y enraizamiento de brotes se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado con iluminación de luz fluorescente de lámparas marca Phillips a una intensidad de 5000 lux, manteniéndose un fotoperíodo de 16 hrs. luz y 8 de oscuridad, la temperatura fue de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 60 - 70%.

IV. RESULTADOS

1. Establecimiento de cultivos asépticos

1.1. Procentajes de brotación

Después de 42 días de incubación de los inóculos en el medio básico en las diferentes concentraciones de benciladenina (BA) se encontraron diferencias en los porcentajes de brotación resultando un mayor porcentaje de brotación al agregar 1 mg/l de benciladenina (BA). Al utilizar sales inorgánicas de Murashige y Skoog sin reguladores mostró un comportamiento similar cuando se adicionó 0.5 mg/l de benciladenina al medio de cultivo, sin embargo, al incrementar la concentración a 3 mg/l de benciladenina el porcentaje de brotación disminuye, siendo totalmente inhibitorio a la concentración de 5 mg/l de benciladenina (cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados del efecto de la benciladenina (BA) sobre la brotación de las yemas axilares de piña (Ananas comosus) sembradas in-vitro después de 42 días de incubación.

TRATAMIENTO	BA (mg/l)	No. inóculos	% Brotación
1	0.0	20	15
2	0.5	20	15
3	1.0	20	25
4	3.0	20	10
5	5.0	20	0

Cuadro 5. Resultados de la prueba de TUKEY para la comprobación de medias en la variable número de yemas en la etapa de brotación.

TRATAMIENTO	MEDIA
3	1.43 a
1	1.09 b
4	1.07 b
2	1.06 b
5	1.00 b

+ Promedios con igual letra dentro de columnas son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$) prueba de TUKEY.

1.2. Número de yemas axilares

En la variable número de yemas axilares formadas por inóculos, se encontraron diferencias significativas de respuesta entre las diferentes dosis (cuadro 1 A). Obteniéndose el mayor número de yemas axilares al utilizar 1 mg/l de benciladenina (cuadro 5). Los tratamientos con 0,0, 0,5 y 3 mg/l de benciladenina no mostraron diferencias estadísticas. Sin embargo, al utilizar 5 mg/l de benciladenina (BA) resultó ser inhibidora completamente para la brotación de yemas axilares (cuadro 4).

2. Multiplicación de propágulos

2.1. Número de yemas por inóculo

Los resultados señalan que el medio básico complementado con 5.4 mg/l de ANA, 5.2 mg/l AIA y 2.1 mg/l de K, fue el adecuado. En estas condiciones se probaron diferentes soportes como son: agar, gelritte, 10, - 15 y 20 ml de medio líquido en agitación a 120 rpm y 20 ml de medio líquido estacionario utilizando dos diferentes tipos de puentes (cuadro 7).

El número de yemas axilares originadas por inóculo en cada uno de los diferentes tratamientos, mostraron diferencias significativas de respuesta entre tratamiento (cuadro 2 A). El número de yemas fue mayor al utilizar 15 ml de medio líquido en agitación a 120 rpm disminuyendo el número de estas al utilizar 10 y 20 ml de medio líquido en agitación - (figura 1). Sin embargo, no mostraron diferencias significativas, al com

parar dos tipos de gelificantes, agar y gelrite, el número de yemas aumentó al utilizar el segundo, no encontrándose diferencias significativas entre estas.

Resultando el menor número de yemas por tratamiento al comparar 20 ml de medio de cultivo líquido estacionario con dos diferentes tipos de puentes, no encontrándose diferencias significativas entre ellos (cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de medias en la variable número de yemas en la etapa de multiplicación.

TRATAMIENTOS	MEDIA (\bar{x}) NUMERO DE YEMAS POR BROTE
4	34.600 a
5	33.650 a
3	27.550 a
2	24.750 a b
1	14.450 b c
6	4.250 c
7	3.500 c

Cuadro 7. Tratamientos utilizados en la etapa de multiplicación de propágulos

1.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ Agar
2.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ Gelritte
3.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ 10 ml en agitación a 120 rpm
4.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ 15 ml en agitación a 120 rpm
5.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ 120 ml en agitación a 120 rpm
6.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ 20 ml es- tacionario puente 1
7.	MS + ANA + (5.4 mg/l) +AIA (5.2 mg/l) + KIN (2.1 mg/l)	+ 20 ml es- tacionario puente 2

