UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

FACULTAD CIENCIAS DE LA TIERRA



CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR EN OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO

ANÁLISIS DOCUMENTAL DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr.)

AUTORES

Junior Hernan Alvarez Mancheno

Lizeth Yajaira Andy Morales

DIRECTOR

Ing. Sandra Luisa Soria Re M. Sc.

PASTAZA – ECUADOR
2021

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Junior Hernan Alvarez Mancheno con C.I: 2200116891 y Lizeth Yajaira Andy Morales con C.I: 1500975980, hace constar que son autores del Trabajo de Integración Curricular titulado: **ANÁLISIS DOCUMENTAL DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr.),** el cual constituye una elaboración personal realizada únicamente con la dirección del Tutor de dicho trabajo, Ing. Sandra Luisa Soria Re M. Sc. En tal sentido, manifestamos la originalidad de la conceptualización del trabajo como interpretación de datos y elaboración de conclusiones dejando establecido que aquellos aportes intelectuales de otros autores se han referenciado debidamente en el texto de dicho trabajo.

En el cantón Pastaza, a los 7 días del mes de Julio del 2021.

_____	_____
Junior Hernan Alvarez Mancheno	**Lizeth Yajaira Andy Morales**
2200116891	**1500975980**

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El tribunal de sustentación aprueba el Trabajo de Integración Curricular titulado: ANÁLISIS DOCUMENTAL DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr.).

KARINA MARIA ELENA CARRERA SANCHEZ

Firmado digitalmente por KARINA MARIA ELENA CARRERA SANCHEZ
Fecha: 2021.07.24 13:05:13 -05'00'

Dra. C. Carrera Sánchez Karina María Elena
Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
PATRICIO FABIAN NARANJO DELGADO

MSc. Naranjo Delgado Patricio Fabián
Miembro del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MARIA ADELA VALDES SAENZ

Dra. C. Valdés Sáenz María Adela
Miembro del Tribunal

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND

Certificado No. 196-SAU-UEA-2021

Puyo, 27 de julio de 2021

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El Trabajo de Integración Curricular correspondiente a los estudiantes: Lizeth Yajaira Andy Morales, con C.I. 1500975980 y Junior Hernán Álvarez Mancheno, con C.I. 2200116891, con el Tema: **"ANÁLISIS DOCUMENTAL DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA PIÑA (*Ananas comosus* L. MERR.)".,** de la carrera, Ingeniaría Agropecuaria. Directora de la investigación, MsC. Sandra Luisa Soria, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 6%, Informe generado con fecha 20 de julio de 2021 por parte de la directora conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
ITALO
MARCELO

Ing. Italo Marcelo Lara Pilco M.Sc.
ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, queremos agradecer a Dios y a nuestros padres, por darnos la fortaleza y sabiduría que nos ha ayudado a lograr una meta más.

A nuestra querida Universidad Estatal Amazónica que un día nos acogió con los brazos abiertos, donde realizamos nuestros estudios de educación superior.
Agradecemos de manera general a todos los docentes de esta prestigiosa Universidad en especial a nuestro Rector el Doctor David Sancho, quien fue maestro y mentor en el aula de clase, a nuestra Tutora la Ingeniera Sandra Soria, principal colaboradora del proyecto de titulación y a los miembros del tribunal de titulación quienes hicieron posible esta meta.
A nuestra querida amiga María, quien nos ayudó en los momentos difíciles que atravesamos como estudiantes.

Junior Alvarez y Lizeth Andy

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a nuestras familias y amigos quienes nos han brindado de su apoyo en nuestra etapa de estudiantes universitarios.

A nosotros mismo que hemos puesto de todo nuestro esfuerzo siendo perseverantes y no conformistas en la obtención de nuestra Ingeniería.

Junior Alvarez y Lizeth Andy

Resumen

Ananas comosus o piña es originaria de Sudamérica. Es una fruta tropical importante en paises desarrollados. El cultivo de piña en Ecuador es extensivo e importante para su economía. El sistema de propagación a través de retoños o hijuelos, tiene la desventaja de bajar de calidad en cada ciclo de cultivo, debido a problemas fitosanitarios hereditarios, elevando los costos de producción. La producción de material de trasplante en piña debe ser masiva pues es un cultivo comercial extensivo. El objetivo de este trabajo fue analizar la técnica de propagación *in vitro* de piña como alternativa de producción para el incremento de plántulas. Esto se logró describiendo los métodos tradicionales de propagación de piña, para luego identificar información disponible en relación a la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción y así determinar los beneficios de esta técnica de propagación. Concluyendo que, la técnica de propagación *in vitro* de piña permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, plántulas y obtener individuos selectos en forma rápida. Esta técnica posibilita una rápida propagación, al trabajar en condiciones controladas de laboratorio se evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios esterilizados. Se puede obtener gran cantidad de individuos uniformes en espacios reducidos facilitando el transporte del material.

Palabras claves: Piña, *Ananas comosus*, propagación, *in vitro*, cultivo

Abstract

Ananas comosus or pineapple is native to South America. It is an important tropical fruit in developed countries. Pineapple cultivation in Ecuador is extensive and important for its economy. The propagation system through suckers or suckers has the disadvantage of lowering quality in each crop cycle, due to hereditary phytosanitary problems, raising production costs. The production of transplant material in pineapple must be massive as it is an extensive commercial crop. The objective of this work was to analyze the *in vitro* propagation technique of pineapple as a production alternative for the increase of seedlings. This was achieved by describing the traditional methods of pineapple propagation, to later identify available information in relation to the *in vitro* propagation of pineapple as a production alternative and thus determine the benefits of this propagation technique. Concluding that, the *in vitro* propagation technique of pineapple allows cultivating cells, tissues, organs, seeds, seedlings and obtaining selected individuals quickly. This technique enables rapid spread, working in controlled laboratory conditions avoids the risk of contamination with pathogens, since it is carried out in sterilized media. It is possible to obtain a large number of uniform individuals in confined spaces facilitating the transport of the material.

Keywords: Pineapple, *Ananas comosus*, propagation, *in vitro*, culture

Tabla de contenidos

Capítulo 1: Introducción 1

1.1 Justificación 2

1.2 Planteamiento del Problema 3

1.3 Objetivos 4

1.3.1 Objetivo general: 4

1.3.2 Objetivos específicos: 4

Capítulo 2: Fundamentación teórica 5

2.1 Origen de la piña (*A. comosus)* 5

2.2 Taxonomía 5

2.3 Morfología de la piña 5

2.3.1 Tallo 6

2.3.2 Raíces 6

2.3.3 Hojas 6

2.3.4 Inflorescencia 7

2.3.5 Flor 7

2.3.6 Fruto 7

2.4 Variedades 7

2.5 Condiciones edafoclimáticas 8

2.6 Reproducción de la piña 10

2.6.1 Propagación *in vitro* 10

2.6.2 Elementos preparatorios 11

2.6.3 Micropropagación vegetativa 11

2.6.3.1 Explante 12

2.6.4 Fases de la micropropagación *in vitro* 12

2.6.5 Factores que limitan el cultivo *in vitro* 13

2.6.6 Medio de cultivo 14

2.6.6.1 Componentes del medio de cultivo 14

2.6.7 Reguladores de crecimiento 15

2.6.7.1 Auxinas 15

2.6.7.2 Citoquininas 16

2.6.8 Condiciones que favorecen la organogénesis 16

2.7 Beneficios de la propagación *in vitro* 17

Capitulo III: Metodología de la investigación 18

3.1. Tipo de Investigación 18

3.2 Método de investigación 18

3.2.1. Análisis y definición de la necesidad de información 19

3.2.2 Nivel de cobertura de la búsqueda 19

3.2.3 Elección de fuentes de información 19

3.2.4 Estrategia para la búsqueda de la información 19

3.2.4.1 Descriptores 19

3.2.4.2 Criterios de inclusión 19

3.2.4.3 Criterios de exclusión 20

3.2.4.4 Selección de estudios 20

3.2.4.5 Manejo de la información 20

Capítulo IV. Análisis de resultados 21

4.1 Descripción los métodos tradicionales de propagación de la piña 24

4.2 Identificación de información disponible en relación a la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción. 25

4.2.1 Proceso de la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción. 26

4.3 Determinación de los beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña 36

4.3.1 Beneficios 37

4.3.2 Análisis sobre beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña. 38

Conclusiones 40

Recomendaciones 41

Referencias 42

Índice de tablas

Tabla 1 *Clasificación taxonómica de la piña* 5

Tabla 2 *Artículos científicos y tesis de grado y posgrado revisados de acuerdo al estudio implementado que han sido utilizados para la* recopilación *de información* 22

Tabla 3 *Medios de cultivo líquido compuesto por sales minerales a media concentración (diferenciación de yemas) y concentración completa (mulplicación de brotes) enriquecidos con vitaminas y reguladores de crecimiento para cada etapa.* 29

Tabla 4 *Composición de soluciones stock (soluciones madre) utilizadas en la propagacion in vitro de la piña* 33

Tabla 5 *Medio de inducción de reactivos que se usan en la propagación in vitro de piña* 34

Tabla 6 *Beneficios de la propagación in vitro de la piña* 37

Tabla 7 *Beneficio de la propagación asexual natural de la piña*..... 38

Índice de figuras

Figura 1. Cortes apicales y basales de las coronas de *A. comosus*..... 27

Figura 2. Incubación *in vitro* en laboratorios..... 29

Figura 3. Planta para aclimatar 31

Figura 4. Establecimiento *in vitro*..... 35

Figura 5. Multiplicación convencional *in vitro* 35

Capítulo 1: Introducción

Ananas c omosus L. Merr., comúnmente llamada piña en Ecuador, presenta una buena adaptación para el cultivo en zonas tropicales. Esta puede reproducirse por retoños o hijuelos que es la forma tradicional utilizada por los agricultores o por propagación *in vitro*. En ambos casos la forma de cultivo se seleccionará según ciertas determinaciones tales como comercialización a pequeña o gran escala destinada a la exportación, o si el cultivo es de tipo convencional, desarrollado por agricultores (Rodríguez et al., 2016).

En cuanto al cultivo *in vitro,* que es el seleccionado para profundizar su estudio en esta investigación documental, consiste en tomar una porción de una planta, como por ej. el ápice, meristema, nudo, segmento de tallo, una hoja o segmento de ella, embrión, semilla, antera, etc., al cual se le denomina explante y colocarla en un medio de cultivo bajo condiciones asépticas donde se regenerarán una o muchas plantas. La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado denominado callo, crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales (Cerratos, 2013).

El éxito en la propagación de una planta, en este caso de *A. comosus* dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero la desdiferenciación y luego la rediferenciación celular.

Por tal motivo el presente proyecto tiene por objetivo, analizar la técnica de propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción para el incremento de plántulas. Para esto se estableció un marco de fundamentación teórica con el fin de obtener posiciones y criterios de diversos autores de investigaciones experimentales, de campo como fuente primaria, así como de análisis documentales como fuentes secundarias para así obtener información fiable.

En este sentido dentro de dicha fundamentación teórica también se establecieron descriptores sobre los métodos tradicionales de propagación de la piña, por lo que se analizó la técnica de propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción para el incremento de plántulas. Determinando así finalmente los beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña. Para la consecución de los

objetivos y con el fin de realizar un análisis documental sobre el tema, se utilizó una metodología de investigación documental con método exploratorio.

Proyecto de integración curricular se organizó en los siguientes capítulos: en el capítulo I, se estableció la justificación, objetivos y planteamiento del proyecto. En el capítulo II se organizó el marco de fundamentación teórico que sustenta la investigación, basado en las líneas y sublíneas de indagación del estudio, así como los criterios y postulaciones de diversos autores frente al tema.

En el capítulo III, se detalló la metodología a utilizarse, seguidamente del Capítulo IV en el cual se construyeron los resultados a partir de la metodología utilizada, en este caso con la información extraída de la base de datos preestablecida para la revisión literaria, sobre resultados experimentales de fuentes primarias comparado con otros ensayos, concluyendo cuales resultados tuvieron mayor relevancia lo que permitió redactar las conclusiones presentadas al final de este proyecto.

