

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE LA PIÑA
(*Ananas comosus*)
EN DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO***

RAFAEL JIMÉNEZ PALMA

**Informe presentado a la Escuela de Agronomía del
Instituto Tecnológico de Costa Rica, como requisito
parcial para optar al título de Bachiller en
Ingeniería en Agronomía**

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Sede Regional San Carlos
Escuela de Agronomía**

2005

RAFAEL JIMÉNEZ PALMA

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE LA PIÑA
(*Ananas comosus*)
EN DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO***

**Informe presentado a la Escuela de Agronomía del
Instituto Tecnológico de Costa Rica, como requisito
parcial para optar al título de Bachiller en
Ingeniería en Agronomía**

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Sede Regional San Carlos
Escuela de Agronomía**

2005

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE LA PIÑA (*Ananas comosus*)
EN DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO***

RAFAEL JIMÉNEZ PALMA

APROBADO POR MIEMBROS DEL JURADO EXAMINADOR

Ing. Sergio Torres Portuguez M.Sc.

Asesor

Ing. Wainer Montero Carmona.

Jurado

Ing. Tomás Palma Zúñiga M.Sc.

Jurado externo

Ing. Fernando Gómez Sánchez M.A.E.

**Coordinador Trabajos
Finales de graduación**

Ing. Olger Murillo Bravo M.Sc.

**Director
Escuela de Agronomía**

DEDICATORIA

A Dios, por haberme concedido la posibilidad de mi existencia y alcanzar, una meta profesional.

A mi madre, por su apoyo incondicional y permanente, por su esfuerzo y por su constancia para lograr en mi la culminación de mi formación integral. Gracias por todos y cada uno de los beneficios que me han permitido alcanzar mis sueños.

A mi hermano por su constante apoyo y reciproca ayuda.

A Tomás, a Claribel, a Mónica, a Melissa y a José Ricardo por compartir conmigo el calor de su hogar.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Sergio Torres Portuguez M.Sc, por la asesoría brindada en la realización del presente trabajo de graduación, por sus consejos oportunos y la confianza puesta en mi.

Al Ing. Wainer Montero Carmona, por sus valiosas sugerencias brindadas en el proceso investigativo.

Al Ing. Tomas Palma Zúñiga M.Sc, quien con su papel de, guía, orientador y motivador me dio herramientas para el logro de los objetivos propuestos en el presente estudio. Gracias por todo su tiempo dedicado, por la paciencia que me brindó, y por sus valiosos aportes que ayudaron a concluir con éxito esta investigación.

Al Sr. Jaime Soto Castro miembro del personal del Laboratorio de Biotecnología, por sacrificar parte de su trabajo con el propósito de colaborar en el en este proyecto. Gracias por sus consejos, por la confianza que en mi depositó y por todos los momentos compartidos.

A las empresas productoras de piña APACONA e INTERCOSTA por proveer la semilla de piña para poder iniciar este proyecto.

A Gustavo Méndez, por su amistad y apoyo constante.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
CUADROS DEL ANEXO	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
FIGURAS DEL ANEXO	X
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GENERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE PIÑA	5
3.1.1 Aspectos botánicos.....	5
3.2 MICROPROPAGACIÓN	6
3.2.1 Micropropagación de piña.....	6
3.2.2 Etapas de la micropropagación de piña (<i>Ananas comosus</i>).....	7
3.2.2.1 Preparación del explante.....	7
3.2.2.2 Desinfección superficial.....	8
3.2.2.3 Medio de iniciación y proliferación de brotes.....	8
3.2.2.4 Condiciones de ambiente durante el cultivo <i>in vitro</i>	8
3.3 EL MEDIO LÍQUIDO EN LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS: VENTAJAS Y DESVENTAJAS.	9
3.4 SISTEMAS AUTOMATIZADOS PARA LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>. SITUACIÓN ACTUAL	10
4. METODOLOGÍA	13
4.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	13
4.2 MATERIAL VEGETATIVO	13
4.3 TRATAMIENTOS	13
4.4 VARIABLES	14
4.4.1 Número de brotes.....	14
4.4.2 Porcentaje de respuesta.....	14
4.4.3 Longitud de brotes.....	14
4.4.4 Número de hojas.....	15
4.4.5 Área de la planta.....	15

4.4.6	Sobrevivencia.....	15
4.4.7	Número de raíces.....	15
4.4.8	Longitud de raíces.....	16
4.4.9	Porcentaje de brotes que presentan raíz.....	16
4.5	DISEÑO ESTADÍSTICO.....	16
4.5.1	Análisis estadístico.....	16
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	17
5.1	RESPUESTA DE LOS BROTES DE PIÑA (ANANAS COMOSUS) A LOS DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>.....	17
5.1.1	Número de brotes	17
5.1.2	Longitud de brotes	19
5.1.3	Número de hojas.....	20
5.1.4.	Porcentaje de respuesta	22
5.1.5	Área de brotes	23
5.1.6	Sobrevivencia	24
5.1.7	Número de raíces.....	24
5.1.8	Longitud de raíces.....	25
5.1.9	Porcentaje de brotes con raíz.....	26
6.	CONCLUSIONES	28
7.	RECOMENDACIONES	29
8.	LITERATURA CITADA.....	30
ANEXOS.....		34
ANEXO 1		35
ANEXO 2		47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Coeficientes de multiplicación en la micropropagación Convencional y mediante el uso de BIT en cultivos alimenticios y ornamentales.....	12
Cuadro 2. Sistemas de cultivo para estudiar la respuesta morfogénica de la piña (<i>Ananas comosus</i>) en diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	14
Cuadro 3. Datos comparativos de los resultados promedios obtenidos la octava semana de evaluación de los brotes de piña como respuesta a dos medios de cultivo <i>in vitro</i> , sólido y líquido.....	27

CUADROS DEL ANEXO

Cuadro 1 A. Número de brotes promedios de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta en el medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005	35
Cuadro 2 A. Longitudes promedios (cm.) de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta en el medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.....	35
Cuadro 3 A. Número de hojas promedios de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.....	36
Cuadro 4 A. Área promedios de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.....	36
Cuadro 5 A. Número de raíces promedios de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.....	37
Cuadro 6 A. Longitudes promedios (cm.) de las raíces de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.....	37
Cuadro 7 A. Porcentaje promedio de brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) con raíz en plantas como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.....	38
Cuadro 8 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 1 semana después de la siembra.....	39
Cuadro 9 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 2 semanas después de la siembra.....	40

Cuadro 10 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 3 semanas después de la siembra.....	41
Cuadro 11 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 4 semanas después de la siembra.....	42
Cuadro 12 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 5 semanas después de la siembra.....	43
Cuadro 13 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 6 semanas después de la siembra.....	44
Cuadro 14 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 7 semanas después de la siembra.....	45
Cuadro 15 A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre las variables evaluadas, en piña (<i>Ananas comosus</i>), 8 semanas después de la siembra.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula de medición del área de brote.....	15
Figura 2. Número promedio de brotes piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR San Carlos 2005.....	19
Figura 3. Longitud promedio (cm.) de lo brotes de Piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos, 2005.....	20
Figura 4. Número de hojas promedio de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos, 2005.....	22
Figura 5. Área promedio de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos, 2005.....	24
Figura 6. Número de raíces promedio de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos, 2005.....	25
Figura 7. Longitud promedio (cm.) de raíces de los brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos, 2005.....	25
Figura 8. Porcentaje promedio de brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) con raíz como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos, 2005.....	26

FIGURAS DEL ANEXO

Figura 1 A. Coronas de piña (<i>Ananas comosus</i>) utilizadas para extracción de yemas axilares.....	47
Figura 2 A. Hijos de piña (<i>Ananas comosus</i>) utilizados para extracción de yema axilares.....	47
Figura 3 A. Coronas de piña (<i>Ananas comosus</i>) de donde se obtienen las yemas axilares para la siembra <i>in vitro</i>	48
Figura 4 A. Yemas axilares de piña (<i>Ananas comosus</i>) sembradas en medio sólido para la obtención de brotes.....	48
Figura 5 A. Brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) obtenidos a partir de la siembra de yemas axilares en medio sólido para dar inicio al ensayo.	49
Figura 6 A. Componentes utilizados para los ensayos en medio líquido. (a) Programador automático regulador de la frecuencia y duración de la entrada de oxígeno al medio. (b) Estante y recipientes conectados al sistema. (c) Compresor de aire.....	49
Figura 7 A. Brotes de piña (<i>Ananas comosus</i>) en medio sólido y medio líquido con dos meses después de siembra.....	50

Respuestas Morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*

RESUMEN

El estudio para determinar las respuestas morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*) micropropagada en dos diferentes sistemas de cultivo, se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales de La Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Los sistemas utilizados fueron: medio sólido y medio líquido, este último conectado a un compresor de aire encargado de oxigenar el medio con una frecuencia de 3 veces por día y con una duración de 1 minuto.

El medio utilizado fue un MS (1962) suplementado con 2 mg/l de ácido indol butírico (AIB) + 2mg/l ácido naftalén acético (ANA) + 2 mg/l de kinetina + 7 g/l de agar, el componente anterior se utilizó como gelificante únicamente para el medio sólido. En los tratamientos se emplearon 3 repeticiones con 5 brotes de piña, de la variedad MD-2, los cuales fueron obtenidos a partir de yemas axilares.