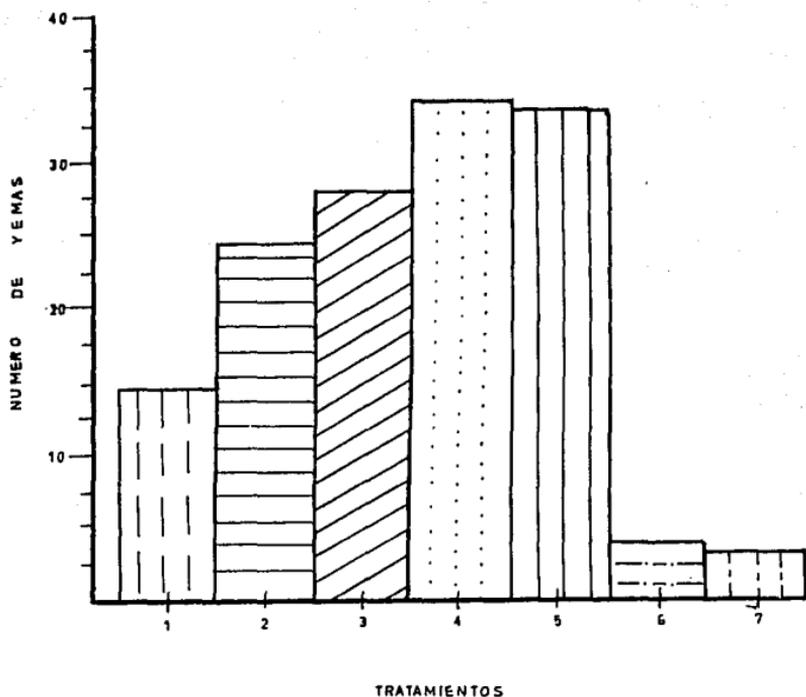


FIG 1. NUMERO PROMEDIO DE YEMAS AXILARES OBTENIDAS POR PROPÁGULOS SEMBRADOS INVITRO UTILIZANDO EL MEDIO M5 CON DIFERENTES TIPOS DE SOPORTE A LOS CUARENTAY DOS DÍAS DE INCUBACIÓN.

3. Enraizamiento de brotes

3.1. Porcentaje de enraizamiento

Al transplantar los brotes de 0.5, 0.7 y 1.0 cm de longitud del medio de multiplicación de propágulos a los tratamientos de enraizamiento, se obtuvieron variaciones dentro de cada uno de los tratamientos en el tiempo de formación de raíces, observándose enraizamiento de los brotes desde los 7 a los 28 días.

El tratamiento con sales al 50% y con brotes de longitud de 0.5, 0.7 y 1.0 cm se obtuvo enraizamiento a los 7 días, siendo menor el porcentaje de estas en brotes de 0.5 cm la diferencia se mantuvo hasta el final del tratamiento, donde los brotes de 0.5 cm de longitud presentaron un 80% de enraizamiento, siendo de 100% para brotes de 0.7 y 1.0 cm de longitud.

Al añadir auxinas al medio de cultivo el porcentaje de enraizamiento disminuyó en la primera semana, sin embargo, a la tercera semana los porcentajes de enraizamiento ya eran mayores que en el tratamiento anterior, siendo en la cuarta semana del 95% para brotes de 0.5 cm de longitud y para brotes de 0.7 y 1.0 cm de longitud el porcentaje de enraizamiento era del 100%.

El porcentaje de enraizamiento fue mayor cuando la concentración de sales se incrementó al 100% con la adición de auxinas, obteniéndose un 100% de enraizamiento en los diferentes tipos de longitud (cuadro 8 Fig. 2).

Cuadro 8. Efecto de tres medios de cultivo y tres tamaños de brotes sobre el % de enraizamiento de los brotes durante el transcurso de 4 semanas de incubación.

