



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



**EFFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN CULTIVO
IN VITRO DE DOS VARIEDADES DE PIÑA (*Ananas comosus* (L.)
Merr.)**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ROSSI GORETTIN MESTAS FLORES

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PUNO – PERÚ

2020



DEDICATORIA

Dedico con toda fe, a Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida y con un afecto especial a mis queridos padres: Vicente Mestas Yucra, Bernardina Flores Quispe por su apoyo incondicional en todo momento de mi carrera universitaria para lograr este importante paso de mi vida.

Con gratitud a mis hermanos menores Breccy, Yury y a la compañía de vida Mónica, por estar en todos mis momentos más difíciles.

A mis abuelos que en paz descansen y de Dios gocen, así mismo a mis amigos(a) de ayer y de siempre, sin Nombrarlos por temor a Olvidarme a alguno de ellos, millones de gracias.

Gorettin M.F.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a nuestro padre Celestial, a la madre tierra y naturaleza que nos da siempre de comer y permitirnos estar en ella, en esas maravillosas mañanas de primavera verano, otoño e invierno,

A mi alma mater la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, también a Beca Permanencia del gobierno de nuestro país-Perú, puesto que contribuyeron culminar mis estudios superiores satisfactoriamente en esta etapa de mi vida y por haber puesto en mi camino a aquellos que he conocido y han sido mis soporte compañía durante todo el periodo de estudio que son mis docentes de la escuela profesional de Ingeniería Agronómica.

A mi familia que con su apoyo constante y amor siempre me impulsaron para seguir adelante esta bonita y estupenda vida del conocimiento donde mi casa fue mi primera escuela y mi escuela fue mi primera casa y a todos mis amigos(as).



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 18

ABSTRACT..... 19

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 23

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA..... 24

1.3. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN 25

1.3.1. Hipótesis general 25

1.3.2. Hipótesis específica 25

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO..... 26

1.5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN..... 28

1.5.1. Objetivos generales 28

1.5.2. Objetivos específicos..... 28

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES..... 29

2.2. MARCO TEORICO..... 37



2.2.1. Cultivo de piña <i>Ananas comosus</i> L. Merr.	37
2.2.2. Origen y Distribución	37
2.2.3. Auxinas.....	38
2.2.3.1. Regulador de Crecimiento hormonales	38
2.2.4. Citoquinina	39
2.2.4.1. Regulador de Crecimiento de citocinina	39
2.2.5. Micro propagación.....	40
2.2.6. Propagación asexual	41
2.2.7. Propagación sexual o semilla	41
2.2.8. Cultivo in vitro o tejidos vegetales.....	41
2.2.9. Importancia económica.	42
2.2.10. Ubicación Taxonómica.....	42
2.2.11. Denominaciones o nombres comunes:	43
2.2.12. Numero cromosómico	43
2.2.13. Parientes silvestres.....	44
2.2.13.1. Ananas Ananasoides.....	44
2.2.13.2. Ananas comosus	44
2.2.13.3. Ananás sativus	45
2.2.13.4. Ananás brácteatus	45
2.2.13.5. Ananás Eurycorymbus.....	45
2.2.13.6. Ananás paraguayensis	45
2.2.14. Características morfológicas	46
2.2.14.1. Planta de piña	46
2.2.14.2. Raíz.....	46
2.2.14.3. Tallo.....	46



2.2.14.4. Hoja	47
2.2.14.5. Flor de piña.....	47
2.2.14.6. Inflorescencia.	47
2.2.14.7. Infrutescencia.	48
2.2.14.8. Sorosis	48
2.2.15. Fenología de piña	49
2.2.16. Variedades de cultivo de piña (<i>Ananas comosus L.</i>).....	49
2.2.16.1. Var. Golden delicious o MD-2	49
2.2.16.2. Var. Samba	50
2.2.16.3. Var. Perolero.....	50
2.2.16.4. Var. Champaka	50
2.2.16.5. Var. Cayena lisa (Pernambuco).....	51
2.2.16.6. Var. Monte lirio	51
2.2.16.7. Var. Manzana	51
2.2.17. Condiciones ecológicas	52
2.2.17.1. Clima	52
2.2.17.2. Suelo	52
2.2.17.3. Temperatura.....	52
2.2.17.4. Precipitación pluvial	52
2.2.18. Época de plantación.....	53
2.2.19. Rendimiento y cosecha.....	53
2.2.20. Plagas y enfermedades.	53
2.2.20.1. Cochinilla (<i>Dysmicoccus brevipes</i>).....	53
2.2.20.2. Gusano blanco (<i>Phyllophaga portoricensis Smith</i>).....	54
2.2.20.3. Mosca de la fruta (<i>Anastrepa fruterculus</i>).....	54



2.2.20.4. Trips (<i>Frankiniella schultzei</i>)	54
2.2.20.5. Polilla (<i>Castnia licus</i>)	55
2.2.20.6. Fusariosis en piña (<i>Fusarium guttiforme</i>)	55
2.2.20.7. Podredumbre negra (<i>Charala paradoxa</i>)	55
2.2.20.8. Podredumbre del corazón (<i>Phytophthora cinnamoni</i>)	55
2.2.20.9. Podredumbre del material de plantación (<i>Threlaviopses paradoxa</i>).....	56
2.2.21. Uso de piña y valor nutricional	56
2.2.21.1. Usos y propiedades de la piña	56
2.2.21.2. Valor nutricional.....	58
2.2.22. Instituciones que estudian biotecnología en cultivo In vitro	59
2.3. MARCO CONCEPTUAL.....	59
2.3.1. Hormona	59
2.3.2. Embriogénesis	59
2.3.3. Organogénesis	59
2.3.4. Callo	60
2.3.5. Fenolización u oxidación.....	60
2.3.6. Cultivar	60
2.3.7. Totipotencia.....	60
2.3.8. Variedad	60
2.3.9. Clon	61
2.3.10. Ex plante	61
2.3.11. Murachige & scook (MS).....	61
2.3.12. Protocolo.....	61
2.3.13. Asepsia.	61
2.3.14. Esterilización.	62



2.3.15. Autoclave.....	62
2.3.16. Cámara de flujo laminar.	62

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO.....	63
3.2. PERIODO DE DURACIÓN DEL ESTUDIO.....	64
3.2.1. Características del experimento.....	64
3.3. PROCEDENCIA DEL MATERIAL UTILIZADO.....	65
3.4. TRATAMIENTOS.....	65
3.5. MATERIALES DE LABORATORIO QUE SE UTILIZARON.	66
3.5.1. Medio cultivo reguladores de crecimiento.	67
3.6. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO.....	67
3.7. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN.....	68
3.7.1. Factor en estudio.....	68
3.8. DISEÑO ESTADÍSTICO EXPERIMENTAL.....	68
3.6. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO.....	69
3.9. PROCEDIMIENTO DEL EXPERIMENTO EN LABORATORIO.....	69
3.9.1. Metodología de etapa de laboratorio.....	69
3.9.2. Metodología de desinfección e introducción del cultivo in vitro.....	74
3.9.3. Metodología para la inducción de germinación de semilla botánica de piña	80
3.10. VARIABLES EN ESTUDIO.....	82
3.11. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	83



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN MEDIO CULTIVO EN LAS DOS VARIEDADES MD-2 Y SAM.	84
4.1.1. Altura de brote de ex plante (ABE).....	84
4.1.2. Diámetro de brote de ex plante (DBE).....	88
4.1.3. Longitud de brote raíz de ex plante (LBRE).....	93
4.2. MÉTODO DE DESINFECCIÓN EN EL CULTIVO IN VITRO DE PIÑA.....	95
4.2.1. Numero de ex plantes contaminados (NEC).....	95
4.2.2. Numero de ex plantes viables (NEV).....	97
4.2.3. Numero de ex plantes en oxidación (NEO).....	100
4.3. EFECTO DE INDUCCIÓN DE GERMINACIÓN DE SEMILLA BOTÁNICA DE PIÑA	103
4.3.1. Numero de semilla botánica germinadas de Piña (N°SG).....	103
V. CONCLUSIONES	109
VI. RECOMENDACIONES	110
VII. REFERENCIAS.....	111
ANEXOS.....	122



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1: A) Hoja e quitante. B) Yema apical del raquis floral de la infrutescencia meristemática C) Primordios de yema foliar o meristemas colaterales.	42
FIGURA 2: Ubicación del estudio experimental, Puno-Perú.	64
FIGURA 3: Variedades de piña MD-2 y SAM, Puno-Perú.	65
FIGURA 4: Secado de frascos de vidrio.	70
FIGURA 5: Pesado de reguladores de crecimiento, M.S, sacarosa y agar, Puno-Perú.	71
FIGURA 6: Preparación de pre-stock y almacenado de reguladores de crecimiento, Puno-Perú.	71
FIGURA 7: Ajuste de pH con HCL y NaOH.	72
FIGURA 8: Preparación del medio de cultivo, Puno-Perú.	73
FIGURA 9: Desinfectando los medios de cultivo, Puno-Perú.	74
FIGURA 10: Almacenado de frascos con medio de cultivo, Puno-Perú.	74
FIGURA 11: Preparando la “yema apical del raquis floral de la infrutescencia” para la desinfección, Puno-Perú.	75
Figura 12: Pesando y midiendo el material desinfectante, Puno-Perú.	76
FIGURA 13: A) Desinfección de yema de la infrutescencia fuera de la cámara de flujo laminar. B) Desinfección del mechón dentro de la cámara de flujo laminar.	77
FIGURA 14: Desinfectado la cámara de flujo laminar para la introducción de ex plantas.	78
FIGURA 15: Corte primordial de tejido meristemático durante la introducción, Puno-Perú.	78
FIGURA 16: Introduciendo tejido meristemático al frasco de vidrio, Puno-Perú.	79
FIGURA 17: Evaluación de los ex plantas, Puno-Perú.	79
FIGURA 18: Prueba de viabilidad de semilla botánica de piña.	80
FIGURA 19: Conteo de semillas botánicas de Piña, Puno-Perú.	81
FIGURA 20: Semillas introducidas para inducción de germinación, Puno-Perú.	81



FIGURA 21: Semillas en incubación, Puno-Perú.....	82
FIGURA 22: Prueba Tukey para variedad de piña, Puno-Perú.....	85
FIGURA 23: Altura de brote de ex plante (ABE) de piña, Puno-Perú.	86
FIGURA 24: Efecto de variedad dentro de tratamiento para (ABE).	87
FIGURA 25: Efecto de diámetro brote ex plante (DBE) de piña, Puno-Perú.	89
FIGURA 26: Diámetro de brote de ex plante (DBE) de piña, Puno-Perú.	90
FIGURA 27: Efecto simple de variedad dentro de tratamiento de piña, Puno-Perú.....	92
FIGURA 28: Prueba Tukey variedad de piña, (LRE), Puno-Perú.	94
FIGURA 29: Longitud de brote de raíz (LBRE) de piña, Puno-Perú.	94
FIGURA 30: Prueba de Tukey para variedad de desinfección, variable NEC, Puno-Perú.	96
FIGURA 31: prueba de Tukey para tratamiento (dosis) desinfección, Puno-Perú.....	97
FIGURA 32: Prueba de Tukey para tratamientos desinfección, Puno-Perú.	99
FIGURA 33: Prueba de Tukey para tratamiento desinfección, Puno-Perú.....	99
FIGURA 34: Prueba de Tukey para variedad de piña, Puno-Perú.....	101
FIGURA 35: Prueba de Tukey para tratamiento (NEO), Puno-Perú.	102
FIGURA 36: Prueba de Tukey para variedad de semillas germinadas.....	104
FIGURA 37: Prueba de Tukey para tratamiento de semillas germinadas.	105
FIGURA 38: Observación de ex plantes en estereoscopio.	130
FIGURA 39: A) Altura de brote de ex plante var. SAM. B) Diametro de brote de explante var. SAM.....	130
FIGURA 40: A) Altura de brote de ex plante var. MD-2. B) Diámetro de brote de ex plante var. MD-2.....	131
FIGURA 41: A) Hojas equitantes. B), C) y D) Vitro planta de var. MD-2.	131
FIGURA 42: A) Yema meristemática Var. MD-2. B) Longitud de raíz T3. C) Longitud de raíz T2.....	132
FIGURA 43: A) Formación de Callo B) Longitud de brote de raíz Var. MD-2.....	132



FIGURA 44: A) Formación del Callo. B) Longitud de brote raíz de ex plante var. SAM.	133
FIGURA 45: Resultado de protocolo de desinfección de 30 días.	133
FIGURA 46: Semillas no germinadas Var.MD-2.....	134
FIGURA 47: Semillas no germinadas Var.MD-2.....	134
FIGURA 48: Nacencia de semilla del embrión Var. SAM.....	135
FIGURA 49: Semillas germinadas Var. SAM.....	135
FIGURA 50: Descripción de las partes de la semilla de interés botánico.	136
FIGURA 51: Descripción de la flor de la piña.	137
FIGURA 52: Cortes transversales y frontales de la flor, formación de la placenta y Partes de la inflorescencia.	138



ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1: Composición de nutrientes de la piña en base húmeda de 100 gr. según USDA.....	58
Tabla 2: Medio de crecimiento para cultivo in vitro.	67
Tabla 3 : Variables utilizadas en el estudio experimental.	82
Tabla 4: ANOVA para altura de brote de ex plante (ABE).....	84
Tabla 5: Prueba de Tukey (alfa=0.05) para altura de brote de ex plante, (ABE), según la variedad.	84
Tabla 6: Prueba de Tukey (alfa=0.05) para altura de brote de ex plante, (ABE), según dosis.....	85
Tabla 7: ANOVA de efectos simples del tratamiento dentro de la variedad para (ABE).	86
Tabla 8: ANOVA de efectos simples de la variedad dentro del tratamiento para (ABE).	87
Tabla 9: ANOVA para diámetro de brote de ex plante (DBE).....	89
Tabla 10: Prueba de Tukey para variedad de diámetro de brote ex plante (DBE).	89
Tabla 11: Prueba de Tukey (alfa=0.05) para diámetro de brote de ex plante (DBE). ...	90
Tabla 12: ANOVA de efectos simples del tratamiento dentro de la variedad para (DBE).	91
Tabla 13: ANOVA de efectos simples de la variedad dentro del tratamiento de la variable (DBE).	91
Tabla 14: ANOVA para longitud de brote de raíz (LBRE).....	93
Tabla 15: Prueba de Tukey para variedad de longitud de raíz ex plante (LBRE).	93



Tabla 16: Prueba de Tukey tratamiento (alfa=0.05) para longitud de brote de raíz (LRE).....	94
Tabla 17: Análisis de varianza para el número de ex plantas contaminados (NEC).	95
Tabla 18: prueba Tukey para variedades de número de ex plantas contaminados (NEC).....	96
Tabla 19: Prueba de Tukey para el número de ex plantas contaminados para (NEC)...	96
Tabla 20: Análisis de varianza para el número de ex plantas viables (NEV).....	98
Tabla 21: Prueba de Tukey para variedad de numero de ex plantas contaminados (NEV).....	98
Tabla 22: Prueba de Tukey para el número de ex plantas viables (NEV).	99
Tabla 23: Análisis de varianza para el número de ex plantas oxidados (NEO).....	101
Tabla 24: Prueba de Tukey para variedad y el número de ex plantas oxidados (NEO).	101
Tabla 25: Prueba de Tukey para tratamiento desinfección (NEO).....	101
Tabla 26: Prueba de porcentaje de inducción de germinación de semilla botánica de piña Variedad dentro de tratamiento.	103
Tabla 27: Análisis de varianza para el numero de semillas botánicas germinadas de piña (N°SG).....	103
Tabla 28: Prueba de Tukey para variedad de semillas germinadas.	104
Tabla 29: Prueba de Tukey para el número de semilla botánica germinadas (N°SG).	104
Tabla 30: Costo de mano de obra /ha. plantación de una campaña agrícola propagación por hijuelos.	107
Tabla 31: Costo /ha. plantación de una campaña agrícola propagación por cultivo in vitro, es decir esto ya en la fase de multiplicación.	108



Tabla 32 : Datos obtenidos del laboratorio para altura de brote de ex planté (ABE) Var.SAM.	122
Tabla 33 : Datos obtenidos del laboratorio para diámetro de brote ex planté (DBE) Var. MD-2.	122
Tabla 34 : Datos obtenidos del laboratorio para longitud de brote de raíz ex planté (LBRE) Var.MD-2.	122
Tabla 35 : Datos obtenidos del laboratorio para altura de brote ex plante (ABE) Var. SAM.	122
Tabla 36 : Datos obtenidos del laboratorio para diámetro de brote ex plante (DBE)Var. SAM.	123
Tabla 37 : Datos obtenidos del laboratorio para longitud de brote ex planté (LBRE) Var. SAM.	123
Tabla 38 : Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas contaminados (NEC) Var. SAM.	123
Tabla 39 : Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas viables (NEV) Var. MD-2.	123
Tabla 40 : Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas oxidados (NEO) Var. MD-2.	124
Tabla 41 : Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas contaminados (NEC) Var. SAM.	124
Tabla 42 : Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas viables (NEV) Var. SAM.	125
Tabla 43 : Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas oxidados (NEO) Var. SAM.	125



Tabla 44: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas germinadas (SG) Var. MD-2.	125
Tabla 45: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas no germinadas (SNG) Var.MD-2.	126
Tabla 46: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas germinadas (SG) Var. SAM.	126
Tabla 47: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas no germinadas (SNG) Var. SAM.....	126
Tabla 48: Composición de Macro y Micronutrientes de Murashige & Skoog del medio de cultivo.....	127
Tabla 49: Tratamiento 1 de reguladores de crecimiento.....	127
Tabla 50: Tratamiento 2 de reguladores de crecimiento.....	127
Tabla 51: Tratamiento 3 de reguladores de crecimiento.....	128
Tabla 52: Tratamiento 4 de reguladores de crecimiento.....	128
Tabla 53: Tratamiento 5 (testigo).	128
Tabla 54: Tratamiento 1, primera etapa de desinfección antes de la cámara de flujo.	128
Tabla 55: Tratamiento 2, segunda etapa de desinfección durante la introducción del tejido meristemático.	129
Tabla 56: Tratamientos para inducción de germinación.....	129
Tabla 57: Primera etapa de desinfección antes de la introducción de semilla.....	129
Tabla 58: Segunda etapa de desinfección durante la introducción de germinación de semilla.	129



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ANA	: Acido Naftalenoacético.
BAP	: Bencilaminopurina.
IBA	: Ácido Indol 3-butírico
KIN	: Kinetina
B9	: Ácido fólico
Adn	: Adenina
ANVA	: Análisis de varianza
CV.	: Coeficiente de variabilidad
FV.	: Fuente de variación
SC.	: Suma de cuadrados
Ft	: F tabular
Fc.	: F calculada
N. S	: No significativo
*	: Significativo
**	: Altamente significativo
%	: Porcentaje
DCA	: Diseño completamente azar
NaCLO	: Hipoclorito de Sodio
Ph	: Potencial hidrogeniones
ABE	: Altura de brote de ex plante
DBE	: Diámetro de brote ex plante
LBRE	: Longitud de brote de raíz ex plante
NEC	: Numero de ex plantas contaminados
NEV	: Numero de ex plantas viables
NEO	: Numero de ex plantas oxidados o fenolizados
NSG	: Numero de semillas germinadas
MS	: Murashige & Scook
OXIDACION	: Fenómeno químico aumenta el oxígeno y disminuye los electrones



RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el distrito, provincia y región Puno, en la Universidad Nacional del Altiplano a 3826 msnm, en *Ananas comosus* (L.) Merr. especie con alta demanda comercial y muchos beneficios nutricionales y nutraceuticos. La estrecha base genética de la piña, el sistema convencional para obtener material de plantación con calidad fitosanitaria es ineficiente, deficiencia biológica de semilla botánica y los elevados costos de producción, generaron el desarrollo del presente trabajo. Los objetivos fueron: determinar la mejor dosis de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones en dos variedades de piña, establecer el método de desinfección para obtener brotes vivos a partir de yema apical del raquis floral de la infrutescencia, determinar el efecto de inducción de germinación de semilla botánica. El material procede de la UNALM, las variedades de piña fueron MD-2 y Samba, evaluadas y conducidas bajo el diseño DCA con un arreglo factorial 5 x 2 y 5 repeticiones haciendo un total de 50 unidades experimentales, se usó la prueba de significancia de Tukey al 0.05 de probabilidad y efectos simples. Los resultados fueron: la var. MD-2 obtuvo 3cm de ABE con el T2, y 1.4 cm de DBE con el mismo T2, también se obtuvo 0.4 cm de LBRE con el T2 y T3 (ANA 0.5 mg, BAP 2.2mg y B9 8mg), el mejor resultado de desinfección fue la dosis de T2(2gr detergente, 1.5% de NaCLO/100ml agua destilada, 5min y benlate 0.62mg/250ml), al 58% de viabilidad y la mejor tasa de inducción de germinación de semilla botánica de piña fue de 1.57 semillas germinadas con var. Samba T2 (en agua hirviendo durante 2 min, a una temperatura 28°C), lo que indica su estrecha base genética determina su germinación.

Palabras Clave: *Ananas comosus* (L.) Merr, cultivo in vitro, regulador de crecimiento, yema apical del raquis floral de la infrutescencia y semilla botánica.



ABSTRACT

The research work was carried out in the district, province and region of Puno, at the National University of the Altiplano at 3826 meters above sea level, in *Ananas comosus* (L.) Merr. species with high commercial demand and many nutritional and nutraceutical benefits. The narrow genetic base of pineapple, the conventional system to obtain planting material with phytosanitary quality is inefficient, biological deficiency of botanical seed and high production costs, generated the development of this work. The objectives were: determine the best dose of growth regulators in different concentrations in two varieties of pineapple, establish the disinfection method to obtain live shoots from the apical bud of the infructescence floral rachis, determine the effect of induction of botanical seed germination. The material comes from UNALM, the pineapple varieties were MD-2 and Samba, evaluated and conducted under the DCA design with a 5 x 2 factorial arrangement and 5 repetitions making a total of 50 experimental units, the significance test of Tukey at 0.05 probability and simple effects.

The results were: var. MD-2 obtained 3cm of ABE with T2, and 1.4 cm of DBE with the same T2, 0.4 cm of LBRE was also obtained with T2 and T3 (ANA 0.5 mg, BAP 2.2mg and B9 8mg), the best result of disinfection was the dose of T2 (2gr detergent, 1.5% NaCLO / 100ml distilled water, 5min and benlate 0.62mg / 250ml), the best pineapple botanical seed germination induction rate was 1.57 seeds germinated with var. Samba T2 (in boiling water for 2 min, at a temperature of 28 ° C), which indicates its narrow genetic base determines its germination.

Keywords: *Ananas comosus* (L.) Merr, in vitro culture, growth regulator, apical bud of the floral rachis of the infructescence and botanical seed.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los orígenes del cultivo de piña *Ananas comosus* L. Merr. se atribuyen principalmente en América del sur, Brasil, norte de Argentina, Perú, Colombia y especialmente en la cuenca del río Paraná –Paraguay, sus parientes silvestres aparentemente fueron domesticados por los nativos americanos y llevados al centro de Sudamérica y la India occidental, mucho antes de la época colonial española, los cronistas indican a “Cristóbal colon” y sus acompañantes observaron por primera vez en la isla de Guadalupe. Y fue difundido, por Europa y el mundo, y bautizaron como Reyna de la frutas por su aroma, sabor, delicia y otras cualidades (Crestani, et al., 2010).