Para estudiar la respuesta de los brotes de piña, los tratamientos se evaluaron durante 8 semanas, se empleó la prueba T de student y para obtener la diferencia entre medidas de tratamientos se efectuó un análisis estadístico mediante el paquete SAS (Statistical analysis system), obteniéndose diferencia significativa cuando se evaluó el número de brotes de piña reportándose datos de 4.3 ± 0.6 y 2.0 ± 0.6 la octava semana en medio líquido y sólido respectivamente. En cuanto a la longitud de los brotes, el medio líquido fue más eficiente ya que para la última semana los brotes mostraban una longitud promedio de 3.3 ± 0.5 mientras que en el medio sólido 1.1 ± 0.5 . En relación al número de hojas, se mostró diferencia significativas a partir de la tercera semana contabilizándose un dato promedio de 4 hojas por planta para el medio sólido, mientras que en el medio líquido se duplicaba ese valor (8), por lo que este sistema permite obtener plantas listas para su enraizamiento y aclimatización en menos tiempo. Además, el área del brote mostró diferencia altamente significativa, con datos promedios de

0.8 ± 0.4 y 3.4 ± 0.8 para el sistema en medio sólido y líquido respectivamente, mostrando que el medio líquido es más eficiente, permitiendo desarrollar mayor área foliar.

A pesar de que los medios no se prepararon para inducir rizogénesis *in vitro*, las variables número de raíces, longitud de raíces y porcentaje de brotes con raíz se evaluaron, ya que estas se presentaron desde la cuarta semana, sin embargo el análisis estadístico no indicó diferencias significativas.

1. INTRODUCCIÓN

La piña es uno de los cultivos que más se ha desarrollado en área y producción en la Zona Norte, la cual tiene unos 600 productores de piña, ubicados principalmente en San Carlos, Los Chiles, Aguas Zarcas, Pital, Guatuso, Upala y Sarapiquí. En esa actividad está involucrado un importante grupo de pequeños agricultores que han visto en este cultivo la forma de incrementar sus ingresos y su calidad de vida. (Consejo Nacional de Producción 2004).

En cuanto a las exportaciones de piña de Costa Rica, el volumen de fruta fresca exportado durante el período enero-noviembre del 2004 sumó 629.846,7 tm con un valor de US\$ 231.881.424. En comparación con el similar período del año anterior (enero-noviembre), se registró un aumento de 24% en volumen y 29% en su valor FOB. El principal mercado de la piña costarricense es Estados Unidos. La demanda por este producto en ese mercado pasó de 233 000 toneladas a 473 000 toneladas de 1999 al 2003, representando un aumento del 67%. El valor de estas importaciones pasaron de \$120 millones a \$223 millones en el mismo lapso, siendo Costa Rica el principal exportador con un 84%. (Consejo Nacional de Producción 2004).

En el año 2004, los ingresos por divisas fueron superiores en un 25% a los del 2003, con precios similares y en algunos casos inferiores, a pesar de que en mayo, junio y julio hubo problemas con ciertos contenedores por la calidad de la fruta; en muchos casos no se pagó bien o se pagó a menor precio. La fruta que no se exporta es utilizada en la agroindustria y cada vez se destina más y más fruta a este uso. (Consejo Nacional de Producción 2004). Para el 2005, se espera que en los meses de marzo abril y parte de mayo se concentre gran parte de la producción. Para evitar que no pase lo del anterior año con la calidad de fruta, muchos clientes están exigiendo más calidad, mediante una diferencia de precio. Además las condiciones climáticas actuales en el Atlántico causarán algunos problemas de producción en cantidad y calidad. Se debe realizar mayor planificación de siembra con el fin de mejorar los rendimientos y la calidad propia de nuestra fruta, mediante

un constante trabajo de asistencia técnica e investigación ante las exigencias de los mercados. El trabajo en las certificaciones Eurep Gap y otros requerimientos deben ser prioritarios para los productores que aún no lo tengan. El control de la calidad de la fruta debe estar en constante mejoría en las empresas y con los pequeños y medianos productores (Consejo Nacional de Producción 2004).

Se estima que el área total sembrada en el país se ubica en 23 000 ha y se espera alcanzar 26.000 ha para marzo-abril del 2005. La distribución porcentual por región ha variado en los últimos años desde el censo realizado en 1999. La Región Huétar Norte pasó a ocupar el mayor porcentaje y la Región Huétar Atlántica que tan sólo ocupaba el 6% ahora casi iguala a la Brunca. La distribución es la siguiente:

-Huétar Norte 52% 12.000 ha

-Huétar Atlántica 22% 5.000 ha

-Brunca 24% 5.500 ha

-Otras 2% 500 ha (Consejo Nacional de Producción 2004).

El incremento en el área de siembra de este cultivo ha provocado una gran demanda de material de siembra. Una alternativa para suplir esta gran demanda es el uso de herramientas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* ya que se ha constituido en una alternativa para la producción de plantas a través de la micropropagación. La piña es micropropagada mediante la proliferación yemas axilares, en medios sólidos y líquidos entre estos últimos están los sistemas en agitación y inmersión temporal. Sin embargo, estos sistemas de propagación vegetativo es lento y costoso. Una alternativa para mejorar la eficiencia de este sistema es incrementar la tasa de multiplicación, por medio del uso de medio líquidos y bioreactores, como por ejemplo las RITAS (Escalona *et al.* 1999).

El uso de medios líquidos en cultivo de tejidos a menudo se describe como un medio que reduce los costos de micropropagación (Alvard *et al.* 1993), otras

ventajas incluyen un incremento en la disponibilidad de agua, y las sustancias disueltas para el explante (Hvoslef-Eide *et al.* 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar las respuestas morfogénicas de la piña como respuesta a diferentes sistemas de cultivo.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el número y longitud de brotes de piña en respuesta a dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido.
2. Cuantificar el número de hojas de los brotes de piña en respuesta a dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido.
3. Determinar los porcentajes de respuesta y de sobrevivencia de brotes de piña en dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido.
4. Determinar el área de los brotes de piña en respuesta a dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido.
5. Cuantificar la longitud y el número promedio de raíces en brotes de piña en respuesta a dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido
6. Determinar el porcentaje de brotes de piña con raíz en respuesta a dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades del cultivo de piña

La piña es originaria de América del Sur, del centro y Sureste de Brasil, y Noreste de Argentina y Paraguay. Ha sido seleccionada desarrollada y domesticada desde tiempo prehistóricos. En la actualidad los frutos de piña y sus derivados tienen gran importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Nakasone y Paul 1998).

3.1.1 Aspectos botánicos

La planta de piña es una monocotiledónea, herbácea y perenne. El tallo está cubierto de hojas lanceoladas las cuales son envolventes y están dispuestas en forma de espiral, se encuentran en un número de 70 a 80 hojas por plantas, los bordes de éstas pueden estar provistas de espinas o libres de éstas según la variedad (Nakasone y Paul 1998).

El sistema radicular de la planta de piña es muy superficial generalmente las raíces se localizan en los primeros 15 cm. superiores del suelo, aunque pueden profundizarse hasta 60 cm o más, la inflorescencia contiene de 100 a 200 flores dispuestas en forma de espiral, fusionadas entre sí y con el tallo central, que dan origen a un fruto partenocárpico del cual la cáscara está formada por los sépalos y brácteas de la flor. Del tallo central brotan los hijos o retoños que serán el medio propagativo de la planta, entre los cuales existe la corona, que se localiza sobre la parte superior del fruto; los hijos basales que se forman en la base del fruto, los hijuelos del tallo que se desarrollan a partir de yemas axilares del tallo y los retoños que se originan en la base del tallo y por su proximidad al suelo presentan raíces propias (Nakasone y Paul 1998).

3.2 Micropropagación

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

La micropropagación se ha constituido es una técnica muy eficiente para producir plantas enteras fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre de la que derivaron, libres de plagas y enfermedades (Flores 1998; Palma y Montero 2002).

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

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

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

3.2.1 Micropropagación de piña

La micropropagación está basada en la proliferación de yemas axilares y en la habilidad de desdiferenciar células maduras hasta un proceso de rediferenciación y el desarrollo de nuevos centros meristemáticos que son capaces de regenerar plantas completas. La regeneración en piña como en otras plantas se llevan a través de dos vías morfogénicas; la formación de un órgano unipolar y la

embriogénesis somática que consiste en la formación de estructuras bipolares (Litz y Jarret 1991)

Palma y Montero, (1998) estableció un protocolo de micropropagación de piña que es el que se utiliza como rutina en el Laboratorio de Biotecnología de plantas del Centro de Investigación de Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, el medio de cultivo consiste de las sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg/l de myo-inositol, 0,5 mg/l de piridoxina, 0,1 mg/l de tiamina, 2 mg/ de glicina y 3 % de sacarosa, en la fase I el medio de cultivo se suplementa con 2 mg/l de ANA, 2 mg/l de AIB, y 2 mg/l de kinetina, el medio de cultivo se solidifica con 7 g/l de agar.

3.2.2 Etapas de la micropropagación de piña (*Ananas comosus*)

El protocolo de micropropagación de la piña desarrollado por Palma y Montero (1998), se puede dividir en:

3.2.2.1 Preparación del explante

Se seleccionan coronas de plantas de piña madura o hijos de la planta, que sean vigorosas y estén en buen estado fitosanitario. En el laboratorio se lavan vigorosamente para eliminar cualquier suciedad presente. Se le remueven las hojas cuidadosamente para no dañar las yemas axilares. Se disectan las yemas con tejidos del eje de la corona, de un tamaño de aproximadamente 0,5 cm que se someten a la desinfección superficial.

3.2.2.2 Desinfección superficial

Las yemas axilares se sumergen en una solución de Benomil + Agrymicin (sulfato de estreptomycin e hidróxido de cobre) a razón de 1 g de cada uno de ellos disueltos en un litro de agua. En esta solución se mantiene durante 20 minutos. Se agrega dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución. Seguidamente se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 15 minutos. Se agregan dos gotas de tween 20 por cada 100 ml de disolución. Inmediatamente se trasladan a una cámara de flujo laminar en donde se practican 3 lavados, de cinco minutos cada uno, del material, con agua destilada y estéril.