MEDIO DE CULTIVO	TAMAÑO DE BROTE (cm)	DÍAS DE INCUBACION			
		7	14	21	28
		% de enraizamiento			
MS (50%)	0.5	5	50	65	80
	0.7	25	40	55	100
	1.0	70	100	100	100
MS (50%) + ANA (0.18 mg/l) + AIB (0.4 mg/l)	0.5	0	50	80	95
	0.7	5	70	100	100
	1.0	45	100	100	100
MS + ANA (0.18 mg/l) + AIB (0.4 mg/l)	0.5	0	70	100	100
	0.7	0	100	100	100
	1.0	65	100	100	100

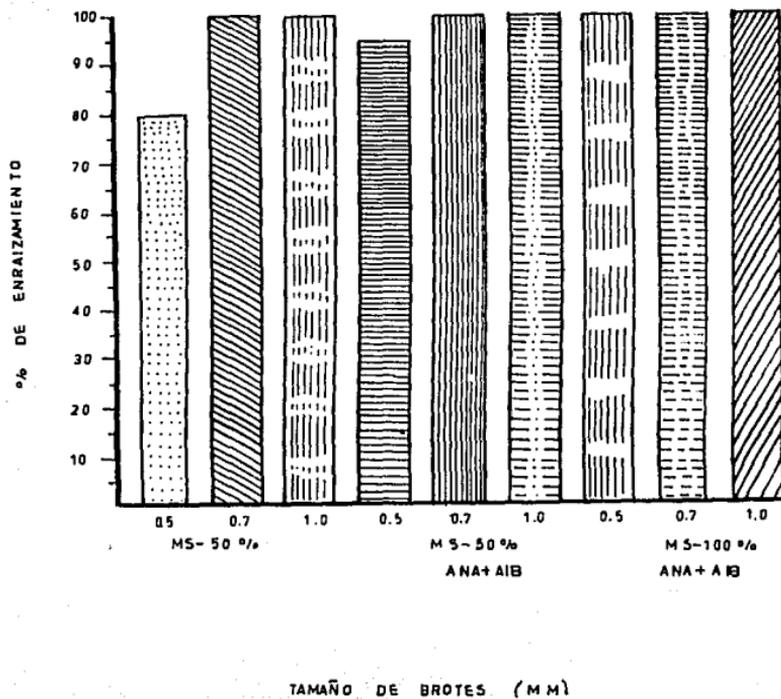


FIG 2. EFECTO DE TRES MEDIOS DE CULTIVO Y TRES TAMAÑOS DE BROTES SOBRE EL % DE ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES DURANTE EL TRASCURSO DE CUATRO SEMANAS DE INCUBACIÓN

3.2. Número de raíces

En la variable número de raíces formadas por brotes se encontraron diferencias significativas entre los diferentes medios, así como por longitud del brote (cuadro 3 A). Se observó que el número de raíces obtenidos fue menor en el tratamiento sales al 50% con brotes de 0.5 cm de longitud, obteniéndose 1.6 raíces por brote, aumentando ligeramente el número de estas a medida que la longitud del brote aumenta. Al utilizar sales al 50% con la adición de auxinas el número de raíces en brotes de 1.0 cm de longitud disminuyó ligeramente con relación al tratamiento con sales al 50%. Al utilizar sales al 100% suplementado con auxinas el número de raíces aumenta hasta 8.3 raíces en brotes de 0.5 cm de longitud obteniéndose la mayor respuesta con brotes de 1.0 cm de longitud lográndose hasta 13.3 raíces por brote (cuadro 9, figura 3).

Cuadro 9. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de medias en la variable número de raíces por brote a los 28 días de incubación.

MEDIO DE CULTIVO	TAMAÑO DE BROTE (cm)	NUMERO DE RAICES (\bar{X})
MS + AUXINAS	1.0	13.300
MS + AUXINAS	0.7	8.700
MS + AUXINAS	0.5	8.350
MS (50%)	1.0	4.250
MS (50%) + AUXINAS	1.0	3.950
MS (50%) + AUXINAS	0.7	2.200
MS (50%)	0.7	2.150
MS (50%) + AUXINAS	0.7	1.650
MS (50%)	0.5	1.650