1.1 Justificación

La piña (*A comosus*) es una fruta tropical de importancia a nivel mundial por su fragancia, dulzor y sabor agradable, es fuente de vitaminas C, B1, B6, ácido fólico y minerales como el potasio, y posee un alto contenido de fibra. Cualidades que determinan que esta fruta tenga propiedades antioxidantes, por la capacidad de combatir a los radicales libres y retrasar el envejecimiento. También, la piña contribuye a la eliminación de toxinas por medio de la orina y previene el estreñimiento mejorando la calidad de vida de las personas (Cetre, Fernandez y Corozo, 2020).

Ecuador tiene áreas dedicadas al cultivo de piña para la exportación, agroindustria y consumo en fresco; así como productos destinados al mercado nacional. En el país este cultivo, abarca un área total aproximada de 4 000 ha, mayormente distribuidas en Los Ríos y Santo Domingo (Moreira y Uguña, 2018).

Ajila (2014) menciona que *A. comosus* es una fruta que presenta una buena adaptación a los ambientes semiáridos y húmedos, su multiplicación vegetativa es a través de hijuelos o retoños, estos tienen la desventaja de bajar la calidad del material seleccionado en cada ciclo de cultivo por lo que la biotecnología ofrece técnicas bajo condiciones controladas como lo es la propagación *in vitro* que brinda alternativas positivas como la obtención de material vegetativo sano, con una alta producción y homogeneidad en el campo, en menor tiempo, plántulas producidas de forma masiva

que abastecen la demanda de plantas para la siembra, produce plantas libres de plagas y enfermedades.

Los beneficiarios son productores y quienes se encuentren en búsqueda de información relacionada con el tema o dispongan de esta investigación académica, donde se detallan específicamente los beneficios de la propagación *in vitro* de *A. comosus*. La disponibilidad de esta información es fundamental para los productores o inversionistas que pretendan cultivar esta fruta tropical. Este trabajo se justifica en virtud a la importancia de los beneficios de la propagación *in vitro* de la piña y cómo esto influye en el cultivo para mejorar la cadena productiva de la piña.

1.2 Planteamiento del Problema

Cárdenas (2016) afirma que para producir una hectárea de piña se necesitan 60 000 plantas, razón por la cual se está abandonando esta actividad agrícola ya que muchos productores no tienen acceso a esta cantidad de material vegetativo. Las vías Quevedo-Santo Domingo y Santo Domingo-Quinindé, donde existían plantaciones de piña, ahora se siembra cacao; sin embargo, algunas exportadoras de piña que han abandonado la siembra aún compran la fruta a los pequeños productores y la exportan.

¿Está siendo abandonado el cultivo de piña por la alta demanda de plántulas que no son abastecidas debido a su difícil propagación?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general:

- Analizar la técnica de propagación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus*) como alternativa de producción para el incremento de plántulas.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Describir los métodos tradicionales de propagación de la piña.
- Identificar información disponible en relación a la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción.
- Determinar los beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña.

Capítulo 2: Fundamentación teórica

2.1 Origen de la piña (*A. comosus)*

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquero (SIAP, 2018) afirma que: "La piña es una fruta tropical perenne, cultivada durante cientos de años. En varios lugares del mundo se le conoce como ananá, posee propiedades nutricionales y es cultivada en cualquier época de año."

La piña es una especie frutal originaria de países sudamericanos como Colombia, Brasil y Paraguay, exportada a diferentes partes del mundo a través de la información difundida por los viajeros e historiadores. Tiene la capacidad de adaptarse a climas de sol y sombra, desde condiciones húmedas a muy secas, y a condiciones tropicales cálidas a subtropicales frías (Londoño y Osorio, 2004).

2.2 Taxonomía

La piña forma parte del grupo de las monocotiledóneas y pertenece a la familia Bromeliaceae y a la subfamilia Bromeliodeae (SIAP, 2018 y Alfaro et al. 2011). Basantes y Chasipanta (2012) reportan la clasificación taxonómica de la piña, misma que se describe en la tabla 1.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la piña

Reino	Plantae
División	Monocotiledóneas
Clase	Liliopsida
Orden	Bromeliales
Familia	Bromeliaceae
Subfamilia	Bromelioideae
Género	*Ananas*
Especie	*Comosus*
Nombre científico	*Ananas comosus*

Tomado de (Basantes y Chasipanta (2012)

2.3 Morfología de la piña

La piña se propaga por vía vegetativa, son necesarios tres clases de materiales de siembra: la corona de hojas, que casi no es usada; los bulbillos que aparecen en la base de la fruta de la mayoría de los cultivares, estos bulbillos fructifican entre 12 y 18 meses, y los brotes basales que nacen en las axilas de las hojas fructifican entre 15 y 18

meses. Son las nuevas hojas las que alcanzan el mayor tamaño, las hojas apicales disminuyen su tamaño cuando la planta ya está lista para la floración. El material de siembra y el follaje casi no incrementan el tamaño de la planta, las hojas e inflorescencias se forman de un meristema apical, el pedúnculo de la inflorescencia y a veces en el ápice de esta (Margara, Box, y Urbano, 1998).

2.3.1 Tallo

El tallo en forma de maza, más ancho en la parte superior, está cubierto por las bases de las hojas que se secan y desintegran en la región basal. Los entrenudos son muy angostos y en ellos se encuentran yemas axilares y raíces. En el ápice hay un meristemo que genera hojas y que al llegar a la madurez forma una inflorescencia. Internamente el tronco de la piña se divide en tres estructuras, con el floema hacia la periferia del tallo y con vainas de fibras bien desarrolladas del lado del floema (Alfaro et al., 2011).

2.3.2 Raíces

Rueda (2015) expresa que las raíces de todas las piñas obtenidas por propagación vegetativa son adventicias, en la base del tronco forman un sistema corto y compacto, poseen numerosas raíces fuertes ramificadas, en el tallo las raíces que van apareciendo en la parte superior del tronco salen al exterior, se enrollan y aplanan, sin alcanzar el suelo. *A. comosus* posee una raíz adulta que tiene una o dos de capas de exodermis, dentro de los tejidos corticales existen dos zonas, la zona de esclerénquima que cuenta con canales aéreos y la zona parénquima que tiene grandes espacios en donde las células se disuelven y desaparecen, por último, está la endodermis que posee paredes hacia el centro.

2.3.3 Hojas

Las hojas de *A. comosus* forman una roseta que rodea totalmente el tallo ya que estas son envolventes y se abren hacia arriba en una lámina lanceolada, acanalada, que termina en un ápice muy agudo. Las hojas centrales son las más largas alcanzando 0.5 hasta un metro de longitud, las inferiores y las apicales son más cortas. Los bordes pueden o no estar provistas de espinas, esto depende de la variedad. En la piña como en otras bromeliáceas el follaje funciona como órgano de absorción, formando un óptimo sistema colector de agua de lluvia y polvo atmosférico, además de acoger a numerosos insectos y otros animales, a menudo en los cultivos comerciales se aplican abonos líquidos a las hojas (Blanco, Vargas, y García, 2017).

2.3.4 Inflorescencia

Anormalmente en el meristema apical se forma una inflorescencia que tiene muchas flores unidas, cada una con una bráctea inferior; el eje de la inflorescencia crece y se separa de la corana de hojas y está provisto de brácteas agudas según el cultivar, o bien las inflorescencias se muestran como sentadas en las hojas. En los tejidos del eje central desde el comienzo existe una función completa, que se trata de una prolongación del tallo con las brácteas y flores individuales (Suárez, 2011).

2.3.5 Flor

Rueda (2015) reporta que la flor individual de la piña está formada por verticilos de tres partes: tres sépalos, tres pétalos, dos grupos de tres estambres y un gineceo de tres carpelos. Cada flor tiene una bráctea inferior, ancha y canosa en la base, la que se fusiona con los tejidos de la flor y con el eje central de la inflorescencia; el ápice de la bráctea es agudo y duro semejante al de las hojas en su aspecto externo. Los sépalos son cortos, cada uno con canal independiente que lo comunica con las celdas del ovario.

2.3.6 Fruto

La infrutescencia de *A. comosus,* comúnmente llamada piña, está formada por la fusión de los tejidos de los frutos individuales y del eje de la inflorescencia, un fruto individual se desarrolla de cada flor, este aparece hacia afuera en modo de escudete poligonal, duro y prominente. El ápice de la bráctea cubre la mitad inferior del estuche, que se ha doblado hacia arriba, y la superior por los tres sépalos; la textura y el color de brácteas y sépalos son muy parecidos. La cavidad extrema de la flor se encuentra debajo del centro individual del fruto que es prominente, este está representado por una cámara de paredes endurecidas. Las celdas del ovario quedan hacia el interior, en la parte superior están los óvulos o semillas y la parte inferior está ocupada por las cavidades grandes de paredes brillantes que formaban los nectarios (Basantes y Chasipanta, 2012).

2.4 Variedades

Rueda (2015) refiere que en *A. comosus* la partenocarpia es general, ya que en la producción de fruta sea natural o inducida artificialmente es sin fertilización de óvulos, lo que hace que la fruta no tenga semillas. Los cultivares más corrientes son incompatibles, aunque de vez en cuando se forman semillas diminutas, aplanadas, de tres a cinco milímetros de longitud por uno a dos milímetros de ancho, con la testa de color café oscuro y superficie áspera. Es conveniente obtener de cruces inter varietales. Las yemas que han mutado forman cultivares con pocas características propicias

León (como se citó en Lescano, 2003) afirma que las variedades de piña se clasifican en grupos de cultivares por la forma del fruto, presencia de espinas en las hojas, color y otras características de la pulpa. Las variedades más representadas son:

a. Española

Fruto globoso, con surcos profundos, amarillo anaranjado a rojo; pulpa amarilla a blanca con la médula ancha, sabor picante, fibrosa; hojas espinosas; resistentes al marchitamiento; susceptibles a gomosis. Cultivares: española-roja, Singapore, selangor, castilla y cabezona (triploide).

b. Queen

Fruto cónico, pequeño, espinoso con surcos profundos, amarillo, pulpa muy amarilla, dulce y poco fibrosa, la médula delgada, hojas espinosas, cultivares: Queen, Mc Gregor, Natal, Ripley y Alexandria, esta variedad es cultivada por sus cualidades organolépticas.

c. Abacaxi

Es una variedad de plantas medianas, erecta, su fruto cónico, amarillo; pulpa amarillo-pálida a blanca, dulce, suave, jugosa, con médula muy angosta; hojas largas de color verde oscuro con manchas rojizas con espinas. Cultivares: Abacaxi, Abaka, Sugar Loaf, Papelón, venezolana.

d. Cayena

Fruto cilíndrico a algo cónico y anaranjado, pulpa amarilla y dulce, algo ácida, suave, jugosa con poca fibra; hojas lisas o con pocas espinas, ápices espinudos; susceptibles al marchitamiento. Cultivares: Cayena Lisa, Guadalupe, Baron Rothschild, Esmeralda.

e. Maipure

La planta es grande, fruto cilíndrico-ovoide, amarillo a anaranjado o rojo; pulpa blanca a amarilla, muy dulce, jugosa, suave, con fibras; la médula mediana; hojas largas color verde oscuro con manchas rojas sin espinas. Cultivares: Maipure, Rondón, Perolera y Monte Lirio.

2.5 Condiciones edafoclimáticas

Py, Lacoeuilhe, y Teisson (1984) describen que las condiciones edafoclimáticas influyen en el proceso de propagación la piña, esta fruta se desarrolla mejor en suelos ligeros, airados y bien drenados, con un pH de 4.5 a 5.5, debido a que posee un sistema radicular débil. Aunque se trata de una planta poco exigente, la piña necesita una adecuada fertilización o abonadura para garantizar una buena producción de frutas.

La acción del clima sobre la planta de piña se expresa por los efectos que producen los factores de una manera integrada, como son la temperatura, las precipitaciones, la luminosidad, los vientos, la latitud y la altitud (Saucedo, Varas, Carmigniani y Ramos, 2008). Sin embargo, puede ser cultivada en condiciones climáticas variables. La temperatura es el factor limitante en la expansión del cultivo, debido a que esta determina el crecimiento y desarrollo de la planta.

Claramente esta tiene poca resistencia a las temperaturas templadas, siendo el rango ideal para el crecimiento entre 28 y 30 ºC, siendo optimo 27 ºC. En cuanto a las temperaturas menores de 22 ºC, aceleran la floración, pero disminuyen el tamaño del fruto. En caso contrario, mayores de 30 ºC, queman la epidermis (efecto solar), a diferencia que la inducción floral requiere entre 15.5 y 16.0 ºC (Rodríguez et al., 2016).