3.2.2.3 Medio de iniciación y proliferación de brotes.

Las yemas axilares se disectan hasta obtener un tamaño de unos 3 mm que se colocan en un medio de iniciación consistiendo en las sales MS suplementado con 100 mg/l de myo-inositol, 0,5 mg/l de piridoxina, 0,1 mg/l de tiamina, 2 mg/ de glicina y 3 % de sacarosa. En esta etapa el medio de cultivo se suplementa con 2 mg/l de ANA, 2 mg/l de AIB, y 2 mg/l de kinetina. El medio de cultivo se solidifica con 7 g/l de agar. Se efectúan subcultivos a medios frescos cada 22 días. Aproximadamente a los 2 meses se obtiene una gran cantidad de brotes, debido al estímulo de los brotes preformados. Al subcultivar los brotes a un medio fresco con los mismos componentes anteriores se estimula la formación de brotes adventicios, En algunas ocasiones se forma un callo embriogénico.

3.2.2.4 Condiciones de ambiente durante el cultivo *in vitro*.

Los cultivos se mantienen en un cuarto en con una temperatura de 27° C un fotoperíodo de 16 horas, una humedad relativa de 80 % y una intensidad lumínica de 2000 lux suministrada con fluorescentes grow lux.

3.3 El medio líquido en la propagación de plantas: Ventajas y desventajas.

A través de diferentes estudios se ha determinado una serie de ventajas de los medios líquidos para la micropropagación de plantas y se mencionan las siguientes: difusión de nutrientes (Romberger y Tabor 1971), la difusión del agua (Stolz 1971), las impurezas que tiene el agar que podrían afectar el desarrollo de los brotes *in vitro* (Nairn *et al.* 1995). En relación a este último aspecto se ha determinado que el agente gelificante es la principal fuente desconocida y una rica fuente de impureza. El significado de la contribución de los contaminantes del agente gelificante, en la concentración final en un medio, depende de los elementos minerales. Se considera que los compuestos inorgánicos en los agentes gelificantes y la dinámica de la interacción entre gelificante-medio de cultivo juegan un papel importante durante el desarrollo de los tejidos *in vitro*. (Scholten y Pierik 1998). Además el uso del medio líquido para la propagación *in vitro* ofrece otras ventajas y se considera una técnica ideal para la propagación masiva de plantas, porque reduce la manipulación y es un requisito indispensable para la automatización del proceso. (Aitken– Christie 1991). Sin embargo, su principal desventaja es que provoca la hiperhidricidad de los tejidos de los brotes (Debergh *et al.* 1981). Para evitar ese desorden fisiológico, se han desarrollado diferentes procedimientos, entre los que se encuentran el cultivo en agitación (Takayama y Misawa 1983), el empleo de soportes alternativos como puentes de papel de filtro, tapones de celulosa, esponjas, canastas flotantes, etc (Smith y Spoomer 1995; Weather *et al.* 1988), la técnica de doble capa (Maene y Debergh 1985), el enfriamiento del fondo del frasco de cultivo (Van Huylenbroeck y Debergh 1996), la aplicación de los nutrientes en forma de niebla (Weather *et al.* 1988), el uso de membranas para aumentar el intercambio gaseoso en el frasco de cultivo y disminuir el vapor de agua (Fujiwara *et al.* 1988), así como el empleo de agentes químicos antivitrificantes (Hdider y Desjardins 1993).

Alvard *et al.* (1993) estudiaron cinco métodos diferentes de cultivo en comparación con el cultivo en medio sólido en la propagación de meristemas de banano. A partir de estos resultados surgió un nuevo concepto para el cultivo *in vitro*

en medio líquido: la inmersión temporal (Teisson y Alvard 1995). Esta técnica se ha empleado exitosamente con diferentes especies de plantas (*Coffea*, *Hevea*, *Musa*, *Citrus*) y en diferentes sistemas de multiplicación (proliferación de meristemos, cultivo de microestacas, desarrollo de embriones a partir de callo, así como la germinación y conversión de embriones somáticos). La calidad del desarrollo de los brotes es generalmente mejor a la que se obtiene con el empleo del medio líquido o semisólido.

3.4 Sistemas automatizados para la propagación *in vitro*. Situación actual.

La micropropagación de plantas requiere la transferencia periódica del cultivo a medio fresco debido al agotamiento y/o alteración de los nutrientes, así como, al crecimiento o proliferación continuo del tejido, que sobre pasa la capacidad del frasco de cultivo. Generalmente, los cultivos se mantienen en frascos individuales y se transfiere a medio fresco en un intervalo de cuatro a seis semanas (Debergh *et al.* 1981).

Algunos sistemas de micropropagación alternativos con el empleo de medio líquido se han desarrollado con el propósito de la automatización del proceso y la consiguiente reducción de los costos (Pieper y Zimmer 1976; Tisserat y Vandercook 1985; Aitken – Christie y Davies 1988; Waether *et al.* 1988; Simonton *et al.* 1991). Más recientemente, Teisson y Alvard (1995) desarrollaron un aparato para la micropropagación de plantas a partir de la modificación de una unidad de filtración Nalgene de 250 mL de capacidad cuyo nombre comercial es RITA[®].

Un grupo de investigadores han diseñado un biorreactor desechable para el cultivo de órganos en Israel, que actualmente comercializa la firma OSMOTEK (Ziv y Raviv 1998).

En Cuba, a partir del desarrollo del primer sistema semi- automatizado de inmersión temporal en 1997, se han realizado investigaciones sobre la aplicación de esta técnica en la proliferación de meristemos de caña de azúcar (Lorenzo *et al.* 1998), para el cultivo intensivo de microtubérculos de papas (Jiménez *et al.* 1998),

para la propagación *in vitro* de la piña (Escalona *et al.* 1999) y para la proliferación de bananos (Daquinta *et al.* 1999).

3.5 Resultados obtenidos por cultivos con el uso de biorreactores de inmersión temporal en comparación con otros métodos de micropropagación.

El biorreactor de inmersión temporal (BIT) tiene dos posibilidades de aplicación: para la obtención de explantes y su ulterior proliferación en frascos convencionales de la micropropagación o para la obtención de brotes aptos para el enraizamiento *ex vitro* y la aclimatización.

En el siguiente cuadro se resumen los coeficientes de multiplicación que se han alcanzado en los diferentes cultivos con el empleo de BIT.

Cuadro 1. Coeficientes de multiplicación en la micropropagación convencional y mediante el uso de BIT en diferentes cultivos alimenticios y ornamentales.

Cultivo	Variedad	Micropropagación Convencional	Inmersión Temporal
<i>Ananas comosus</i>	Cayena Lisa	8.0	68.8
	CB1	5.8	26.8
<i>Sacharum officinarun</i>	C91-301	3.7	34.1
	C1051-73	4.1	58.0
	C120 –78	3.9	30.2
	C323-68	4.3	39.5
	C85-212	3.8	31.6
	C85- 214	4.0	29.8
	CP-5243	4.0	32.5
<i>Xanthosoma sp.</i>	INIVIT	3.0	10.44
	México 1	2.8	7.71
<i>Musa AAA</i>	FHIA-18	3.8	7.40
	FHIA-01	3.4	10.4
	Gran Enano	4.0	16.6
<i>Syngonium</i>	W. Butterfly	7.3	28.0
	Pixie	2.2	18.4
<i>Spathyphyllum</i>	Sensation	3.7	17.6
<i>Phylodendrom</i>	Xanadu	2.0	8.8

Centro Bioplantas, Universidad de Ciego de Avila.

4. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación del estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales de la Escuela de Agronomía, ubicados en la Sede Regional del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en San Carlos.

4.2 Material vegetativo

El estudio se llevó a cabo utilizando yemas de corona de plantas de piña (*Ananas comosus*), de la variedad MD-2. Parte de este material vegetal fue donado por las empresas productoras de piña APACONA e INTERCOSTA y otra parte fue recolectada en diferentes fincas de producción ubicadas en el cantón de San Carlos.

4.3 Tratamientos

Para los dos sistemas de cultivo se utilizó el medio universal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2 mg/l AIB + 2mg/l ANA + 2 mg/l de kinetina + 7 g/l de agar, este último componente fue utilizado como gelificante únicamente para el medio sólido (cuadro 2).

Cuadro 2. Sistemas de cultivo para estudiar las respuestas morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*).

Tratamiento	# de repeticiones	# de desplantes/ repetición	Composición del medio de cultivo	Sistema de propagación
1	3	5	Sales MS +2 mg/l AIB + 2mg/l ANA + 2 mg/l de kinetina + 30 g/l sacarosa + 7 g/l de agar.	Semisólido
2	3	5	Sales MS +2 mg/l AIB + 2mg/l ANA + 2 mg/l de kinetina + 30 g/l sacarosa.	Líquido oxigenado con un compresor

Los explantes se mantuvieron en un cuarto aséptico, con un fotoperíodo de 16 horas, a 2000 lux, una temperatura de $27 \pm 2^{\circ} \text{C}$. y una humedad relativa del 80 %.

4.4 Variables

Semanalmente se estarán evaluando las siguientes variables:

4.4.1 Número de brotes

Se cuantificó el número de brotes en cada explante inicial y se obtuvo un promedio por cada unidad experimental.

4.4.2 Porcentaje de respuesta

Se considera el número de brotes que dan respuesta en relación al total de los brotes sembrados.

4.4.3 Longitud de brotes

Se midió la longitud del brote inicial a partir de su base y hasta su extremo apical de la hoja más larga.

4.4.4 Número de hojas

Se cuantificó semanalmente el número de hojas de cada uno de los brotes iniciales.

4.4.5 Área de la planta

El área de los brotes se determinó a partir de dos longitudes a lo largo y a lo ancho del brote inicial y se aplicó la siguiente fórmula: $\frac{d_1 \times d_2}{4}$ (mm²). (Kononoawicz y Janick 1984).