El cultivo de esta infrutescencia data de hace 10000 a 6000 años a.c. en la actualidad es consumida a nivel mundial y cultivada en los 5 continentes de acuerdo, (Cerrato, 2013). Los mayores productores a nivel mundial de Piña son, Costa Rica, India, Filipinas, Brasil, Tailandia China, Colombia, México y Perú, (FAOSTAT, 2017), a nivel nacional se producen en Junín, Libertad, Puno, Amazonas, San Martín, Loreto, Ucayali, Cusco, Cajamarca, Madre de Dios, Ayacucho; a nivel regional la producción de, San Juan del Oro, Sandía y Putina Punco (DRA. Dirección Regional Agraria., 2018).

Entre tanto las variedades de mayor importancia económica en el Perú son las variedades Samba, Pucallpina, Motilóns, Cayena Lisa, Roja Trujillana y últimamente MD-2, otro hecho que no escapa a la observación es que los rendimientos de la piña está aumentando en los tres últimos años esto quiere decir que requiere mayores cantidades de material vegetativo de plantación (DRA 2018).

Wai y Vanbuneren (2017) afirman que, la ruta de asimilación de carbono alterado del (CAM) da como resultado el uso eficiente de agua en un 80%, mayor que la



fotosíntesis C3 en lo que le convierte un potencial para diseñar plantas con tolerancia a la sequía. A través de un gradiente de hojas verdes y blancas se identificaron genes con oscilación circadiana de CAM alrededor de 20% micro ARN de piña.

La piña emplea una forma especial de fotosíntesis llamada metabolismo ácido de crasuláceas (CAM), lo que significa que el dióxido de carbono captado de día sea utilizado en la fotosíntesis y absorbido en la noche esto es lo que le hace que utilice el 20% de agua eficientemente a comparación de otras plantas, para ayudar la diferenciación del día y la noche se ajustaría su metabolismo de forma más idónea cerrando los poros de hojas de día con un gel fabricado y de noche abrirlos los poros, (Ming, *et al* 2016).

Xu & Col (2018) mencionan que, la piña ocupa una posición filogenética muy importante, ya que su genoma sirve para estudiar la evolución de la familia bromeliácea y la fotosíntesis del CAM, para registrar en un base de datos, plataforma central en línea para almacenar datos genómicos, transcripto micos, marcadores genéticos y anotación de funciones para que estudien los investigadores.

El cultivo *in vitro* es una biotecnología que nos abastecerá en la seguridad alimentaria del futuro debido al acelerado crecimiento de la población. Puesto que nos ofrece muchos beneficios desde el punto de vista fitosanitario, homogeneidad de las infrutescencias al momento de cosechar si fuera poco el cultivo *in vitro* puede multiplicar miles y cientos de plántulas en poco periodo de tiempo acortando su periodo vegetativo y así obtener altas tasas de producción.

Por lo expuesto anteriormente, se busca mejorar la producción de piña mediante el método de cultivo *in vitro* para obtener mejores tasas de producción, acerca de los reguladores de crecimiento, desde la identificación de la dosis ideal, hasta la aplicación del tratamiento para obtener brotes de ex plantas vivos, por otro lado, desde buscar hasta



establecer el protocolo de desinfección ideal para obtener brotes viables y calidad fitosanitaria, así mismo la determinación del tratamiento para la inducción de germinación de semilla de interés botánico en el menor tiempo posible, se realizó la aplicación de los tratamientos, finalmente el vigor de los brotes y la supervivencia donde se analizaron en las diferentes variables de respuesta, para tener éxito en este proceso de investigación de cultivo in vitro.



1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr, es una de las especies tropicales más importante en los últimos años, la producción a nivel mundial es de 25 millones de toneladas según (FAOSTAT, 2017), a nivel nacional con unos 494.6 TM concentrando la región Junín la mayor producción con un 73.7%, seguido por La libertad con 4.9% y la Región Puno con 228.41 TM que representa el 4.5% según (DRA, 2018).

A nivel fruticultor piñero (metodo convencional), hay baja calidad fitosanitaria del material de plantacion de piña, mayor demanda de personal al momento de recoleccion y seleccion del hijuelo de piña, mayor demanda de tiempo en obtener material de plantacion, dificil manejo para su traslado al campo de plantacion, desuniformidad de infrutescencias al momento de la cosecha, por lo antes mencionado existe mayores costos de produccion en el pais y esto afecta al productor. Y a nivel de investigacion (metodo de cultivo in vitro), dificil adaptacion a los reguladores de crecimiento durante el establecimiento del cultivo in vitro esto gracias a su estrecha base genetica, dificil encontrar la dosis de desinfeccion para obtener explantes viables durante el establecimiento del cultivo in vitro, deficiencia biologica de la semilla de interes botanico escasos trabajos de investigacion en el tema, por lo tanto hay un bajo potencial genetico.

Tradicionalmente la plantacion de piña es apartir de semilla vegetativa obtenidas de campos en produccion y hay diferentes tipos de semillas vegetativas la corona misma, hijuelo de la base del tallo, bulbillos, esquejes, chupones aereos del suelo ultimamente estan propagando mediante flores es decir esta tecnica convencional no dispone de material suficiente en tiempos oportunos (Reinhardt, *et al.* 2003).

Nasution y Hadiati (2012) mencionan que, es dificil de obtener el material necesario de plantación con calidad fitosanitaria en piña, por eso es justo y necesario



recurrir al mejoramiento de métodos biotecnológicos en desinfección para cultivo in vitro de piña, lo que significaría que incrementaría hasta en un 40% de cosechas prosperas, el problema es la escases de trabajos de investigación en establecimiento de protocolo de desinfección para lograr brotes viables por lo que los problemas fitosanitarios en cultivo in vitro son delicados y a veces difíciles de controlar sobre todo cuando se tiene infección de virus.

Obstáculo percibido la presencia de las famosas patentes son un problema biológico peligroso ablando económicamente, la ingeniería genética es una herramienta peligrosa al servicio de un monopolio agroindustrial, esto a la larga puede volver dependiente al agricultor serrando con un candado biológico de las plantas mejoradas aquí se incluye los híbridos, y la disminución de la biodiversidad, es más la creencia errónea que nos implanto FAO, las plantas pueden y deben estar conservados en banco de genes en cámaras frías, en vez que digan que las plantas deben y tienen que estar al aire libre junto con los agricultores para su conservación (Brac y Seuret, 1999).

Obstáculo percibido a nivel local en la región tenemos zona tropical sandía, San Juan de Oro y Putina Punco con un gran potencial, es decir los pocos Fruticultores Piñeros de estos lugares se están dedicando a otras labores y hemos constatado que por falta de apoyo técnico y orientación están recurriendo a otras actividades y otros cultivos por tanto es justo y necesario nuestra intervención para ofrecer la biotecnología de la piña.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Pregunta general

¿Con el uso de la determinación de cultivo in vitro y reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de (ANA, BAP, KIN, ácido fólico y adenina) a partir de “yema



apical del raquis floral de la infrutescencia de piña” e inducción de germinación semilla botánica sobre las dos variedades se puede lograr disminuir los costos de producción?

Pregunta específica

- ¿con que variedades y dosis de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de (ANA, BAP, KIN, B9 y adenina) se pueden lograr mejores brotes de ex plantas de piña en cultivo in vitro?
- ¿Cuál y como es el método de desinfección para obtener brotes vivos de ex plante de la yema apical del raquis floral de la infrutescencia de piña para obtener plantas con calidad fitosanitaria?
- ¿Cómo determinar el efecto de inducción de germinación de semilla botánica de piña, será un portador de biotecnología?

1.3. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Hipótesis general

- Al menos habrá, una dosis de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de (ANA, BAP, KIN, B9 y adenina) a partir de “yema apical del raquis floral de la infrutescencia de piña” e inducción de germinación semilla botánica sobre las dos variedades.

1.3.2. Hipótesis específica

- Al menos habrá, una dosis de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de (ANA, BAP, KIN, B9 y adenina) sobre las dos variedades.
- Al menos habrá, un método de desinfección para obtener brotes vivos de ex plante de “yema apical del raquis floral de la infrutescencia de piña”.



- Al menos habrá, un efecto de tratamiento para determinar la inducción de germinación de semilla botánica.

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La piña *Ananas comosus* L. Merr, en los costos de producción en promedio se gasta 26,000 soles/ha desde la preparación de terreno hasta la cosecha, lo que se vende en promedio es de 120,000 soles/ha (Anahui, 2019), así mismo para cosechar 25TM se requiere 5000-6000 soles/ha solo para fertilización y control de plaga y enfermedades, durante 12 meses. En términos de costos de producción el precio de una infrutescencia de piña variedad MD-2 en promedio tiene un costo de 3 a 4 soles/piña y la variedad SAM entre 2.5 a 3 soles/piña (DRA, 2018), el rendimiento varía desde 35 mil a 70 mil infrutescencia de piña/ha, la infrutescencia es apreciada por su sabor aroma valor alimenticio sobre todo por el contenido nutraceutico, así mismo amplía la base alimentaria a las familias, por otro lado mediante el cultivo de piña se puede completar varios vacíos de empleo generando actividad agrícola, industrial, farmacéutica, comercial a nivel mundial.

Apogbua y Osuji (2011) mencionan que en los últimos años el cultivo in vitro se presenta como una técnica promisoría por su alta tasa de multiplicación y por garantizar la sanidad de las semillas vegetativas al momento de cosechar nos brinda la uniformidad de la infrutescencia.

Napoles *et al.* (2019) mencionan que la disponibilidad de material vegetal, para la plantación de piña es uno de las causas que limita el alcance de plantación a gran escala entonces necesita recurrir obligatoriamente a cultivo in vitro para multiplicar cientos y miles de plántulas de piña, para obtener y lograr material disponible suficiente, y satisfacer la demanda de productores de piña.



Aragon (2012) menciona que la multiplicación in vitro no crea procesos nuevos dentro de la planta, el cultivo IN-VITRO simplemente dirige y asiste el potencial natural de la planta y dispone de un nuevo crecimiento y reproducción con alta eficiencia, por otro lado, se usa como un modelo de estudio de procesos fisiológicos, el cultivo in vitro ofrece una importante alternativa de solución a la producción sostenida de alimentos para las futuras generaciones.

Ming y Vanburen (2015) mencionan que la piña *Ananas comosus* L. Merr. tiene valor ambiental, es un cultivo económicamente valioso por este nuevo método de fotosíntesis(CAM) recientemente descubierto, según los científicos las plantas de fotosíntesis CAM viene regulada por los “genes del reloj circadiano”, pues este marca el ritmo del ciclo celular este es el que determina la hora de asimilar los nutrientes, agua e intercambio gaseoso entonces la detección de luz y temperatura del día, la ritmicidad de la célula en gran parte viene por las oscilaciones de la actividades de proteínas, en tal sentido la vía fotosintética de asimilación de carbono (C3) lo que le convierte con alta eficiencia de uso de agua.

La variedad MD-2 tiene una gran actividad comercial sobre todo exportación y está destinado la mayor parte para consumo fresco y una parte para la industria, lo más asombroso es que tiene ocupado el mercado internacional desde 50% a 55% a EE.UU 58% a Alemania y 25% a otros países de acuerdo a la (University Agricultural of Kerala 2013).

La variedad samba también es comercial y tiene mayor aceptación en la industria además es resistente al transporte (DRA, 2018).

Describimos todas las características morfológicas de la semilla y flor como indica el anexo, entonces el interés botánico, la preservación, conservación de plantas es muy



importante para verificar cómo ha evolucionado, cambiado las plantas en el tiempo para facilitar el estudio y enfrentar el cambio climático, social de acuerdo a (Holloway 2003).

1.5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1. Objetivos generales

- Determinar la mejor dosis de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de (ANA, BAP, KIN, B9 y adenina) a partir de “yema apical del raquis floral de la infrutescencia de piña” e inducción de germinación semilla de botánica sobre las dos variedades.

1.5.2. Objetivos específicos

-Determinar la mejor dosis de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de (ANA, BAP, KIN, B9 y adenina) sobre las dos variedades.

-Establecer el método de desinfección para obtener brotes vivos de ex plantas de “yema apical del raquis floral de la infrutescencia de piña”.

-Determinar el efecto de inducción de germinación de semilla botánica.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

La piña *Ananas comosus* L. Merr. es un cultivo económicamente valioso. Los científicos descubren que las plantas de piña poseen fotosíntesis CAM, en consecuencia este viene regulada por los “genes del reloj circadiano”, entonces el ritmo del ciclo celular es responsable de determinar la hora de asimilar los nutrientes, agua e intercambio gaseoso, la detección de luz y temperatura del día específicamente, así mismo la ritmicidad del ciclo celular en gran parte viene regulada por las oscilaciones de la actividad proteica, en tal sentido la vía fotosintética de asimilación de carbono (C3) se observa en cultivo in vitro, lo que le convierte en una especie con alto uso eficiente de agua reportado (Zhang, Liu y Ming 2014).

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal de la facultad de ciencias agrarias de UNCA con el objetivo de determinar el efecto de la citocinina y auxina en la organogénesis directa in-vitro de piña, variedad roja trujillana con un diseño experimental DCA bajo un arreglo factorial 3*3 y 9 tratamientos y 7 repeticiones, donde utilizó el medio M.S. con (KIN 0.8, 16, 0.2, 4 mg/L), resultando el mejor tratamiento con dosis de (8 mg/L KIN + 2 mg/L de 3 BAP) que permitió obtener mayor promedio de brotes, así mismo el tratamiento 1 (M.S. + 0 mg/L de KIN + 0 mg/L BAP), se logró mayor longitud promedio de brote siendo 5 cm, por otro lado el tratamiento con dosis (M.S. + 0 mg/L de ANA + 2 mg/L IBA) obtuvo mayor longitud de raíz con 2.49 cm (Ventura, 2018).

Cisneros *et al.* (1997) mencionan que, se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, es decir de campo se realizó la desinfección, para la formación



de callos a partir de segmentos de la base de hojas obtenidas de plántulas de crecimiento *in vitro* con la var. Smoot cayenne y red spanish, de estos ex plantas se obtuvieron callos de crecimiento lento, duro nodular y amarillo pálido, similar al callo descrito por otros autores a pesar del bajo aumento de peso de los callos formados con 2.5 mg /L de dicamba más 0.5 mg /L de BAP (benzil aminopurina) su capacidad de regeneración fue mayor que las demás características embriogénicas del callo y se determinaron mediante examen histológico.

Aragon (2012) menciona que, la multiplicación *in vitro* no crea procesos nuevos dentro de la planta, el cultivo IN-VITRO simplemente dirige y asiste el potencial natural de la planta por su puesto dispone de mejor crecimiento y reproducción de la piña.

El trabajo se realizó en la universidad estatal de Quevedo en Ecuador donde determinaron la mejor concentración de reguladores de crecimiento en el establecimiento de cultivo *in vitro* siendo la dosis conformado por (MS), con BAP (0.5mgL⁻¹); AIB (1.0 mgL⁻¹) y ANA (1.0 mgL⁻¹) obteniéndose el 47 y 56 % de supervivencia. Para la proliferación de brotes, la mejor concentración fue el mismo medio MS es decir suplementado con 3.5 y 4.0mgL⁻¹ de BAP (benzil aminopurina) en la var. Champaka y hawaiana. Sin embargo, se llegó a esta conclusión como sigue en el siguiente párrafo. Para el enraizamiento *ex vitro* y aclimatación la mejor respuesta se presentó en el testigo (sin hormona) con una sobrevivencia de 93.75% para la var. Hawaiana y 79.16 para la var. Champaka, respuesta al número de raíces en testigo lo evidencio con un promedio 7.25cm la mayor longitud en la var. Hawaiana y con 3.55cm la var. Champaka, (Saucedo, Vargas, Carmigniani y Ramos 2008).

Pinto, *et al.* (2018) refieren que el objetivo del trabajo fue evaluar la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales etiolados para la producción de plántulas de



piña ornamental *Ananás comosus* (L.). var. Bracteatus, en la fase de introducción los tratamientos fueron ,medio MS sin regulador de crecimiento ,medio MS + 10mM ANA,MS +10Mm AIA y MS + 10Mm AIB a una temperatura de 24C° en oscuridad una vez evaluados el tratamiento sin regulador de crecimiento presento el valor más alto para el numero de brotes y número total de nodos por ex plante ,mientras que en otros tratamientos no hubo diferencia en el número de brotes y número total de nodos por ex plante, el efecto del medio que contenía ANA obtuvo el valor más bajo, para la fase de regeneración los tratamientos fueron, medio MS sin regulador de crecimiento ,MS+BAP 4.44mM ,MS+8.88mM BAP , MS +13.32mM a una temperatura de 24C° a 16 horas luz después de evaluar a los 30 días no hubo diferencia en desarrollo de ganglios en tratamientos probados es decir a los 45 días el medio BAP 13.32mM promovió una mejor regeneración plántulas con nodos.

Pineda (2012) mencionan que, la investigación fue realizada en Caracas Venezuela llegando a comprobar la naturaleza de la organogénesis de piña, los resultados mostraron la rizo génesis y formación de vástagos de callo en el medio de cultivo que contenía la dosis de regulador de crecimiento siendo, 5mgL-1ANA, y 0.25mgL-1IBA, fue la misma dosis revertido en aclimatación.

El trabajo se realizó en la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado con el programa de horticultura y señalan que las altas tasas de multiplicación de cayena lisa en medio de cultivo liquido con combinación de reguladores de crecimiento obteniendo la dosis de mejor respuesta con , BAP al 1.5mg/L y ANA a 0.5mg/L, Logrando mayores cantidad de brotes de ex plantas introducidos en medio liquido reportado por, (Mogollon, Diaz y Hernandez 2004).



Mhatre, Srinivas y Ganapathi (2011) mencionan que, del 4 al 8 % de las bases foliares cocultivas produjeron brotes múltiples de 6 semanas después, que le transfirieron el medio MS suplementado con ANA 1.8mg/l, Kinetina 2.0mg/l, cefotaxima 400mg/l, y kanamicina 50mg/l.

Olmedo, *et al.* (2005) Demuestran que la luz es el factor de más influencia en la calidad de regeneración de ex plantas en cultivo *in vitro*, aunque en estas condiciones parecen utilizar más los nutrientes del medio de cultivo. Por otro lado, los biorreactores de inmersión temporal tienen un mejor rendimiento que los propagados por método convencional puesto que provee la nutrición y el control de la atmosfera.

Realizaron la investigación en la Universidad Sao Paulo Brasil, el objetivo fue evaluar los efectos de BAP y ANA en la inducción y multiplicación de piña, se utilizó las axilas de la corona de piña suplementado con medio MS +5% de agar, ajustado a un pH de 5.7. Después de la evaluación demostraron el efecto del medio más adecuado y fue 1.0mg/L de BAP y 0.5mg/L de ANA proporcionando un menor porcentaje de hipersensibilidad (poco sensible) y mayor número de brotes, (Borges, Giuseppino y Lima 2009).

Omokolo, *et al.* (2001) mencionan que, el uso de reguladores de crecimiento, las cito quininas constituyen una técnica intermedia entre las prácticas de cultivo *in vitro* es decir estos reguladores no tienen mucho efecto *in vitro* en los ex plantas, sin embargo, nos sirve para evaluar el rendimiento de *in vitro* plantas por corona. En efecto obtuvieron resultados con la dosis de 4mg BAP/L y 6mg kinetina /L llegando a obtener 9-10 *in vitro* plantas por corona.

Blanco, Varga y Garcia (2017) mencionan que, la investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal de la facultad de ciencias, universidad central de



Venezuela, recurriendo al cultivo de tejidos de piña mediante embriogénesis somática y organogénesis adventicia. El material obtenido corresponde al segmento de hoja el protocolo de desinfección fue pi cloran 10mg/l+tidiazuron2mg/l, sin reguladores de crecimiento llegando a brotar 1.06 cm de altura, con rendimiento in vitro de 1.58plantas por ex planté siendo el ultimo mejor dosis de desinfectante directo con M.S. +ANA5mg/l+BAP0.25mg/l en conclusión el autor recomienda esta dosis sin desinfectante.

Llanos (2015) menciona la investigación se realizó en la Universidad Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Bilógicas. Estableció un protocolo de desinfección para cultivo in vitro en introducción de yemas de piña, siendo el más eficaz la concentración de lejía a (25%por 15min), para la primera desinfección y para segunda desinfección (10%por 10min) siendo esta mejor dosis.

Lopes, Martins y Torres (2010) mencionan que han probado el protocolo de desinfección, para la introducción de ex plantas in-vitro, con “hipoclorito de sodio” al 0.0003% así como otros procedimientos de asepsia que proporcionaron una esterilización completa obteniendo resultados que aumentaron los brotes y biomasa de los ex plantas.

El objetivo de esta investigación fue optimizar la producción de material vegetal mediante la técnica de cultivo in vitro y desinfección de los brotes llegando a determinar la mejor dosis con la adición de medio MS más agar al 0.8%,BAP 5mg-10mg/L,ANA4.5-0.7mg/L y gentamicina a 300mg7/L , la mejor dosis de desinfección fue al 15% de hipoclorito de sodio a 5min en estos dosis explosiono con éxito los brotes al 26.07% ,por otro lado la desinfección con cloruro de mercurio se obtuvo altas tasas de necrosis determinado por (Badou, *et al.* 2017).



Ocurre cuando se realiza un corte este inmediato libera enzimas para proteger contra hongos y bacterias entonces el poli fenol se desencadena y hace ocurrir una reacción química gracias al oxígeno provocando el oscurecimiento de los ex plantas recién aislados, cuando esto ocurre inhibe el crecimiento abecés causa la muerte del ex plante, la oxidación es también dependiente del genotipo (Azofeifa, 2009).

La obtención de material de propagación de cultivo in vitro de plántulas de piña a partir de cultivo de tejidos reduce los costos de producción en comparación de la obtención de método convencional (Winkelmann, Geir & Preil 2006).

Las vitro plantas después de permanecer durante un prolongado periodo de tiempo bajo condiciones muy controladas de luz, temperaturas altas, humedad relativa y nutricional en el cultivo in vitro sufren un gran estrés, necrosis, oxidación y llegando hasta morir entonces se llegó a una conclusión que los factores controlados tienen riesgos conforme a (Shu, *et al.* 1995).

Villalobos, *et al.* (2019) mencionan que, el trabajo fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura en el pre acondicionamiento de plantas in –vitro de piña. En resultados se pudo comprobar en temperatura de 35°C durante el día se comportaron como plantas CAM y las establecidas a 25°C durante el día tuvieron metabolismo C3, en conclusión, las altas temperaturas influyen en mayor viabilidad celular y supervivencia por tanto mayor contenido de clorofila.

Reinhardt, *et al.* (2018) mencionan que, las semillas botánicas de piña solo se producirá si hay polinización cruzada entre variedades por tanto la piña debe propagarse por material vegetativo y se denominan material de plantación convencional, su disponibilidad y calidad depende de muchos factores especialmente la variedad y el medio ambiente, en las últimas décadas las técnicas de cultivo in vitro se están



desarrollando con más frecuencia ,en efecto los segmentos que se utilizan de la planta de piña son ,corte de tallo, corte de ápice, transformación de flores a plantas, corona y segmentos de hijuelos disponibles a bajo costo. Sin embargo, la técnica in vitro no se ha transformado en una forma comercial común de propagación de piña debido al alto costo final y a los riesgos aun altos en incidencia y variaciones soma clónales.