Otro efecto que determina la propagación, es la luminosidad, esta participa necesariamente en los fenómenos fisiológicos como la fotosíntesis y la transpiración. En el caso de la piña se ha comprobado que ejerce una acción muy marcada en el rendimiento, ya que está relacionada con la síntesis de hidratos de carbono en las hojas, y con la utilización del nitrógeno por la planta (Londoño y Osorio, 2004).

Influye además en la coloración del fruto. Para obtener buenos rendimientos, el número de horas luz anual, debe superar el valor de 1200 horas.luz^{-1}. La diferenciación de la inflorescencia en la piña está asociada con la disminución de la luminosidad, ocurriendo principalmente cuando los días son más cortos y con nubosidad alta (Cetre et al., 2020). La variación de la intensidad luminosa actúa sobre la composición de los frutos ya que el ácido málico está estrechamente relacionado con este factor, pero no así el ácido cítrico.

El cultivo, también es susceptible al efecto de los vientos fuertes. Cuando estos son muy secos, se incrementa la transpiración y se produce desecamiento en el extremo de las hojas. Se considera como una de las especies cultivadas que mayor cantidad de agua economiza, lo cual está dado en gran medida por sus características botánicas, al presentar hojas acanaladas, dispuestas en espiral y con un tejido acuífero que cubre alrededor del 50 % de su estructura interna. La carencia de agua puede alargar significativamente su ciclo vegetativo (Alfaro et al., 2011).

2.6 Reproducción de la piña

La piña se reproduce asexualmente, lo que significa que la descendencia es genéticamente idéntica a un único progenitor. Desde el desarrollo de óvulos no fertilizados hasta la división de organismos primitivos en varias partes independientes, existen muchos tipos de reproducción asexual en las plantas. Sin embargo, en todos estos casos, la nueva planta es producto de la mitosis y, por tanto, es un clon del parental (Ruíz, 2000).

Existen tres variantes de propagación vegetativa: 1) propagación a través de partes vegetativas (esqueje, rizoma, bulbo, etc.); 2) mediante la propagación por injerto, una parte de una planta se combina con otro rasgo genético abierto, resistente o superior; y 3) en la propagación *in vitro*, se utilizan pequeños tejidos u órganos de plantas para sembrar en condiciones controladas dentro de un laboratorio (Margara et al., 1998).

2.6.1 Propagación *in vitro*

(Rodríguez et al. (2016) afirma que la propagación *in vitro*, nace como una alternativa de mejoramiento en cuanto al cultivo tradicional de plantas. Define que es una tecnología que permite mantener y desarrollar células vegetales, tejidos, obtenidos de plantas y utilizar esta muestra extraída a través de un medio artificial bien sea sólido o líquido y tratar de forma científica los factores de crecimiento y condiciones ambientales utilizando modificación genética para lograr óptimas muestra para su posterior desarrollo en extensiones de tierras destinadas a mayor producción (p.22).

Este tipo de cultivos involucra células con diferente grado de diferenciación. Pueden cultivarse plantas enteras, semillas, órganos o células no diferenciadas que generalmente son propagadas a partir de callos. Algunos de estos tipos de cultivos pueden ser interconvertibles mediante el uso de fitohormonas, es decir, que la radiación no es continua, por lo que los átomos no pueden absorber o emitir cualquier valor de energía, sino sólo unos valores concretos (Ajila, 2014).

Existe diversidad de métodos de propagación vegetativa *in vitro*, que incluyen: cortar zonas del tallo desde donde nacen las hojas, ramas axilares para producir órganos adventicios (raíces o brotes) en los explantes en cuyo caso el proceso se denomina organogénesis Luego está la técnica de embriogénesis que consiste en formar embriones somáticos a partir de callos y regenerar plantas a partir de suspensiones celulares. Luego se tiene el cultivo y fusión de protoplastos (Rodríguez et al., 2016).

En los órganos adventicios se pueden entender dos procesos: la organogénesis directa, en la que los brotes o raíces provienen directamente de los explantes; la organogénesis indirecta, en la que se induce la desdiferenciación celular para obtener callos, que se forman a partir de los explantes *in vitro* y posteriormente inducir nuevamente la diferenciación celular para la formación de los brotes provienen del callo y las raíces (Murillo y Del Rocio, 2013).

2.6.2 Elementos preparatorios

La preparación del cultivo de tejidos para la producción de plantas de importancia económica y con enorme potencial como es el caso en las plantas tropicales como la piña, claramente es un proceso que consiste en aislar una porción de la planta, a la cual se le llamará explante o propágulo, y proporcionarle artificialmente, en un laboratorio, las condiciones físicas y químicas que requiera, para que las células expresen su potencial intrínseco; los principios en los que se fundamenta la técnica son el de totipotencialidad y regulación hormonal (Rocha y Treminio, 2008).

De acuerdo a lo señalado por Lodoño y Osorio (2004) está la preparación del espacio de cultivo (laboratorio), después la preparación de las células o pequeñas partes de tejidos u órganos a ser cultivada en condiciones controladas de laboratorio.

2.6.3 Micropropagación vegetativa

La micropropagación o propagación clonal es uno de los métodos más comunes en el cultivo *in vitro*, mediante este método, los fragmentos (explantes) de la planta madre pueden producir una descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas, las yemas vegetativas son el material más utilizado en este tipo de técnica (Castillo, 2004).

Con base a lo señalado por el autor, se entiende como método o técnica a la micropropagación *in vitro* de plantas, esta expone importantes ventajas que se relaciona al incremento acelerado del número de plantas por cada genotipo, la reducción del tiempo de multiplicación, producción permanente de material, la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida simplificando costos, tener un mayor control sobre la sanidad del material propagado, facilidad para el transporte del material, posibilidades de multiplicar con rapidez una variedad o ecotipo del cual se posean pocos individuos.

En síntesis, este procedimiento se basa en aislar una parte de las plantas, llamadas explantes o propágulos bajo condiciones *in vitro,* para proporcionarles de forma

artificial en el laboratorio los nutrientes y reguladores de crecimiento, para que, de acuerdo con las condiciones físicas y químicas necesarias, las células de los explantes, expresen su potencial único. En este método, primero se requiere procedimientos asépticos para que el material vegetal introducido quede libre de la contaminación microbiana. La aplicabilidad de esta tecnología se basa en la totipotencia y la regulación hormonal, lo que explica con más detalle el modelo biológico de morfogénesis *in vitro* es decir el proceso biológico que lleva a que un organismo desarrolle la forma (MADR, 2004).

2.6.3.1 Explante

Es el tejido, órgano o embrión que se cultivará para obtener una planta similar a la planta madre. Depende del tipo y ubicación en la planta, puede provenir de fragmentos de órganos como raíces, hojas, tallos, puntas laterales o yemas, brotes, tejido meristemático o de aquellas estructuras reproductivas como: semillas, inflorescencias jóvenes, tejidos ovoides o embriones, anteras o granos de polen, etc. En la mayoría de los casos, el ápice, el meristemo floral o la yema apical es el material más utilizado como fuente vegetal. Hay que insistir en que, como método de clonación, la planta madre o donadora debe satisfacer características ideales y sobresalientes como son el rendimiento, calidad, resistencia, etc. (MADR, 2004).

Ajila (2014) expuso que para establecer un cultivo *in vitro* se deben considerar los siguientes factores: genotipo, edad y tamaño de la planta, la edad del órgano o tejido, estado fisiológico, estado de higiene. Determinar los efectos del clima para establecer las condiciones de crecimiento. La posición del explante en la planta, el método de desinfección y los efectos de enfermedades previamente existentes.

La micropropagación *in vitro*, es un método de propagación rápida, la composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación, que permite obtener gran cantidad de plantas libres de enfermedades, en poco tiempo y consta de cinco etapas (Margara et al., 1998).

2.6.4 Fases de la micropropagación *in vitro*

Fases 0: Mantener una alta condición sanitaria con nutrientes y riego para que crezca fuerte y libre de enfermedades. Fases 1: Introducción: En la fase de inicio, los explantes se aíslan asépticamente y se descartan los contaminantes externos, hongos y bacterias. Fase 2: Proliferación: Se consigue la rápida formación de brotes, manteniendo las

características hereditarias de su progenitor. Fase 3: Enraizamiento: Las plántulas proliferadas obtenidas de la etapa de proliferación se enraízan *in vitro*. Fase 4: Acondicionamiento y Aclimatación: Es donde se adaptan al ambiente externo, se lo hace en sustrato o en suelo estéril, primero en condiciones de invernadero para que favorezca al enraizamiento *ex vitro* y llegue a la independencia de las plantas, previo a la salida a campo abierto (Ruíz, 2000).

2.6.5 Factores que limitan el cultivo *in vitro*

Fenolización: El fosfatado es producido por oxidasas que contienen cobre (como el polifenol oxidasa y la tirosinasa). Este tipo de daño ocurre cuando dañamos los tejidos y finalmente proporciona a los explantes compuestos de quinina altamente tóxicos (Toro, como se citó en Ajila, 2014).

De acuerdo a lo expresado por Roca y Mroginsk (1991) la contaminación como factor limitante puede ser de tipo:

- Exógena: cuando existe una desinfección insuficiente de los materiales vegetales, cuando, el explante lleva contaminantes externos en la superficie del material vegetal y será necesario eliminarlos con procedimientos de desinfección, generalmente utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 1-3%. También se puede utilizar como desinfectantes, yodo, y combinar el procedimiento con fungicidas y bactericidas y otros desinfectantes químicos, que por su toxicidad han caído en desuso como es el cloruro de mercurio (Pérez, Salgado, Córdova, Lagunes y Ortiz, 2010).

- Endógena: cuando los contaminantes son sistémicos, difícil de eliminarla. Ocurre en el caso de infección interna de los tejidos y es difícil de descartar, debido a ello se incorporará en el medio de cultivo fungicidas y agentes bacteriostáticos. La dosis de gentamicina, penicilina y sulfato de estreptomicina también debe ser de 10 a 50 $mg.L^{-1}$ (Alfaro et al., 2011).

Vitrificación: las especies vegetales cultivadas *in vitro* y entre ellas la piña, se encuentran bajo el efecto de la continuada presencia de factores culturales que originan alteraciones morfológicas y fisiológicas. Estas alteraciones se denominan: vitrificación, hiperhidratación, suculencia, cristalización. La vitrificación exhibe a los explantes con una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida. Estos desórdenes, se manifiestan en las hojas, y afectan a los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso.

Aunque en menor medida tallos y raíces también resultan afectados por estas anomalías anatómicas, que en ciertos casos van a impedir el normal establecimiento de plantas micropropagadas a condiciones *ex vitro* (Rocha y Treminio, 2008).

2.6.6 Medio de cultivo

El medio de cultivo es la matriz sobre la que se colocan los explantes seleccionados. Los medios se componen de sales inorgánicas, vitaminas, azúcar, reguladores del crecimiento, agua y agar. Su composición depende del tipo de planta con la que trabaja, la edad de la planta, la edad del órgano o tejido, el tipo de órgano o tejido a cultivar y la etapa del proceso de micropropagación. La función principal del medio de cultivo es brindar soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de explantes (Murillo y Del Rocio, 2013).

La fórmula más utilizada es el medio desarrollado por Rodríguez et al. (2016), se lo abrevia con las siglas MS, debido a su alto contenido de nitrógeno, aproximadamente 60 $meq.L^{-1}$ expresada en las formas amoniacales y nítricas, alta concentración de potasio y la incorporación del hierro en forma de quelato (Margara et al., 1998).

2.6.6.1 Componentes del medio de cultivo

De acuerdo a lo expresado por Margara et al. (1998) Los principales componentes del medio de cultivo son:

- Agua: El medio está compuesto por un 95% de agua. Debe utilizarse agua destilada y de ser posible no utilice agua del grifo (Cuellar y Somoza, 2015).
- Agar: Es un derivado de las algas y se utiliza como agente gelificante, es un polisacárido de alto peso molecular. Esto es muy importante porque retiene el agua y les da firmeza a las plantas (Margara et al., 1998).
- Azúcar: Se utiliza como fuente de carbono, sacarosa con una concentración de 1 - 5% (Rocha y Treminio, 2008).
- Nutrición mineral: Es el nutriente más importante en cultivo *in vitro*, compuesto por macro, meso y micro elementos, así como los elementos traza (Margara et al., 1998).