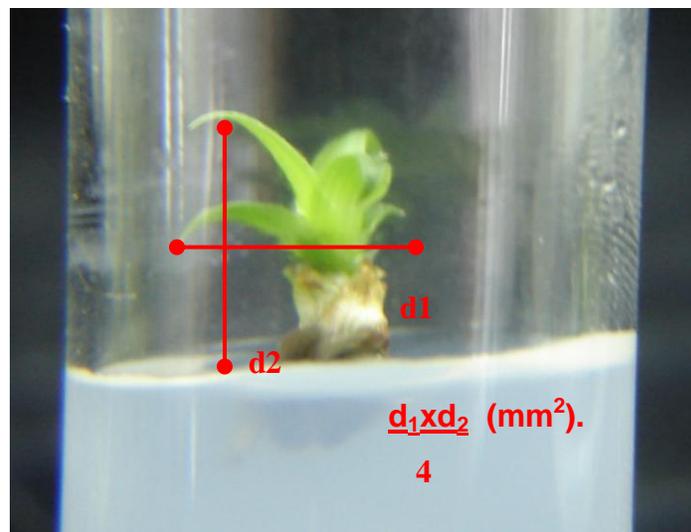


Figura 1. Fórmula de medición del área del brote.

4.4.6 Supervivencia

Se determinó mediante la relación entre los brotes muertos y el número total de cada tratamiento al inicio de este estudio, multiplicado por 100.

4.4.7 Número de raíces

Se cuantificó el número de raíces formadas en cada brote enraizado.

4.4.8 Longitud de raíces

Se midió la longitud de aquellas raíces que tengan al menos 0.5 cm desde la unión de la raíz con la base del brote hasta su extremo apical.

4.4.9 Porcentaje de brotes que presentan raíz.

Se considera el número de brotes con raíz en relación al total de los brotes sembrados.

4.5 Diseño estadístico

Para estudiar la respuesta de brotes de piña a diferentes medios de cultivo, se utilizó la prueba de T de student. Los dos tratamientos consistieron de los sistemas de cultivo, uno de ellos gelificado con agar y el otro tratamiento consistió de un medio líquido oxigenado mediante un compresor de aire. Cada tratamiento se repitió 3 veces y cada unidad experimental consistió de 5 brotes de piña.

4.5.1 Análisis estadístico

Para detectar la diferencia entre medias de tratamiento se efectuó un análisis estadístico, mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Respuesta de los brotes de piña (*Ananas comosus*) a los diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

5.1.1 Número de brotes

El análisis estadístico mostró diferencias significativas cuando se evaluó el número de brotes de piña como respuesta a diferentes sistemas de cultivos a partir de la sexta semana (Cuadros 8 A -15A). Los valores de brotes promedios desde la sexta hasta la octava semana, cuantificados fueron de 3.4 ± 0.5 , 4.0 ± 0.6 , 4.3 ± 0.6 y de 1.9 ± 0.5 , 1.9 ± 0.6 y 2.0 ± 0.6 para el medio líquido y sólido respectivamente. Los brotes fueron evidentes a partir de la segunda semana, cuando crecieron en un medio líquido, mientras que los brotes sembrados en el medio semisólido mostraron respuesta en estímulo de brotes hasta la tercera semana después de la siembra (Figura 2). Al final de la evaluación, los brotes que crecieron en el medio sólido únicamente desarrollaron en promedio 2 brotes, mientras los que crecieron en el medio líquido duplicaron ese número (Figura 2). Respuestas similares fueron obtenidas en *Rodhodedrom* en la que la producción de brotes fue 10 veces superior cuando crecieron en un medio líquido comparado con el medio solidificado con agar (Douglas 1984).

Años atrás los estudios de Skoog y Miller (1957) permitieron introducir el concepto de control hormonal en la formación de órganos, demostraron que la diferenciación de raíces y brotes en la médula de plantas de tabaco *in vitro* está en función de la relación auxina/citocinina y que la diferenciación de órganos puede ser regulada cambiando las concentraciones relativas de los dos reguladores en el medio de cultivo; este concepto de regulación hormonal se aplicó a este estudio ya que se consideró una relación auxina/citocinina a favor de la citocinina (2 mg/l AIB + 2mg/l ANA + 2 mg/l de kinetina) y promover la formación de brotes, tal y como se observó en los resultados obtenidos en piña en este estudio y según el protocolo propuesto por Palma y Montero (1998).

Además, este estudio permitió aprovechar las ventajas del medio líquido, tales como el favorecimiento en absorción de nutrientes, el crecimiento del material vegetal y la dilución de los metabolitos excretados por los explantes lo que reduce sus inconvenientes. (Escalona *et al.* 1999).

Los métodos comerciales de micropropagación buscan rapidez, seguridad y períodos cortos en su multiplicación, además de plantas libres de enfermedades, variedades de explotación o la introducción de nuevas variedades, en este sentido el uso de medios líquidos es una condición para lograr desarrollar esta alternativa (Alvard 1993).

En relación al número de brotes de piña obtenidos en el presente estudio, resultados similares fueron obtenidos por Escalona *et al.* (1999), experimentado con sistemas líquidos en 3 variedades de piña, donde los coeficientes de multiplicación obtenidos (Cuadro 1, en el artículo no se hace referencia al tiempo de evaluación), así como la calidad del desarrollo de las vitroplantas superan a la micropropagación en sistemas semisólidos, demostrando que en el sistema anterior el aumento en la calidad intrínseca de los brotes fue producto de una mayor asimilación de nutrientes del medio de cultivo y no a un mejoramiento en el intercambio gaseoso del ambiente.

También Garita (1995), evaluó diferentes medios líquidos obteniendo resultados favorables en la obtención de brotes a las 12 semanas para el medio MS modificado (4.93 brotes), quien superó la tasa de multiplicación del medio de Casales y García (1987) donde se mostró menor brotación en ese lapso de tiempo (3.23 brotes).

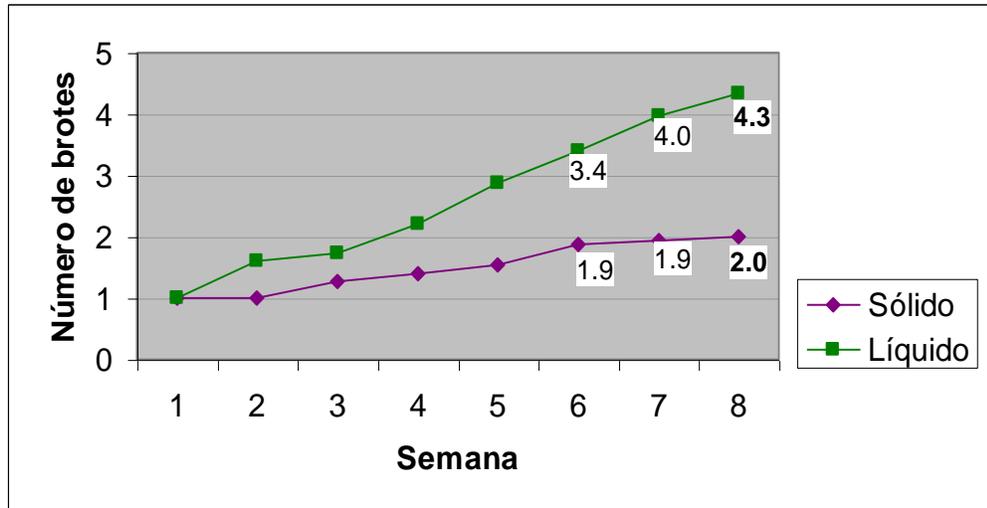


Figura 2. Número de brotes promedio de piña (*Ananas comosus*) como respuesta a dos medios, sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

5.1.2 Longitud de brotes

La longitud de brotes mostró diferencias significativas como respuesta a los sistemas de cultivo a partir de la primera semana después de la siembra. (Cuadros 8A -15A) y fue evidente el efecto positivo del medio líquido durante todo el proceso de evaluación. Ocho semanas después de la siembra en el medio sólido se cuantificaron longitudes promedios de brotes de 1.1 ± 0.5 cm, mientras que en el medio líquido los valores de longitud promedio fueron de 3.3 ± 0.5 cm.

Escalona *et al.* (1999) han implementado los sistemas líquidos en otras especies como: caña de azúcar (12 variedades), Malanga (3 variedades), banano (3 variedades), plantas ornamentales y piña (3 variedades), brindando dos posibilidades: la obtención de plantas competentes para su posterior aclimatización, ya que estas experimentan un mayor desarrollo foliar comparado con el medio sólido y la inyección de un gran número de explantes en cortos períodos de tiempo (Cuadro 1, en el artículo no se hace referencia al tiempo de evaluación).

La relación auxina/citocinina empleadas en los dos medio de cultivo (Sales MS +2 mg/l AIB + 2mg/l ANA + 2 mg/l de kinetina) se estableció con el fin de

estimular en número de brotes y no tanto para su crecimiento; sin embargo el medio líquido no solo permitió la proliferación de brotes sino además su alargamiento, superando la repuesta de los brotes que crecieron en el medio sólido tal y como se muestra en el figura 3. Debido a que los nutrientes se movilizan por difusión hasta los tejidos, el medio líquido ofrece poca resistencia a su movilidad por difusión lo que beneficia la asimilación de nutrientes por parte de la planta, lo que explica el mayor crecimiento de los brotes de piña .¹

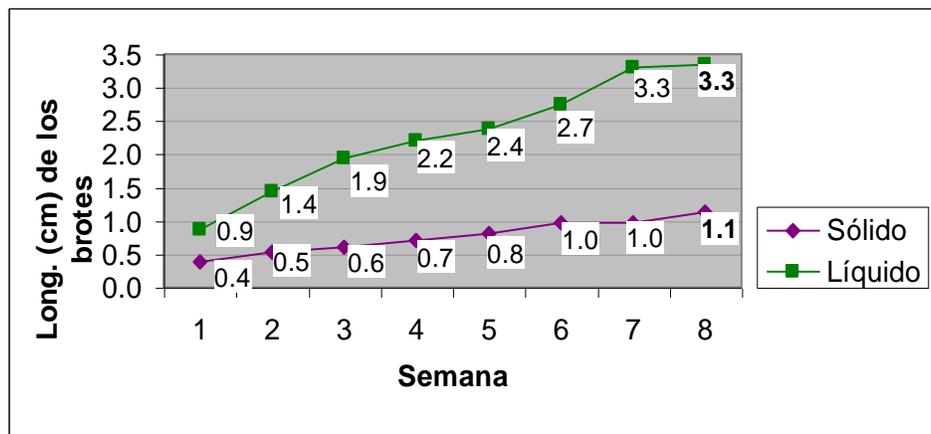


Figura 3. Longitud promedio (cm.) de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