Cedeño (2019) menciona que, la piña se caracteriza por tener el fruto “partenocarpico, si hay semillas es decir no son viables, sin embargo la apertura o no de flores no es un aspecto determinante de la capacidad productiva de la piña ,la apertura de flores de piña durante la floración dura 1-2 días es decir esta apertura es una condición que tiene que ver mucho con el aspecto fitosanitario porque en esos 2 días puede penetrar patógenos que posteriormente pudren la infrutescencia de la piña tal es el caso de hongos fusarium,*Penicillium fuiniculum* esto hace pérdidas considerables ,entonces es práctica usual de impedir la apertura de flores por países productores de piña aplicando acido 2-cloro-etil-foffonico etanol en dosis de 1000-2000 ppm cada 4-8 días dirigidos a la inflorescencia lo que no afecta al tamaño ni las características físicas ni químicas de la infrutescencia de la piña, en conclusión, las semillas que no tienen polinización cruzada, no son viables y al no ser viables no germinan.

Iyer, Singh y Subrayamanyam (1978) mencionan las semillas de piña *Ananas cornosus* L.Merr. tienen una capa resistente llamado pericarpio o testa y un endospermo duro y pedernal, sin previo tratamiento la germinación es pobre o nula es tanto lenta como lenta ,las semillas se sembraron en método niebla intermitente estandarizada sin embargo en este método las semillas se vuelven cloróticas debido a la constante lixiviación de nutrientes por otro lado en esta investigación sea tratado con ácido sulfúrico comercial de 30 a 60 segundo ,luego para la introducción el material de germinación debe ser poco profunda para el movimiento del aire saturado, con un temperatura 30-35C°.



Miles (1997) menciona que, la estructura de la semilla botánica *Ananas sativus* L.Merr. de la planta silvestre de piña fueron examinados y encontraron la condición adormecida. La tasa de germinación de semilla botánica de piña silvestre son muy bajas debido a la dureza de la cascara por otro lado señala que a 60F° las semillas se mueren y menores a 75 F° se pudren, solo germinaran con un buen tratamiento con alcohol tiránico, ácido sulfúrico fuerte y cloruro de mercurio a partir de 80 F° a más, han demostrado que el tiempo no es determinante. El material proveniente es obtenido y enviado por el profesor Berman de la Universidad de Hawái, el trabajo se realizó en Universidad Collins London con el único objetivo de investigar y asegurar la semilla botánica de *Ananás sativus* (siendo este un pariente silvestre). En conclusión, las semillas de parientes silvestres si pueden germinar es decir bien tratados, desinfectados y a temperaturas mayores 75°F.

Haroldo (2018) menciona que, las semillas botánicas de piña se produce solo si hay “polinización cruzada “entre variedades en las últimas décadas sean puesto a disposición otros métodos de propagación vegetativa de la piña ,que tratan del fraccionamiento del tallo que son utilizados para cultivo convencional y el tratamiento químico para la “transformación de flores de piña a plántulas” es decir hay desventajas ya que estas plántulas producen plántulas pequeñas , es decir el método aun no sea transformado en una forma comercial común de propagación de piña .

Crocker (1906) y Crocker (1916) menciona que, la latencia y la incapacidad de las semillas para germinar es causado por muchos factores ,los embriones rudimentarios no están maduros entonces no germina, cuándo hay inhibición completa de absorción de agua y oxígeno y quizá la de CO₂ no germina, es más la resistencia mecánica a la expansión del embrión(cascara dura),estado latencia del embrión, causa tardía de la semilla y dormancia.



Nee, Xiang y Soppe (2017) mencionan la latencia de las semillas determina el momento de la germinación, a su vez la liberación está controlado por los reguladores y reserva nutritiva del almacenamiento de la semilla, fijados e influenciados por factores ambientales ya durante la maduración por lo tanto la germinación de semilla es fijada desde la cosecha, sin embargo, las relaciones estrechas de reguladores de latencia aún no se entienden completamente.

2.2. MARCO TEORICO

2.2.1. Cultivo de piña *Ananas comosus* L. Merr.

La planta es característica de las zonas cálidas y tropicales, necesita abundante luz solar en promedio de 16 horas luz y altas temperaturas entre 25-32 °C, por otro lado se tiene la colección botánica en la “Universidad de Harvard” dentro de las colecciones se tiene a la piña que alberga unas 25 únicos conjuntos con unos 12000 especímenes haciéndola el herbario más grande del mundo, donados por el botánico William hookes registrado en base de datos <http://wwhub.harvard.edu/data> (Mendonca, Carvalho, Fernandes y Stephanezabel, 2009)

2.2.2. Origen y Distribución

Los orígenes atribuyen principalmente en América del sur, Brasil, norte de Argentina, Perú, Colombia y quizás especialmente en el río (Paraná–Paraguay), los parientes silvestres aparentemente se han domesticado por los indígenas y llevados al centro de Sudamérica y la India occidental, mucho antes que la llegada de “Cristóbal colon y sus acompañantes “que vieron por primera vez en la isla de Guadalupe. Y fue difundido por los navegantes Españoles, por Europa y el mundo afínales del siglo XV, por su aroma, sabor, delicia etc. por otro lado fue bautizado



como la Reyna de las frutas, en la actualidad siendo consumida a nivel mundial y cultivada por los 5 continentes y data la antigüedad de 6000 a 10000 años antes cristo ,así mismo el descubrimiento y la cultura pertenece a américa esto es indudable y aunque ha sido citado por véngala en el siglo XVI desde ahí se conoce y al parecer han cultivado en invernaderos (Collins, citado por Crestani, *et al.* 2010).

2.2.3. Auxinas

Es una fitohormona universal que estimula la “división celular” y actúa como un regulador de crecimiento, está presente en condiciones variables en las células de la planta, además estas ponen en marcha la velocidad de crecimiento de las plantas induciendo la elongación, y son sintetizados en ápice de brotes de hojas, flores y raíces en ANA, IBA (Mutte, *et al.* 2018).

2.2.3.1. Regulador de Crecimiento hormonales

Es una hormona que está presente en el efecto tropismo estos atraviesan la membrana celular y entra en el citoplasma impregnándose a un receptor es decir los nutrientes claves co-factores hormonales son, Ca, Cu, Mg, Mn, N, Zn y NO_3 (Mutte, *et al.* 2018).

-Ácido naftalenacético (ANA)

Es un compuesto orgánico cristalino, incoloro ligeramente amarillo con formula $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, con propiedades hormonales pertenece a la familia de las auxinas se usa en ciencias agrícolas como un “agente enraizador” de ex plantas y como característica principal no es sensible a la luz, (Dippy, Hughes y Laxton 1954).



-Ácido Indol butírico (IBA)

Es un compuesto natural solido cristalino de color blanco, “estimula desarrollo raíces e incrementa tamaño de fruto”, promueve el desarrollo de “callo génesis” cuya fórmula es $C_{12}H_{13}NO_2$ perteneciente a la familia de las auxinas, (Ponahanish 2015).

-Ácido fólico (B9)

Conocida también como vitamina B9, cuya fórmula es $C_{19}H_{19}NO_6$ se encuentra principalmente en los vegetales verdes oscuros, ayuda en trabajo celular ayuda a producir ADN y “transporta información genética”.

2.2.4. Citoquinina

Es una fitohormona que promueve la “división y diferenciación celular”, están presentes en germinación y establecimiento de desarrollo de las plantas y activa el factor ARR10 del gen MUCHEL regulador clave de brote, para controlar la expresión genética, estos se sintetizan en los tallos, raíces, hojas, flores, frutos y semillas dentro de ellos tenemos BAP, kinetina, zeatina.

2.2.4.1. Regulador de Crecimiento de citocinina

Los reguladores de crecimiento son compuestos sintéticos que replican la acción de las hormonas vegetales los nutrientes Co-factores de citosina son. N, Ca, P, Zn, Mg, K y Mn.



-Benzil amino purina (BAP o BA)

Es una cito quinina sintética de primera generación que provoca crecimiento y desarrollo de plantas “estimula división celular” cuya fórmula es $C_{12}H_{11}N_5$, (Silva 2019).

-Kinetina

Perteneciente a la familia de las cito quininas una clase de hormona vegetal que promueve división celular induce la “formación de callo y regenerar los tejidos de brotes” cuya fórmula $C_{10}H_9N_5O$, (Murashige y Scook 1960).

-Adenina

Antes llamado vitamina B4, dicho de otro modo, es una de 5 bases nitrogenadas que forma parte de los ácidos nucleicos, en el código genético se representa con la letra “A” y también es derivado de la purina sirve como molécula de “reserva de energía” cuya fórmula es $C_5H_5N_5$, (Shapiro 1995) y (Steigewald 2011)

2.2.5. Micro propagación

Es un método de multiplicación sexual y asexual a gran escala a partir de un segmento o porción de tejido llamado ex plante o cualquier órgano de la planta, capaces de regenerar una nueva planta, que dan como resultado la propagación masiva de plantas genéticamente idénticos denominados “clones”. Permite plantas de alto registro fitosanitario, plantas obtenidas por este método son replicas idénticas, la obtención de individuos es superior a otro método, acorta la producción de la planta (Billard, Bartololini y Lallana, 1995).



2.2.6. Propagación asexual

Capacidad de reproducirse a partir de una célula u cualquier segmento de órganos vegetativos de una planta dando origen a unos nuevos genotipos (clones) con las mismas características idénticas,(Campana y Ochoa 2007).

2.2.7. Propagación sexual o semilla

Capacidad de reproducirse a partir de una semilla fecundada dando origen a un embrión que posteriormente será una planta, (Campana y Ochoa 2007).

2.2.8. Cultivo in vitro o tejidos vegetales

Significa cultivar algunos segmentos de la planta como tallo, hoja, flores, raíces y semilla botánica dentro de un material de vidrio. (Frasco, tubo de ensayo, placa Petri) en un medio cultivo artificial, ambiente artificial controlado, luz artificial, temperatura artificial, lo único que hay que cuidar es el axénico, (Billard, Bartololini y Iallana 1995).

Corona o yema apical del raquis floral de la infrutescencia de la piña

En botánica es una estructura de células del raquis que se denomina “yema apical meristemática”, que a su vez contienen yemas colaterales resultado de la protección de las hojas e quitantes, a cuál se llama “primordios de yema foliar” escuamiformes o de consistencia membranosa coriácea que carece de clorofila cuyo tejido meristemático embrional da lugar a la totipotencia celular hasta formar otro tejido adulto (planta).

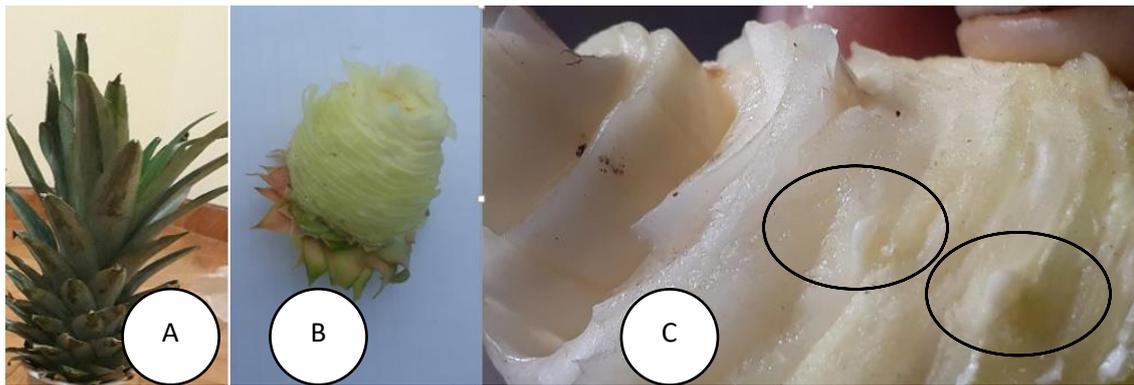


FIGURA 1: A) Hoja e quitante. B) Yema apical del raquis floral de la infrutescencia meristemática C) Primordios de yema foliar o meristemas colaterales.

2.2.9. Importancia económica.

En la actualidad esta infrutescencia llega a miles de personas en diferentes presentaciones ya sea en infrutescencia fresca, jugos, alcohol, vino y bebidas gurmé está presente en industria en general, moviendo una economía de 10 millones de dólares anuales en los EE.UU, con estas evidencias nos atrevemos a decir que hay actividad económica (UAK, 2013).

2.2.10. Ubicación Taxonómica

La piña *Ananas comosus* L. Merr. Según el sistema de clasificación filogenético establecido por Engler citado por Solano (2019), y de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura Botánica, se escribe taxonómicamente, como sigue.

Reino : Plantae

Sub reino : Phanerogamae

División : Magnoliophyta

Sub división : Angiospermae

Clase : Monocotiledóneae



Orden	: Bromeliales
Familia	: Bromeliáceae
Género	: <i>Ananas</i> .
Especie	: <i>Ananas Comosus</i> (L.) Merr.
Variedad	: Samba y Golden delicious.

2.2.11. Denominaciones o nombres comunes:

Según cultura y lugar la voz Bernaculada usada por indios guaraníes es *Anana* o nana que significa flor, perfumé de perfume, por otro lado *comosus* o comic que significa peludo ,dosel, coronado, en nuestro país Perú como piña, en griego” *Ananas comosus*” “piña en España”, “*Ananas* en portugués” y del “guaraní nana” “pineapple en EE.UU.” (D"eeckenbrugge 2016).

Son las únicas especies aceptadas de la familia bromeliácea, *Ananas comosus* L. Merr. Comprende 8 especies, *Ananas bracteatus*, *Ananas hondorensis*, *Ananas parguazensis*, *Ananas eurycorymbos*, *Ananas lucidas*, *Ananas monstrouss*, *Ananas ananassoides*, *Ananas sativa* Lindl, (Bartholomew, *et al.* 2018).

2.2.12. Numero cromosómico

El género *Ananas* comparte un mismo número cromosómico ($2n = 2x = 50$), especie diploide, también hay variedades de poliploides del género *Ananas*, por otro lado aproximadamente 2700 especies, herbáceas, epifitas y 56 géneros, se caracteriza por una reproducción vegetativa dominante así mismo tiene baja fertilidad sexual, tiene alogamia controlado,(Crestani, *et al.* 2010).



Gitai, Juras, Zizka y Schulte (2014) mencionan que estimaron el número absoluto de cromosomas de 5 sub familias y 28 especies de bromeliáceas en estas pruebas incluye la especie *Ananas comosus* L. Merr, concordando con el anterior autor que la piña es diploide, $2n=50$, también en esta especie de *Ananas*. Existen los niveles de ploidia y son $2x$, $4x$, $6x$ el mecanismo responsable de generación es 48, 50, 75, 100 cromosomas.

2.2.13. Parientes silvestres

2.2.13.1. Ananas Ananasoides

Planta con ramificación basal (sin hijuelo o estolones), hojas muy largas y espinosas, con fruto pequeño a mediano, tiene muchas semillas, sabor agradable poco dulce, inflorescencia cilíndrica 8 a 12 cm de largo (infrutescencia madura). Crece en zonas montañosas y laderas y está Distribuido en Perú, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay y Venezuela reportado (MHNB 2018)

Por otro lado, ya se tiene el mapeo genético de esta especie , que acelerará la investigación genética y genómica de la piña (Zhang, Liu y Ming 2014).

2.2.13.2. Ananas comosus

Planta ramificada, presenta numerosos hijuelos, inflorescencia cónica 10 a 15 cm largo penacho, sabor dulce acido, infrutescencia madura es grande, crece en laderas y zonas montañosas del trópico, está distribuido en, nativo de Brasil, Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú y Venezuela (Coppen y Leal 2019).



2.2.13.3. Ananás sativus

Es una especie monocotiledónea ,cuyo característica principal es que el tallo crece longitudinalmente, hojas espinosas , herbácea, flores de color rosa, perenne, alógama auto incompatible, ovario hipogénico, 3 pétalos, inflorescencia espiga y su fruto se forma sin necesidad de fecundación, (Coppens 2014).

2.2.13.4. Ananás brácteatus

Planta de hojas largas con espinas tricolores se caracteriza por la las brácteas largas rojizas también tiene mucha semilla, por otro lado se ha secuenciado los genomas afirmando que el genoma tiene un evento de duplicación y un cariotipo de 7 cromosomas ancestrales en la accesión CB5 es más el número cromosómico es $2n = 50$, nativa de Colombia, Amazonia y los Andes a altitudes de 200-1200 msnm (Xu y Liu 2015).

2.2.13.5. Ananás Eurycorymbus

Especie con hojas lanceoladas, ápice puntiagudo, borde aserrado, inflorescencia compuesta, panícula ampliamente ramificada, brácteas papiráceas con numero cromosómico de $2n=88^*$, (Coppens 2014) y (Souza y Lapa 2000)

2.2.13.6. Ananás paraguayensis

Especie utilizado como ornamental, con hojas de 60 a 70 cm con espinas cortas y fuertes, fruto pequeño de 4 cm largo , se ubica en américa del sur y nativa de Colombia desde altitudes desde 60-440 msnm, (Smith 1961).



2.2.14. Características morfológicas

2.2.14.1. Planta de piña

Planta herbácea, perenne, pertenece a las monocotiledóneas mide unos 1.20m de altura, caracterizado por propagación vegetativa. Semillas son generalmente vestigiales, debido a los procesos evolutivos normales, que son altamente de fertilidad auto incompatible “esto se debe a la inhibición del crecimiento del tubo de polen a través de la fertilización que está determinada por el sistema gametofito controlado por los cromosomas, estos poseen 2 “alelos” ubicados en el mismo lugar formando un “locus” a pesar que las semillas botánicas son necesarias para la mejora genética y la variabilidad cultural en nuevas variedades Cabral (citado por (Crestani, *et al.* 2010)).

2.2.14.2. Raíz

Se localiza entre los primeros 15 cm, a veces superficial en el suelo por supuesto dependerá de la variedad ,tipo de suelo, manejo de la planta, humedad esto puede alcanzar hasta 60 cm de profundidad, (Moreira y Uguña 2018).

2.2.14.3. Tallo

Es único corto y herbáceo, relativamente grueso con entre nudos muy juntos el cual está recubierto por aproximadamente 80 hojas generalmente envueltas hasta varios metros de alto, (Moreira y Uguña 2018)



2.2.14.4. Hoja

Las hojas son carnosas y coriáceas, lanceoladas o lineares envolventes, paralelinervias a veces con bordes espinosos, glabras en algunas variedades, por lo general en roseta. Pueden llegar a medir 30 a 100 cm de largo ,de 70 a 80 hojas por planta sentadas alrededor del tallo de la circunferencia en las axilas de las hojas pueden surgir retoños que facilitan la reproducción vegetativa de la planta, (Sanewski, Bartholomew y Paull 2018).

2.2.14.5. Flor de piña

Las flores son actinomorfas, heteroclamídeas, por lo general hermafroditas, quedando como fórmula $*\frac{K}{3}, C_3, A_{3+3}, G_{(3)}$,^a floral trímera con cáliz de 3 sépalos, corola de 3 pétalos con dos escamas o lígulas o sin ellas ,androceo de 6 estambres, gineceo de 3 carpelos con un solo estilo rara vez nulo o corto ovario supero o ínfero trilocular con numerosos óvulos, estambres, episepalos, epipetalos en cada lóculo, placentación axilar ,estigma con 3 pétalos lingüiformes, estambres exteriores con episepalos, estambres internos con epipetalos, en su base hasta la mitad rodeado por bráctea que es gruesa y carnosa (Marion y Okimoto 2017).

2.2.14.6. Inflorescencia.

Está formado por un grupo de flores individuales hermafroditas auto estériles ,sésiles (que carece de antera y es dehiscente) estos mismos están conectados por tres sépalos y brácteas in conspicuas junto al núcleo, resultado del alargamiento del pedúnculo engrosado, alineados en filas



espirales presentando 8/21 filotaxia, flores repetitivas alrededor del eje o centro de forma regular a menudo formando una línea imaginaria llamada espiral periódica, por ello aparece un nuevo órgano en la misma posición vertical sobre la misma, por último forma una espiga de unos 30 cm de altura, racimo, panícula o capítulo (Pinto 2005).

2.2.14.7. Infrutescencia.

Es Sincárpico o partenocárpico, baya o capsula, se caracteriza por un grupo de 1 a 200 pequeños frutos estos alrededor del mismo eje central en que cada fruto se llama “ojo” o “escala” de cascara cerosa compuesta por secciones octogonales de piña, esto si es un verdadero frutito que creció de una flor, estos se fundieron llegando a unirse en un gran cuerpo (carnoso blando amarillento), llamado “sorosis” o “infructuosa” sobre la cual se forma la corona y llegando a pesar desde 0.3 hasta 2.5 kg a más por infrutescencia dependiendo de la variedad (Silvun & Tassara, (Citado por (Crestani, *et al.* 2010)).

2.2.14.8. Sorosis

Es una estructura carnosa resultado de la degeneración del órgano reproductor de la inflorescencia llamada también infructuosa, que está formado por varios frutitos (vayas) que han sido un conjunto de flores, fusionados entre sí, sobre un receptáculo común o eje floral (raquis) (Gonzales, 2010).



2.2.15. Fenología de piña

PEPP (2015) menciona y describe de la siguiente manera. El ciclo productivo por lo general dura 12 meses es decir variara de acuerdo a la variedad, clima, suelo manejo agronómico.

- a) Fase inicial: dura de 2-4 meses
- b) Fase vegetativa: dura 6-8 meses
- c) Fase de inducción floral: dura de 2 meses
- d) Fase de fructificación: dura de 3-4 meses, entonces la fase fenológica dura entre 12 a 16 meses esto dependerá de las variedades.

2.2.16. Variedades de cultivo de piña (*Ananas comosus L.*)

2.2.16.1. Var. Golden delicious o MD-2

Es un híbrido originado del grupo cayena también conocida como amarillo dorado, planta de rápido crecimiento y rendimiento de 70000plantas/ha, baja acidez con (0.4-0.45%), alto valor Brix 17° ,se caracteriza por tener 5 veces más contenido de ácido ascórbico (vitamina C) que las demás variedades ,peso de infrutescencia 1.5 a 2 kg ,en promedio, forma cuadrado rombo y cilindriforme, núcleo pequeño, 30 días de vida útil, resistente a podredumbre interna ,sensible a *phytophthora*, alta resistencia a plagas, precio de venta es superior a otros variedades. En actividad comercial tiene ocupado 50-55% a nivel internacional, está destinada a la exportación a EE. UU con un 58%, Alemania 25% y otros países menores a 25%, (UAK, 2013).



Alto contenido de azúcar y los azúcares transportados son gracias al gen SWEET, así mismo hecho un análisis RNA y se muestran que pueden estar involucrados en el desarrollo y la maduración de la infrutescencia de la piña recientemente identificados, (Guo y Col 2018).