- Vitaminas: a veces se utilizan una o más vitaminas, como tiamina, pridixina, ácido nicotínico e inositol o mioinositol, estas son consideradas las vitaminas del medio MS (Blanco et al., 2017).

2.6.7 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento, hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que ayudan al crecimiento y desarrollo, su contenido es muy bajo. En el cultivo *in vitro* de plantas, los reguladores de crecimiento pertenecientes a los grupos de las auxinas y citoquininas son esenciales para su desarrollo, sin reguladores es imposible desarrollar el cultivo *in vitro* porque la división celular no procederá (Medina y Mena, 2011).

2.6.7.1 Auxinas

Son ampliamente utilizados en micropropagación para promover el crecimiento de callos, suspensión celular, órganos (meristemas y ápices). Normalizan la morfogénesis, especialmente cuando se combinan con citoquininas. La elección de la auxina y su incorporación en el medio depende del tipo de crecimiento o desarrollo requerido, de la presencia de un nivel natural de auxinas en el explante desde el inicio de la siembra, la capacidad del tejido para sintetizar auxinas de forma natural y de la interacción entre auxina sintética que se incorpora al medio y la auxina natural endógena (Blanco et al., 2017).

Se han utilizado auxinas comercialmente en agricultura y horticultura durante más de 50 años. El uso comercial inicial fue prevenir la caída de frutos y hojas, estimular la floración, inducir partenocarpia de frutos, engrosar frutos y estimular la producción de raíces en estacas y esquejes para propagar plantas (Mogollón, Díaz y Hernández, 2004).

Pierik (1990) menciona que las auxinas como el ácido indol acético (IAA), el ácido indol butírico (IBA) o el ácido 2,4 dicloro fenoxi acético (2,4-D) se usan repetidamente en el medio nutritivo o de cultivo. El IAA se produce naturalmente en las plantas y se agrega en una concentración de 0.01-10 $mg.L^{-1}$. Las auxinas producen alargamiento celular y expansión tisular, división celular, formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de yemas axilares y adventicias y embriogénesis repetida en cultivo en suspensión, dependiendo de las dosis seleccionadas (Rural, 2004).

2.6.7.2 Citoquininas

Para Rodríguez et al. (2016) indica que las citocinas son fitohormonas naturales que pueden estimular la división celular en tejidos que no son granulocitos. Inicialmente se les llamó quininas, pero debido al uso anterior de los nombres de un grupo de compuestos derivados de la fisiología animal, se modificó el término citoquina seis. Se elaboran en la zona de cultivo, como el meristemo de la punta de la raíz y son traslocados para cumplir su función en la parte aérea de la planta yemas apicales.

Las citocinas más utilizadas y más habituales son: kinetina, benzil adenina (BA), 6-γ, γ-dimetilalilaminopurina (2iP) y benzil amino purina (BAP), que cuando la auxina las acompaña para producir la división celular estimulan el crecimiento y desarrollo. La citoquinina también promueve la formación de yemas axilares, reduce el dominio de la punta de la raíz y retrasa el envejecimiento (Rueda, 2015).

2.6.8 Condiciones que favorecen la organogénesis

Murrillo y Del Rocíol (2013) mencionan que la organogénesis está amenazada por los siguientes factores tales como: luz, temperatura, humedad relativa y pH. La luz en el cultivo *in vitro* es proporcionada por lámparas fluorescentes, cuya intensidad luminosa va de 1 000 a 4 000 lux.

Margara et al. (1998) aclara que la organogénesis especialmente aquella asociada al enraizamiento, y formación de callo se ha observado favorecida con poca luz. Otras especies si requieren presencia de luz. Rueda (2015) explicó que para el cultivo *in vitro*, generalmente se seleccionan de 14 a 16 horas, que es un día, y algunos usan luz continua. Alfaro et al. (2011) menciona que en la mayoría de las cámaras de cultivo la temperatura debe ser constante permaneciendo entre 22 y 25°C, dependiendo de la especie a cultivarse. Los controles de temperatura se realizan con sistemas de aires acondicionados, controles y alarmas (Ajila, 2014).

La humedad relativa en el cuarto de crecimiento debe ser de 70 a 80% (Toro, 2004), el aumento de humedad puede causar una cantidad muy alta de infecciones (Pierik, 1990). Toro (2004) citado por Ajila (2014) señala que el pH juega un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento de los cultivos *in vitro*, por lo que se recomienda utilizar un valor de pH entre 5,5 y 5,8, un valor de pH bajo provocará un IAA inconsistente, etc.

2.7 Beneficios de la propagación *in vitro*

El cultivo o propagación *in vitro*, es una técnica de producción en condiciones totalmente asépticas; es decir esterilizadas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo una cantidad determinada de plantas genéticamente iguales a la planta madre cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas o químicas controladas en un medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1963).

Los principales beneficios residen en que: se pueden obtener plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias, micoplasmas, virus y tiroides). La micropropagación permite propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria. Así mismo permite optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales, facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña (Cuéllar y Somoza, 2015).

El propósito de la reproducción vegetativa *in vitro*, de acuerdo con lo que reporta el MADR (2004) es:

1. Desde un punto de vista genético, preste atención a la interacción de los materiales vegetales, el ambiente del genotipo y cualidades similares del rendimiento joven y maduro.
2. Guardar el genotipo y el complejo genético en la biblioteca de clones.
3. Reducir el tiempo de reproducción para reducir la tecnología de hibridación.
4. Conservar buenos genotipos que puedan determinar sus propias características genéticas (resistencia a plagas, crecimiento, rendimiento, calidad del fruto, tolerancia a condiciones extremas de humedad o sequía, etc.). Estos rasgos se pueden perder a través del cruce genético en la reproducción sexual.
5. Cuando la reproducción sexual no sea el método más factible o efectivo.
6. Especies cuyas semillas tienen problemas de germinación o almacenamiento o tienen ciclos de reproducción prolongados.
7. Utiliza las características genéticas favorables de dos plantas en una planta.
8. Gestionar las diferentes etapas del desarrollo de la fábrica.
9. Lograr una siembra unificada u obtener una gran cantidad de individuos con igualdad genética.

Capitulo III: Metodología de la investigación

3.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación fue descriptiva, sobre la propagación *in vitro* de la piña, donde se trabajó a partir de revisión documental proveniente de fuentes primarias y secundarias libros, tesis de pregrado, maestría y doctorados, así como artículos.

3.2 Método de investigación

El método de investigación que se utilizó fue exploratorio, el cual ayudó a dar cumplimiento a cada uno de los objetivos propuestos, referentes a la síntesis de los métodos tradicionales de propagación de la piña, a la identificación de información disponible en relación a la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción y a los beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña, a continuación, se describe las variables.

Para la consecución de los objetivos específicos, en lo que respecta al primer objetivo, para su cumplimiento se realizó una descripción de los métodos tradicionales de propagación de la piña, donde se describieron las principales características de este método de propagación.

En el caso del segundo objetivo, se realizó una búsqueda sistemática exhaustiva de información relacionada a la propagación *in vitro* de la piña, organogénesis en piña (directa e indirecta) y embriogénesis en piña de fuentes correspondes a sistemas de información científica, bibliotecas virtuales y bases de datos indexadas de información.

Una vez ya identificada la información científica disponible en relación información disponible en relación a la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción., en cumplimiento del tercer objetivo, se extrajo la información más relevante, que aportó a la investigación y nos llevó a un completo análisis de los beneficios de la propagación *in vitro* de la piña frente a la propagación natural.

Los términos de búsqueda consultados fueron: Piña. (*A. comosus*) Pineapple micropropagation, micropropagación de piña, cultivo de tejido de piña, organogénesis de piña.

3.2.1. Análisis y definición de la necesidad de información

Para la búsqueda y análisis de información de los documentos bibliográficos, se realizó una revisión rápida de los autores, títulos, resumen y los resultados los cuales estaban enfocados en la propagación *in vitro* y sus beneficios, es decir la información pertinente que llevó a dar cumplimiento con los objetivos planteados.

3.2.2 Nivel de cobertura de la búsqueda

Se realizó una búsqueda de información, esta se centró en publicaciones científicas de fuentes primaria y secundaria, que otorgó fiabilidad y fueron verificables para los análisis construidos, fundamentados en bases científicas comprobables.

3.2.3 Elección de fuentes de información

Las bases de datos primarias y secundarias que se utilizaron para respaldar la información fueron: Google académico (Google Scholar), Latindex, Redalyc, World Wide Science, EcuRed, Academia.edu, SciELO (Biblioteca Científica Electrónica en Línea), Repositorios Universitarios de tesis y proyectos de titulación de grado y de posgrado.

3.2.4 Estrategia para la búsqueda de la información

La estrategia para la búsqueda de información se efectuó a través de una vinculación de términos seleccionados denominados términos de inclusión, palabras clave u operadores que permiten combinar términos para ejecutar la búsqueda, relacionados con el tema de investigación. La selección de documentos de estudios se realizó mediante una lectura selectiva que admitía decidir, qué información preservar y que datos se debían eliminar, para ello se establecieron una serie de criterios los cuales serían la modalidad de seleccionar si estos documentos son de inclusión o exclusión.

3.2.4.1 Descriptores

Los descriptores utilizados se construyeron basados en los objetivos planteados en la investigación, los cuales se agruparon resaltando los siguientes: Propagación *in vitro*, *A. comosus*.

3.2.4.2 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión considerados para la búsqueda fueron los siguientes:

a. Palabras clave.

Para el cumplimiento del objetivo uno se utilizó las siguientes: *A. comosus*, propagación de la piña, propagación tradicional de la piña.

Para el cumplimiento del objetivo dos se utilizó las siguientes: *A. comosus*, Cultivo *in vitro*, propagación *in vitro*, micropropagación.

Para el cumplimiento del objetivo tres se utilizó las siguientes: *A. comosus*, Cultivo *in vitro* beneficios, beneficios de la propagación *in vitro*, bondades del cultivo *in vitro* de piña.

b. Año de publicación.

Se tomó información de recursos literarios, artículos académicos y documentos bibliográficos segmentados en los últimos 20 años (2001 a 2021) para la ejecución investigativa de ambos objetivos.

c. Número de estudios.

En general consideraron al menos 14 artículos científicos experimentales, seis tesis y cuatro libros.

3.2.4.3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron aquellos que tuvieron información con respecto a:

a) Publicaciones de *A. comosus* basados en cultivos en los que no se relacione directamente la propagación *in vitro*

b) Información de *A. comosus* que no tengan las variables necesarias para la finalidad del presente estudio.

c) Artículos y documentos bibliográficos que no tengan una fuente oficial o verificable, que no presenten rigurosidad científica.

3.2.4.4 Selección de estudios

Se seleccionaron estudios con rigor científico, para el caso de artículos científicos que fueron publicados en revistas científicas indexadas y en el área temática de la investigación; para el caso de libros, tesis, capítulos de libros.

3.2.4.5 Manejo de la información

Para el manejo de la información y datos de los recursos utilizados para la construcción de análisis, se elaboró un formato utilizando el programa de hojas de cálculo Excel- Microsoft Excel 2013 que permitió organizar y analizar la información. Para tener una visión ordenada y general de la información que consolidaran las bases de los análisis construidos para este estudio. Fue estructurado por: año de publicación, país, autor, título, base de datos y revistas.

Capítulo IV. Análisis de resultados

Con el accionamiento de protocolo de búsqueda bibliográfica descrito inicialmente, se logró obtener un total de 14 artículos, publicados entre los años 2001 y 2021, en las diferentes bases de datos Scielo, Scopus, Redalyc, Google Académico, EBSCOhost Scribd, ResearchGate, Dialnet, seis tesis y cuatro libros.

En la presente investigación se pauto alcanzar los objetivos propuestos, en los que se analizó la técnica de propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción para el incremento de plántulas. Esta es una técnica de propagación rápida, que permite obtener gran cantidad de plantas libres de enfermedades, en poco tiempo (Roca y Mroginsk, 1991). La propagación *in vitro* de la piña, permite cultivar la especie bajo condiciones de laboratorio. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados y además existe una provisión de elementos nutritivos entre los que se incluyen las vitaminas y los reguladores de crecimiento (Pierik, 1990).