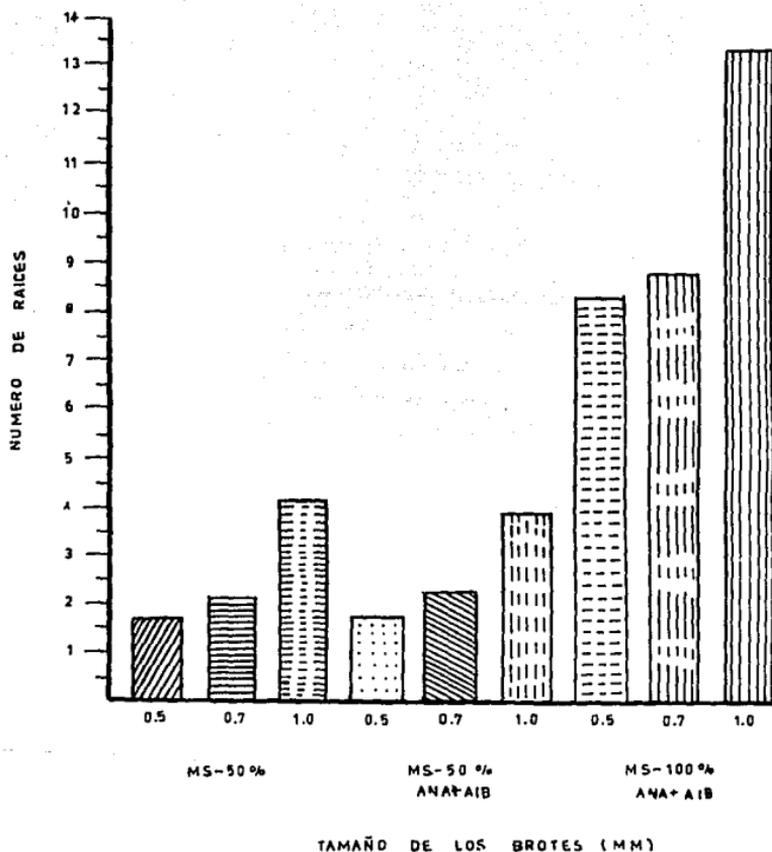


FIG. 3. EFECTO DE LAS AUXINAS ANA+AIB Y DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS SALES INORGANICAS DE MURASHIGE Y SKOOG SOBRE EL ENRAIZAMIENTO DE BROTES DE PIÑA.

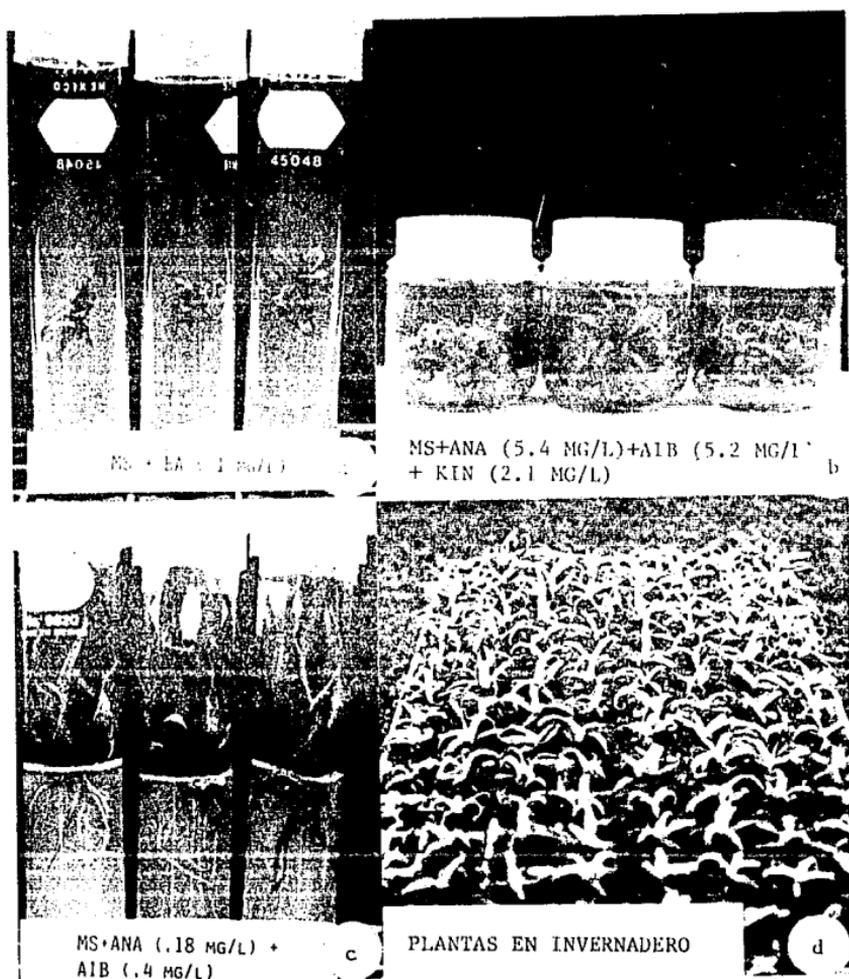


FIG. 4. Micropropagación de piña a partir de yemas axilares de la corona. a).- Es tablecimiento de cultivo aséptico. b).- Multiplicación, c).- Enraizamiento, d).- Adaptación en invernadero



FIG. 5 PLANTA DE PIÑA (Ananas comosus) OBTENIDA in-vitro UNA VEZ TRASNSPLANTADA A SUELO DE SEIS MESES DE EDAD.