5.1.3 Número de hojas

El análisis estadístico de la variable número de hojas, mostró diferencias significativas a partir de la tercera semana después de la siembra, como respuesta a los sistemas de cultivo (Cuadros 8 A -15A). A partir de la tercera semana los brotes de piña que crecieron en el medio líquido duplicaron en el número de hojas a los brotes desarrollados en el medio sólido tal y como se observa en la figura 4. Este comportamiento se mantuvo hasta el final de la evaluación. Como se mencionó anteriormente con las otras variables analizadas, una posible explicación

¹ Palma Z.T. Comunicación personal (2005)

de las diferencias encontradas en el número de hoja que crecieron en el medio líquido y el medio solidificado con agar incluye la difusión de nutrientes (Romberger y Tabor 1971), la difusión del agua (Stolz 1971) las impurezas que tiene el agar que podrían afectar el desarrollo de los brotes *in vitro* (Nairn *et al.* 1995). En relación a este último aspecto se ha determinado que el agente gelificante es la principal fuente desconocida de elementos minerales y una rica fuente de impurezas como cenizas, calcio, magnesio, potasio, fósforo, sodio. El significado de la contribución de los contaminantes del agente gelificante en la concentración final en un medio, depende de los elementos minerales. Se considera que los compuestos inorgánicos en los agentes gelificantes y la dinámica de la interacción entre gelificante-medio de cultivo juega un papel importante durante el desarrollo de los tejidos *in vitro*. (Scholten y Pierik 1998).

Al comparar los resultados obtenidos en ambos tratamientos, se cuantificaron mayor número de hojas en los brotes de piña que crecieron en el medio líquido (Figura 4). Como el tratamiento semisólido contiene agar, la interacción de las sales de Murashige y Skoog y los componentes inorgánicos contenidos en el agar (Scholten y Pierik 1998), probablemente afectó el desarrollo foliar en los brotes.

Un mayor número de hojas en los brotes regenerados *in vitro* permite obtener en un tiempo relativamente corto plantas listas para su enraizamiento y posterior aclimatación.

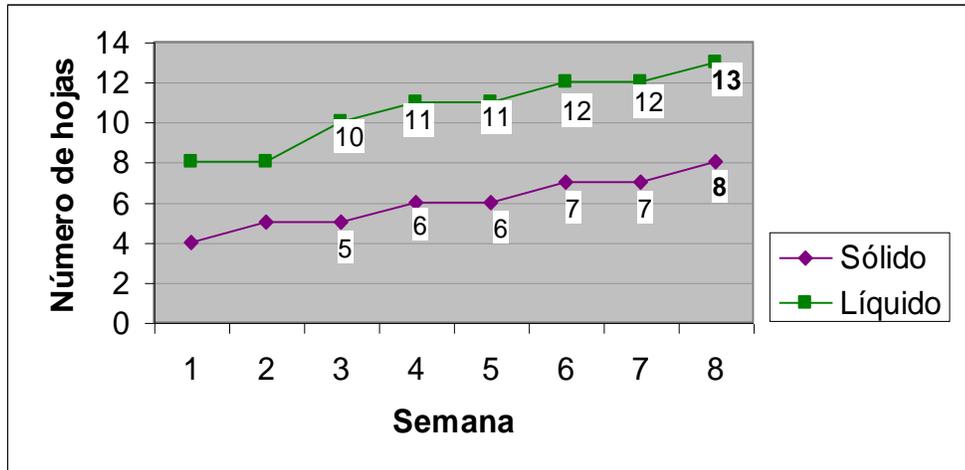


Figura 4. Número de hojas promedio de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

5.1.4. Porcentaje de respuesta

Los brotes de piña transferidos a medios de cultivo tanto en el medio sólido como en el medio líquido mostraron una respuesta positiva durante todo el período de evaluación. La respuesta de los brotes de piña fue evaluada a través de las diferentes variables de crecimiento, estas fueron cuantificadas durante este estudio y mostraron respuestas lineales crecientes, lo que indica que las condiciones físicas y químicas en que se desarrollaron los brotes fueron adecuadas, pero de una forma más eficiente en el medio líquido. A pesar de que no se detectaron diferencias al evaluar el porcentaje de respuesta cuando los brotes de piña crecieron en diferentes sistemas de cultivo, al medir las variables, número de brotes y longitud de brotes, se obtuvieron valores mayores cuando los brotes crecieron en el medio líquido. La mejor difusión tanto de nutrientes como de agua en el medio líquido (Romberger y Tabor, 1971) pareciera ser los responsables de dicha respuesta. Marchal y Alvard (1988) mencionan que el medio líquido estimula un mayor crecimiento y multiplicación de los explantes de piña que en los medios sólidos. Según Benzina y Buró (1970) citados por Casale y García (1987) quizás

esto se deba a la alta capacidad que tiene la piña y las bromelias en general, para absorber agua y nutrimentos por los tricomas de las hojas.

5.1.5 Área de brotes

El área de brotes se calculó durante todo el período de estudio y mostró diferencias significativas a partir de la segunda semana después de la siembra. (Cuadro 8A - 15A). El análisis estadístico practicado para la cuarta semana mostró diferencias altamente significativas ($P > 0,01$). Los valores de área de brotes de piña promedio que crecieron en el medio sólido, fue de $0,8 \pm 0.4 \text{ cm}^2$ mientras que el valor obtenido en los brotes que crecieron en el medio líquido fueron de $3,4 \pm 0.8 \text{ cm}^2$. (Figura 6). Esta respuesta demuestra que el medio líquido superó en más de 4 veces al medio sólido en cuanto a desarrollo de área foliar, que fue reforzado con las otras variables evaluadas. Tal y como se discutió con las variables anteriores esta respuesta se debe a una mejor difusión tanto de nutrientes como de agua en el medio líquido (Romberger y Tabor 1971; Stolz 1971) a la probable presencia de impurezas en el agar que interacciona con los componentes inorgánicos del medio afectando y como se menciona en la literatura podría afectar negativamente la respuesta de los brotes de piña que crecieron en el medio solidificado con agar (Nairn *et al.* 1995) .

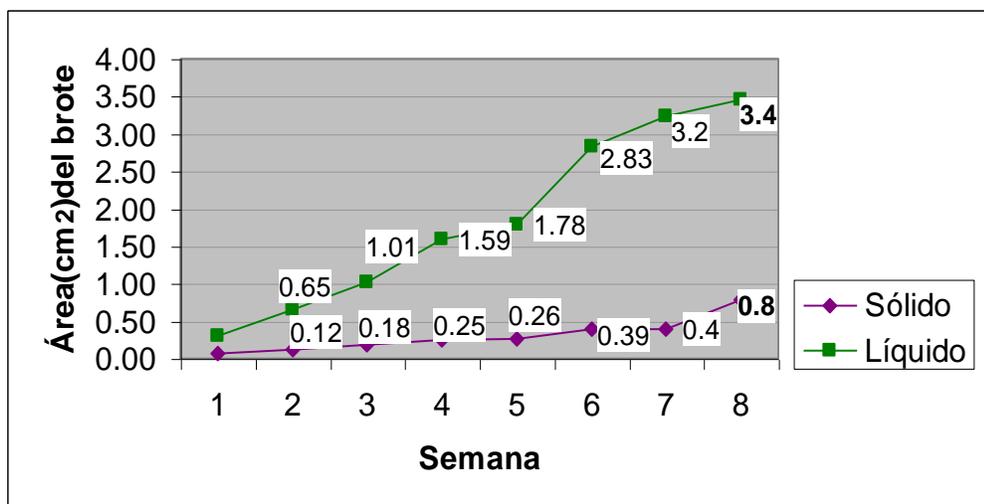


Figura 5. Área (cm²) promedio de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

5.1.6 Sobrevivencia

Al estudiar la respuesta de brotes de piña en diferentes sistemas de cultivo, no se determinaron diferencias estadísticas durante todo el periodo de evaluación (Cuadros 8A -15A), obteniéndose como resultado un 100 % de sobrevivencia. Esto demuestra que las medidas tomadas para evitar la contaminación fueron efectivas. Los medios líquidos exigen un mayor control de los contaminantes, lo que se logró con el uso de filtros miliporo y asepsia general en los sistemas de mangueras que oxigenan los medios líquidos.²

5.1.7 Número de raíces

A pesar de que los medios en el que desarrollaron los brotes de piña no fueron preparados para inducir la rizogénesis *in vitro*, esta variable se evaluó debido a su presencia a partir de la cuarta semana después de la siembra. Aún así el análisis estadístico no indicó diferencias significativas. (Cuadros 8 A -15A).

² Palma Z.T. Comunicación personal (2005)

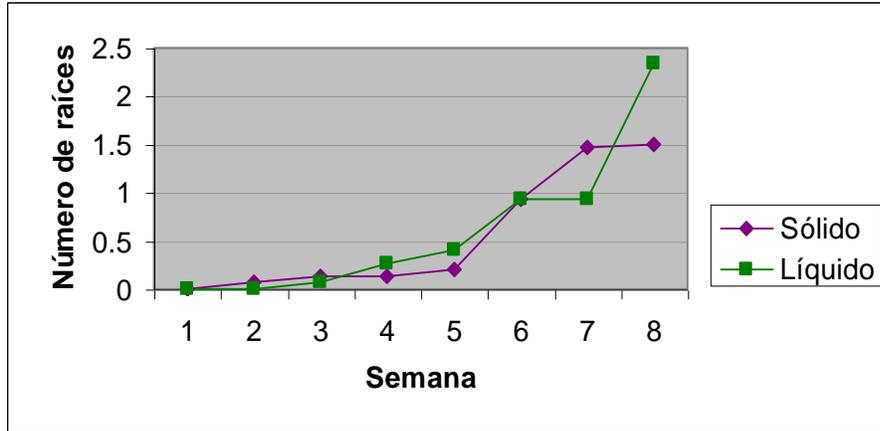


Figura 6. Número de raíces promedio de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

5.1.8 Longitud de raíces

Tal y como se indicó anteriormente, la rizogénesis *in vitro* en brotes de piña se observó simultáneamente con la fase de estímulo de brotes 4 semanas después de la siembra. La longitud de raíces fue cuantificada a partir de la cuarta semana y no mostró diferencias estadísticas como respuesta al medio líquido y al medio solidificado con agar.