2.2.16.2. Var. Samba

Es una variedad comercial al igual que la MD-2 ampliamente cultivada en chanchamayo-Perú, cuyo característica principal es bastante vigorosa de color rojo y presenta abundante formación de hijuelos en la base de la infrutescencia y poco en la base del tallo, hojas de bordes lisos, infrutescencia rojo oscuro ala madures, algo cilíndrico con un peso promedio entre 1.2 a 1.9 kg pulpa de color blanco amarillento, bastante resistente al transportes (PEPP, 2015).

2.2.16.3. Var. Perolero

Es mayormente cultiva para la industria y los refrescos ,este cultivar posee hijos sin espinas ,fruto maduro cilíndrico color amarillo anaranjado y con pulpa de color amarillento cremoso, ojos profundos, predomina una sola corona pueden pesar entre 0.6 hasta 3 kg la pula es ½ fibrosa ,altamente apetecible succulenta y refrescante ,de 13 a 16 ° Birx°, es resistente al manipuleo y transporte, resistente a *phytophthora*, (Moreira y Uguña, 2018).

2.2.16.4. Var. Champaka

Esta variedad surge de la variedad cayena lisa, es de buen sabor jugosa, pulpa amarillo pálido, así misma pesa 3-6 libras, hojas con



coloraciones azules a morado rojizo en el centro de la hoja (Moreira y Uguña, 2018).

2.2.16.5. Var. Cayena lisa (Pernambuco)

Conocida como hawaiana ,pueden llegar a medir 1.20 m de altura, se cultiva en menor proporción que la anterior variedad, infrutescencia es cilíndrico alargado de color amarillo naranja con un peso promedio desde 0.5 hasta 2.5 kg .el contenido de fibra es bajo el porcentaje de jugo es alto ,la pulpa es de color amarillento a dorado, rojizo al madurar ,alto contenido de azúcar, resistente a la pos cosecha, la desventaja es de bajo número de retoños e hijos .Anteriormente era preferida por la exportación y agroindustria ahora le ha reemplazado la Var. MD2. Posee una baja resistencia al manipuleo y transporte, susceptible a enfermedades en los últimos años, junto a champaca está siendo destinado a la agroindustria (Moreira y Uguña, 2018).

2.2.16.6. Var. Monte lirio

Sus características, tamaño mediano, hojas verdes rojizo, no poseen espinas son lisas infrutescencia globosa, pulpa blanca amarillenta, resistente a plaga la cochinilla, no es adaptable para la industria, (PEPP 2015).

2.2.16.7. Var. Manzana

Esta variedad no está bien definida, hojas no tienen espinas, infrutescencia de color rojo pálido cuando es madura, presenta bulbillos en la base de la corona, es una mutación de variedad parolera por otro lado



tiene las características de las variedades “española”, “Queen” y “cayena” por supuesto es cultivado en el Perú y otros países poca resistencia al manipuleo (Salazar, 1993).

2.2.17. Condiciones ecológicas

2.2.17.1. Clima

El clima tropical en condiciones favorables es en altitudes que varían desde 100 a 600 msnm, crecen en toda la selva, norte, centro y sur del Perú específicamente la Región de Junín y Puno (PEPP, 2015).

2.2.17.2. Suelo

El suelo en la costa en su mayoría son franco arenoso o arcillo, en la selva los suelos varían de arcilloso a franco- arenoso de textura liviana con acides pH 4.5 a 6.0 con niveles toxicos como el aluminio no obstante es necesario incluir dosis 20-46% N, P₂O₅ 18-32%, K₂O 48-60% ,esto dependerá del análisis de suelo además de micronutrientes Zinc, manganeso y cobre esto afín de obtener resultados económicos esto,(PEPP 2015).

2.2.17.3. Temperatura

Para un buen desarrollo de la piña requiere una T ° ideal de 20 a 30 °C aunque las T ° óptimas para su crecimiento son 25 a 27 °C.

2.2.17.4. Precipitación pluvial

Haroldo (2018) y PEPP (2015) mencionan que, la piña requiere 1.3 mm/día, una precipitación promedio de agua 60-150 mm/mes y 1000-2000



mm/año son necesarias para garantizar un crecimiento normal y una cosecha exitosa.

2.2.18. Época de plantación

La época de plantación más adecuada es el comienzo de la estación lluviosa octubre-noviembre.

2.2.19. Rendimiento y cosecha.

La densidad de siembra variedad cayena varia de 51mil, 70mil, 80mil y 100 plantas /ha de piña, la var. Perolero de 30mil plantas/ha, así mismo la var. MD-2 con 70mil plantas /ha. y 120mil plantas /ha. Obteniendo 55, 73, 80 y 88 tn/ha. con peso de fruto de 1.0 a 1.251 kg/infrutescencia, densidad 90cm, 70cm, 60cm entre línea,40cm, 30cm, 25cm entre surco y 30cm,20cm entre planta , el rendimiento varía de acuerdo a la distancia entre plantas, entre líneas y entre surcos, por tanto el rendimiento será de 70 a 90tn/ha, la producción nacional de piña con 495 mil TM y puno ocupa el tercer lugar con una producción de 22.841TM en los tres últimos años (Santa y Col, 2009).

2.2.20. Plagas y enfermedades.

2.2.20.1. Cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*)

. Se considera la plaga más importante que son pequeños insectos blancos y estos son transmisores de virus y causa marchitamiento poniendo la coloración amarilla, enrollamiento de la hoja , ataca las raíces ,detiene el crecimiento de la planta, teniendo su control con intenso radiación solar, malathion a razón de 3 cucharadas/ 4L, nemacur-40 ec la dosis de mayor



mortalidad es de 78% con una dosis de 10 L/ha ,investigación realizada en la Universidad Autónoma de México metropolitana (Araya, 2019).

2.2.20.2. Gusano blanco (*Phyllophaga portoricensis* Smith)

Es otra plaga que afecta tanto las raíces y tallo causando degeneración y galerías, control: selección y desinfección de la semilla vegetativa, fertilización adecuada y época de preparación de terreno (Alvarado y Duran 2017).

2.2.20.3. Mosca de la fruta (*Anastrepa fruterculas*)

El ciclo biológico (huevo-larva-pupa-adulto), umbral 0.5 moscas/mosquero / día, daño de la infrutescencia de la piña ataca más en la etapa de larva entonces requiere realizar un control con anticipación en la etapa de adulto, control colocar trampeo con trampas de atracción y muerte o químico sintéticas, eliminar infrutescencias picadas, control biológico siendo *C.capitata* (Bravo, 2012 y FAO, 2017).

2.2.20.4. Trips (*Frankiniella schultzei*)

Actúa como vector de virus y enfermedades, mide 0.6-1.5 mm sin embargo en zonas tropicales pueden ser más grandes, control biológico siendo la familia *Anthocoridae*, control cultural eliminar inmediatamente los rastrojos después de la cosecha cuando es severo control químico (Bravo, 2012 y FAO, 2017) .



2.2.20.5. Polilla (*Castnia licus*)

Es la misma que ataca al plátano ataca desde la formación de la infrutescencia hasta la cosecha comiéndose como un roedor ,control con cebos envenenados, eliminación de infrutescencia infectadas (Bravo, 2012 y FAO, 2017).

2.2.20.6. Fusariosis en piña (*Fusarium guttiforme*)

Es una enfermedad devastadora en la actualidad debido facilidad de diseminación, causando daños de clorosis, enanismo, pudrición de raíces, desorden filo taxia, necrosa miento la parte de la infrutescencia de la piña, control evitar causar daño físico por ahí se contamina (MINAGRI, 2017).

2.2.20.7. Podredumbre negra (*Charala paradoxa*)

Causado por el hongo *Cerastomella* este constituye un serio problema cuando se presenta días lluviosos o nublados son propicios para la proliferación del agente afecta a cualquier parte de la planta antes o después de la cosecha, control con ácido benzoico al 20% ,talco o cualquier material inerte 80% seco ejemplo cal (FAO, 2017).

2.2.20.8. Podredumbre del corazón (*Phytophthora cinnamoni*)

Esta enfermedad ataca las hojas jóvenes de la piña ocasionando caída y formando una coloración café chocolate, control es químico, manejo agronómico adecuado, no plantar en terrenos mal drenados (FAO, 2017).



2.2.20.9. Podredumbre del material de plantación (*Threlaviopsis paradoxa*)

Ataca la base de los hijuelos, infrutescencia durante la maduración y a veces en pos cosecha control: plantar en terrenos bien drenados (FAO, 2017).

2.2.21. Uso de piña y valor nutricional

2.2.21.1. Usos y propiedades de la piña

En la antigüedad los pobladores nativos lo utilizaban las coronas de piña en la entrada de sus casas como símbolo de amistad y hospitalidad (Cerrato, 2013).

Upadhyay, Prava y Tawata (2010) mencionan los científicos japoneses que el desecho de piña se utiliza para la extracción de la proteasa que se llama “Bromelina”, aprovechando el bajo costo de materia prima desde luego para la fabricación de medicamentos farmacéuticos, etanol, biogás, fibra y la producción de antioxidantes fenólicos, ácidos orgánicos, por qué las implicancias científicas y tecnológicas lo permiten.

Por otro lado en los últimos años ha tomado más actividad comercial el cultivo de piña por lo que se convierte en fuente principal de ingresos económicos ,por ejemplo el vino de fruta de piña contiene 2.29 gr/L de ácido total,10.2% de alcohol y 5.4° de solidos solubles, pH 3.52, en el vino de piña se detectó 68 tipos de componentes aromáticos ,bajo contenido de alcohol por lo que es fácil de aceptar por el público, (Ningli, *et al.* 2017).



Ali, et al. (2019), hacen referencia que en EE.UU. descubren que la piña es un excelente agente terapéutico para combatir a pacientes con “bocio endémico”, ya que la piña contiene “yodo”, esto después de la aplicación de 8 semanas llegando a excelentes resultados ya mencionados.

Sun (2019) afirma que la piña junto al plátano y mangos es la tercera fruta tropical más importante en el mundo, así mismo han encontrado que las hojas de piña contienen “fibra “y “polvo blanco que esta adherido a la hoja”, este último tiene la capacidad de matar y/o inhibir bacterias e eliminar olores desagradables.

Leao, et al. (2010) mencionan que han desarrollado fibras de nanocelulosa a partir de troncos y hoja de piña y plátano para fabricar autos del futuro (salpicaderos y parachoques) ya que serán 100% ecológicas, es más se reducirá el gasto de combustible ya que los coches pesaran menos por si fuera poco las fibras resisten más al calor, al agua y al oxígeno 3-4 veces más resistentes al kevlar.

Por su importancia social, industrial, farmacéutica y la relación que tiene con la biotecnología (Joy 2010) menciona que, la infrutescencia de la piña contiene en 100 gramos de la misma, fósforo 11mg, calcio 16mg, hierro 0.28, fibra 1.4mg, carbohidratos 13.7mg, vitamina C 24 mg, agua soluble antioxidante, potasio, cobre, también es fuente de vitamina (B1 1.07mg), (B2 0.03mg), (B3 0.48 mg) (B6 0.11mg) y un exquisito contenido de “bromelina”, estas propiedades se aprovechan para ablandar la carne ,por otro lado para combatir las enfermedades de sinusitis aguda, dolor garganta, artritis, es antiinflamatorio, cura úlceras diabéticas, para

recuperar lesiones de cirugías, trata angina, bronquitis, arteriosclerosis, anemia, excelente virador de alzhéimer, combate tristeza esto consumiéndose en infrutescencia fresca u otras presentaciones.

Decheco (2019) menciona que, ha obtenido etanol a partir de la bio transformación de cascara de piña a partir de la variedad MD-2 con 23° grados Brix que representa 67% de alcohol a las 120 horas, realizado en la universidad nacional Federico Villarreal lima –Perú.

2.2.21.2. Valor nutricional

La composición de nutrientes varia con geografía, la cultura, la época de cosecha pocos estudios informan esto según (USDA, 2013).

Tabla 1: Composición de nutrientes de la piña en base húmeda de 100 gr. según USDA.

Composición	Unidades	Piña cruda	Jugo de piña
Agua	Gr	86.0	87.37
Energía	Kcal	50.0	53.0
Proteína	Gr	0.54	0.36
Lípidos (grasas)	Gr	0.12	0.12
Carbohidratos	Gr	13.12	12.87
Azúcares totales	Gr	9.85	9.98
Calcio	Mg	13.0	13.0
Hierro	Mg	0.29	0.31
Fosforo	Mg	8.0	8.0
Magnesio	Mg	12.0	12.0
Sodio	Mg	1.0	2.0
Ácido ascórbico	Mg	47.8	10.0
Niacina	Mg	0.50	0.199
Vitamina B6	Mg	0.112	0.100
Riboflavin	Mg	0.032	0.021
Tiamina	Mg	0.079	0.055
Vitamina AUI		58.0	5.0
Vitamina E(ATE)	Mg	0.02	0.0

FUENTE: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (USDA, 2013).



2.2.22. Instituciones que estudian biotecnología en cultivo In vitro

Laboratorio de biotecnología Universidad Nacional Agraria de Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Universidad Nacional Federico Villarreal, Universidad Nacional de Cajamarca, Universidad Nacional Del Altiplano Puno, estas son las instituciones que estudian la piña en cultivo in vitro y otros.

2.3. MARCO CONCEPTUAL

2.3.1. Hormona

Son señales químicas que facilitan la comunicación entre células y la coordinación entre células puede biosintetizarse en cualquier órgano de la planta, es una característica de las plantas y los animales hormona deriva del latín que significa excitar, (R.A 2017).

2.3.2. Embriogénesis

Proceso de iniciación y desarrollo del embrión dicho de otro modo es la formación a partir de un embrión (semilla botánica), célula somática, célula meristemática esto, (Billard, Bartololini y lallana 1995).

2.3.3. Organogénesis

Es la evolución de células disociadas de estructuras que muestran formas naturales de órganos. Dicho de otro modo, es la formación a partir de un órgano de planta ya sea primordio de yema, flores, hojas o en últimos casos de una célula estas vías se le llama directas, indirecta a partir de callo, (Billard, Bartololini y lallana1995).



2.3.4. Callo

Son un grupo de células con alta división que han perdido el control de diferenciación celular, a partir de estos se pueden formar brotes o embriones somáticos esto se logra solo con la adición de auxinas y cito quininas, (Billard, Bartololini y lallana 1995).

2.3.5. Fenolización u oxidación

Ocurre cuando se realiza un corte o un daño físico ejemplo corte de un ex plante, mordiscón de una manzana etc. este inmediato libera enzimas para proteger contra hongos y bacterias entonces la “liberación de iones en forma de energía y las células sufren un proceso de combustión por medio del cual intercambia CO₂ por oxígeno” (Azofeifa 2009).

2.3.6. Cultivar

Es una forma de una especie obtenida artificialmente obtenida por mano del hombre y mantenida en cultivo con caracteres definidos en el término vulgar es conocido como variedad o puede usarse como sinónimo de raza, (Trofani, *et al.* 2017 y UNLPam, 2017).

2.3.7. Toti potencia

Es la potencia celular máxima, capacidad de dar origen a una planta (Bernard 2004).

2.3.8. Variedad

Es un conjunto de individuos con caracteres definidas o hereditarias notables esto según, (Trofani *et al.* 2017 y UNLPam 2017).



2.3.9. Clon

Conjunto de individuos originados por vía agamía de dos especies y se obtienen por multiplicación vegetativa ,estaca, rizoma, injerto, bulbo, tubérculo, etc (Trofani *et al.* 2017 y UNLPam 2017).

2.3.10. Ex plante

Tejido obtenido de su sitio original y transferido aun medio artificial, es extraer un segmento de cualquier órgano de la planta, aun medio nutritivo en condiciones asépticas a un frasco o tubo de ensayo de vidrio, (Billard, Bartololini y lallana 1995).

2.3.11. Murachige & scook (MS)

Es un medio artificial que se asemeja a un suelo, para cultivo in vitro de plantas en laboratorio, es un sustrato de laboratorio de uso universal, que contiene elementos macro y micro nutriente, dependiendo del propósito a esta se adiciona hormonas de crecimiento por otro lado existen otros medios de cultivo y esto son knudson, White, gamberg, kas y michayluk, (Murashige y Scook 1960).

2.3.12. Protocolo.

Conjunto de técnicas basados en normas y medidas representativos que nos permite examinar nuestros procesos (A.A.M 2018).

2.3.13. Asepsia.

Es la desinfección, proviene de voces griegas “a” que significa falta o ausencia, “sepsis” que significa infección o contaminación, entonces es la maniobra que tienden a evitar la contaminación o infestación de microorganismos a instrumentos, equipos de laboratorio o instrumentos médicos y farmacéuticos.



2.3.14. Esterilización.

Es un procedimiento para destruir gérmenes que posteriormente impiden su desarrollo y evitar la contaminación, es el proceso de eliminación de toda forma microbiana, así pues existen 2 métodos a) químico (gases: formol, oxidó de etileno y liquido: xilenol, etanol) físico (calor: flameado, estufa) húmedo (ebullición, vapor de agua aquí está autoclave, radiación ultravioleta, (A.A.M, 2018).

2.3.15. Autoclave.

Es un esterilizador de presión, equipo metálico de paredes gruesas con cierre hermético que permite trabajar con vapor de agua sometiendo a 121°C durante 15-20 minutos a altas temperaturas, que sirve para esterilizar material médico o de laboratorio inactivando a todos los virus y bacterias.

2.3.16. Cámara de flujo laminar.

Se llama así aun equipo de esterilización con rayos ultravioleta que permite una zona estéril y segura para cualquier aplicación científica o clínica y cuenta con espacios libres de bacterias, virus y microorganismos que puedan contaminar el espacio de trabajo.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO

El trabajo de investigación, se realizó en la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Altiplano-Puno.

En el laboratorio de pastos y forrajes de la escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, que está ubicado geopolíticamente a 4.03 km del centro de la ciudad, con las siguientes características.

a) UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Esto para el mega laboratorio UNA-PUNO.

- Latitud sur :15°49'23.53"
- Longitud oeste:70°01'10.66"
- Altitud :3826 msnm.
- Clima : Frio a templado y relativamente seco.

b) UBICACIÓN GEOGRAFICA

Para el laboratorio de pastos y forrajes del F.C.A. y EPIA.

- Latitud sur :15°49'21.98"
- Longitud oeste :70°01'09"
- Altitud :3826 msnm.
- Clima : Frio a templado y relativamente seco

c) UBICACIÓN GEOPOLITICA

- Lugar : Escuela profesional de ingeniería agronómica

- Distrito : Puno
- Provincia : Puno
- Departamento : Puno
- País : Perú

d) UBICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

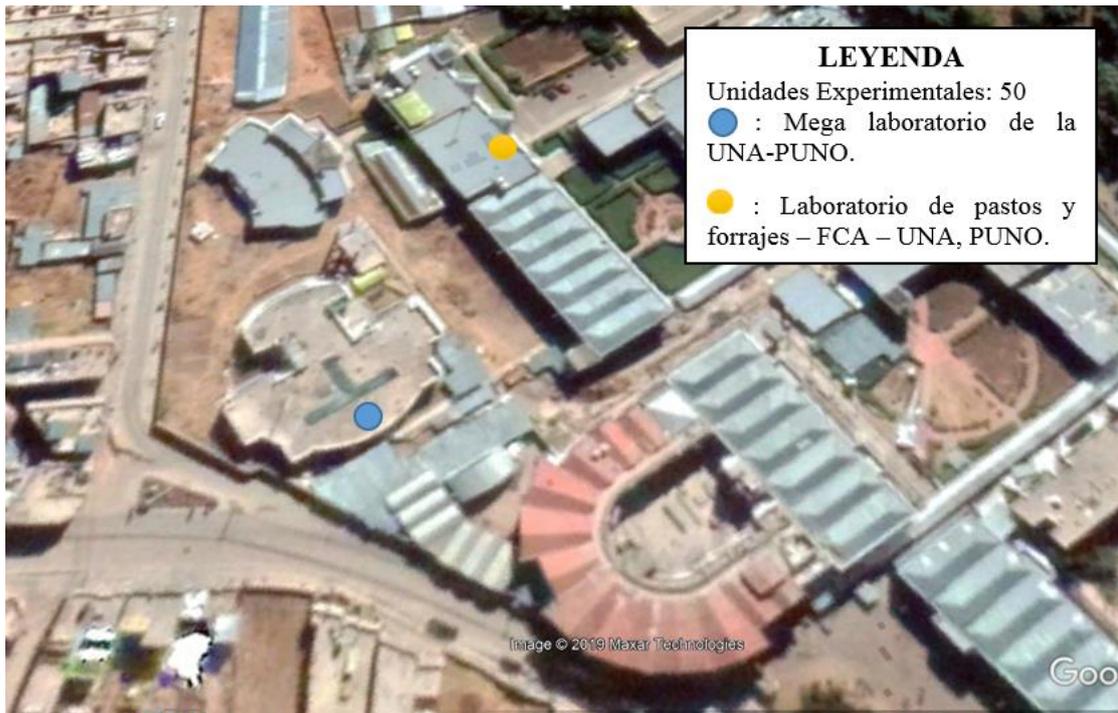


FIGURA 2: Ubicación del estudio experimental, Puno-Perú.

3.2. PERIODO DE DURACIÓN DEL ESTUDIO

El trabajo de investigación se realizó, durante los años 2018 a 2019 con fecha de inicio 30/04/2018 y la fecha término fue el 15/09/2019.

3.2.1. Características del experimento

Durante el experimento se utilizó 50 frascos para las dos variedades, con 3 ex plantes por frasco para regenerar los meristemos de la corona de piña, 10 placas Petri para inducción de germinación semillas de interés botánico de las variedades SAM y MD-2 de piña.

3.3. PROCEDENCIA DEL MATERIAL UTILIZADO

El material utilizado proviene del Centro Experimental de la Región Junín de propiedad de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima-Perú, las variedades que se utilizaron son var. MD-2 y var. SAM, las infrutescencias fueron tiernos y maduros para obtener los primordios de la yema y coleccionar semillas.



FIGURA 3: Variedades de piña MD-2 y SAM, Puno-Perú.

3.4. TRATAMIENTOS.

RC	T1	T2	T3	T4	T5
ANA	0.7mg	0.6mg	0.5mg	1mg	-
BAP	2.4mg	2.3mg	2.2mg	2mg	-
IBA	-	2mg	1mg	2mg	-
KIN	-	1.8mg	-	2mg	-



B9	-	9mg	8mg	10mg	-
Adn.	2mg	4mg	6mg	2mg	-

(MS.1.1gr, Agar 1.5gr, Sacarosa 30gr, Myoinositol 0.05gr).

3.5. MATERIALES DE LABORATORIO QUE SE UTILIZARON.

Material de vidrio plástico

- Placas Petry
- Erlenmeyer de 125 y 250 ml
- Frascos de vidrio 100 unidades
- Vasos de precipitado
- Pipeta 0, 5, 1,5 y10ml
- Probeta 2L
- Tubos de ensayo de varias medidas

Equipos

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Destilador
- Estufa
- Microondas
- Potenciómetro
- Refrigerador
- Mechero alcohol
- Pinzas

Materiales Líquidos

- NaCLO al 4%
- Agua destilada
- Alcohol 70°
- NaOH
- HCL
- Agua potable
- Azúcar

Reguladores, Medio y Vitamina

- ANA
- BAP
- IBA
- B9
- Adn
- Murashige & skoog
- Detergente
- Benlate

Material de limpieza

- Jabón carbólico
- Bandejas, Valdés escoba.