V. DISCUSION

Uno de los problemas que se presentan en la propagación de piña por cultivo in vitro es la contaminación por hongos y bacterias de los inóculos. Sin embargo, en la presente investigación está se logró disminuir realizando pretratamientos con fungicidas y bactericidas cada ocho días durante un mes bajo condiciones de invernadero.

La desinfección en el laboratorio fue similar a la utilizada por Zepeda (1980). En donde las coronas defoliadas y sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (10% de cloralex) por un tiempo de 60 minutos y una vez extirpadas las yemas axilares estas se vuelven a sumergir en la misma solución desinfectante por un tiempo de 30 minutos, obteniéndose mayor porcentaje de cultivo aséptico.

Mathews et al (1979) utilizando el medio de cultivo MS complementado con ANA (1.8 mg/l) + AIB (2.1 mg/l) + KIN (2.0 mg/l) para el establecimiento de cultivo aséptico obtuvieron brotación de las yemas en dormancia de la corona de la piña.

Zepeda et al (1981) trabajando con el medio de cultivo MS con 25% de agua de coco realizando un subcultivo después de 2 semanas en el medio de cultivo MS a la mitad de la concentración de sus sales inorgánicas complementado con 0, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg/l de benciladenina lograron brotación de sus yemas, sin embargo, al igual que Mathews et al (1979) no reporten el porcentaje de brotación obtenido.

En la presente investigación para la etapa de establecimiento de cultivo aséptico de yemas axilares de la corona, sin utilizar agua de coco ni realizando subcultivos, como los utilizados por Zepeda (1981). Así mismo utilizando un medio de cultivo más simple que el utilizado por Mathews (1979) logramos obtener la brotación de las yemas hasta en un 25% utilizando 1 mg/l de benciladenina. Comparativamente se obtuvieron mejores resultados que el testigo donde el porcentaje de brotación fue solamente del 10%.

Así mismo trabajando con 1 mg/l de benciladenina se obtuvieron brotes múltiples resultados que superaron a los obtenidos por Tingwen et al (1975) quien trabajó con los macroelementos de Murashige y Skoog complementado con 1 ppm de ANA y Kinetina más 20% de agua de coco que obtiene solamente un solo brote por inóculo.

Por otro lado muchas yemas no brotaron debido a la oxidación del tejido, sin embargo los porcentajes de brotación logrados fueron superiores a los obtenidos por Drew (1980) quien menciona que el porcentaje de sobrevivencia de yemas de la corona puede ser tan bajo como un 10%.

Al utilizar concentraciones de 5 mg/l de benciladenina, hay una total inhibición en los porcentajes de brotación y desarrollo de brotes. Lo cual coincide con lo que menciona Mapes (1981) en cuanto a que las altas concentraciones de citocininas tienden a ser tóxicas o bien promueven malformaciones en los tejidos cultivados in vitro.

En la etapa de multiplicación de propágulos se obtuvo un mayor número de brotes en comparación con la etapa de establecimiento de cultivo aséptico este aumento pudo haber sido debido al aumento y combinación de auxinas y citocininas.

Tingwen et al (1975) utilizando un medio líquido modificado obtuvieron plantas. Drew (1980) logró obtener 30-50 plantas en un mes trabajando con yemas axilares de la corona.

Nosotros utilizando un medio de cultivo similar a Mathews et al (1979) comparando medio líquido en agitación y estacionarios no fue posible superar esos resultados, posiblemente esto se haya debido a las condiciones de cultivo y al manejo de material vegetativo, así como a las variedades utilizadas. Los resultados mostraron diferencias en la capacidad de multiplicación de brotes, lo que coincide con lo que menciona Vastey - (1962) que señala que la gran variación en respuesta se puede observar no solo de una especie a otra, sino de una variedad a otra dentro de individuos de una misma variedad, lo que muestra la influencia de los factores genéticos y fisiológicos y por otro lado la falta de aclimatación de los cultivos a las condiciones in vitro. Zimmeman y Broone (1981) citando a Mecown y Amos (1979) quienes indican que cuando se obtiene la aclimatación de los cultivos a condiciones in vitro existe una rápida y uniforme proliferación de brotes.