Parte de la información recopilada sobre el cultivo *in vitro* de plantas, se basa en el principio de Haberlandt, quien postuló en 1902 que las plantas eran capaces de desarrollar un individuo completo a partir de una sola célula cultivada, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran en la actualidad los medios de cultivo, todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década del ´50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad (Margara et al., 1998).

Del análisis de la bibliografía consultada, presentada en los resultados evidenció que en muchas especies el desarrollo de yemas se ve favorecido usando medios nutritivos reducidos en concentración de sales, pero es importante señalar que el efecto de las sales minerales depende exclusivamente de la especie utilizada (Mogollón, Díaz y Hernández, 2004).

Una vez recopilada la información relacionada al tema descrito, se dividen en temas de interés para el lector, se evaluaron 14 artículos publicados en las bases de datos, seis tesis de grado y posgrado y cuatro libros. Se identificó información disponible en relación a los métodos tradicionales de la piña, a la propagación *in vitro* como alternativa de producción y a los beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural (Tabla 2).

Tabla 2

Artículos científicos y tesis de grado y posgrado revisados de acuerdo al estudio implementado que han sido utilizados para la recopilación *de información*

AUTOR (CITA)	TITULO	BASE DE DATOS/REVISTA/LIBROS
(Cetre et al., 2020)	Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento vegetativo de vitroplantas de piña (*Anana comosus* L. Merr)	Scribd
(INIA, 2019)	Manual de propagación *in vitro* de piña *Ananas comosus*. Var MD-2 Golden utilizando biorreactores de inmersión temporal	INIA
(Moreira y Uguña, 2018)	Diagnóstico base del cultivo de piña en Ecuador con énfasis en el cultivo del cultivar "criolla o milagreña"	ResearchGate
(Molina et al., 2018)	Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piñas *Ananas comusus* L. Merr. Variedad Golden	Agrociencias
(SIAP, 2018)	Piña, reina de las frutas tropicales	Agriculturamex
(Cárdenas, 2016)	Factores que inciden en los niveles de exportación de la piña Ecuatoriana al mercado chileno	Repositorio Institucional de la Universidad de Guayaquil
(Ebel, et al., 2016)	Morphoanatomical leaf "D" evaluation of pineapple (Ananas comosus (L.) Merr.var. comosus) in response of two cropping systems in Corrientes, Argentina	Acta agronómica
(Rodríguez et al., 2016).	Producción de frutas de piña Ananas comosus L Merr. MD-2 a partir de vitroplantas.	Scielo
(AGROPER, 2016)	Propagación Asexual	Scielo
(Rueda, 2015)	Botánica sistemática. 1ra. Ed. Electrónica, Quito, Ecuador, Universidad de las Fuerzas Armadas	Repositorio de la Unidad de Fuerzas Armadas ESPE
(Ajila, 2014)	Interacción de hormonas vegetales utilizadas en la fase de establecimiento *in vitro* en	Repositorio Digital de la UTMACH

	explantes de piña (*Ananas comosus* L.)	
(Murillo y Del Rocio, 2013)	Establecimiento de tres medios de cultivo para la fase de enraizamiento *in vitro* de anturio (*Anthurium andreanum*)	Repositorio Digital de la UTMACH
(Cerratos, 2013)	Panorama mundial de la piña	Scribd
(Medina y Mena, 2011)	Selección clonal de germoplasma élite de *Ananas comosus* L. «piña de castilla del Chocó» para la obtención de material de siembra para el establecimiento de cultivos comerciales, vía cultivo *in vitro*	Dialnet
(Saucedo et al., 2008)	Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades champaka y hawaiana.	Ciencia y tecnología
(Segretín, 2006)	Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).	ArgenBio
(MADR, 2004)	Propagación asexual de plantas	Ecojardines
(Londoño y Osorio, 2004)	Obtenciónde plantulas Ananas comosus mediante cultivos *in vitros* a partir de yemas axilares.	Repositorio Digital Uquindio
(Toro, 2004)	Establecimiento de protocolos para regeneración *in vitro* de cerezo 33 dulce (Prunusavium) var. Lambert.	Repositorio digital UCT
(Ruíz, 2000)	Efectos del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andreanum* L (en línea)	Redalyc
(Roca y Mroginsk, 1991)	Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones	Libro
(Pierik, 1990)	Cultivo *in vitro* de las plantas superiores	Libro
(Margara et al., 1998)	Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* los meristemos y la organogénesis	Libro
(León, 1987)	Botánica de los cultivos tropicales	Libro

Autoría propia

4.1 Descripción los métodos tradicionales de propagación de la piña

La propagación tradicional se realiza enraizando las coronas formadas encima del fruto, enteras o divididas longitudinalmente, o por los brotes laterales que surgen de distintas posiciones en el tronco de la planta. El suministro de material a plantaciones comerciales por este sistema, tiene el gran inconveniente de que únicamente se obtenían en unas 10-13 plántulas con referencia a cada planta por ciclo de cultivo de 18 meses y se tarda, a partir de la corona, 13 años en producir suficiente cantidad de material, para sembrar una hectárea, siempre y cuando se dividan en cinco trozos cada corona. Este problema ha sido parcialmente solucionado mediante los métodos de propagación empleando segmentos de tronco de plantas maduras (Margara et al., 1998). En este sentido lo que supone una ligera mejoría en la propagación de la piña y ha sido empleado en todos los países productores.

La cantidad de plantas que se pueden obtener por este sistema es de un 50 – 60 % de las hojas que posea la corona, de las cuales en condiciones idóneas (esterilización del sustrato, tipo de sustrato, desinfección óptima de la (hoja-yema, tipo de sombreado, etc.) sobrevive un 80%, que a los seis meses de cultivo se pueden pasar a tierra y a los 18 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 (Medina y Mena, 2011).

La propagación de *A. comosus* es estrictamente vegetativa y para establecer plantaciones nuevas se utilizan brotes vegetativos que la planta madre emite en forma natural, como la corona, hijuelos, chupones y retoños. La corona se localiza en la parte superior del fruto y se obtiene una corona por planta, aunque no es muy utilizada por ser parte del fruto, presenta el más rápido y uniforme crecimiento vegetativo; sin embargo, se considera de menor calidad por que presenta mayor porcentaje de mortalidad en la época lluviosa (Cerratos, 2013).

Los hijuelos basales se encuentran localizados en el pedúnculo de la fruta y se pueden obtener de uno a tres semillas asexuales de vigor intermedio por planta. El problema con este material es que presenta una curvatura en la parte inferior, poco deseado para la siembra (Cárdenas, 2016). Los hijos axilares provienen de la parte media y el tallo de la planta, estos encuentran por encima del suelo y se producen de las yemas axilares del tallo. Estos hijos presentan mejor desarrollo vegetativo y se pueden dejar de una segunda cosecha (Ruíz, 2000).

También pueden utilizar el sistema de reproducción de semillas asexuales de pie de planta o retoños, los que provienen del tallo de la planta por debajo del suelo; estos generalmente

son más grandes y de mayor peso, normalmente sus hojas son más largas que las de los demás brotes de la planta; aunque es necesaria la estimulación mediante el uso de hormonas de crecimiento (Cárdenas, 2016). Dado que la piña es una especie herbácea perenne, basta con proporcionar una sola vez el material vegetativo a un productor, para que él obtenga semilla asexual para sus siembras de manera indefinida y durante muchos ciclos. Sin embargo, esta primera cosecha de brotes ocurre en promedio a los 16 meses después del inicio del ciclo del cultivo (Londoño y Osorio, 2004).

Por otro lado, la selección es fundamental para el éxito inicial en la etapa de establecimiento del cultivo, depende en gran proporción del material de propagación que se seleccione; las características de tamaño, peso, genética y sanidad, son un factor fundamental para obtener buen desarrollo en la planta y alta productividad. En este sentido, una adecuada clasificación comienza con la separación de la semilla asexual según el sitio del cual se obtenga en la planta (corona, basal, axilar o pie de planta); la segunda clasificación se realiza de acuerdo al tamaño y peso de esta semilla, ejemplo: hijuelos, de 100 a 250 g son pequeños, de 250 a 400 g son medianos y de 400 g en adelante son grandes. De esta forma se pueden obtener en la nueva plantación, un desarrollo, floración y cosecha uniformes favoreciendo las labores de manejo y comercialización de la fruta (Ajila, 2014).

4.2 Identificación de información disponible en relación a la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción.

El cultivo *in vitro* es una técnica muy utilizada en especies de importancia económica, permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida (Segretín, 2006). La técnica propagación *in vitro* de plantas expone importantes ventajas que se relaciona al incremento acelerado del número de plantas por cada genotipo, la reducción del tiempo de multiplicación, producción permanente de material, la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida simplificando costos, tener un mayor control sobre la sanidad del material propagado, facilidad para el transporte del material, posibilidades de multiplicar con rapidez una variedad del cual se posean pocos individuos (Ajila, 2014).

En general la propagación *in vitro* es una técnica de laboratorio, que prepara el material colectado a propagar, lo desinfecta, luego se siembra en un medio de cultivo enriquecido, allí se multiplica, se cultiva en un medio de enraizamiento, luego se lleva a condiciones de invernadero para su aclimatación y producción de nuevas raíces, y por último las plantas se

siembran en el campo. En la propagación las etapas de enraizamiento y aclimatación, son las más importantes para la aplicación comercial cuyo éxito depende del número de plantas que sobreviven in vivo (Cetre et al., 2020).

4.2.1 Proceso de la propagación *in vitro* de la piña como alternativa de producción.

a. Material vegetal

Al mencionar el material vegetal, se determinan brotes axilares de piña (*A. comosus*), de aproximadamente cinco meses de edad, 60 cm de longitud y 18 brácteas; los cuales se extraen de plantas maduras identificadas en parcelas de agricultores. La necesidad de material vegetal de calidad para la siembra, ha motivado al estudio de técnicas de propagación *in vitro* de los tejidos vegetales; no siendo la excepción la propagación *in vitro* de piña *(A. comosus). E*ntre sus principales beneficios están el que permite producir en un tiempo relativamente corto, una considerable cantidad de material de buena calidad libre de enfermedades, disponible para ser suministrado a los agricultores, lo que es posible obtener a partir del cultivo de tejidos meristemáticos (Ajila, 2014).

b. Tratamiento sanitario del material vegetal

La propagación *in vitro* ha sido considerablemente utilizada para lograr la rápida multiplicación de numerosas especies vegetales, y entre ellas a la piña (*A. comosus*). El éxito de esta técnica en escala comercial depende de la habilidad y capacidad de transferir las plantas a condiciones *ex vitro*, pues la adecuada implementación de la técnica empleada determinará o no la obtención de una alta tasa de supervivencia de las plantas, por lo que el tratamiento sanitario del material vegetal es esencial, pues los brotes se sumergen en solución desinfectante antes de su uso (Instituto Nacional de Innovación Agraria [INIA], 2019).

Por tal razón, se evidenció en los documentos más relevantes consultados que, el protocolo de desinfección óptimo para realizar la introducción de las yemas de la corona de piña es, mediante el uso del tratamiento T5 (25% de cloro comercial por 10 minutos para la primera desinfección y 15% de cloro comercial por 10 minutos‟ para la segunda desinfección).

Así se pudo analizar con base al medio de cultivo, para la obtención de un mayor número de brotes en la multiplicación debe considerarse una tasa de multiplicación de 11 a través del método de destrucción del meristemo terminal.

c. Preparación del material vegetal

En cuanto la preparación del material vegetal es el proceso seguido del tratamiento, pues estos brotes son cortados en dos partes apical y basal, a fin de quedarse con la región intermedia donde se concentra el cormo con yemas no diferenciadas.

Este material procede a lavarse en constante agitación con agua y detergente por un intermedio de 10 minutos. Enseguida, se trata con 2 $mL.L^{-1}$ de Kasumin (kasugamicina) por 20 minutos, se enjuaga con agua destilada y serán las brácteas para exponer el cormo. Finalmente, el cormo resultante es lavado y nuevamente tratado con 2 $mL.L^{-1}$ de Kasumin por un intervalo de 10 minutos con menor frecuencia de agitación a fin de evitar daño físico en las yemas axilares expuestas. Luego de este tratamiento el cormo se lava por dos veces y se lleva a la cámara de flujo laminar para su desinfección (Murrillo y Del Rocíol, 2013).