- Rejillas
- Platos vinílico
- Magentas
- Bandejas
- Algodón
- Cocinilla eléctrica
- NaClO
- Escobillas de diferentes dimensiones

3.5.1. Medio cultivo reguladores de crecimiento.

El medio estuvo adicionado con los siguientes reguladores de crecimiento.

Tabla 2: Medio de crecimiento para cultivo in vitro.

Murashige & Skoog	MS. sustrato de macro y micro nutrientes
Ácido Naftalenocético	ANA
Benzil Amino Purina	BAP
Ácido Indol-3-Butírico	IBA
Ácido Fólico	B9 también conocido como vitamina B12
Kenetina	KIN
Adenina	Adn

3.6. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO.

La población es de 50 frascos, para el segundo objetivo son los mismos frascos, para el tercer objetivo, 10 placas Petri para las dos variedades con 100 semillas empleadas.



3.7. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN.

Por los datos y evaluaciones obtenidos el trabajo es considerado tipo experimental y de nivel experimental.

3.7.1. Factor en estudio

Los factores en estudio son los reguladores de crecimiento siendo los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 como muestra las tablas 54, 55, 56, 57, 58 y las dos variedades de SAM y MD-2. Así mismo las variables de estudio están en la tabla 3.

3.8. DISEÑO ESTADÍSTICO EXPERIMENTAL.

El trabajo de investigación se realizó bajo el diseño completamente al azar (DCA), en un arreglo factorial de $5 \times 2 \times 5$ con 5 tratamientos, 2 variedades y 5 repeticiones, haciendo un total de 50 unidades experimentales, para determinar significancia se utilizó la prueba de Tukey de $\alpha=0.05$. El modelo aditivo lineal del diseño experimental fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = M + T_i + V_j + (VT)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es una observación en el i -ésimo tratamiento de la j -ésima variedad en la k -ésima repetición

M = Medida verdadera de la variable de respuesta

T_i = Es el efecto del i -ésimo tratamiento

V_j = Es el efecto de la j -ésima variedad



$(VT)_{ij}$ =Es el efecto de la Interacción del i -ésimo tratamiento con la j -ésima variedad.

E_{ijk} = Efecto de error experimental.

Donde: $i=1,2...5$ tratamiento

$j=1,2...2$ variedades

$k=1,2,3...5$ repeticiones

3.6. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO.

La población es de 50 frascos con 3 ex plantas por frasco, para el segundo objetivo se evaluaron los mismos frascos, para el tercer objetivo 10 placas Petri y 100 semillas.

3.9. PROCEDIMIENTO DEL EXPERIMENTO EN LABORATORIO

3.9.1. Metodología de etapa de laboratorio

- a) Lavado de frascos, tubos, placas Petri, el procedimiento se realizó usando detergente y enjuagues con abundante agua.
- b) Secado de materiales, los materiales se secaron 3 a 4 horas en una mesa de laboratorio como se muestra en la imagen.



FIGURA 4: Secado de frascos de vidrio.

c) Llevar a autoclave los materiales inorgánicos después de lavar, se realiza la esterilización por primera vez los frascos y materiales a utilizar para cultivo In-vitro a 121°C y 1.6 kg/cm y 2 libras de presión atmosférica realizar los enjuagues con agua destilada.

d) Pesado de reguladores de crecimiento. MS y Agar, Este procedimiento comprende en pesar todos los reguladores de crecimiento, MS, agar, sacarosa y Myoinositol como muestra la tabla, 53, 54,55, 56, 57, 58, la figura 4.

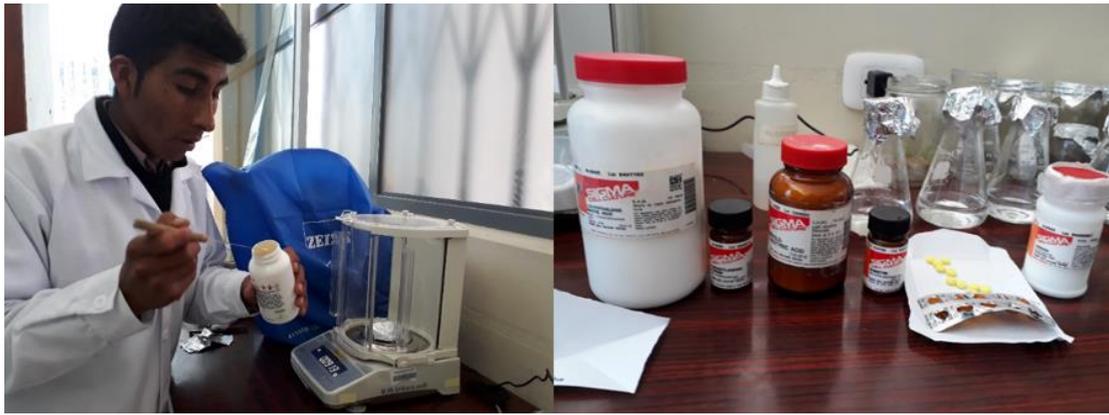


FIGURA 5: Pesado de reguladores de crecimiento, M.S, sacarosa y agar, Puno-Perú.

e) Pre preparación de stock específico de reguladores de crecimiento, la solución se prepara para cada tratamiento adicionando agua destilada y los reguladores de crecimiento, vitaminas como muestra la figura 5.



FIGURA 6: Preparación de pre-stock y almacenado de reguladores de crecimiento, Puno-Perú.

f) Preparación de medio de cultivo, comprende preparar 250 ml de medio cultivo, en vaso precipitado, se debe adicionar 200ml de agua destilada a este mismo agregar 1.1 gr de MS el resto es pre-stock de reguladores de crecimiento.

h) Medición y ajuste del pH a 5.7, para bajar el pH de la solución se utiliza el ácido clorhídrico concentrado 8.6 ml HCL en 91.4 ml de agua destilada, para subir el pH se utiliza 5.6gr, NaOH hidróxido de sodio, el resto se completa con 100ml de agua destilada, el procedimiento se realiza con peachimetro como se muestra en la figura 6.



FIGURA 7: Ajuste de pH con HCL y NaOH.

- i)** Adicionar Agar y Sacarosa, se debe adicionar azúcar 30 gr/L y agar 1.5 gr.
- j)** Disolución del medio cultivo, disolver el medio de cultivo en una coccinilla, en una temperatura de 30°C durante 5 minutos hasta que el medio de cultivo sea homogéneo, tal como muestra en la figura 7.

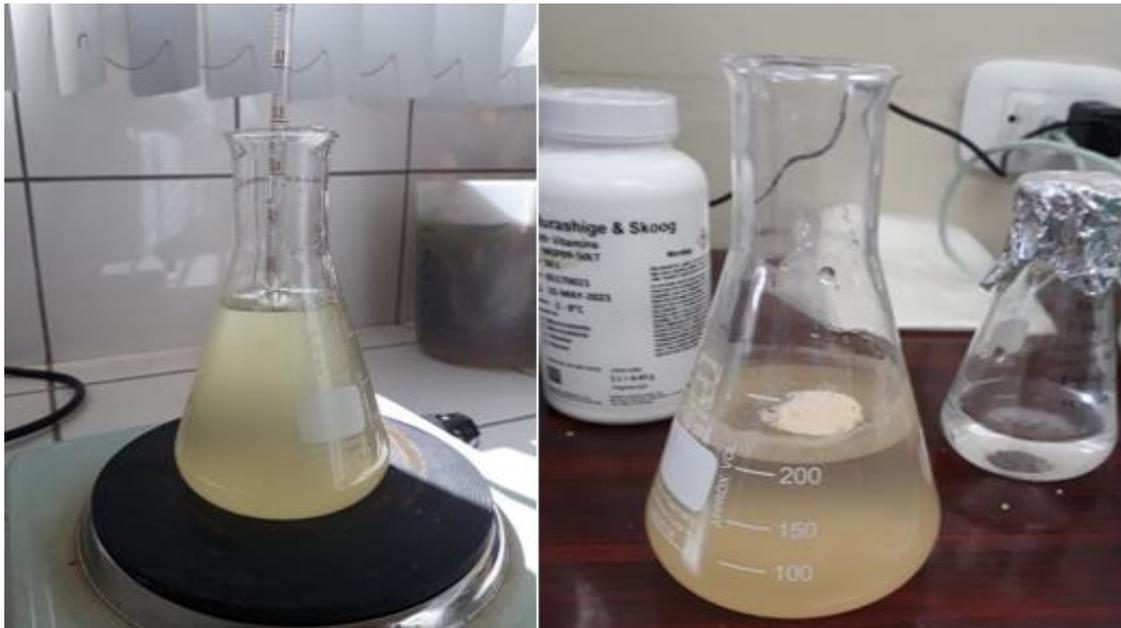


FIGURA 8: Preparación del medio de cultivo, Puno-Perú.

k) Distribución del medio cultivo, repartir el medio de cultivo de 250 ml en 10 frascos por tratamiento hasta completar los cinco tratamientos de la tabla 53, 54, 55, 56, 57 y 58 respectivamente.

l) Desinfección de los medios de cultivos y materiales de laboratorio, los medios de cultivo preparados son esterilizados con los reguladores de crecimiento a 121°C y 1.6 kg/cm^2 y 15 libras de presión atmosférica durante 20 minutos, luego debe sellar con stripfil como muestra la figura 8.



FIGURA 9: Desinfectando los medios de cultivo, Puno-Perú.

m) Retirar los frascos con medio de cultivo y almacenar a 4C° hasta su utilización, realizar el almacenamiento y esperar de 5 a 7 días en sala de almacenamiento de medios de cultivo como muestra la figura 9.

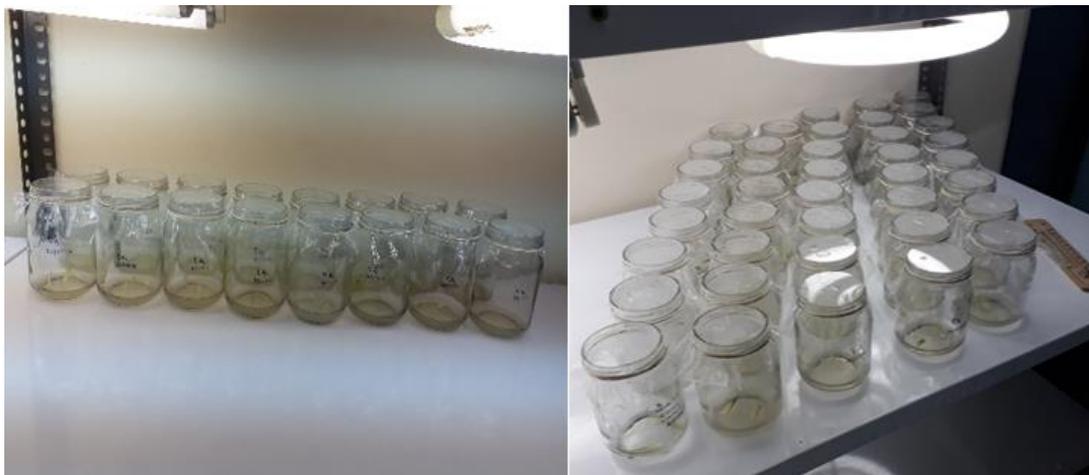


FIGURA 10: Almacenado de frascos con medio de cultivo, Puno-Perú.

3.9.2. Metodología de desinfección e introducción del cultivo in vitro

a) Preparación de la “yema apical del raquis floral de la infrutescencia” de piña.

Una vez retirado la corona de la infrutescencia de piña, deshojar las hojas hasta localizar los primordios de la zona del tejido meristemático de la “yema apical

meristemática” para luego desinfectar con hipoclorito, así como se muestra en la figura 10.



FIGURA 11: Preparando la “yema apical del raquis floral de la infrutescencia” para la desinfección, Puno-Perú.

b) Calculo para los elementos desinfectantes

Cálculos para el protocolo de desinfección.

$$\text{Formula } V1 = \frac{V2 * C1 \text{ NaClO}}{4\% \text{ NaClO}}$$

V1=Volumen Requerido de NaClO

V2=agua destilada

C1=Concentración de desinfectante requerido (NaClO)

NaClO 4%=Hipoclorito de sodio(Etiqueta)

a) Primera etapa desinfección fuera de la cámara de flujo laminar

$$V1 = \frac{100 * 2.5\%}{4\%} = 62.5 \text{ ml de NaClO en 100 ml de agua destilada}$$

$$V1 = \frac{100 * 1.5\%}{4\%} = 37.5 \text{ ml NaClO en 100 ml de agua destilada}$$

b) Segunda etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.

$$V1 = \frac{100 * 0.9\%}{4\%} = 22.5 \text{ ml de NaClO en 100 ml de agua destilada}$$

$$V1 = \frac{100 * 0.5\%}{4\%} = 12.5 \text{ ml NaClO en 100 ml de agua destilada}$$

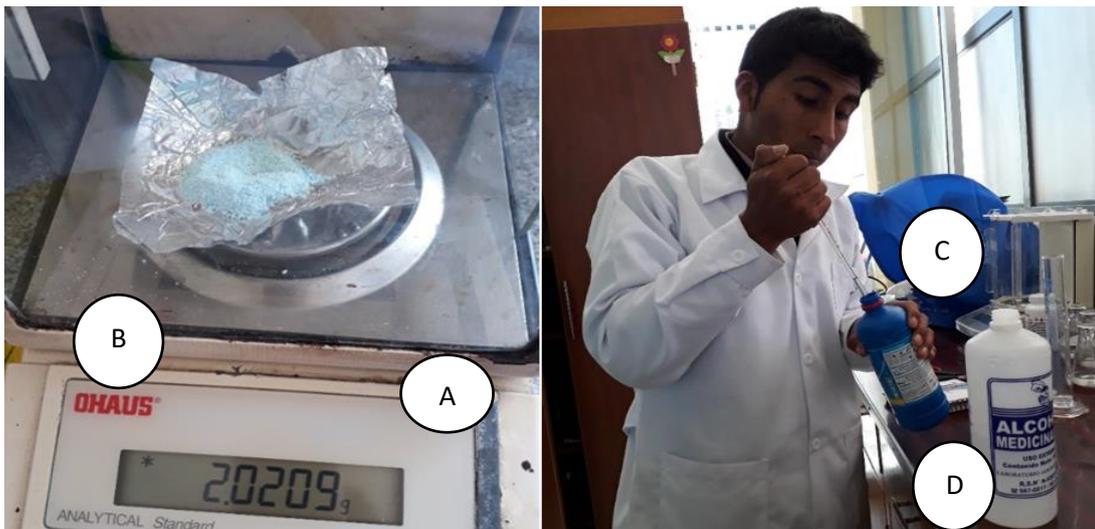


Figura 12: Pesando y midiendo el material desinfectante, Puno-Perú.

c) Preparación de materiales desinfectantes

Se adiciono el detergente de 2gr/L y el benlate de 0.50mg/L en 1 de los 4 frascos de vidrio de 100 ml con agua potable para lavar el mechón, luego se enjuago en los 3 frascos restantes con agua potable, en el siguiente paso se realizará el protocolo 1 y 2.

-Protocolo 1.

Primera etapa de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar siendo la dosis de 2.5% y 1.5% de NaClO, durante 5 minutos luego de la inmersión fueron lavados y enjuagados con agua estéril, tal como se muestra en la Figura 12a.

-Protocolo 2.

Segunda etapa de desinfección dentro de la cámara flujo laminar siendo la dosis de 0.9% y 0.5% de NaClO durante 2 minutos luego, enjuagados con agua estéril, tal como se muestra en la (Figura 12).



FIGURA 13: A) Desinfección de yema de la infrutescencia fuera de la cámara de flujo laminar.

B) Desinfección del mechón dentro de la cámara de flujo laminar.

e) Preparación de cámara de flujo laminar para la introducción de los meristemas de la yema apical del raquis floral de la infrutescencia de piña.

Se limpió con algodón y NaClO al 4% toda la cámara de flujo laminar luego se enjuago con alcohol de 70° por último se expone a rayos ultra violeta durante 5 minutos como muestra la figura 13.



FIGURA 14: Desinfectado la cámara de flujo laminar para la introducción de ex plantas.

f) Introducción de tejido meristemático de corona (ex plantas) en frascos

Se realiza el corte con bisturí y pinza, previo flameo en mechero bunsen, luego se toma el segmento cortado y se introduce al frasco con medio de cultivo gelificado en seguida se tapa con plástico stripfil con liga, como muestra en la figura 14.



FIGURA 15: Corte primordial de tejido meristemático durante la introducción, Puno-Perú.



FIGURA 16: Introduciendo tejido meristemático al frasco de vidrio, Puno-Perú.

g) Almacenamiento en sala de incubación y esperar la evaluación

Se almacena a 28°C, luz artificial iluminación a 10,000° lux, fotoperiodo de 16 horas luz, como muestra la figura 16.



FIGURA 17: Evaluación de los ex plantas, Puno-Perú.

3.9.3. Metodología para la inducción de germinación de semilla botánica de piña

a) Prueba de viabilidad

Esta prueba consiste en realizar un círculo de semillas, como se muestra en la figura 17. Luego dividir la población de semillas en cuatro partes iguales y tomar 10 semillas representativas al azar de 100 semillas, en seguida sumergir las semillas en un frasco con agua. Luego contar las semillas que flotan, para determinar la viabilidad se tiene la siguiente formula, %viabilidad =

$$\frac{N^{\circ}\text{Semilla total}-N^{\circ}\text{semillaflotantes}}{N^{\circ}\text{semillas totales}} * 100 \quad (\text{Ramírez, et al. 2018})$$



FIGURA 18: Prueba de viabilidad de semilla botánica de piña.

b) Conteo de semilla botánica de las dos variedades.

Se observa las semillas contadas de las 2 variedades, para los 2 tratamientos empleados en la presente investigación, como muestra la figura 18.

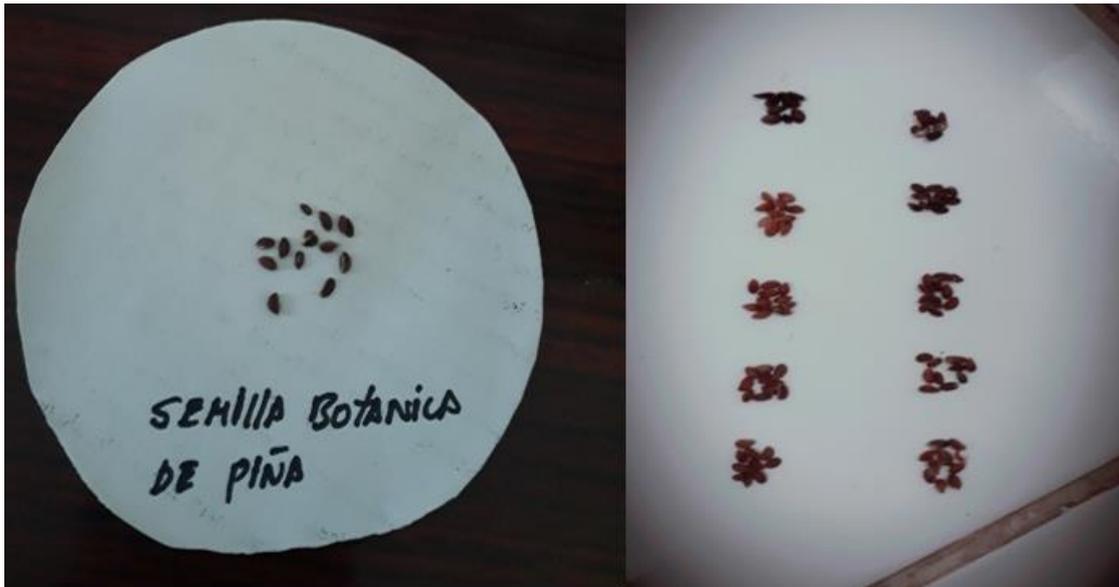


FIGURA 19: Conteo de semillas botánicas de Piña, Puno-Perú.

c) **Cantidad de semillas.** 100 semillas se han utilizado para las dos variedades.

d) **Desinfección de semilla botánica de piña.** Se utilizó los siguientes tratamientos como muestra la tabla 61, 62, 63.

e) **Introducción de las semillas botánicas en las placas Petri.** Se introdujeron las semillas previamente desinfectados con los dos tratamientos como muestra la figura 19.



FIGURA 20: Semillas introducidas para inducción de germinación, Puno-Perú.

f) **Almacenar, encender y programar equipo germinador.** Una vez introducido a la placa Petri las semillas se coloca a 28 °C la semilla luego esperar hasta la evaluación, como se muestra en la figura 20.



FIGURA 21: Semillas en incubación, Puno-Perú.

3.10. VARIABLES EN ESTUDIO

Tabla 3 : Variables utilizadas en el estudio experimental.

Variable dependiente	Variable Independiente	Variable Interviniente
Altura de brote ex plante (ABE)	Var. zamba	Dosis de reguladores de Crecimiento y vitamina
Diámetro de brote ex plante (DBE)	Var. MD-2	Protocolo de Desinfección.
Longitud brote raíz explante (LBRE)		Humedad
N° contaminación explante (NEC)		Temperatura
N° viabilidad explante (NEV)		Intensidad de luz
N° oxidación explante (NEO)		
N° de semillas germinadas (SG)		

FUENTE: Elaboración propia, Puno-Perú.



3.11. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En la presente investigación los datos se registraron en un cuaderno de registro, luego se realizó el análisis varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ y 0.01 de probabilidad de error. También se realizó a comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ de probabilidad de error, la técnica utilizada fue el análisis con estadística experimental. El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0, además el uso de programas Microsoft office Excel automatizada y computarizada.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN MEDIO CULTIVO EN LAS DOS VARIEDADES MD-2 Y SAM.

4.1.1. Altura de brote de ex plante (ABE).

El análisis de varianza para altura de brote ex plante se muestra en la (tabla 4.), la fuente de variabilidad para las variedades de Samba y Golden, muestra que hubo diferencia estadística altamente significativa, lo que indica que entre variedades tuvieron distintas respuestas al Fito regulador en (ABE), al evaluar los tratamientos hubo y diferencia estadística altamente significativa, lo que indica el efecto de los tratamientos fueron diferentes, la interacción de variedades y tratamiento se observó diferencia estadística significativa, lo cual nos indica que la interacción variedad y tratamiento no actúan independientemente, el coeficiente de variabilidad (CV) es igual a 1.89% (Montgoumeri 2012 y Steel, Torrie 1985).

Tabla 4: ANOVA para altura de brote de ex plante (ABE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft		SIG.
					0.05	0.01	
VAR	1	12.300	12.300	6150.40	4.08	7.31	**
TRAT	4	0.533	0.133	66.65	2.61	3.83	**
VAR*TRAT	4	0.029	0.007	3.65	2.61	3.83	*
ERROR	40	0.080	0.002				
TOTAL	49	12.943					
		CV=1.89	\bar{X} =2.35				

Tabla 5: Prueba de Tukey (alfa=0.05) para altura de brote de ex plante, (ABE), según la variedad.

Orden de merito	Variedad	Promedio	N° Ex plantas	SIG. ≤ 0.05
1	MD-2	2.85	25	a
2	SAM	1.86	25	b

Letras diferentes indican diferencia significativa (p=0.05).