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 15 ml de medio lí

quido en agitación produciendo hasta 34 brotes, sin embargo, se observó la aparición de masas de callo, lo cual se debe evitar la propagación vía callo debido a que las plantas obtenidas pueden no ser genéticamente iguales a causa de la inestabilidad cromosómica Murashige (1974). Al utilizar medio líquido estacionario con puente de papel Heller los resultados obtenidos mostraron una tasa de multiplicación muy baja. Esto pudo haberse debido a que el tejido no estaba en contacto directo con el medio de cultivo por lo que hubo una deficiente absorción de sustancias que no le permiten llevar a cabo una brotación de yemas. Sin embargo en este tratamiento se observó la presencia de raíces cortas lo cual indica que el brote estaba respondiendo a las auxinas producidas en el brote, las cuales se producen en el ápice de brote inhibiendo el crecimiento de yemas laterales.

Al utilizar medios sólidos disminuyó la brotación de yemas, sin embargo, este número puede aumentar rompiendo la dominancia apical del brote principal que se presentó. Drew (1980) menciona que se estimula la producción de yemas múltiples al vencer la dominancia apical mediante una disección vertical del brote, cortando a través de la yema apical.

En la etapa de enraizamiento, utilizando tres diferentes tratamientos no solo se observó una diferencia en la cantidad de raíces sino también un cambio en las características de las mismas.

Trabajando con un medio de cultivo similar al probado por Mathews

et al (1979) y una longitud del brote recomendado por Tingwen et al (1975) logramos un 100% de enraizamiento obteniendo 13 raíces por brote en dos semanas. Comparativamente se obtuvieron mejores resultados pues se logro un excelente enraizamiento en un menor tiempo y con un medio de cultivo menos complejo.

Sin embargo, trabajando con el medio de cultivo probado por Zepeda (1981) el porcentaje de enraizamiento disminuyó así mismo el número y calidad de las raíces fueron inferiores debido a que estos eran raíces de hasta 5 cm de largo y muy delgadas con lo cual se tiene problemas con las plantas a la hora de pasarlas a macetas pues las raíces al ser largas y fragiles se rompen con facilidad y por otro lado dificultan su transplante.

Tal vez esto es debido a que los apices de las raíces producen citoquinas que inhiben la formación y desarrollo de nuevas raíces llevando se así un efecto de dominancia apical.

La presencia de auxinas en el medio de cultivo nos originó un mayor número de raíces y más vigorosas permitiendo un mejor desarrollo del brote. Esta disminución en la longitud de las raíces en presencia de auxinas coincide con lo señalado por Chadwick y Bora (1967, 1970) quienes encontraron que la inhibición del crecimiento de estas es debido principalmente a la presencia de etileno, el cual es sintetizado por las plantas cuando se aplican auxinas al medio de cultivo.

Esta mayor vigorosidad y disminución de longitud de raíces ha sido favorable para el acondicionamiento de nuestras plantas a suelo ya que las raíces no sufren daños físicos al sacarlas del medio, presentan mayor facilidad de trasplante y una rápida recuperación, lográndose un 100% de sobrevivencia bajo condiciones de invernadero.

CONCLUSIONES

El pretratamiento del material vegetativo con fungicidas y bactericidas durante un mes bajo condiciones de invernadero permite obtener mayor porcentaje de cultivo aséptico.

En la etapa de establecimiento de cultivo aséptico, los mejores resultados se lograron utilizando 1 mg/l de benciladenina (BA).

Al utilizar concentraciones de 5 mg/l de BA ésta resulta ser completamente inhibitoria para la brotación de las yemas axilares.

Durante la etapa de multiplicación de propágulo se obtuvieron los mejores resultados al utilizar 15 ml de medio líquido en agitación a 120 rpm. Sin embargo, en este tratamiento se observó la presencia de una masa callosa.

Utilizando medios sólidos hay buena brotación de yemas pudiendose incrementar rompiendo la dominancia apical del brote principal.

Al transplantar los brotes en el medio básico con auxinas los mayores porcentajes de enraizamiento se lograron utilizando brotes de 1 cm de longitud con 0.18 mg/l de ácido naftalínacético (ANA) más 0.4 mg/l de ácido indolbutírico (AIB). Lograndose enraizamiento en 2 semanas.