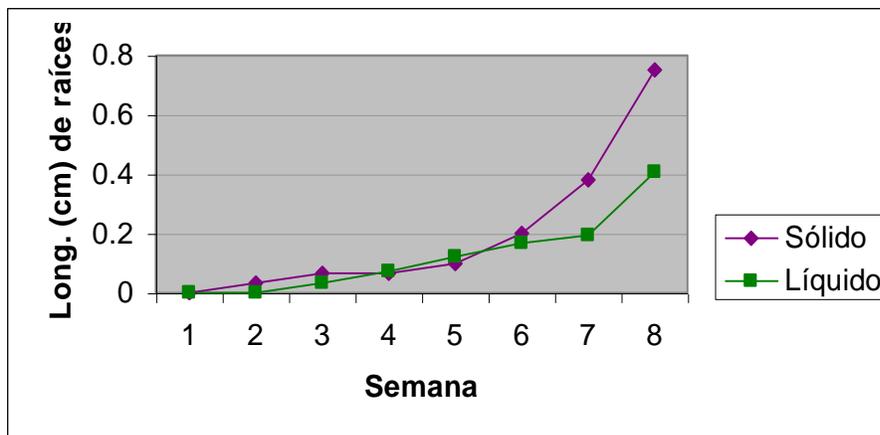


Figura 7. Longitud promedio (cm.) de las raíces de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

5.1.9 Porcentaje de brotes con raíz.

La variable porcentaje de brotes con raíz no presentó diferencias estadísticas como respuesta a diferentes sistemas de cultivo. (Cuadro 8A -15A). Lo anterior se debe a que la relación auxina/citocinina en los medios de cultivo utilizados en este estudio favorece a las citocininas lo cual hace que se den condiciones favorables para inducir a la brotación y no a la formación de raíces.

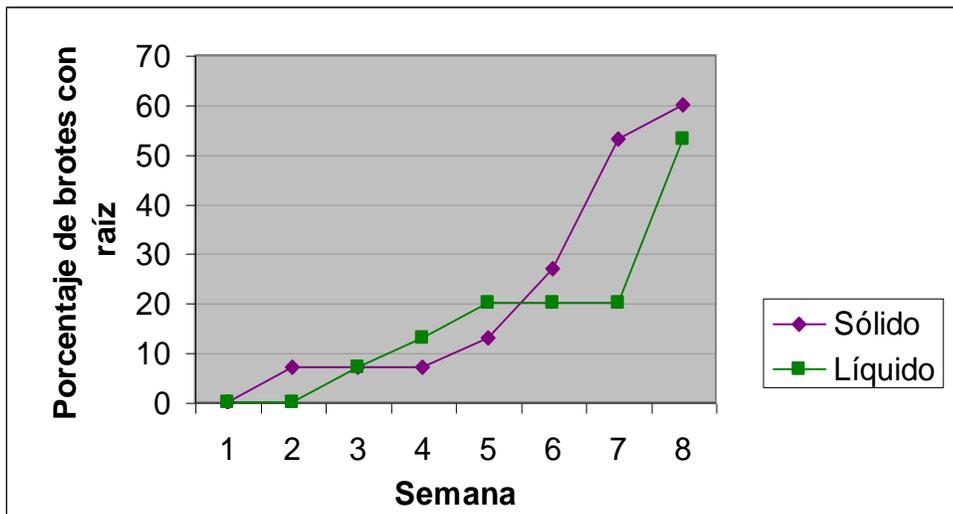


Figura 8. Porcentaje promedio de brotes de piña (*Ananas comosus*) con raíz como respuesta a dos medios sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Los datos comparativos considerados en el cuadro 3 muestran que el medio líquido es más favorable que el medio semisólido principalmente, en las variables número y longitud de brotes, número de hojas y área del brote.

Estos resultados aportan argumentos para automatizar una o más etapas en los procesos de micropropagación de piña; como una opción para la reducción de costos de manipulación y del espacio, e incrementar volúmenes de producción (Alvard *et al.* 1993).

Cuadro 3. Datos comparativos de los resultados promedios obtenidos la octava semana de evaluación de los brotes de piña como respuesta a dos medios de cultivo *in vitro*, sólido y líquido.

Variable	Tratamiento	
	Sólido	Líquido
Número de Brotes	2.00	4.33
Longitud de Brotes	1.13	3.33
Número de Hojas	8.00	13.00
% de respuesta	100	100
Área de los brotes	0.79	3.45
Sobrevivencia	100	100
Numero de raíces	1	2
Longitud de raíces	0.75	0.41
% de brotes con raíz	60	53

6. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente estudio se desprenden las siguientes conclusiones:

1. El medio líquido permitió observar diferencias significativas cuando se evaluó la longitud y el número de brotes a partir la primera y de la sexta semana respectivamente.
2. El medio líquido permitió un mayor desarrollo de hojas en los brotes, en comparación con el medio solidificado con agar.
3. El área foliar en los brotes de piña fue mayor en el tratamiento líquido, en comparación con el medio solidificado con agar.
4. Las variables número de raíces, longitud de raíces y porcentaje de brotes con raíz no mostraron diferencias estadísticas al comparar el medio sólido con el medio líquido.

7. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se plantean las siguientes recomendaciones:

1. Continuar con el estudio que evalúa los sistemas de cultivo en la respuesta morfogénica de brotes de piña y considerar las fases de enraizamiento y climatización de la micropropagación.
2. Considerar el tiempo que requiere una plántula de piña hasta llegar a la fase de aclimatación considerando los sistemas líquido y el medio solidificado con agar.
3. Considerar como variable adicional los volúmenes en el medio de cultivo líquido y el tiempo de oxigenación, ya que en el presente estudio sólo se estudió un único volumen y 3 tiempos de oxigenación.
4. Estudiar otros tiempos entre subcultivo, diferentes al empleado en este estudio.
5. Realizar estudios histológicos para verificar los eventos morfogénicos así como el potencial de micropropagación, como respuesta a los diferentes sistemas de cultivo.

8. LTERATURA CITADA

- Aitken–Christie, J. 1991. Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. The Netherland. 358 – 363 pp
- Aitken–Christie, J; Davies, H. 1988. Development of a semiautomated micropropagation system. Acta Horticulture. 230 : 81 – 87.
- Alvarenga, S. 2001. Manual de Laboratorio cultivo de tejidos I. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 62 p.
- Alatorre, C.F. 2002. Estudio morfogénico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona* Schiede obtenido *in vitro*. Tesis. Bach. Agr. Universidad Autónoma de Chapingo , Chapingo, México. 86 p.
- Alvard, D; Cote, F; Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid culture for banana micropropagation. Effect of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32:55 – 60
- Casales, M.; García, M. 1987 Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. En: Boletín Científico del Centro de Botánica Tropical, Universidad Central de Venezuela 2: 3-18.
- Centro Bioplasmas, Universidad de Ciego de Avila. Manual descriptivo de bioreactores de inmersión temporal.
- Consejo Nacional de Producción. 2004. Frutas y vegetales. Subgerencia de Desarrollo Agropecuario, Dirección de Mercadeo y Agroindustria. San José, Costa Rica. 8/02/05.
<http://www.mercanet.cnp.go.cr/SIM/Frutas_y_Vegetales/documentospdf/Frutas_frescas_09-06-2004.pdf >
- Daquinta, M; Barrera, L; Lezcano, Y; Mosqueda, O; Escalona, M; Borroto, C. 1999. Efecto de la oscuridad en la multiplicación *in vitro* del banano FHIA –18 en los sistemas de inmersión temporal. Libros de reportes cortos. 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. 185 –187pp.
- Debergh, P; Harbaqui Y; Lemuer, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cyanara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiologia Plantarum. 53: 181 – 187 pp.

- Douglas, G.C. 1984. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron* *in vitro* using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 24, 337-347.
- Escalona, M; Lorenzo J.C; González B; Daquinta M; González J.L, Desjardins Y; Borroto CG. 1999. Pineapple (*Ananas comosus*) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18:743 -748 .
- Flores, V. 1998. La planta: Estructura y función. 2ª ed. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 504 pp.
- Fujiwara, K; Kozai, T; Watanabe, I. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoot and /or plantlets at rooting an acclimatization stage. *Acta horticulture* 230: 153 – 158.
- Garita, H. 1995. Micropropagación de dos variedades de piña (*Ananas comosus*). Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia. San José, Costa Rica. 94p
- Hdider, Ch; Desjardins, Y. 1993. Prevention of shoot vitrification of strawberry micropropagated shoots proliferated on liquid media by new antivitrifying agents. *Canadian Journal Plant Science* 73: 231 – 235.
- Hvoslef-Eide, A; Kathrine, P., Walter. 2005. Liquid culture system for *in vitro* plant propagation. 588 p.
- Jiménez, J; Perez N; Feria, M; Balboa, R; Capota, A; Chavz, M; Quiala, E; Perez, J. 1998. Improved production of potatoes (*Solanum tuberosum*) microtubers using temporary immersion systems. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*.
- Kononoawicz, H; Janick, J. 1984. Sexual embryogenesis via callus of *Theobroma cacao*. *Zeitschrift fuer pflazerphysiol (Alemania)* 113: 347 – 358.
- Litz, R.E; Jarret, R. L.. 1991. Regeneraciónn de plantas en el cultivo de tejidos. En. W. Roca L.A Mroginski. *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. 143-172.
- Lorenzo, J; González, B, Escalona, M; Teisson, C; Espinoza P; Borroto C. 1998. sugar cane shoot formation in an improved Temporary Immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54 (3): 197 – 200.
- Maene L; Debergh PC. 1985. Liquid médium additions to established tissue cultures to improbe elongation and rooting in vivo. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 5: 23 – 33.
- Marchal, J; Alvard, D. 1988. Influence du rythme de renouvellement des solutions de culture *in vitro* d` ananas sur milieu liquide. *Fruits* 43 (12): 701-707.