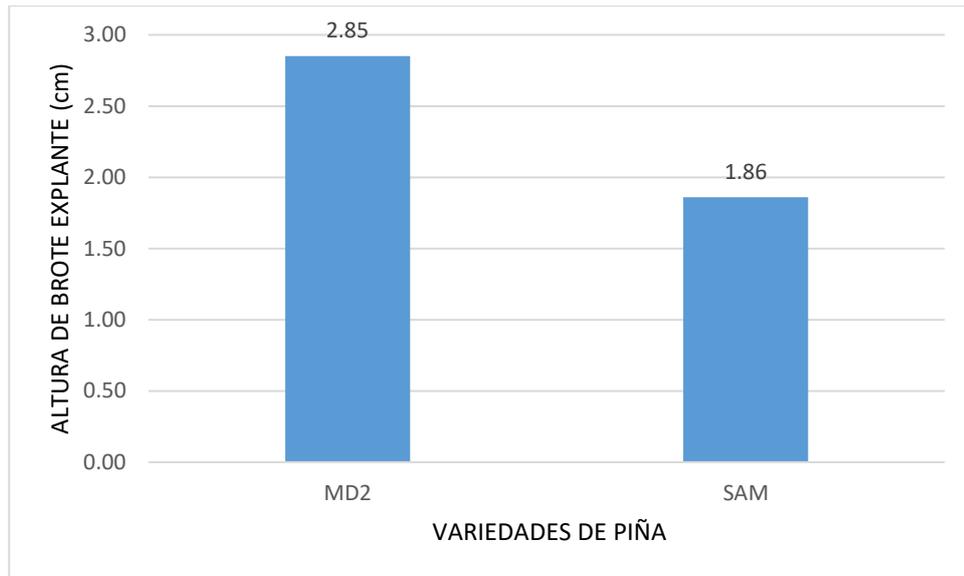


FIGURA 22: Prueba Tukey para variedad de piña, Puno-Perú.

Las variedades evaluadas en altura de brote ex plante, mayor (ABE) se obtiene en la Var.MD-2 de 2.85 cm con el tratamiento T2 y 1.86 cm para Var. SAM, siendo menor tamaño con el tratamiento “5” testigo y el mejor tratamiento fue el tratamiento “2” tal como se muestra en la tabla 5 y figura 22.

Tabla 6: Prueba de Tukey (alfa=0.05) para altura de brote de ex plante, (ABE), según dosis.

Orden de mérito	Tratamientos	Promedio	SIG. ≤ 0.05
1	T2	2.50	a
2	T3	2.45	a
3	T1	2.31	b
4	T4	2.30	b
5	T5	2.22	c

Letras diferentes indican diferencia significativa (p=0.05).

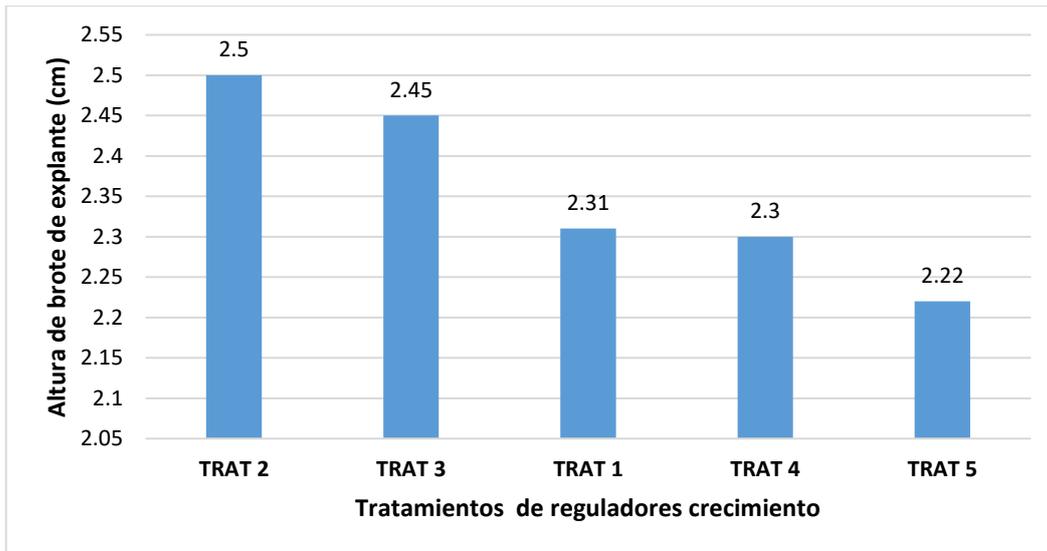


FIGURA 23: Altura de brote de ex plante (ABE) de piña, Puno-Perú.

Prueba de Tukey de cinco tratamientos, donde indican estadísticamente diferencias en los grupos de tratamientos como se muestra en la (tabla 6 y figura 23), se observa altura de brote de ex plante, en donde los T2 y T3 tuvieron mayor altura brote con 2.5 cm y 2.45 cm respectivamente; le siguen los T1 y T4 teniendo una altura de 2.31cm y 2.3 cm de promedio respectivamente, el de menor altura de brote de ex plante fue el testigo con 2.22 cm respectivamente.

Tabla 7: ANOVA de efectos simples del tratamiento dentro de la variedad para (ABE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft		SIG
					0.05	0.01	
TRAT Dentro de MD2	4	0.2024	0.0506	25.3	2.60597	3.82829	**
TRAT Dentro de SAM	4	0.36	0.09	45	2.60597	3.82829	**
ERROR	40	0.08	0.002				
TOTAL	49	12.9432					

El análisis para efectos simples del tratamiento dentro de la variedad como muestra la tabla 7. La fuente de variabilidad de la variedad MD-2 y la variedad SAM es de diferencia estadística altamente significativa, lo que nos indica que fueron distintos.

Tabla 8: ANOVA de efectos simples de la variedad dentro del tratamiento para (ABE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft		SIG
					0.05	0.01	
VAR Dentro de T1	1	2.601	2.601	1300.5	4.08	7.31	**
VAR Dentro de T2	1	2.5	2.5	1250	4.08	7.31	**
VAR Dentro de T3	1	2.025	2.025	1012.5	4.08	7.31	**
VAR Dentro de T4	1	2.5	2.5	1250	4.08	7.31	**
VAR Dentro de T5	1	2.704	2.704	1352	4.08	7.31	**
ERROR	40	0.08	0.002				
TOTAL	49	12.9432					

El análisis para efectos simples de las variedades dentro de los tratamientos como muestra la (Tabla 8). La fuente de variabilidad de VAR dentro de T1 es estadísticamente con diferencia altamente significativa, lo que nos indica que fueron distintos, VAR dentro de T2 la fuente de variabilidad es altamente significativa, lo que indica que son diferentes, VAR dentro de T3 también es altamente significativa, lo que indica que son diferentes, VAR dentro de T4 es altamente significativa, indica que son diferentes, VAR dentro de T5 es altamente significativa, indica que son diferentes.

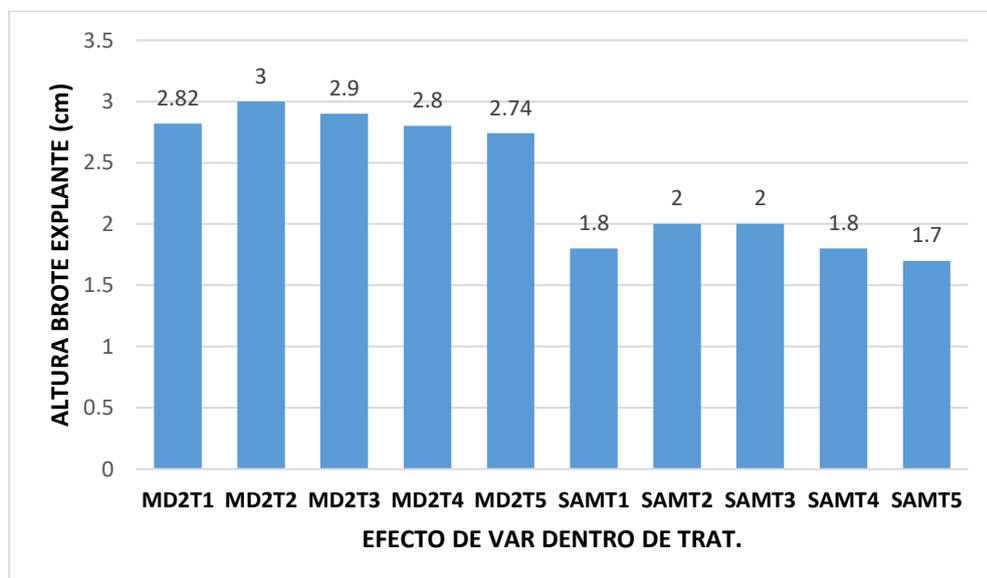


FIGURA 24: Efecto de variedad dentro de tratamiento para (ABE).

La interacción de la variedad con el tratamiento para altura de brote de ex plante con mejor resultado fue el T2 con 3 cm Var. MD-2 y Var. SAM con 2cm como se muestra



en la (Figura 24), siendo ligeramente superior reportado por (Ventura 2018) donde utilizo la dosis de (0mg ANA, 8mg KIN, 2mg BAP y IBA 2mg) obteniendo mayor promedio de brotes, la altura de brote de ex plante puede deberse a las características genotípicas sin embargo el realizo con otra Var. Zhang, *et al.* (2014), encontrando en cultivo in vitro la asimilación de nutrientes y la ritmicidad de los mismos, esta viene regulada por las oscilaciones de la actividad de los reguladores de crecimientos (fitohormonas) esto gracias al ciclo celular, pues esta marca la hora de asimilación de nutrientes, agua e intercambio gaseoso así mismo en condiciones de cultivo in vitro la planta de piña presenta fotosíntesis CAM y CO₂ lo que le convierte a esta especie con alta eficiencia de uso de agua, durante el día siendo su fotoperiodo de 16 horas luz.

Las dosis utilizadas de MS, 5% de agar ajustado a un pH de 5.7 y 1.0 mg BAP y 0.5mg de ANA en la inducción y multiplicación han proporcionado mayor número de brotes esto reportado por (Borges, Giuseppino y Lima 2009).

Con las concentraciones de reguladores de crecimientos establecidos en cultivo in vitro se obtuvo 58% de brotes viable, con dosis (MS 1.1mg, ANA 0.6mg, BAP 2.3mg, IBA 2mg, KIN 1.8mg, B12 9mg, Adn 4mg, myoinositol 0.05mg, agar 1.5mg, sacarosa 30mg), siendo superior reportado por Saucedo, *et al.* (2008), (BAP 0.5mg, AIB 1mg, y ANA 1mg/L) solo obtuvo 47% y 56% de brotes.

Mediante la embriogénesis somática y organogénesis. Sin la concentración de reguladores de crecimiento solo obtuvo 1.06 cm de altura de brote con rendimiento in vitro 1.58 plantas por ex plante reportado por (Blanco, A; Varga, T; y García 2017).

4.1.2. Diámetro de brote de ex plante (DBE)

El análisis de varianza para diámetro de brote ex plante, como se muestra en la tabla 9, la fuente de variabilidad para variedad, si hubo diferencia estadística

altamente significativa, lo cual nos indica que fueron distintos, al evaluar los tratamientos también hubo diferencia estadística altamente significativa, lo que nos indica que fueron diferentes, la interacción de variedad y tratamiento también se observa diferencia estadística significativa, lo que nos indica son diferente, el coeficiente de variabilidad (CV) es igual a 2.78%, (Montgoumeri, 2012; Steel, R., y Torrie, 1985).

Tabla 9: ANOVA para diámetro de brote de ex plante (DBE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F.t		SIG.
					0.05	0.01	
VAR	1	0.039	0.039	32.67	4.08	7.31	**
TRAT	4	0.255	0.063	53.17	2.61	3.83	**
VAR*TRAT	4	0.020	0.005	4.33	2.61	3.83	*
ERROR	40	0.048	0.048				
TOTAL	49	0.363					

CV=2.78 % \bar{X} =1.24

Tabla 10: Prueba de Tukey para variedad de diámetro de brote ex plante (DBE).

Orden de merito	Variedad	Promedio	N° Ex plantas	SIG.
1	MD2	1.272	25	a
2	SAM	1.216	25	b

Letras diferentes indican diferencia significativa (p=0.05).

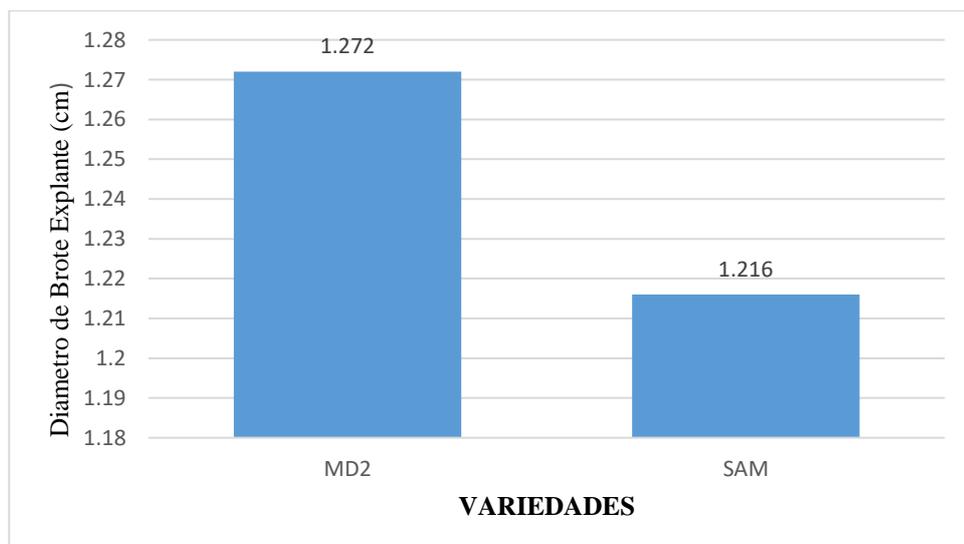


FIGURA 25: Efecto de diámetro brote ex plante (DBE) de piña, Puno-Perú.

Las variedades evaluadas en diámetro de brote ex plante, tienen un diámetro promedio que varía de 1.272 cm a 1.216 cm, siendo mejor variedad MD-2 seguido por SAM, tal como se muestra en la (tabla 10 y figura 25).

Tabla 11: Prueba de Tukey (alfa=0.05) para diámetro de brote de ex plante (DBE).

Orden de mérito	Tratamientos	Promedio	SIG. ≤ 0.05
1	2	1.35	a
2	3	1.30	b
3	1	1.21	c
4	4	1.21	c
5	5	1.15	d

Letras diferentes indican diferencia significativa (p=0.05).

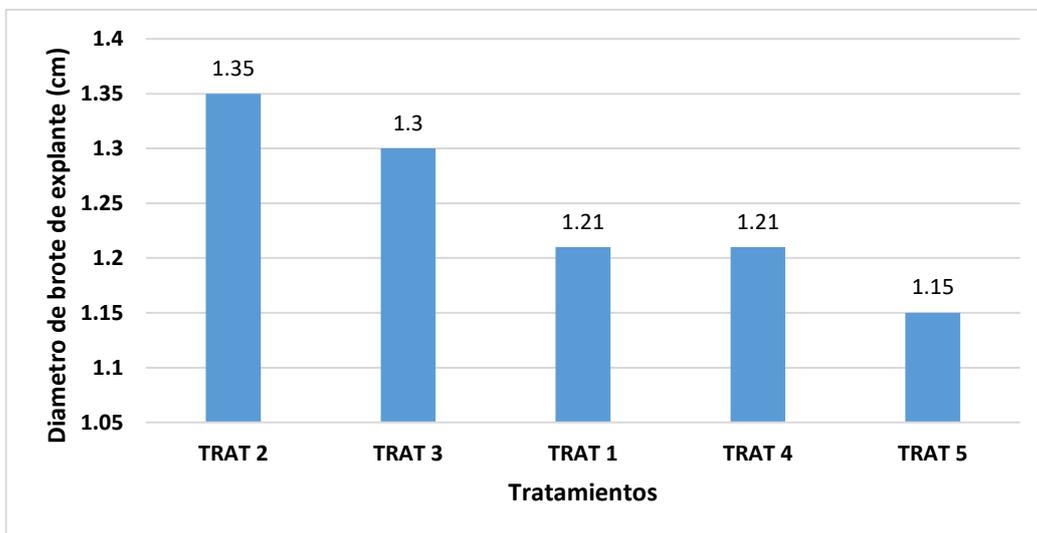


FIGURA 26: Diámetro de brote de ex plante (DBE) de piña, Puno-Perú.

En la (Tabla 11 y figura 26), se observa que el T2 posee buen desarrollo en el diámetro de brote y el de menor desarrollo diámetro fue el T5(testigo), lo que nos indica que son diferentes respectivamente.

Tabla 12: ANOVA de efectos simples del tratamiento dentro de la variedad para (DBE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft		SIG
					0.05	0.01	
TRAT dentro de MD2	4	0.1304	0.0326	27.17	2.61	3.83	**
TRAT dentro de SAM	4	0.1456	0.0364	30.33	2.61	3.83	**
ERROR	40	0.048	0.0012				
TOTAL	49	0.3632					

El análisis para efectos simples tratamiento dentro de la variedad como muestra la (Tabla 12). La fuente de variabilidad de TRAT dentro de VAR es diferencia estadística altamente significativa, lo que nos indica que fueron distintos y la fuente de variabilidad para TRAT dentro de variedad SAM también es altamente significativo, lo que indica que son diferentes.

Tabla 13: ANOVA de efectos simples de la variedad dentro del tratamiento de la variable (DBE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M	Fc	Ft		SIG
					0.05	0.01	
VAR Dentro de T1	1	0.009	0.009	7.5	4.08	7.31	**
VAR Dentro de T2	1	0.025	0.025	20.83	4.08	7.31	**
VAR Dentro de T3	1	4.81E-34	4.81E-34	0	4.08	7.31	NS
VAR Dentro de T4	1	0.001	0.001	0.83	4.08	7.31	NS
VAR Dentro de T5	1	0.025	0.025	20.83	4.08	7.31	**
ERROR	40	0.048	0.0012				
TOTAL	49	0.3632					

El análisis para efectos simples de las variedades dentro de los tratamientos como muestra la (Tabla 13). La fuente de variabilidad de VAR dentro de T1 es diferencia estadística altamente significativa, lo que nos indica que fueron distintos, VAR dentro de T2 la fuente de variabilidad es altamente significativa, lo que indica que son diferentes, VAR dentro de T3 no hubo diferencia significativa, lo que indica que no son diferentes, VAR dentro de T4 no hubo diferencia significativa, lo que indica que no son diferentes, VAR dentro de T5 es altamente significativa, indica que son diferentes.

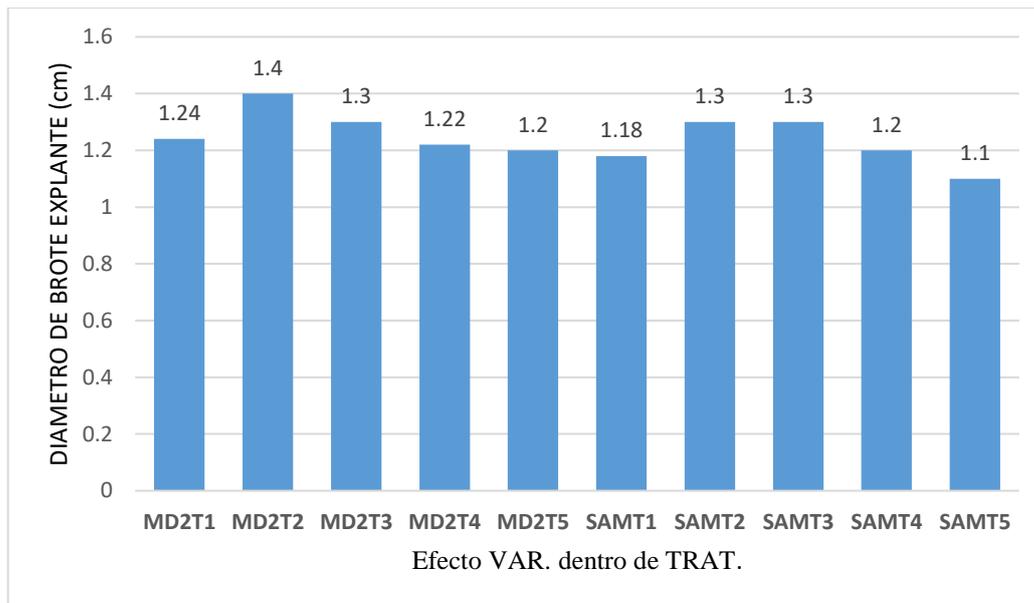


FIGURA 27: Efecto simple de variedad dentro de tratamiento de piña, Puno-Perú.

Las variedades dentro de tratamiento en diámetro de brote ex plante el mejor resultado alcanzado fue de 1.4 cm con T2 Var.MD-2 y Var. SAM con 1.3cm con tratamiento T2 y T3, tal como se muestra en la (Figura 27), es ligeramente superior reportado por (Cisneros, *et al.* 1997), por lo que ellos obtuvieron explantes de crecimiento lento, con duro callo noular y amarillo palido esto con segmentos de la base de hoja.

Sin las concentraciones de reguladores de crecimiento, no presento mejores resultados en piña ornamental a 24°C de temperatura es decir empleando la dosis de BAP 13.32 mg promovio una mejor regeneracion de explantes con nodos (Pinto *et al.* 2018).

Con las concentraciones de reguladores de crecimiento 1.5 mg de BAP y 0.5 mg/l logrando mayor cantidad de brotes determinado por (Mogollon, N; Dias, J; y Hernandez 2004).

Con las concentraciones de dosis de reguladores de crecimiento de 4mg BAP y 6mg Kninetina /L de las coronas de piña llegan obtener obtener 9-10 vitroplantas por corona es mas mencionan que las citoquininas tienen un efecto intermedio en las practicas de cultivo in vitro esto reportado por (Omokolo *et al.* 2001).

La mejor dosis de reguladores de crecimiento determinado fue (agar 0.8%,BAP 5mg a 10mg/l y ANA 4.5mg a 0.7mg/l) obteniendo 26.07% de brotes reportado por (Badou *et al.* 2017).

4.1.3. Longitud de brote raíz de ex plante (LBRE)

El análisis de varianza para la longitud de brote raíz como se muestra en la tabla 15. La fuente de variabilidad para variedad, se observa que no hubo diferencia estadística significativa, lo cual nos indica que fueron iguales, fuente de variabilidad para tratamientos se observa que hubo diferencia estadística altamente significativa ,lo que indica que son diferentes, en la interacción de variedades y tratamiento se observa que no hubo diferencia significativa, lo que nos indica que son iguales, además el coeficiente de variación (CV) es igual a 4.13% , (Montgoumeri 2012 y Steel, Torrie 1985).

Tabla 14: ANOVA para longitud de brote de raíz (LBRE).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F.t		SIG.
					0.05	0.01	
VAR	1	0.0002	0.0002	1.00	4.08	7.31	N.S.
TRAT	4	0.1128	0.0282	141.00	2.61	3.83	**.
VAR*TRAT	4	0.0008	0.0002	1.00	2.61	3.83	N.S.
ERROR	40	0.0080	0.0002				
TOTAL	49	0.1218					

CV=4.13% \bar{X} =0.34

Tabla 15: Prueba de Tukey para variedad de longitud de raíz ex plante (LBRE).