Utilizando el medio básico sin auxinas se formó un número reducido de raíces, escasa consistencia y hasta 5 cm de longitud.

El potencial de la metodología de propagación in-vitro propuesta en el presente trabajo es de 2 millones de plantas en 12 meses a partir de un solo brote.

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que es posible la obtención y propagación de plantas de piña (Ananas comosus) por cultivo in vitro a partir de yemas axilares de la corona. El uso de esta metodología permite aumentar el potencial de propagación vegetativa en comparación con el método convencional.

VII.- BIBLIOGRAFIA

1. AGHION, D. AND BEAUCHESENE, G. 1960. Utilisation de la technique de culture sterile d' organes pour obtenir des elones de' Ananas. Fruits 15: 464 - 466.
2. BROWN, F. B. 1953. Pineapple varieties and selection in Malay. Agricultural Journal, 36: 237 - 246.
3. BAKER, K. AND COLLINS, J. L. 1939. Notes on the distribution and ecology of Ananas and Pseudoananas in South America. Am. l. But. 26: 697 - 702.
4. CHADHA, K. L., MELANTA, K. R., AND SHIKAMANY, S. D. 1974. High density planting increases pineapple yields. Indian Hortic. 18: 3-5.
5. COMISION NACIONAL DE FRUTICULTURA. 1974. Folleto (Hoja de Divulgación) México.
6. COLLINS, J. L. AND CARTER, W. 1954. Wilt Resistant mutations in the cayyener variety of pineapple. Phytopath. 44 (6): 662 - 666.
7. DREW, R. A. 1980. Pineapple tissue culture unegualed for rapid multiplication. Queensland Agricultural Journal. Sept. - Oct. 447-451.

8. EVANS, H. R. 1952. Pineapple propagation. E. Afr. Agricultural Journal. 17: 179-182.
9. FLATH, R. A. 1980. Pineapple In: Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses (S. Nagy and P. E. Shaw, eds.). pp 157 - 187. AVI pub., Westport, Connecticut.
10. FAO, 1983. Anuario Estadístico de producción.
11. GATTONI, L. A. 1961. Nuevo método de propagación de la piña. Ceiba 9: 13 - 20.
12. GAJON, S. L. 1947. Cultivo de la piña. México.
12. HUSAKI, T. AND ASAHIRA, T. 1980. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. Hort. Science 15: 603 - 604.
14. INRA. 1968. Piña. Instituto Nacional de la Reforma Agraria. La Habana. Normas técnicas para el cultivo de la piña. Folleto 5.977.
15. JONES, J. B. AND MURASHIGE, T. 1974. Tissue culture propagation of Aechmea fasciata Baker and other bromeliads. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 24: 117 - 126.
16. KNIGHT, R. Jr. 1980. Origin and world importance of tropical and sub-

- tropical fruits: Composition, properties and uses (S. Nagy and P. E. Shaw, eds.) pp, 1-120. AVI pub, Westport, Connecticut.
17. LAKSHMI, G., SINGH, R., AND IYER, C. P. 1974. Plantlets through shoot tip culture in pineapple. *Curr. Sc.* 43:724.
 18. MACLUSKIE, H. 1939. Pineapple propagation: A New method in Sierra Leone. *Trop. Agric. (Trinidad)* 16:1920193.
 19. MAPES, M. O. 1973. Tissue culture of bromeliads. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 23: 47-55.
 20. MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant.* 15, 473-497.
 21. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
 22. MURASHIGE, T. 1978. The impact of plant tissue culture in agriculture in frontiers of plants tissue culture. Trevor A. Thorpe (ed) Calgary, Alberta, Canada, pp. 15-26.
 23. MATHEWS, U. H., RANGAN, T. S. Y NARAYANASWANY, S. 1976. Micropropagation of Ananas sativus in vitro *Z. pflanzenphysiol.* 79:450-454.