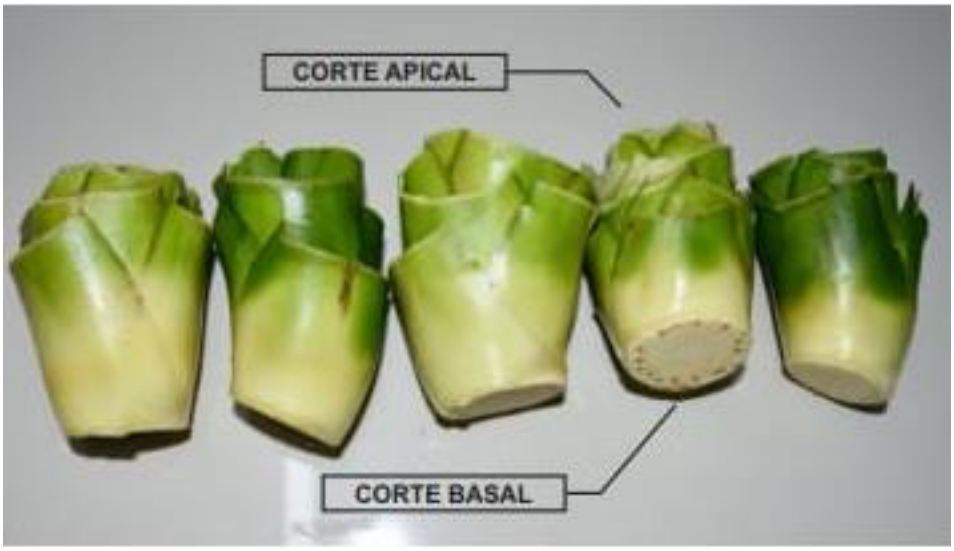

Figura 1. Cortes apicales y basales de las coronas de *A. comosus*
Tomado de (INIA, 2019)

d. Desinfección

Este proceso determinar la desinfección, esta se realiza en dos etapas, la primera consiste en colocar el cormo en una solución de 1 % de hipoclorito de sodio por un intervalo de 20 minutos en constante agitación y luego se enjuagan tres veces por un minuto cada uno, con agua destilada estéril. Esta actividad se realiza en la cámara de flujo laminar. La segunda etapa, las yemas axilares son tratadas con 0,5 % de hipoclorito de sodio por cinco minutos y posteriormente enjuagados tres veces con agua destilada estéril y son inoculadas en un medio de cultivo líquido en agitación (65 rpm) para su diferenciación (INIA, 2019).

e. Condiciones de cultivo in vitro

Como indica Rodríguez et al. (2016), la propagación puede llevarse a cabo a través de tres vías de regeneración, a saber: brotación de yemas axilares preexistentes, producción de yemas de novo. Partiendo de este material vegetal, para completar esta técnica es necesario cumplir cinco etapas fundamentales, que son:

- Preparatoria o fase 0: Selección de las plantas madres que sean sanas, vigorosas y fuera de estrés, libres de deficiencias o enfermedades por hongos o virus para poder obtener inóculos de buena calidad.
- Establecimiento o iniciación del cultivo: Consiste en el acondicionamiento del explante para garantizar su supervivencia en condiciones de laboratorio, se debe evitar al máximo problemas de contaminación y de oxidación que pueden causar la muerte del explante.
- Multiplicación de vástagos o embriones: Finalizada la fase de establecimiento del cultivo, se traslada el brote a un nuevo medio de cultivo. A medida que el explante comienza a crecer y multiplicarse es subdividido y cada nuevo explante es cultivado individualmente en un nuevo medio de cultivo, una vez multiplicado y desarrollado, nuevamente es subdividido (subcultivo); el número de subdivisiones depende de la especie.
- Enraizamiento: En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias, lo cual puede llevarse a cabo tanto *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso suelen emplearse reguladores de crecimiento y sustratos apropiados, en el segundo caso, suelen emplearse previamente esterilizados tierra, abono, arena en mezclas con diferentes proporciones.

En este sentido, para la diferenciación de yemas y multiplicación de brotes se debe emplear medios de cultivo líquido compuesto por sales minerales, a media concentración (diferenciación) y concentración completa (multiplicación) enriquecidos con vitaminas y suplementados con reguladores de crecimiento para cada etapa (Tabla 3) (INIA, 2019).

Tabla 3

Medios de cultivo líquido compuesto por sales minerales a media concentración (diferenciación de yemas) y concentración completa (mulplicación de brotes) enriquecidos con vitaminas y reguladores de crecimiento para cada etapa.

	Concentración
Diferenciación	Thiamine-HCl 0,4 mg.L^{-1} + ácido anicónico 0,5 mg.L^{-1} + 6-bencil amino purina (BAP) 3 mg.L^{-1} + 10% (v/v) de endospermo líquido de coco + sacarosa 30 g.L^{-1}
Multiplicación:	Thiamine-HCl 0,4 mg.L^{-1} + ácido nicotínico 0,5 mg.L^{-1} + 6-bencil amino purina (BAP) 2 mg.L^{-1} + ácido naftaleacéco (ANA) 0,3mg.L^{-1} + sacarosa 30 g.L^{-1}. Ambos medios de cultivo con un pH=5,8 (Murashige & Skoog, 1962)

Tomado de (INIA, 2019)

f. Condiciones de incubación in vitro

Las condiciones de crecimiento en el área de incubación del laboratorio son esenciales para las dos etapas diferenciación y multiplicación. Deben respetarse temperaturas de 24±2 °C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de 800 lux, la cual se aporta con luz proveniente de lámparas fluorescentes o de focos led. A diferencia de la etapa de multiplicación, las yemas que inician el proceso de diferenciación son expuestas inicialmente a condiciones de oscuridad total por 48 horas.



Figura 2. Incubación *in vitro* en laboratorios

Tomado de (INIA, 2019)

g. Preaclimatación de plántulas

Las plántulas de piña contenidas en los biorreactores se trasladan a vivero de aclimatación, en el cual permanecen por espacio de tres a cuatro días, entre ese tiempo el frasco se abre poco a poco para que entren en contacto con las condiciones ambientales naturales (Molina, Orellana, González y Areválo, 2018).

Estudios realizados por Rodríguez et al. (2016), sobre la micropropagación de piña variedad Champaka F-153 evaluaron en la fase de aclimatación el efecto de diferentes sustratos y observaron que el sustrato de fibra de coco molida presentó los mejores resultados en longitud promedio de raíz (2.06 cm).

Molina et al. (2018) mencionan sobre el Sistema de Inmersión Temporal y método convencional para la variable longitud promedio de raíz (cm), en esta investigación los resultados fueron muy similares a los obtenidos por (Ebel, Giménez, González y Luaces, 2016); los datos presentados en las variables longitud promedio de explantes (cm) y número promedio de raíces no coincidieron con los de Pineda et al. (2012) y (Medina y Mena, 2011), siendo estos mayores que los obtenidos por ambos métodos en la investigación y para la variable porcentaje de sobrevivencia (%) los resultados concuerdan con los planteados por (Ajila, 2014), posiblemente esto se debe a los siguientes factores: al trasladar las vitroplantas del laboratorio de cultivo de tejidos al área de invernadero requieren que se les proporcionen las condiciones idóneas para que puedan aclimatarse y desarrollarse, una de estas es la humedad relativa ya que las plantas cultivadas *in vitro* tienen generalmente la cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa, 90-100% que se da *in vitro* (Cetre et al., 2020). Por tal razón los primeros días son determinantes ya que las vitroplantas deben ser colocadas en un propagador que debe estar cerrado por un cierto tiempo (ocho días), para que las vitroplantas se acostumbren a las condiciones *ex vitro*.

h. Aclimatación de plántulas

Esta etapa procede después de la preaclimatación de plántulas de piña, éstas son guardadas de los frascos contenedores y son lavadas en agua destilada para eliminación de restos de medio de cultivo, así mismo se individualizan las plántulas de los clústers, con la finalidad de homogenizar el tamaño en las bandejas de aclimatación. Se realiza una inmersión en solución fungicida Benomyl ($1g.L^{-1}$), se deja secar por espacio de 20 minutos, finalmente se coloca una plántula en un tubete conteniendo el sustrato específico para aclimatación (INIA, 2019).



Figura 3. Planta para aclimatar
Tomado de (INIA, 2019)

Los sustratos son autoclavados en bolsas de polipropileno a 121 °C y una atmósfera de presión por 30 minutos. Se deja enfriar por un día y se llenan los tubetes de las bandejas aclimatadoras. Vale destacar que si la producción es mayor y no se cuenta con equipo autoclave existen otros métodos de esterilización que funcionan exitosamente. En cuanto al riego, se debe considerar que, con el tipo de sustrato mencionado, se puede realizarse tres veces por semana considerando un riego profundo en la cuarta vez para eliminar restos de sales que se acumulen, provenientes de la fertilización (INIA, 2019).

La obtención masiva de plantas a partir de la micropropagación incluye varias fases: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Siendo la última fase, la que comprende el paso de las vitroplantas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, y es considerada la etapa más crítica de la micropropagación porque, se pierden entre el 50 a 90 % de vitroplantas (Rueda, 2015). Por lo que, el manejo de las vitroplantas en condiciones *ex vitro*, es determinante y fundamental para lograr la obtención de más de un 90% de supervivencia. Para ello, la elección del material a considerar en esta etapa es importante para evitar pérdida de material vegetal. Con base en lo mencionado anteriormente el objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes sustratos para lograr el crecimiento vegetativo de las vitroplantas en la fase de aclimatación.

i. Fertilización

En este sentido en cuanto al proceso de fertilización debe ser aplicada en forma conjunta en el momento del riego, es decir es un procedimiento que va de la mano con la aclimatación y el riego. Se da por medio de soluciones nutritivas NPK + Microelementos, considerándose una conductividad eléctrica (CE) de 1000 μS. La aplicación se realiza tres veces por semana en el agua de riego (INIA, 2019).

Las necesidades del nitrógeno son permanentes, desde que se establece la planta hasta que el fruto madura fisiológicamente, sin embargo, la aplicación de Nitrógeno debe ser cuidadosa en las semanas previas a la inducción de floración pues una excesiva fertilización en nitrógeno puede interferir en ella (Sánchez, 2014).

En cuanto a la cantidad de nutrimentos, el magnesio requerido por la piña es 1/5 de las cantidades de potasio (K_2O) y la deficiencia de hierro (Fe_2O_3) es común en los suelos piñeros debido a las altas cantidades de Manganeso (MnO_2), lo cual es normal en suelos ácidos. Otros elementos que se encuentran en deficiencia son el zinc (ZnO) y el cobre (CuO) por las mismas condiciones de suelo ácidos. Según la densidad de plantas utilizada, se requieren durante el ciclo de cultivo, de 12 a 18 gramos de nitrógeno por planta; de cuatro a cinco gramos de fósforo (P_2O_5); de 12 a 18 gramos de potasio (K_2O); y de dos a cuatro gramos de magnesio (MgO). Estos nutrimentos se distribuyen en cuatro o cinco aplicaciones solidas o sus equivalentes 12 a 15 aplicaciones liquidas en aspersión total antes de que la planta inicie su floración (Murrillo y Del Rocíol, 2013).

j. Control fitosanitario

Para tener plantas sanas de piña se debe aplicar soluciones fungicidas e insecticidas solo si se corre el riesgo de ataque de plagas y enfermedades en vivero, con el fin de obtener plantas sanas y vigorosas. Es de gran importancia manejar y utilizar equipos de protección personal al momento de preparar y aplicar pesticidas (Murrillo y Del Rocíol, 2013).

k. Composición de los medios de cultivo

La composición de un medio de cultivo adecuado utilizado en la propagación *in vitro* de piña es muy impórtate, este medio de cultivo contiene los nutrientes necesarios en cantidades adecuadas para el desarrollo del explane, dentro del medio de cultivo se utiliza la composición de soluciones Stock, mismas que están formuladas por sales minerales (Tabla 4) (Saucedo et al., 2008).