Orden de merito	Variedad	Promedio	N° Ex plantas	SIG.≤ 0.05
1	MD-2	0.34	25	A
2	SAM	0.34	25	A

Letras diferentes indican diferencia significativa (p=0.05).

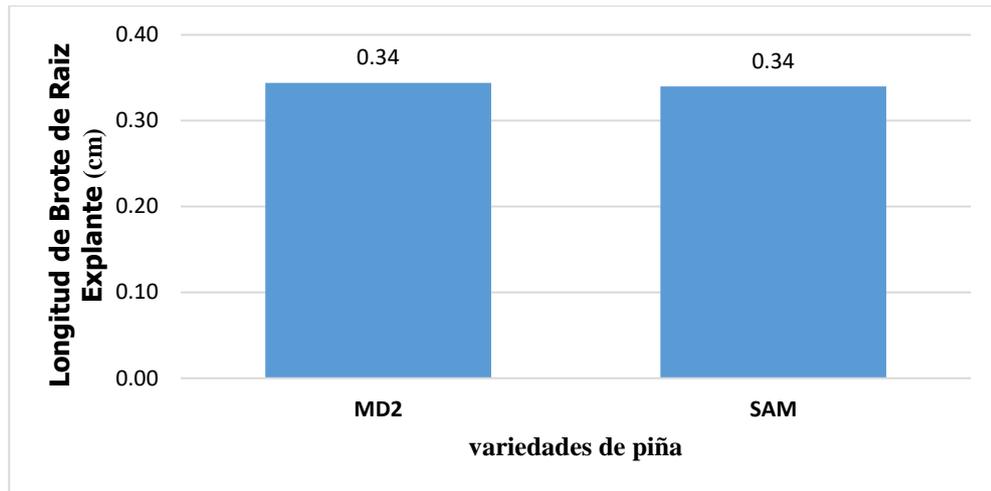


FIGURA 28: Prueba Tukey variedad de piña, (LRE), Puno-Perú.

Las variedades evaluadas en longitud de brote ex plante raíz, tienen un promedio de 0.34 cm para las dos Var.MD-2 y SAM, siendo similares, tal como se muestra en la tabla 16 y (Figura 28) para variedad no se muestra ranking debido que la asimilación de nutrientes es única para ambas variedades.

Tabla 16: Prueba de Tukey tratamiento (alfa=0.05) para longitud de brote de raíz (LRE).

Orden de mérito	Tratamientos	Promedio	SIG. ≤ 0.05
1	3	0.400000	a
2	2	0.400000	a
3	1	0.310000	b
4	4	0.300000	b
5	5	0.300000	b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p=0.05$).

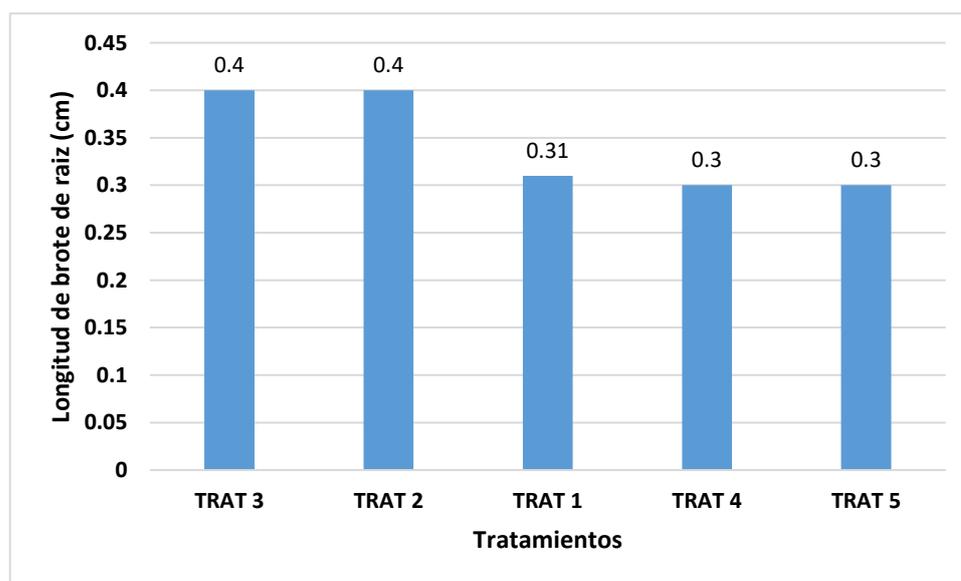


FIGURA 29: Longitud de brote de raíz (LBRE) de piña, Puno-Perú.

Se observa la prueba de Tukey en la (Tabla 16 y Figura 29), se observa que el T3 posee buen desarrollo en la longitud de brote raíz con 0.4cm y el de menor desarrollo longitud fue testigo con 0.3cm para ambas variedades, es ligeramente superior al reporte de (Pineda 2012), donde mencionan que solo encontraron rizo génesis con formación de vástagos de callo con dosis (5mg/l de ANA, 0.25mg/l de IBA).

Obtuvo mejor respuesta para el enraizamiento ex vitro sin la concentración de reguladores de crecimiento con un 93.75% en la Var. Hawaiana y 79.16% para Var. Champaca esto reportado por (Saucedo *et al.*2008).

4.2. MÉTODO DE DESINFECCIÓN EN EL CULTIVO IN VITRO DE PIÑA

4.2.1. Numero de ex plantas contaminados (NEC)

El Análisis de varianza para el número de ex plantas contaminados in vitro de dos variedades samba y MD-2 de piña como se muestra en la (tabla 17), la fuente de variabilidad para variedades , se observó diferencia estadística altamente significativa ,lo cual indica que estadísticamente son diferentes, la fuente de variabilidad en los niveles de tratamiento si hubo diferencia altamente significativa, tal es así, que la interacción estadística de variedades con tratamientos no hubo diferencia significativa, indica que estadísticamente las dosis empleadas son similares. El coeficiente de variabilidad es de 7.57%, (Montgoumeri, 2012 y Steel, Torrie 1985).

Tabla 17: Análisis de varianza para el número de ex plantas contaminados (NEC).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F.t		SIG.
					0.05	0.01	
VAR	1	6.05	6.05	121.0	4.49	8.58	**
TRAT	1	4.05	4.05	81.0	4.49	8.58	**
VAR*TRAT	1	0.05	0.05	1.0	4.49	8.58	N.S.
ERROR	16	0.80	0.05				
TOTAL	19	10.95					

CV=7.57 % \bar{X} =2.95

Tabla 18: prueba Tukey para variedades de número de ex plantas contaminados (NEC).

Orden de merito	Variedad	Promedio	<i>Sig. ≤ 0.05</i>
1	MD2	2.5	a
2	SAM	3.4	b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p=0.05$).

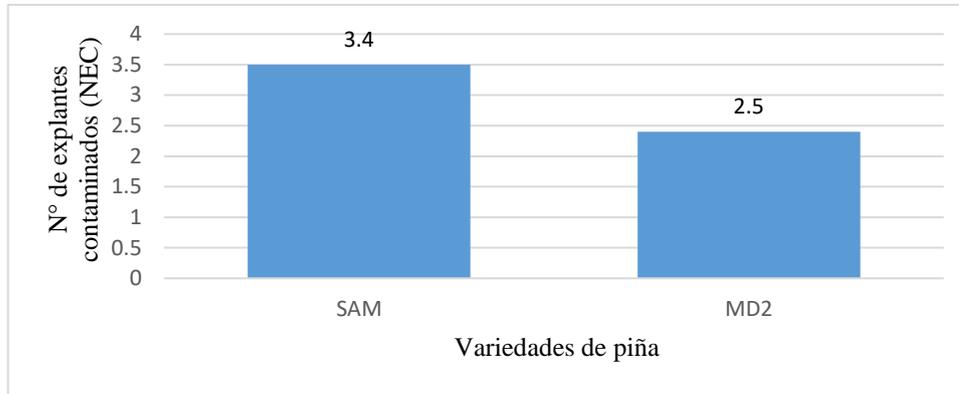


FIGURA 30: Prueba de Tukey para variedad de desinfección, variable NEC, Puno-Perú.

Es la comparación de medias de dos variedades donde las letras a y b indican estadísticamente diferencias en los tratamientos como se muestra en la (Tabla 18 y Figura 30), en donde la Var. MD-2 tuvo una contaminación de 2.5 ex plantas, le sigue la Var. SAM con 3.4 ex plantas contaminados respectivamente.

Tabla 19: Prueba de Tukey para el número de ex plantas contaminados para (NEC).

Orden de Merito	tratamiento	Promedio	<i>Sig. ≤ 0.05</i>
1	2	3.4	A
2	1	2.5	B

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

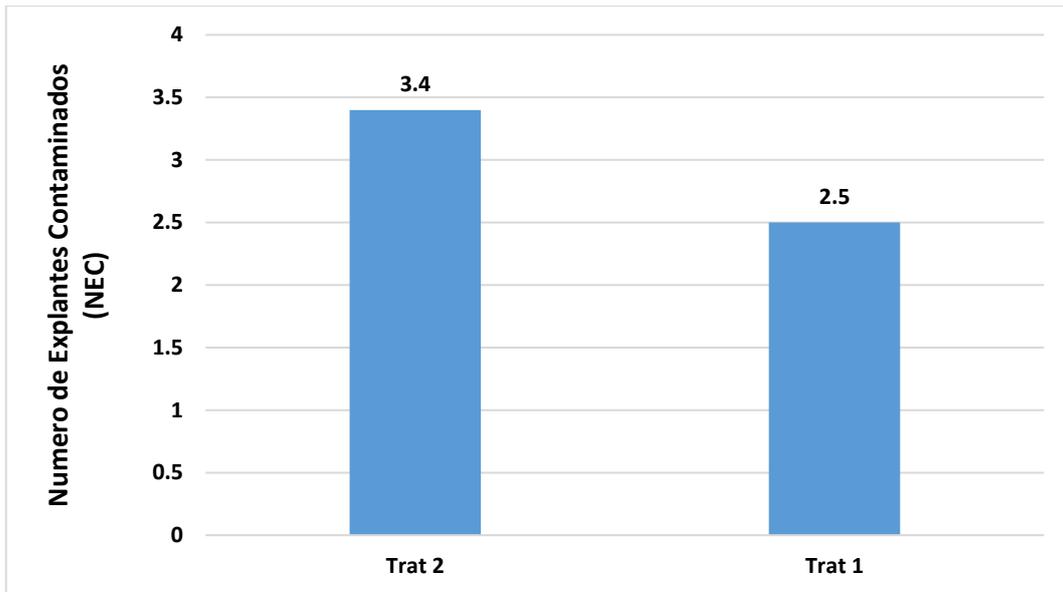


FIGURA 31: prueba de Tukey para tratamiento (dosis) desinfección, Puno-Perú.

Es la comparación de medias de 2 tratamientos donde existe diferencia estadística como se muestra en la (Tabla 19 y la Figura 31), se observa que el T2 presenta de 3.4 ex plantas y el T1 presenta 2.5 ex plantas lo que significa que a mayor concentración de NaCLO será menor la contaminación y menor concentración de NaCLO mayor la contaminación, (Llanos, 2015), debido a la concentración de dosis de 25% de NaCLO a 15min para la primera fase de desinfección y la segunda fase de desinfección con 10% de NaCLO.

La concentración de hipoclorito de sodio al 0.0003% así como otros procedimientos de asepsia proporciono mejor resultado al reporte de (Lope, *et al.* 2010).

La dosis que explosionó con éxito en los brotes al 26.07% fue con la concentración de 1.5% de NaCLO a 5 min, por otro lado, la desinfección con cloruro de mercurio obtuvo altas tasas de necrosis esto reportado por (Badou, *et al.* 2017).

4.2.2. Numero de ex plantas viables (NEV)

El Análisis de varianza para el número de ex plantas viables in vitro de las variedades samba y MD-2 , como se muestra en la (Tabla 20), se observa que la

fuelle de variabilidad en variedades si hubo diferencia estadística altamente significativa ,lo cual indica que estadísticamente son distintos, así mismo en la fuente de variabilidad de los niveles de tratamiento se observó diferencia significativa, lo cual indica que estadísticamente son distintos, para la interacción de variedades con tratamientos no se observó diferencia significativa, indica que estadísticamente las dosis empleadas actúan de la misma manera, por supuesto el coeficiente de variabilidad es de 8.77%, (Montgoumeri 2012 y Steel, Torrie 1985).

Tabla 20: Análisis de varianza para el número de ex plantas viables (NEV).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F.t	SIG.	
					0.05 0.01		
VAR	1	5.00	5.00	20.00	4.49	8.58	**
TRAT	1	5.00	5.00	20.00	4.49	8.58	**
VAR*TRAT	1	0.20	0.20	0.80	4.49	8.58	N.S.
ERROR	16	4.00					
TOTAL	19	14.20					

$CV=8.77\%$ $\bar{X}=5.70$

Tabla 21: Prueba de Tukey para variedad de numero de ex plantas contaminados (NEV).

Orden de Merito	Variedad	Promedio	Sig. ≤ 0.05
1	SAM	6.2	A
2	MD2	5.2	B

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

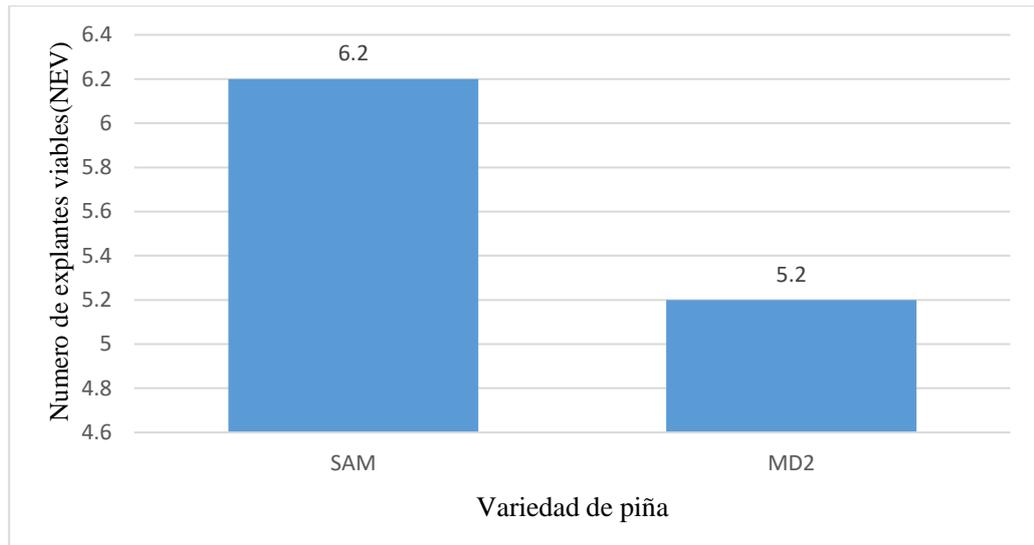


FIGURA 32: Prueba de Tukey para tratamientos desinfección, Puno-Perú.

Las variedades evaluadas para número de ex plantas viables, tiene un promedio de viabilidad de 6.2 ex plantas viables con T2 a comparación del T1 con 5.2 ex plantas viables, tal como se muestra en la (Tabla 21 y Figura 32).

Tabla 22: Prueba de Tukey para el número de ex plantas viables (NEV).

Orden de Merito	Tratamiento	Promedio	<i>Sig. ≤ 0.05</i>
1	2	6.20	a
2	1	5.20	b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

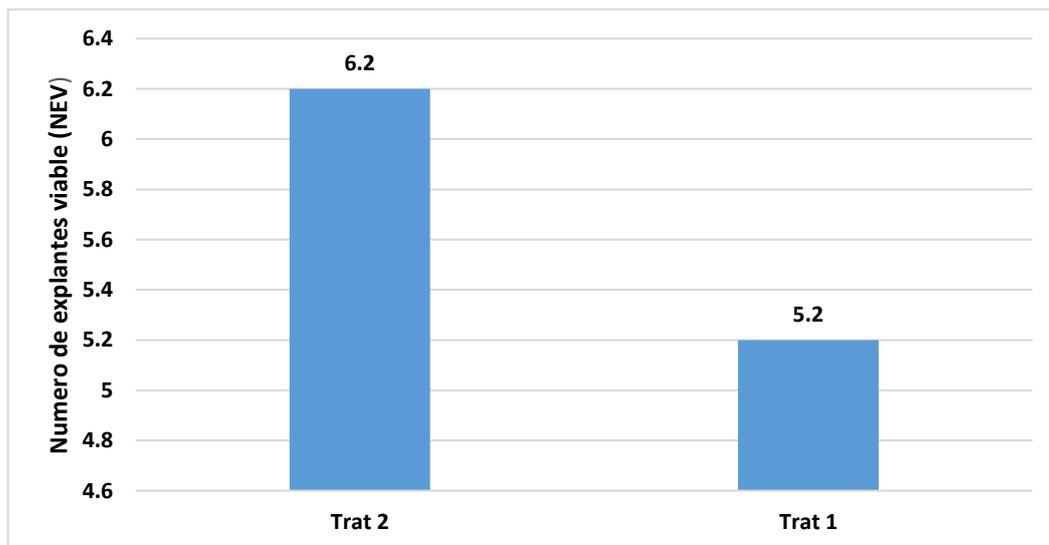


FIGURA 33: Prueba de Tukey para tratamiento desinfección, Puno-Perú.



Es la comparación de medias de 2 tratamientos donde indican que existe diferencia estadística como se muestra en la (Tabla 22 y Figura 33), se observa el T2 con alto grado de viabilidad de brote de ex planté con 6.2 ex plantas viables en las dos variedades, y el de menor grado es el T1 con 5.2 ex plantas viables, lo que significa que a menor concentración de NaCLO, benlate, alcohol mayor es la viabilidad y mayor concentración de NaCLO, benlate, alcohol, menor es la viabilidad de ex plantas obteniendo 58% de brotes viables, lo que es superior reportado por (Badou *et al.* 2017), a altas tasas de concentración de NaCLO obtuvieron solo el 26% de brotes, es más con cloruro de mercurio obtuvo necrosis, esta muerte celular ocurre debido a la inactivación de membrana celular y el citoplasma.

El protocolo de desinfección fue con picloran a 10mg/L y tidiazuron al 2mg/l siendo esta mejor dosis de desinfectante obteniendo brotes viables esto reportado por (Blanco *et al.* 2017).

4.2.3. Numero de ex plantas en oxidación (NEO)

El Análisis de varianza para el número de ex plantas en oxidación in vitro de las variedades samba y MD-2 , como se muestra en la (Tabla 23), se observa que la fuente de variabilidad en variedades , que si hubo diferencia estadística altamente significativa ,lo cual indica que estadísticamente son diferentes ,así mismo la fuente de variabilidad en los niveles de tratamiento no hubo diferencia significativa, lo que indica que son iguales, tal es así, que la interacción de variedades con tratamientos se observó que no hay diferencia significativa, lo cual indica que estadísticamente las dosis empleadas actúan independientemente , por supuesto el coeficiente de variabilidad es de 11.77%, (Montgoumeri, 2012; Steel, R., y Torrie, 1985).

Tabla 23: Análisis de varianza para el número de ex plantas oxidados (NEO).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F.t	SIG.	
					0.05	0.01	
VAR	1	2.5559	2.5559	84.02	4.49	8.53	**
TRAT	1	0.0007	0.0007	0.02	4.49	8.53	NS
VAR*TRAT	1	0.0451	0.0451	1.48	4.49	8.53	NS
ERROR	16	0.4867	0.0304				
TOTAL	19	26.55					

$CV=11.77$ $x=1.35$

Tabla 24: Prueba de Tukey para variedad y el número de ex plantas oxidados (NEO).

Orden de Merito	Variedad	Promedio	Sig. ≤ 0.05
1	SAM	1.3	a
2	MD2	1.4	b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

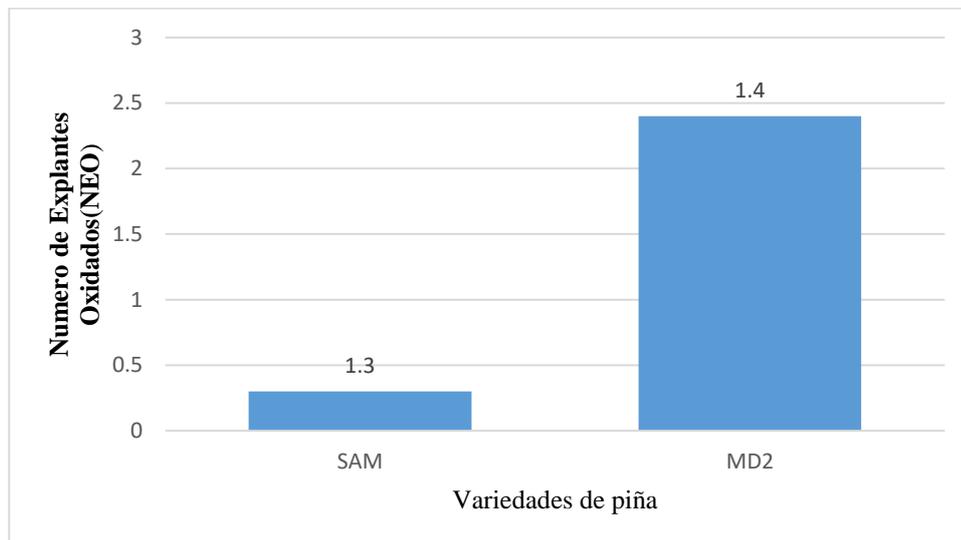


FIGURA 34: Prueba de Tukey para variedad de piña, Puno-Perú.

Las variedades evaluadas para número de ex plantas oxidados, la var. MD-2 tuvo mayor oxidación con 1.40 ex plantas oxidados respectivamente; le siguen la Var. SAM con menor oxidación con 1.30 ex plantas viables respectivamente, como se muestra en (Tabla 24 y Figura 34).

Tabla 25: Prueba de Tukey para tratamiento desinfección (NEO).

Orden de Merito	Tratamiento	Promedio	Sig. ≤ 0.05
1	T2	1.3	a
2	T1	1.4	b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

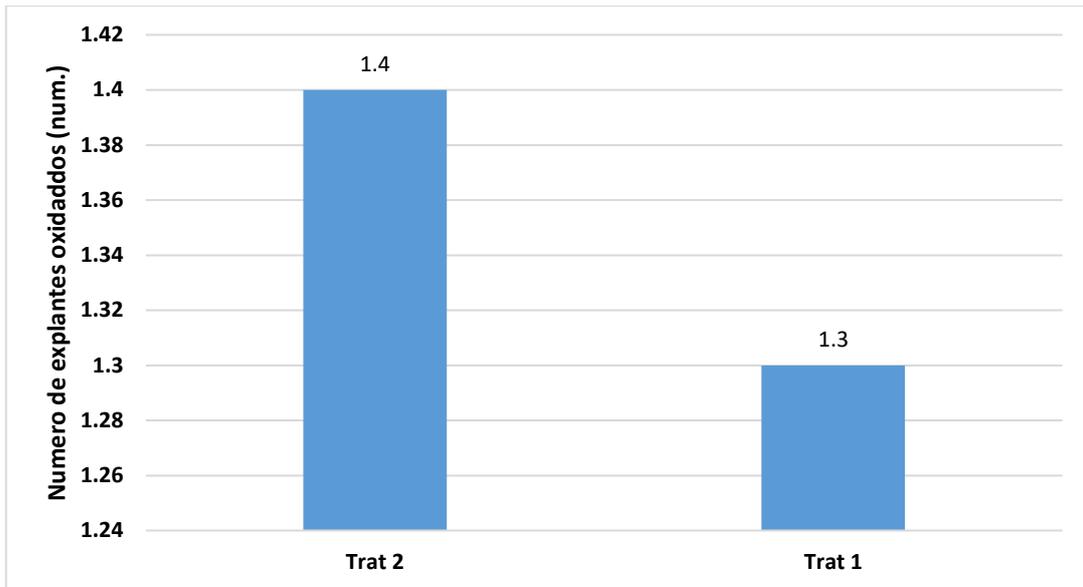


FIGURA 35: Prueba de Tukey para tratamiento (NEO), Puno-Perú.