24. MATHEWS, U. H. y RANGAN, T. S. 1979. Multiple plantlets in lateral, buds and leaf explants in vitro cultures of pineapple. *Scientia Horticulturae*. 11: 319-328.
- 25.- MATHEWS, U. H. y RANGAN, T. S. 1981. Growth and regeneration of plant in callus cultures of pineapple, *Scientia Horticulturae* 14: 227-234.
26. MINOCHA, C. S. 1980. Cell and tissue culture in the propagation of fures trees. In plant cell culture, results and perspectives. F. Sala, B. Parisi, R. Cella y O. Ciferri (eds). Elsevier, North Holland Biomedical Press, pp. 295-300.
27. NAMBIAR, K. P. 1955. A note on the method of raising pineapple suckers from stem and forcing their growth. *Indian Hort.* 3:116-117.
28. J. J. OCHSE, M. J. SOULE, JR. M. J. DIJKMAN Y C. WEHLBURG. 1986. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol. 1 pp. 639-651.
29. PURSEGLOVE, J. W. 1972. Tropical crops. Monocotyledons. John Wiley and Sons, New York.
30. PANNETIER, C. y NANAUD, C. 1976. Divers aspects de l'utilisation possible des cultures in vitro par multiplication vegetative L Ananas comosus L. Merr Variete "Cayenne Lisse". *Fruits* 31:739-759.

31. PY. C. y ESTANOVE, P. 1954. La multiplication des Ananas por portions de tiges. *Fruits*. 19: 465-468.
32. SIY, R. G. S. 1941. A new method of vegetative propagation of the pineapple, Ananas comosus (L) Merr. Univ. of Hawaii, Honolulu.
33. SEOW, K. K. y WEE, Y. Z. 1970. The leaf bud method of vegetative propagation in pineapple. *Malasian Agricultural Journal* 47: 495-507.
34. SAMUELS, G. 1970. Pineapple cultivars. *Proc. Trop. Reg. Am. Soc. Hort. Sc.* 14: 13 - 24.
35. SRICIVASA, N. K. 1981. Differentiation of plantlet in hybrids embryo callus of pineapple, *Scientia Horticulturae* 15: 235-238.
36. SARH, DGEA. 1984. Anuario estadístico.
37. TKACHENKO, B. 1947. One Method rapide de multiplication de L ananas
Fruits 2: 371 - 373.
38. TEO, C. H. K. 1874. Clonal propagation of pineapple by tissue culture. *Planter (Malaya)* 50: 58 - 59.
39. TAKASHI, H. AND TADASHI, a. 1980. In vitro propagation of bromeads in liquid cultive, *Japan. Hort. Science*, 15 (5): 603 - 604.

40. TING, W. P. AN CHUA, B. K. 1975. Tissue culture of pineapple; Proceedings of the national plant tissue culture Symposium.
41. VAZQUEZ, P. A. 1981. Parásitos más comunes del cultivo de la piña variedad "Cayena Lisa" en la región de Loma Bonita, Oaxaca. Tesis.
42. WANG, H., CHANG, S. M. y HUING, C. C. 1958. The stem section propagation of pineapple. Taiwan. Agr. Res. Inst.
43. WAKASA, K. 1979. Variation in plants differentiated from the tissue culture of pineapple. APn. J. Bree. 29: 13 -22.
44. WAKASA, K., KOGA, Y., Y KUDO, M. 1978. Differentiation from in vitro culture of Ananas comosus. J. pn. J. Breed. 28: 113-121.
45. ZEPEDA, C. Y SAGAWA, Y. 1981. In vitro propagation of pineapple Hortscience 16: 495.

A P E N D I C E

Cuadro 1 A.- Resultados de análisis de varianza realizados para la variable número de yemas por brote a los 42 días de incubación con BA.

F. V.	GL	SC	C.M.	F. Cal	F.	Tab.
TRAT.	4	2.415	0.6037	3.83*	3.71	0.05
ERROR	95	14.96	0.1574		4.54	0.01
TOTAL	99	17.375				

* Significativo al 0.05%

** Altamente significativo 0.01

Cuadro 2 A.- Resultados del análisis de Varianza realizados para la variable número de yemas después de 42 días de incubación.

F.	V.	GL	S.	C.	C M	F CAL	F TAB	C.	V.
TRAT.		6	20581.64		3430.27	21.30*	0.0001 (0.05)	62.21	
ERROR		133	21409.75		167.97				
TOTAL		139	41991.39						

* Significativo al 0.05%

** Altamente significativo al 0.05%

Cuadro 3 A.- Resultados del análisis de Varianza realizado para la Variable Número de Raíces después de 28 días de incubación.

F. V.	G L	S. C.	C M	F cal	F tab	C. V.
TRAT.	8	2674.30	334.28	33.58**	0.0001 (0.05)	61.46
ERROR	171	1702.50	9.95			
TOTAL	179	4376.80				

* Significativo al 0.05%

** Altamente significativo al 0.01%