- Montero, W. 2001. Estudio morfogénico e histológico de *Echinacea purpurea in vitro*. Tesis para optar Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 60 pp.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497
- Nakasone, H y Paull, R.E. 1998. Tropical fruits. ed CAB International. 326 pp.
- Nairn, B.J; Furneaux, R.H. y Stevenson, T.T. 1995. Identification of dan agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiate pine. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 43, 1-11.
- Palma, Z.T, Montero W. 1998. Micro propagación de piña (*Ananas comosus*). Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 10 pp.
- Palma, T; Montero, W. 2002. Curso de biotecnología orientada a la micropropagación de especies tropicales: curso impartido para profesores del Colegio Técnico Agrícola de Pital, San Carlos. San Carlos, Costa Rica. Editorial Tecnológica. 50 pp.
- Pieper, W; Zimmer, K. 1976. A simple, inexpensive apparatus for in vitro propagation of tissues. *Gartenbauwissenschaft* 41 (5): 221 – 224.
- Romberger, J.A. y Tabor, C.A. 1971. The *Picea abies* shoot meristem in culture. I: agar and autoclaving effects. *American Journal of Botany*. 58, 131-140.
- Scholten, H.J y Pieik, R.L.M. 1998. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports* 17, 230-235.
- Skoog, F. y Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol* 11: 118- 130.
- Simonton, W; Robacher, C; Krueger, S. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 211 – 218.

- Smith, M A; Spoomer, L. 1995. Vessels gels, liquid media and support systems. In: J Aitken – Christie, T Kozai, M A L Smith (eds). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer pp Academic Publishers, Dordrecht.
- Stolz, L.P. 1971 . Agar restriction of the growth of excised mature Iris embryos. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 96, 618-684.
- Takayama, S; Misawa, M. 1983. The mass propagation of *Lilium in vitro* by stimulation of multiple adventitious bulb scale formation and by shake culture. *Canadian Journal of Botany* 61: 224 – 228.
- Teisson, C; Alvard, D.1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En: M Terzi, R Cella, A Falavigna (eds). Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers. 105 – 109 pp.
- Tisserat, B; Vandercook, C E. 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 107 – 117.
- Van Huylenbroeck, J M y Debergh, P C. 1996. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnonology* 2 (3): 136 – 141.
- Weather, P J; Cheetham R D; Giles K L. 1988. Dramatic increases in shoot number and length for *Musa*, *Cordyline* and *Nephrolepis* using nutrient mist. *Acta Horticulture*. 230: 19 – 44.
- Ziv, M; Ronen, G; Raviv, M. 1998. Proliferation of meristematic cluster in disposable presterilized plastic biorreactors for the larg-escale micropropagation of plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 152 – 158.

ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 1A. Número de brotes promedio de piña (*Ananas comosus*) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	Nº de Brotes	
	Sólido	Líquido
1	1	1
2	1	1,6
3	1,3	1,7
4	1,4	2,2
5	1,5	2,9
6	1,9	3,4
7	1,9	4,0
8	2,0	4,3

Cuadro 2A. Longitud promedio (cm.) de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	Longitud (cm.) de Brotes	
	Sólido	Líquido
1	0,4	0,9
2	0,5	1,4
3	0,6	1,9
4	0,7	2,2
5	0,8	2,4
6	1,0	2,7
7	1,0	3,3
8	1,1	3,3

Cuadro 3A. Número de hojas promedio de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	Nº de Hojas	
	Sólido	Líquido
1	4	8
2	5	8
3	5	10
4	6	11
5	6	11
6	7	12
7	7	12
8	8	13

Cuadro 4A. Área promedio(cm²) de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	Área (cm ²) de los brotes	
	Sólido	Líquido
1	0,06	0,30
2	0,12	0,65
3	0,18	1,01
4	0,25	1,59
5	0,26	1,78
6	0,39	2,83
7	0,4	3,2
8	0,8	3,4

Cuadro 5A. Número de raíces promedio de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	Nº de Raíces	
	Sólido	Líquido
1	0	0
2	0,1	0,0
3	0,1	0,1
4	0,1	0,3
5	0,2	0,4
6	0,9	0,9
7	1,5	0,9
8	0,8	2,3

Cuadro 6A. Longitud promedio (cm.) de las raíces de los brotes de piña (*Ananas comosus*) como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	Longitud de raíces (cm.)	
	Sólido	Líquido
1	0	0
2	0,03	0,00
3	0,07	0,03
4	0,07	0,07
5	0,10	0,12
6	0,20	0,17
7	0,38	0,19
8	0,75	0,41

Cuadro 7A. Porcentaje promedio de brotes de piña (*Ananas comosus*) con raíz como respuesta al medio sólido y líquido durante 8 semanas. ITCR, San Carlos 2005.

Semana	% de Brotes con raíz	
	Sólido	Líquido
1	0	0
2	7	0
3	7	7
4	7	13
5	13	20
6	27	20
7	53	20
8	60	53

Cuadro 8A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces y porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 1 semana después de la siembra

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,00	0,00	,	4	,	ns
	Líquido	1,00	0,00				
Longitud de brote	Sólido	0,39	0,02	-3,29	4	0,030	*
	Líquido	0,87	0,25				
Número de hojas	Sólido	3,80	0,35	-2,64	4	0,058	ns
	Líquido	7,67	2,52				
Área de los brotes	Sólido	0,06	0,02	-2,76	4	0,051	ns
	Líquido	0,30	0,15				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

Cuadro 9A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 2 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,00	0,00	-1,96	4	0,12	ns
	Líquido	1,60	0,53				
Longitud de brote	Sólido	0,53	0,15	-3,20	4	0,03	*
	Líquido	1,43	0,46				
Número de hojas	Sólido	5,00	1,00	-1,71	4	0,16	ns
	Líquido	7,67	2,52				
Área de los brotes	Sólido	0,12	0,08	-3,80	4	0,02	*
	Líquido	0,65	0,23				
Número de Raíces	Sólido	0,07	0,12	1,00	4	0,37	ns
	Líquido	0,00	0,00				
Largo de raíces	Sólido	0,03	0,06	1,00	4	0,37	ns
	Líquido	0,00	0,00				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

Cuadro 10A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 3 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,27	0,46	-1,32	4	0,26	ns
	Líquido	1,80	0,53				
Longitud de brote	Sólido	0,61	0,26	-4,59	4	0,01	*
	Líquido	2,00	0,46				
Número de hojas	Sólido	5,33	1,53	-3,14	4	0,03	*
	Líquido	10,67	2,52				
Área de los brotes	Sólido	0,18	0,18	-2,78	4	0,04	*
	Líquido	1,01	0,49				
Número de Raíces	Sólido	0,13	0,23	0,45	4	0,68	ns
	Líquido	0,07	0,12				
Largo de raíces	Sólido	0,07	0,12	0,45	4	0,68	ns
	Líquido	0,03	0,06				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

Cuadro 11A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 4 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,40	0,53	-1,31	4	0,26	ns
	Líquido	2,20	0,92				
Longitud de brote	Sólido	0,70	0,20	-3,96	4	0,02	*
	Líquido	2,20	0,62				
Número de hojas	Sólido	5,80	1,31	-3,02	4	0,04	*
	Líquido	11,33	2,89				
Área de los brotes	Sólido	0,25	0,19	-7,43	4	0,00	**
	Líquido	1,59	0,25				
Número de Raíces	Sólido	0,13	0,23	-0,60	4	0,58	ns
	Líquido	0,27	0,31				
Largo de raíces	Sólido	0,07	0,12	-0,09	4	0,93	ns
	Líquido	0,07	0,06				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

** : Existen diferencias altamente significativas (P > 0.01)

Cuadro 12A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 5 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,53	0,58	-1,18	4	0,30	ns
	Líquido	2,33	1,03				
Longitud de brote	Sólido	0,80	0,30	-3,99	4	0,02	*
	Líquido	2,37	0,61				
Número de hojas	Sólido	5,83	1,26	-3,03	4	0,39	ns
	Líquido	11,33	2,89				
Área de los brotes	Sólido	0,26	0,20	-6,16	4	0,00	**
	Líquido	1,78	0,38				
Número de Raíces	Sólido	0,20	0,35	-0,55	4	0,61	ns
	Líquido	0,40	0,53				
Largo de raíces	Sólido	0,10	0,17	-0,17	4	0,87	ns
	Líquido	0,12	0,11				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