Tabla 4

Composición de soluciones stock (soluciones madre) utilizadas en la propagacion in vitro de la piña

STOCK	REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK (gl-1)
Stock A	NH4NO3	82,5
	Nitrato de amonio	
Stock B	NNO3	95
	Nitrato de potasio	
Stock C	CaCl2.2H2O	88
	Cloruro de calcio hidratado	
Stock D	KH2PO4	34
	Fosfato de potasio monobasico	
Stock E	Na2MoO4.2H2O	0,05
	Molibdato de sodio dehidratado	
	CoCl2.6H2O	0,005
	Cloruro de cobalto hexahidratado	
	Kl	0,166
	Cloruro de potasio	
	H3BO3	1,23
	Acido borico	
Stock F	MnSO4.4H2O	3,38
	Sulfato de manganeso tetrahidratado	
	MgSO4.7H2O	74
	Sulfato de magnesio heptahidratado	
	ZnSO4.7H2O	1,725
	Sulfato de zinc heptahidrtado	
	CuSO4.5H2O	0,005
	Sulfato de cobre pentahjidratado	
Stock G	Na2EDTA.2H2O	1,865
	Disodium ethylenediaminetetraacetate	
	dihidratado	
	FeSO.7H2O	1,39
	Sulfato ferroso heptahidratado	

Tomado de (INIA, 2019)

Por otra parte, Cetre et al. (2020) señala que, al aplicar hormonas (auxina/citoquinina) al medio de cultivo, debe existir un balance entre ambos; así, al aumentar la cantidad de citoquinina con respecto a la auxina, se induce la formación de brotes. Suárez por su lado, señala que las necesidades de citoquinina (tipo de citoquininas y concentración) son extremadamente variables y dependen del contenido endógeno de cada especie (Suárez, 2011).

El medio de cultivo puede ser inicialmente ácido e inicialmente básico, para el caso del pH ácido se ajusta con hidróxido de potasio (KOH) y en el caso del pH básico se ajusta con ácido clorhídrico (HCl) y así poder llegar a un pH con un valor entre 5.7 - 5.8, que es el requerido para este tipo de medios de cultivo. Los medios de cultivo se preparan uno o dos días antes de su uso (Tabla 5).

Tabla 5

Medio de inducción de reactivos que se usan en la propagación in vitro de piña

Reactivos	Volumen (1000 mL)
A, B,G	10 mL
C, D, E, F	2,5 mL
Thiamina (1 000 ppm)	0,4 mL
Ácido nicotínico (1 000 ppm)	0,5 mL
Azúcar	30g
ELC-Endospermo líquido de coco	100 mL
BAP- Bencilamino purina	3 mg
pH 5,7 (KOH-Hidróxido de potasio- 1M)	
Esterilización de autoclave	15 min.

Tomado de (INIA, 2019)

l. Flujograma de la propagación in vitro de piña (A. Comosus)

La planta de piña debe producir la energía necesaria para la toma de los nutrientes es producida por el proceso de respiración de las raíces de las plantas. Este proceso depende del suministro de oxígeno en la atmósfera del suelo. De tal manera, una pobre aireación inhibe la absorción de muchos nutrimentos y afecta el estado de oxidación de algunos nutrientes esenciales (Alfaro, 2011).

A continuación se presenta un flujograma con el propósito de establecer los procesos de propagación a mayor escala mediante un protocolo más definido para proyectos de producción de semilla certificada de piña (*A. comusus*).

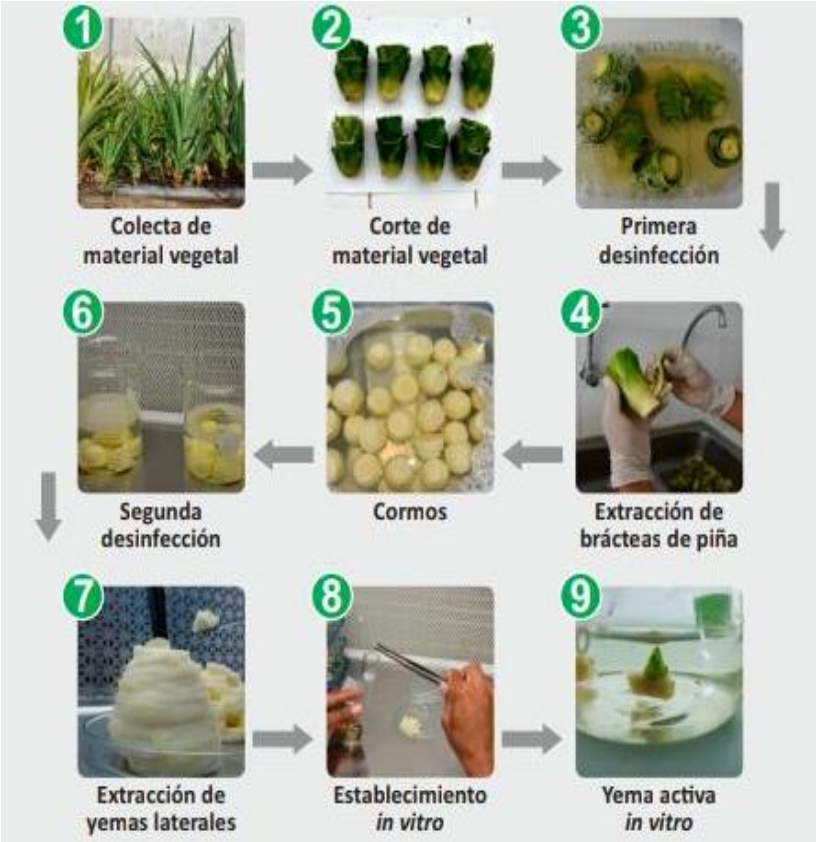

Figura 4. Establecimiento *in vitro*

Tomado de (INIA, 2019)



Figura 5. Multiplicación convencional *in vitro*

Tomado de (INIA, 2019)

m. Factores limitantes del cultivo in vitro

Los factores limitantes del cultivo *in vitro son:*

- Fenolización: producida por acción de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas, esto sucede cuando lesionamos los tejidos, proporcionando como resultado final compuestos quinónicos muy tóxicos para los explantes (Toro, 2004) citado por (INIA, 2019).
- Contaminación: Se presenta de forma exógena por una mala esterilización del material vegetal, y también de manera endógena, cuando hay contaminantes sistémicos muy difíciles de eliminar. es necesario aclara que los contaminadores provienen del: explante, el medio, el aire y de la persona que realiza la investigación por no haber tomado todas las precauciones necesarias. (INIA, 2019).
- Contaminación exógena: El explante lleva la contaminación en la superficie y para eliminar se necesita un protocolo de desinfección, habitualmente se usa soluciones de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones, de 1 al 3%. También se puede se puede utilizar desinfectantes tales como el yodo, fungicidas, y otros bactericidas químicos.
- Contaminación endógena: Se debe a una infección dentro del tejido y es muy difícil de descartar, para eso se debe usar fungistáticos y bacteriostáticos en el medio, asimismo se aplica gentamicina, penicilina y sulfato de estreptomicina de 10 mg a 50 $mg.L^{-1}$ (Ajila, 2014).

4.3 Determinación de los beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña

La propagación *in vitro,* es una técnica que permite obtener plantas sanas y vigorosas en condiciones completamente asépticas, en la que se puede generar u obtener a partir de un pequeño segmento inicial de tejido grandes cantidades de plantas genéticamente iguales a la planta madre, por lo tanto es de gran importancia seleccionar de manera correcta el genotipo que se va a propagar, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas o químicas controladas en un medio de cultivo. En el caso de la propagación tradicional, la piña puede reproducirse asexualmente a partir de bulbos, rizomas, tubérculos, hijuelos, estolones, entre otros (Rodríguez et al., 2016).

4.3.1 Beneficios

Tabla 6

Beneficios de la propagación in vitro de la piña

BENEFICIOS	Permite propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria
	Permite obtener plantas libres de enfermedades como hongos y bacterias, pues se realiza el proceso de desinfección exógeno y endógeno
	Permite optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales
	Facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña
	Puede conservar material biológico por periodo de tiempo prolongados
	Se puede incluir aspectos de fitomejoramiento
	Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos
	Permite la ampliación de la base genética de una especie
	Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas
	Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año
	El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo, de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios
	Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia
	Permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales)

Tomado de (Margara y Urbano, 1988)

Los resultados del análisis de la bibliografía consultada evidencio que muchas especies el desarrollo de yemas se ve favorecido usando medios nutritivos reducidos en concentración de sales, pero es importante señalar que el efecto de las sales minerales depende exclusivamente de la especie utilizada. Concluyendo que la propagación *in vitro* para *A. comosus* es una herramienta de control genético para garantizar el éxito del cultivo. Por otra parte la propagación asexual también aporta beneficios, pero estos a comparación de la propagación *in vitro* son menos ventajosos (Tabla 7).

Tabla 7

Beneficio de la propagación asexual natural de la piña

Beneficios	Posibilidad de seleccionar genotipos de una gran cantidad de clones y propagarlos indefinidamente por métodos vegetativos
	Fijar y mantener genotipos superiores. Importante cuando se trata de preservar variedades altamente heterocigotas, incrementar la población de un genotipo determinado
	Combinación de más de un genotipo en una sola planta
	Población de plantas uniformes
	Facilidad de propagación en muchas especies
	Único método de propagación en plantas que no producen semillas (partenocarpia: mandarina, naranja, vid) o semillas viables (banano, higuera, fresa)
	Acortamiento del periodo vegetativo de la planta, importante en la propagación de especies leñosas, orquídeas y bulbos que tiene un periodo de juvenilidad muy prolongado
	Controlar fases de desarrollo o formas de crecimiento de las plantas: desarrollo plagiotrópico, ortotrópico, topófisis, epigenia, etc.
	Permite la ampliación de la base genética de una especie
	Es un método económico, propagación en masa sin variación del genotipo de una especie determinada

Tomado de (AGROPER, 2016)

4.3.2 Análisis sobre beneficios de la propagación *in vitro* frente a la propagación natural de piña.

Los beneficios de la propagación *in vitro* de la piña (*A. comosus*) frente a la propagación natural son muchos, el principal beneficio de esta técnica de propagación permite obtener plantas libres de enfermedades, es decir hongos, bacterias, micoplasmas, virus y viroides. En este sentido la propagación *in vitro* admite propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria. Optimizando el uso de factores ambientales y nutricionales (AGROPER, 2016). En el caso de la propagación natural, esta facilita la diseminación de virus en plantas que se propagan por este medio; tal como es el caso de la piña. Por otra parte, los clones pueden presentar escasa capacidad de adaptación frente a cambios ambientales radicales, es decir temperaturas extremas, sequía.

En cuanto a otra de las ventajas de la propagación *in vitro* es que en una superficie pequeña se puede tener un gran número de plantas, además que se puede conservar el material biológico por periodos de tiempo prolongados. Por otra parte, mediante este método de propagación se puede incluir aspectos de fitomejoramiento.

En otro aspecto, la propagación natural presenta excesiva uniformidad genética de una población de plantas (como en los monocultivos a gran escala) facilitan el ataque de patógenos y plagas. Por lo que puede originar pérdida de variabilidad genética de una especie o el desplazamiento de parientes relacionados provocando erosión genética (monocultivo continuado, pérdida de variedades tradicionales).

Una de las variedades más promisorias para el cultivo de la piña con fines comerciales en Ecuador y otras zonas tropicales es la MD-2, por ello se ha permitido aplicar las técnicas de micropropagación, con el fin de lograr plantas con mejores caracteres agronómicos y producir semilla asexual de excelente calidad. El cultivo *in vitro* es una técnica muy utilizada en especies de importancia económica, ayuda a la obtencón individuos selectos en forma rápida. Por lo que los cultivos son realizados por personal especializado en medios específicos y condiciones ambientales controladas tales como; temperatura, humedad y luz.

Conclusiones

Los métodos tradicionales de propagación se lo realiza enraizando las coronas formadas encima del fruto, enteras o divididas longitudinalmente, o por los brotes laterales que surgen de distintas posiciones en el tronco de la planta, esta es la forma más sencilla de propagar esta fruta aunque su producción de cosecha es baja ya que únicamente se obtienen de 10 a 13 plantas por ciclo de cultivo en 18 meses y, en el caso de los hijuelos basales se pueden obtener de una a tres semillas asexuales de vigor intermedio por planta además de que presenta una curvatura en la parte inferior, poco deseada para la siembra. Para producir suficiente cantidad de material para una hectárea de piña a partir de la corona se necesitarían 13 años, por otra parte, este tipo de propagación se ve afectada en gran medida por la aparición de plagas y enfermedades que inciden de forma negativa en el cultivo.

La propagación *in vitro* como alternativa de producción es una técnica de laboratorio, donde se prepara el material colectado a propagar, este material se desinfecta para luego sembrarlo en un medio de cultivo enriquecido, donde se multiplica y se extraen los brotes que serán cultivados en un medio de enraizamiento, posteriormente pasan a las condiciones de invernadero para su aclimatación y producción de nuevas raíces, posteriormente se siembran las plántulas en el campo. En la técnica de propagación de inmersión temporal para la variable longitud promedio de raíz (cm) y longitud promedio de exaplantes (cm) no hubo similitudes entre varios autores coincidiendo solo en el porcentaje de sobrevivencia, esto es posible debido a los factores de traslado de vitroplantas del laboratorio al área de invernadero.

Los beneficios que aporta la propagación *in vitro* a comparación de la propagación natural son varios, uno de los principales es que permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas y embriones, se obtienen individuos selectos en forma rápida, esto por lo que los cultivos son realizados por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales controladas tales como; temperatura, humedad y luz. Con esta técnica se logra tener plantas con mejores caracteres agronómicos y producir hijuelos o propágulos de excelente calidad demás de la obtención de un mayor número de brotes y plantas libres de enfermedades. Constituye una de las técnicas biotecnológicas que ha contribuido de manera positiva a la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

Recomendaciones

En base a los resultados y conclusiones obtenidas de la revisión documental, se sugieren estas recomendaciones:

Realizar más investigaciones sobre la propagación *in vitro* de la piña en el Ecuador, puesto a que esta fruta es significativa dentro del país ya que es de exportación y además es de interés económico a nivel mundial, por ende, deber ser más estudiada a nivel de laboratorio debido a su difícil propagación en condiciones naturales. Es por ello que se necesitan más estudios que ayuden a dar información actualizad a las personas interesadas en la propagación *in vitro* de la piña, orientándolos así a mejorar su producción.

Se sugiere el uso de plántulas obtenidas por medio de la técnica de propagación *in vitro,* debido a que esta técnica de propagación al ser realiza bajo condiciones controlas y de asepsia da origen a plántulas sanas, libres de enfermedades, resistentes (plagas, enfermedades) y además se puede obtener un mayor número de plántulas en menos tiempo, asegurando así la producción del cultivo de piña.

Referencias

AGROPER (2016). *PROPAGACION ASEXUAL*. Recuperado de http://www.lamolina.edu.pe/hortalizas/Ense%C3%B1anza/Clases%20PROPA/SPP.PROPAGACION%20ASEXUAL.pdf

Alfaro, G., Johansen, J., Dighe, S. A., Duamel, G., Kozminski, K. G. y Beh, C. T. (2011). The sterol-binding protein Kes1/Osh4p is a regulator of polarized exocytosis. *Traffic, 12*(11), 1521-36. Recuperado de https://www.yeastgenome.org/reference/S000146382

Ajila, G. (2014). *Interacción de hormonas vegetales utilizadas en la fase de establecimiento in vitro en explantes de piña (Ananas comosus L.), "hibrido md-2"* (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Machala. Facultad Ciencias Agropecuarias. Machala. Ecuador.

Recuperado de http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1055

Basantes, S. y Chasipanta, J. (2012). *Determinación del requerimiento nutricional del fósforo sobre la inducción floral en el cultivo de piña (Ananas comosus)* (tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas Ecuador ESPE, Sangolquí. Ecuador.

Recuperado de http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8021/1/T-ESPE-IASA%20I-004680.pdf

Blanco, H., Vargas, T., y García, E. (2017). Regeneración in vitro de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora. *Revista Colombiana de Biotecnología, 19*(1), 7-20. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/65561

Buendía, C. (2015). *Micropropagación in vitro de piña, Ananas comosus (L.) Merr Var. MD2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal* (tesis de posgrado).Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Peru.

Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.12672/3944

Cárdenas, E. (2016). *Factores que inciden en los niveles de exportación de la piña Ecuatoriana al mercado chileno* (tesis de posgrado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

Recuperado de https://es.scribd.com/document/362888447/Panorama-Mundial-de-La-Pina

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

Recuperado de http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf

Cerratos, I. (2013). *Panorama mundial de la piña*. Recuperado de https://es.scribd.com/document/362888447/Panorama-Mundial-de-La-Pina

Cetre, C., Fernadez, V., y Corozo, Q. (2020). Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento vegetativo de vitroplantas de piña (*Anana comosus* L. Merr) var. Perolera. *La Técnica: Revista de las Agrociencias. ISSN 2477-8982*, 21-32. Recuperado de https://revistas.utm.edu.ec/index.php/latecnica/article/view/2702

Cuellar, J., y Somoza, C. (2015). Multiplicación in vitro de piña MD-2 Ananas comosus L Merr. haciendo usos de fertilizantes comerciales. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, *4*, 77-88. Recuperado de https://lamjol.info/index.php/PAyDS/article/view/3965

Ebel, A., Giménez, L., González, A. & Luaces, P. (2016). Morphoanatomical leaf "D" evaluation of pineapple (Ananas comosus (L.) Merr.var. comosus) in response of two cropping systems in Corrientes, Argentina. *Acta Agronómica, 65*(4), 390-397. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/50560

Instituto Nacional de Innovación Agraria. (2019). *Manual de propagación in vitro de piña (Ananas comosus L. Merr.), var. MD-2 Golden utilizando biorreactores de inmersión temporal*. Recuperado de https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/572079/pub_manual-de-propagaci%C3%B3n-in-vitro-de-pi%C3%B1a.pdf

León, J. (1987). *Botánica de los cultivos tropicales en Costa Rica*. Recuperado de: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=bOMNAQAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=ananas+comosus+boatanica+sistematica&ots=_lODKASqIO&sig=3Wzj8LudI_yecmyizkrS2f1OBbQ#v=onepage&q=ananas%20comosus%20boatanica%20sistematica&f=false

Lescano, L. (2003). *El cultivo del tabaco (Nicotiana tabacum L.) tipo Burley en Bagua y Jaén; y la piña (Ananas comosus L.) Merr. cv. 'Cayena Lisa' en el Valle del Río Apurímac* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María. Perú

Londoño, D. y Osorio, D. (2004). *Obtenciónde plantulas Ananas comosus mediante cultivos in vitros a partir de yemas axilares* (tesis de pregrado). Universidad del Quindío, Quinío. Colombia.

Recuperado de https://bdigital.uniquindio.edu.co/handle/001/5590

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2004). *Propagación asexual de plantas.* Recuperado de https://ecojardines.files.wordpress.com/ 2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf

Margara, J., Box, M., y Urbano, T. (1998). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro los meristemos y la organogénesis*. Madrid, España: Mundi Prensa.

Recuperado de: https://www.iberlibro.com/servlet/BookDetailsPL?bi=889108612&cm_sp=rec-_-pd_hw_o_1-_-bdp&reftag=pd_hw_o_1

Medina, M. y Mena, R. (2011). *Selección clonal de germoplasma élite de Ananas comosus L. Biodivers. Neotrop, 1*(2), 122-125. Recuperado de https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5168107

Mogollón, N., Díaz, J. y Hernández, N. (2004). Multiplicación conla y enraizamiento in vitro Ananas comosus L. Queen Australia. *Rev. Fac. Agron.(LUZ), 21*(1), 15-21. Recuperado de https://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/suplemento_2004/Mogollon%20et%20al.pdf

Molina, A., Orellana, M., González, J. y Areválo, C. (2018). Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (Ananas comosus L. Merr.) variedad Golden. *Revista Agrociencia, 1*(4), 48-57. Obtenido de https://www.agronomia.ues.edu.sv/agrociencia/index.php/1a1/article/view/22/23

Moreira, R. y Uguña, F. (2018, 23 de julio). Diagnóstico base del cultivo de piña en Ecuador con énfasis en el cultivo del cultivar criolla o milagreña. *Instituto Nacional de Investigacion Agropecuarias INIAP*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/322665769_DIAGNOSTICO_BASE_DEL_CULTIVO_DE_PINA_EN_ECUADOR_CON_ENFASIS_EN_EL_CULTIVO_DEL_CULTIVAR_CRIOLLA_O_MILAGRENA

Murashige, T., & Skoog, F. (1963). *A revised medium of rapid growthand bioassays with tobacco tissue culture*. doi: https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Murrillo, L. y Del Rocíol, J. (2013). *Establecimiento de tres medios de cultivo para a fase de enraizamiento in vitro de anturio* (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Machala, Machala. Ecuador.

Recuperado de http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1022

Pérez, J., Salgado, S., Córdova, S., Lagunes, L., y Ortiz, C. (2020). Evaluación de parámetros de crecimiento en piña" cabezona"(Ananas comosus (L.) Merr.) en respuesta a la fertilización NPK. *AgroProductividad, 13*(8).

Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/344445844_Evaluacion_de_parametros_de_crecimiento_en_pina_cabezona_Ananas_comosus_L_Merr_en_respuesta_a_la_fertilizacion_NPK

Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores en España.* Recuperado de https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/1516

Py, C., Lacoevilhe, J. y Teisson, C. (1984). *L'ananas sa culture: ses produits*. Recuperado de https://unctad.org/es/system/files/official-document/INFOCOMM_cp09_Pineapple_es.pdf

Toro, M. 2004. *Establecimiento de protocolos para regeneración in vitro de cerezo 33 dulce (Prunusavium) var. Lambert* (tesis de pregrado). Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

Recuperado de http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1022

Rocha, D. y Treminio, S. (2008). EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN REPRODUCCIÓN in vitro DEL CULTIVO DE PIÑA (Ananas comosus. L. Merr) CULTIVAR MD-2. (Trabajo de diploma). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

Recuperado de https://repositorio.una.edu.ni/2057/1/tnf62r672.pdf

Rodríguez, R., Becquer, R., Pino, Y., López, D., Rodríguez, R. C., Lorente, G. Y.,...González, J. (2016). Producción de frutas de piña Ananas comosus L Merr. MD-2 a partir de vitroplantas. *Cultivos tropicales*, *37*, 40-48. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362016000500006&script=sci_arttext&tlng=pt

Rueda, D. (2015). *Botánica sistemática* (tesis de pregrado). Universidad de las fuerzas Armadas-ESPE, Sangolqui. Ecuador.

Recuperado de http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10180/1/Bot%C3%A1nica%20sist%C3%A9mica.pdf

Roca, W. y Mroginsk, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones en* Cali, Colombia. Recuperado de: ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf

Ruíz, B. (2000). *Efectos del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de Anthurium andreanum L (en línea)* (tesis de pregrado). Universidad Zamorano. Honduras.

Recuperado de https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2744/1/CPA-2000-T061.pdf

Rural, M. (2004). *Propagación asexual de plantas.* Bogota, Colombia: Editorial Produmedios. Recuperado de https://ecojardines.files.wordpress.com/2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf

Sanchez, H. (2014). Fisilogía Vegetal. *Academia.* Recuperado de https://www.academia.edu/9072519/Fisiologia_de_la_piña

Saucedo, S., Varas, E., Carmigniani, F. y Ramos, L. (2008). Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades champaka y hawaiana. *Ciencia Y Tecnología, 1*(1), 49-54. Recuperado de https://doi.org/10.18779/cyt.v1i1.61

Servicio de Informaciñon Agroalimentaria y Pesquera (2018). *Piña, reina de las frutas tropicales*. Recuperado de https://www.gob.mx/siap/articulos/pina-reina-de-las-frutas-tropicales?idiom=es#:~:text=La%20piña%20es%20una%20fruta,cultivado%20durante%20cientos%20de%20años

Suárez, F. (2011). *Microporpagación in vitro de piña (Ananas comosus L. Merril* (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí. Ecuador.

Recuperado de http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4952/1/T-ESPE-IASA%20I-004581.pdf

Segretín, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, *2*, 5-8. Recuperado de https://www.argenbio.org/images/La_biotecnologia/Cap_2/Cultivos_celulares_II.pdf