** : Existen diferencias altamente significativas (P > 0.01)

Cuadro 13A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 6 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia																																																		
Número de brotes	Sólido	1,87	0,50	-3,64	4	0,02	*																																																		
	Líquido	3,40	0,53					Longitud de brote	Sólido	0,97	0,50	-4,43	4	0,01	*	Líquido	2,73	0,47	Número de hojas	Sólido	7,00	1,00	-3,21	4	0,03	*	Líquido	11,67	2,31	Área de los brotes	Sólido	0,39	0,35	-4,88	4	0,01	**	Líquido	2,83	0,79	Número de Raíces	Sólido	0,93	1,62	0,00	4	1,00	ns	Líquido	0,93	1,45	Largo de raíces	Sólido	0,20	0,35	0,15	4
Longitud de brote	Sólido	0,97	0,50	-4,43	4	0,01	*																																																		
	Líquido	2,73	0,47					Número de hojas	Sólido	7,00	1,00	-3,21	4	0,03	*	Líquido	11,67	2,31	Área de los brotes	Sólido	0,39	0,35	-4,88	4	0,01	**	Líquido	2,83	0,79	Número de Raíces	Sólido	0,93	1,62	0,00	4	1,00	ns	Líquido	0,93	1,45	Largo de raíces	Sólido	0,20	0,35	0,15	4	0,89	ns	Líquido	0,17	0,16						
Número de hojas	Sólido	7,00	1,00	-3,21	4	0,03	*																																																		
	Líquido	11,67	2,31					Área de los brotes	Sólido	0,39	0,35	-4,88	4	0,01	**	Líquido	2,83	0,79	Número de Raíces	Sólido	0,93	1,62	0,00	4	1,00	ns	Líquido	0,93	1,45	Largo de raíces	Sólido	0,20	0,35	0,15	4	0,89	ns	Líquido	0,17	0,16																	
Área de los brotes	Sólido	0,39	0,35	-4,88	4	0,01	**																																																		
	Líquido	2,83	0,79					Número de Raíces	Sólido	0,93	1,62	0,00	4	1,00	ns	Líquido	0,93	1,45	Largo de raíces	Sólido	0,20	0,35	0,15	4	0,89	ns	Líquido	0,17	0,16																												
Número de Raíces	Sólido	0,93	1,62	0,00	4	1,00	ns																																																		
	Líquido	0,93	1,45					Largo de raíces	Sólido	0,20	0,35	0,15	4	0,89	ns	Líquido	0,17	0,16																																							
Largo de raíces	Sólido	0,20	0,35	0,15	4	0,89	ns																																																		
	Líquido	0,17	0,16																																																						

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

** : Existen diferencias altamente significativas (P > 0.01)

Cuadro 14A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 7 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,93	0,61	-4,16	4	0,01	*
	Líquido	3,97	0,59				
Longitud de brote	Sólido	0,97	0,50	-4,87	4	0,01	*
	Líquido	3,00	0,52				
Número de hojas	Sólido	7,00	1,00	-4	4	0,02	*
	Líquido	12,33	2,08				
Área de los brotes	Sólido	0,39	0,35	-5,80	4	0,00	**
	Líquido	3,23	0,77				
Número de Raíces	Sólido	1,47	1,22	0,49	4	0,65	ns
	Líquido	0,93	1,45				
Largo de raíces	Sólido	0,38	0,29	0,95	4	0,40	ns
	Líquido	0,19	0,18				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

** : Existen diferencias altamente significativas (P > 0.01)

Cuadro 15A. Resultados de la prueba T, al evaluar el efecto de dos medios de cultivo, sólido y líquido, sobre el número de brotes, longitud de los brotes, número de hojas, porcentaje de respuesta, área de los brotes, porcentaje de sobre vivencia, número de raíces, largo de raíces, porcentaje de brotes con raíz, en piña (*Ananas comosus*), 8 semanas después de la siembra.

Variable evaluada	Medio de Cultivo	Media	Desviación Estándar	Valor T	Grados de Libertad	P > T	Significancia
Número de brotes	Sólido	1,93	0,61	-4,16	4	0,01	*
	Líquido	3,97	0,59				
Longitud de brote	Sólido	0,97	0,50	-4,87	4	0,01	*
	Líquido	3,00	0,52				
Número de hojas	Sólido	7,00	1,00	-4,00	4	0,02	*
	Líquido	12,33	2,08				
Área de los brotes	Sólido	0,39	0,35	-5,80	4	0,00	**
	Líquido	3,23	0,77				
Número de Raíces	Sólido	1,47	1,22	0,49	4	0,65	ns
	Líquido	0,93	1,45				
Largo de raíces	Sólido	0,38	0,29	0,95	4	0,40	ns
	Líquido	0,19	0,18				

ns: No existe diferencias significativas

* : Existe diferencias significativas (P > 0.05)

**.: Existen diferencias altamente significativas (P > 0.01)

Anexo 2



Escala 1 : 5

Figura 1A. Coronas de piña (*Ananas comosus*) utilizadas para extracción de las yemas axilares.



Escala 1 : 7

Figura 2A. Hijos de piña (*Ananas comosus*) utilizados para extracción de yema axilares.



Escala 1 : 3

Figura 3A. Corans de piña (*Ananas comosus*) de donde se obtienen las yemas axilares para la siembra *in vitro*.

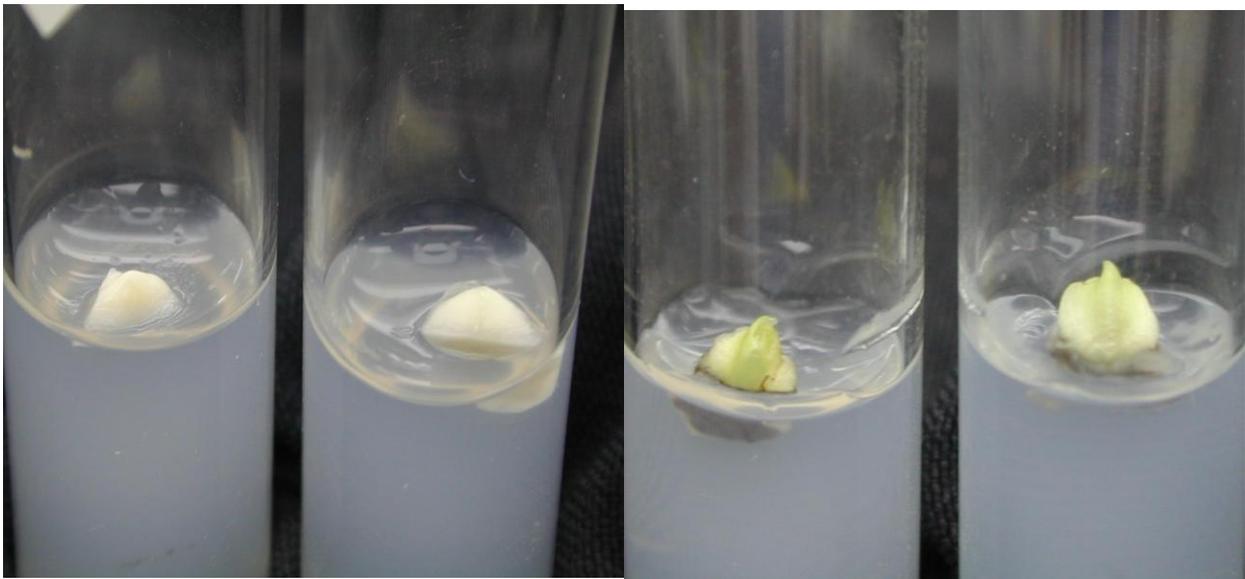
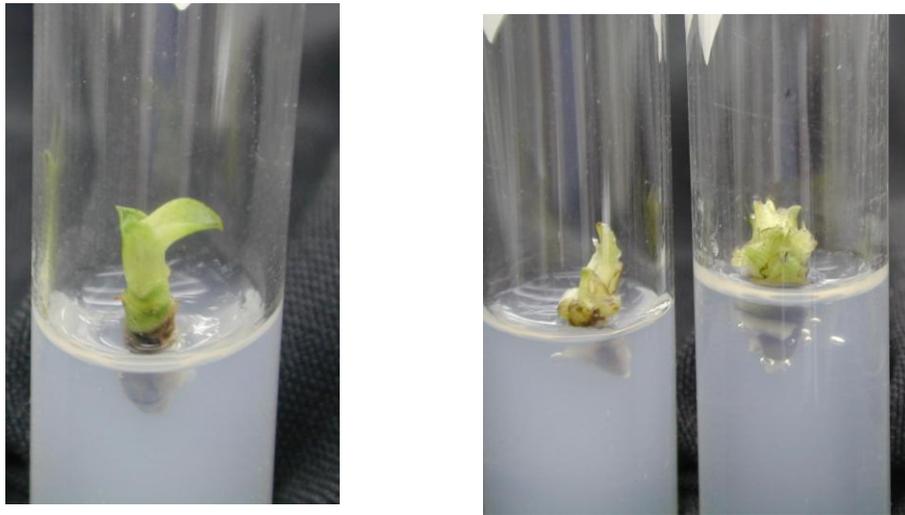


Figura 4A. Yemas axilares de piña (*Ananas comosus*) sembradas en medio sólido para la obtención de brotes.



Escala 1 : 0.02

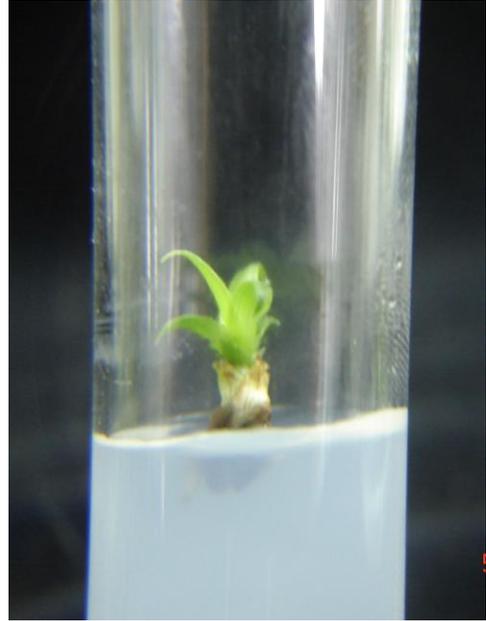
Figura 5A. Brotes de piña (*Ananas comosus*) obtenidos a partir de la siembra de yemas axilares en medio sólido para dar inicio al estudio.



Figura 6A. Componentes utilizados para los ensayos en medio líquido. (a) Programador automático regulador de la frecuencia y duración de la entrada de oxígeno al medio. (b) Estante y recipientes conectados al sistema. (c) Compresor de aire.



Escala 1 : 0.53



Escala 1 : 0.42

Figura 7A. Brotes de piña (*Ananas comosus*) en medio sólido y medio líquido con dos meses después de la siembra.