En la (Tabla 25 y Figura 35), se observa el T2 con oxidación de brote de ex planté con 1.4 ex plantes oxidados y el T1 con 1.3 ex plantes oxidados, queda demostrado que al producir corte siempre se producirá oxidación y las células liberan enzimas en el proceso fisiológico por medio del cual los ex plantes intercambian CO₂ por oxígeno en efecto esto gracias al contenido del azúcar inicia la fermentación alcohólica a su vez por el sabor agridulce de la Var. MD-2 y Var. SAM, al tener estas características los iones cambian su estado ocasionando el oscurecimiento u oxidación.

La oxidación ocurre gracias a la presencia del oxígeno, cuando se realiza corte las células liberan enzimas para protegerse de los patógenos y bacterias entonces el poli fenol se desencadena provocando el oscurecimiento de los ex plantes esto reportado por (Azofeifa 2009).

4.3. EFECTO DE INDUCCIÓN DE GERMINACIÓN DE SEMILLA BOTÁNICA DE PIÑA

4.3.1. Numero de semilla botánica germinadas de Piña (N°SG)

Tabla 26: Prueba de porcentaje de inducción de germinación de semilla botánica de piña Variedad dentro de tratamiento.

VAR.	TRAT.	% de Semillas Germinadas	N° Semillas Germinadas
MD2	T1	0.00	0
MD2	T2	20.00	5
SAM	T1	20.00	5
SAM	T2	32.00	8

El análisis de varianza para número de germinación de semilla botánica se muestra en la (Tabla 27.), se observa la fuente de variabilidad para las variedades de Samba y Golden , que si hubo diferencia altamente significativa, lo cual nos indica que las variedades fueron diferentes, al evaluar los tratamientos también si hubo diferencia altamente significativa ,lo que nos indica que los tratamientos no fueron iguales, la interacción de variedades y tratamiento, aquí se observó que si hubo diferencia altamente significativa, lo cual nos indica que la interacción variedad y tratamiento no actúan de igual manera, además el coeficiente de variabilidad (CV) es igual a 1.0% lo que nos indica que los datos son confiables y el experimento fue conducido perfectamente, (Steel, R., y Torrie, 1985).

Tabla 27: Análisis de varianza para el numero de semillas botánicas germinadas de piña (N°SG).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F.t		SIG.
					0.05	0.01	
VAR	1	5.000	5.000	∞	4.49	8.58	**
TRAT	1	5.000	5.000	∞	4.49	8.58	**
VAR*TRAT	1	0.000	0.000	∞	4.49	8.58	**
ERROR	16	0.000	0.000				
TOTAL	19	10.000					

CV=1.0 x=1.00

Tabla 28: Prueba de Tukey para variedad de semillas germinadas.

Promedio	N° de semilla	Variedad
1.500	10	SAM
0.500	10	MD2

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

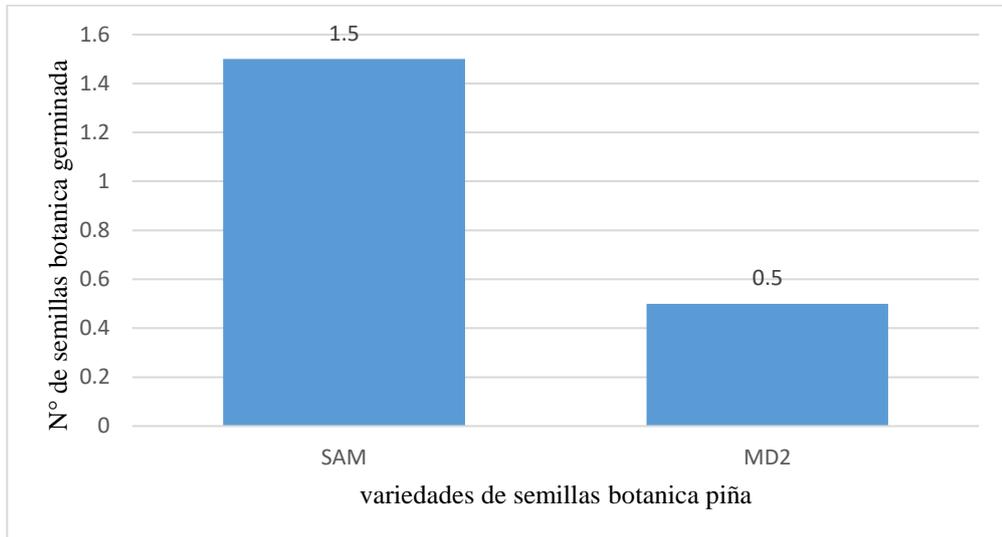


FIGURA 36: Prueba de Tukey para variedad de semillas germinadas.

Las variedades evaluadas en número de semilla germinadas de interés botánico, tienen una tasa de germinación que varían de 1.5 a 0.5 semillas germinadas promedio, la menor tasa fue la var.MD-2 la mejor tasa fue de la var. SAM tal como se muestra en la (Tabla 28 y Figura 36).

Tabla 29: Prueba de Tukey para el número de semilla botánica germinadas (N°SG).

Orden de Merito	Tratamientos	Promedio	Sig. ≤ 0.05
1	2	1.500	A
2	1	0.500	B

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

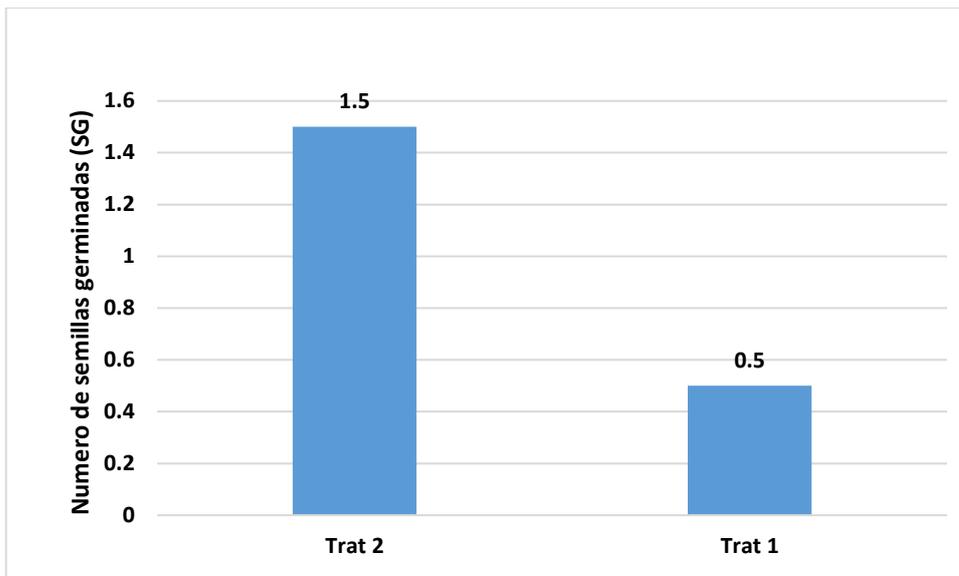


FIGURA 37: Prueba de Tukey para tratamiento de semillas germinadas.

En la (Tabla 29 y Figura 37), se observa que la prueba de Tukey con el T2 se obtuvo 1.5 semillas siendo mejor tasa de inducción de germinación de semilla botánica, el de menor tasa de germinación fue el T1 con 0.5 semillas, esto significa que es totalmente superior al reporte de (Miles 1997), trabajo con pariente silvestre de piña *Ananás sativus*, obteniendo baja tasa de germinación, con 28°C de temperatura, también es cierto que sin un buen tratamiento la germinación es nula, en tratamiento utilizo cloruro de mercurio, alcohol tiránico, ácido sulfúrico fuerte.

Por otro lado es totalmente superior al reporte de Cedeño (2019), menciona que la piña se caracteriza por ser “partenocarpico” es decir tiene semillas pero no son viables.

Es totalmente superior al reporte de (Iyer *et al.* 1978), trabajo con semilla de *Ananas comosus* L. Merr., refieren que tiene una capa resistente llamado pericarpio o testa y un endospermo duro y pedernal lo que requiere un tratamiento especial y mencionan que utilizaron el método niebla estandarizada sin embargo en este método las semillas se vuelven cloróticas debido a la constante lixiviación de nutriente, sin previo tratamiento la germinación es pobre es tanto lenta como lenta, con 28°C de temperatura para arriba si germinan, cabe aclarar a menos 24°C las semillas no germinan.



Nee (2017), mencionan que la latencia de las semillas determina el momento de la germinación, la liberación de la latencia de semilla está controlado por los reguladores crecimiento, hormonas y proteína del mismo almacenamiento de la semilla fijados e influenciados por factores ambientales durante la maduración esto ya en el momento de la cosecha, sin embargo, las relaciones estrechas de reguladores de latencia aún no se entienden completamente.

(Reinhardt *et al.* 2018), menciona que la semilla botánica de piña solo producirá si hay polinización cruzada entre variedades por tanto la piña debe propagarse por material vegetativo y se denominan material de siembra convencional.

Haroldo (2018) menciona que la semilla botánica de piña producirá solo si hay “polinización cruzada “entre variedades en las últimas décadas sean puesto a disposición otros métodos de propagación vegetativa de la piña.

Crocker (1906) y Crocker (1916) mencionan que la latencia es el factor que incapacita a las semillas para germinar, también mencionan que hay otros factores como, los embriones rudimentarios no están maduros entonces no germina, cuándo hay inhibición completa de absorción de agua, oxígeno, quizá la de CO₂ y resistencia mecánica a la expansión del embrión(cascara dura),estado latencia del embrión, causa tardía de la semilla y dormancia.

Análisis económico del material de plantación de la Piña (Método convencional y método cultivo in vitro)

Propagación convencional por hijuelos, el material de plantación por este método ocupa mayor espacio, no garantiza calidad de homogeneidad para exportación, no garantiza eficientemente la producción.



Tabla 30: Costo de mano de obra /ha. plantación de una campaña agrícola propagación por hijuelos.

Actividad	Número de personal	Precio Jornal s/.	Costo s/.
Recolección hijuelo	8	40	240
Clasificación de hijuelo	3	40	120
Distribución de hijuelo	3	40	120
Desinfección hijuelo	2	40	80
Traslado de hijuelo	3	40	120
Otros gastos	-	100	100
Material propagación	-	-	-
Total	19	-	780

Elaboración Propio, Puno-Perú.

Propagación por cultivo in vitro, nos brinda beneficios como: rentabilidad social, rentabilidad ambiental, garantiza la producción y uniformidad para la exportación por tanto mayor valor económico, garantiza Fito sanidad de las plantas de piña, satisfacción del dueño o empresario en unidades monetarias.



Tabla 31: Costo /ha. plantación de una campaña agrícola propagación por cultivo in vitro, es decir esto ya en la fase de multiplicación.

Artículo-variable	Costo unidad s/.	Cantidad usada	Costo s/.
ANA	45	0.7mg	22.5
BAP	30	2.4mg	15
IBA	27	2mg	13
KIN	10	1.8mg	5
B9	5	9mg	2.5
Adn.	30	2mg	15
Myoinositol	40	0.05mg	20
Otros costos-fijos	Costo unidad	Cantidad usada	Costo s/.
M.S.	15	1.1gr	7.5
Agar	100	1.5gr	50
Sacarosa	4	30gr	2
Agua destilada	3.5	2L	1.5
Alcohol	5	2L	2.5
Cloro	3	1L	1.5
Material propagación	0.15	50	-
Total	-	-	158

Elaboración Propia, Puno-Perú.



V. CONCLUSIONES

De los resultados y análisis obtenidos se llega a las siguientes conclusiones:

- Se concluye que en ABE alcanzo 3.0 cm de altura con el T2 (ANA 0.6 mg, BAP 2.3mg y B9 9mg) con la variedad MD-2; en DBE el mayor diámetro alcanzado fue de 1.4cm con el mismo T2 y la variedad MD-2; en LBRE alcanzo 0.4 cm longitud con el T2 y T3(ANA 0.5 mg, BAP 2.2mg y B9 8mg) con la variedad MD-2.
- Para obtener brotes viables de ex plantas de primordios de yema, en NEC se obtuvo 2.5 ex plantas con el T1(Detergente 2gr, Benlate 0.50mg y NaCLO 2.5% en 5 min); en NEV el T2(Detergente 2gr, Benlate 0.62mg y NaCLO 1.5% en 5 min) obteniendo 6.20 ex plantas vivos; en NEO se obtuvo el T1(Detergente 2gr, Benlate 0.50mg y NaCLO 2.5% en 5 min) con 1.3 ex plantas oxidados
- Del efecto de inducción de germinación de semilla de interés botánico, concluimos que en semillas germinadas se determinó una tasa de nacencia de 1.57 semillas germinadas con el T2(Con tegumento o episperma en agua hirviendo durante 2 min y a 28°C), lo que indica que la estrecha base genética de las dos variedades determina la germinación.



VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar trabajos en cultivo in vitro de piña en las variedades samba y MD-2 con mayor contenido de dosis de reguladores de crecimiento, myoinositol y vitaminas.

Se recomienda realizar trabajos de investigación con otros medios de cultivo para el equilibrio nutricional adecuado del ex plante en piña.

Se recomienda realizar más trabajos en temas de inducción de germinación y dosis de desinfectantes de semilla botánica en piña, para lograr mejores tasas de germinación.

Se recomienda realizar otros métodos de corte para evitar la presencia de oxidación.



VII. REFERENCIAS

- A.a.M; (2018). *Glosario de Términos de Bioseguridad y Biocustodia*. Asociación ARGENTINA de Microbiología,.
- Ali, R.; Shahid, T.; Aen, M.; y Majeed, A. . (2019). Ananas comosus L. Merr. *Profesional Medical College Faissalabad.*, Vol.26(1024–8919).
<https://doi.org/10.29309/TPMJ/2019.26.02.3118>
- Alvarado, A ; y Duran, D. ; (2017). El Gusano de la Piña Aspectos Generales de Biología y Manejo. *Hortic Science*.
- Anahui, J. (2019). *Produccion piña, Golden en experiencias del IRD selva UNALM en Satipo-Junin*. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Peru.
- Apogbua, J; y Osuji, J. (2011). Split crown technique for mass propagation of smoot cayenne pineapple in south-south Nigeria. *African Journal of Plant Science.*, Vol.5., 592-598.
- Aragon, C. C. (2012). Fisiología de la piña ex vitro (Ananas comosus L, Merr.) Var MD2 como CAM y C3, esta regulada por las condiciones ambientales. *Revista Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1195-7.epub> .
- Araya, M. (2019). Control Quimico de cochinilla en piñas. *Acta Horticulture Nature*.
<https://doi.org/10.17660/Actahortic.2019.1239.18>.
- Azofeifa, A. (2009). Problema de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana Latindex.*, pp,150-175.
- Badou, B; Nodichao, L; Gbidinoukown, A; Dossoukpe, V; Cacai, R; Gilles, TH; Hovedjissin, S; y Ahanhanzo, C. (2017). *Effects of two disinfectants and two growth*



- regulators on in vitro propagation of "smooth cayenne" and sugarloaf cultivars of pineapple (Ananas comosus Mill). Vol. 3.(2413–3256), pp,94-105.*
- Bartholomew, D; Botella, J; Chen, C; Coppens, G; Assis, A; Pires, A; Souza, E; y Duval, F. (2018). *The pineapple botany, production and uses*. 2nd. Edition. Editorial CABY Publishing.
- Bernard, A. (2004). *Ultimas investigaciones en biologia celulas madre y celulas embrionarias*. Secretaria General Tecnica. Madrid, España.: Aulas de Verano.
- Billard, C; Bartololini, V; y lallana, H. (1995). *Términos comúnmente usados en cultivo in vitro*. Parana, Brasil.
- Blanco, A.; Varga, T.; y Garcia, E. . (2017). In vitro regeneration of amazonia pineapple (Ananas comosus L.Merr) plants ecotype gobernadora. *Colombo.Biotecnol., Vol. 19*.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>.
- Borges, C; Giuseppino, L; y Lima, G. (2009). In vitro bud induction and multiplication of cv. "IAC gomo-de mel" pineapple fruit with benzil amino purine BAP and aphthalene acetic ANA. *Ciencia Rural, Vol. 39.*, pp,1682-1687.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000600008>
- Brac, A; y Seuret, F. (1999). *Plantas Transgénicas una Amenaza para los Agricultores del Sur*. Editora Vozes y Ediciones TRILCE.
- Bravo, R. (2012). *Entomología Conociendo a los Insectos*. Puno, Perú.: Editorial Altiplano E.I.R.L.
- Campana, R; y Ochoa, J. (2007). *Progacion Vegetativa de Especies Frutales*.
- Cedeño, L. (2019). La piña y sus enfermedades. *Acta Horticultura Brasileira*.



<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36428.67208>

- Cerrato, I. (2013). Panorama mundial de piña. *Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario. SAG. Tegucigalpa, Honduras.*
- Cisneros, A., Rodriguez, M., Escalona, C., Perez, I., Luna, C., & Borroto, G. (1997). Embriogénesis somática en piña(*Ananas comosus* L.)Merr. *ISHS Acta Horticulturae. II Simposio Internacional de Piña., Vol. 425.*
[https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.425.28.](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.425.28)
- Coppen, E; y Leal, R. (2019). The International Plant Names IPNI . *Kewscience.*
- Coppens, G. . (2014). Pineapple taxonomy: especies botanical varietes and cultivars, and their importance in undertanding and managing pineapple diversity. *Research to Academia Natur., vol.21*, pp,35-39.
- Crestani, M.; Barberi, R.; Irja, F.; De carvalo, F.; y Costa de Oliveira, A. . (2010). De las americas al mundo origen domesticación y distribución de la piña. *Rural Science Natur., 40.*, 1472-1484pp.
- Crestani, M.; Hawernot, R.; Barberi, L.; Irja, F.; De Carvalho, F.; y Costa de Oliveira, A. . (2010). De las americas para el mundo origen domesticación y distribución de la piña. *Rural Sciense*, 1473-148pp.
- Crocker, W. . (1906). Role of seed coats in delayed germination. *Gazeta Botánica, vol.42*, pp,265-292.
- Crocker, W. . (1916). Mechanics of dormancy in seed. *Gazeta Botánica, Vol.3.*, pp,99-120.
- D"eckenbrugge, G. (2016). The last revision of pineapple nomenclatura, *pineapplenews.*



- Acta Horti Nature.*, Vol. 23., pp45-48.
- Deheco, A. . (2019). *Biotransformacion de cascaras de Ananas comosus (piña) para la obtención de etanol en el marco de desarrollo sostenible de las regiones productoras del Perú*. Universidad Nacional Federico Villareal. Lima, Perú.
- Dippy, F; Hughes, C; y Laxton, W. (1954). Chemical constitution and the dissociation constants of monocarboxylic acids y monomethylecymonocarboxylic acids. *Homepage*. <https://doi.org/10.1039/JR9540004102>
- DRA. Direccion Regional Agraria. (2018). *Oficina Estadística Agraria e Informática*. Puno, Perú.
- Engler, A. (2019). Indice internacional de nombres de plantas IPNI de la Univeridad de Harvard. *Kewscience Jardin Botanico*.
- F.A.O. (2017). Manual de Manejo de Frutas Tropicales. In *Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación*.
- FAOSTAT. (2017). *Pineapple production statistic*. United States.
- Gitai, J.; Juras, P.; Zizka, G.; Schulte, K. . y B. A. . (2014). El número de cromosomas y contenido DNA en Bromeliácea. *Botanical of the Linnean Society*.
- Gonzales, A. (2010). *Morfologia de plantas vasculares*. Universidad Nacional Noreste de Aregentina.
- Guo, C; y Col, C. (2018). Caracterizacion funcional de transportadores de azúcar dulce en ananas comosus. *Elsevier Indexado Medline*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.024.epub2018>
- Haroldo, D. . (2018). Avances en la propagación de plantas de piña. *Revista Brasileira*



- de Froticultura*. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018302>.
- Holloway, M. (2003). Colección Botánica Universidad Harvard. *Scientific American* "Flores Friables," Vol:289., pp, 108-109. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0903-108>
- Iyer, C; Singh, R; y Subrayamanyam, M. (1978). A Simple Method for Rapid Germination of Pineapple Seed. *Elsevier Scientia Horticulturae*, Vol.8, pp,39-41. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(78\)90067-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(78)90067-5).
- Joy, P. (2010). Benefits and Uses of Pineapple. *Researchgate of Pineapple, Universidad Gricultural de Kerala-India*,. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2782.4888>.
- Leao, A.; Souza, B.; Cherian, F.; y Pothan, M. . (2010). Agro-Based Biocomposites for Industrial Applications. *Cristales Moleculares y Cristales Liquidos. Reunión de La Asociación Americana de Química (AMC). Universidad de Sao Paulo*. <https://doi.org/10.1080/15421401003719852>
- Llanos, C. (2015). *Micropropagación in vitro de piña (Ananas comosus L.) Merr. Var. MD2(Bromeliaceae) bajo un sistema de bioreactores de inmersión temporal*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Lopes, S; Martins, J; y Torres, M. (2010). Influencia de NaClO en la esterilización del medio nutriente y en el comportamiento de la piña (Ananás comosus L.) cv.cayenne. *Springer*.
- Marion, C.; y Okimoto, X. . (2017). Anatomía e histología de la inflorescencia y fruto de la piña(Ananas comosus L.). *Revista Internacional de Ciencias de La Planta. Universidad de Chicago*. <https://doi.org/10.1086/335530>.



- Mendonca, L; Carvalho, M; Fernandes, F; y Stephanezabel, M. (2009). The collection of pineapple fibers(*Ananas comosus* L.)-Harvard University Herbaria. *Scientific American. USA.*, Vol.14, pp,104-109.
- Mhatre, M., Srinivas, L., y Ganapathi, T. (2011). Acumulación mejorada de hierro y zinc en plantas de piña genéticamente modificadas utilizando el gen de ferretina de soja. *Nature Genetic. Springer Science +Bussi Media.*
<https://doi.org/Doi:10.1007/s12011-011-9092-z>.pub 2011/05/31.
- MHNB. (2018). *Herbario Nacional de Bolivia*. La Paz, Bolivia.
- Miles, T. . (1997). Desarrollo de la estructura de la semilla y la planta joven dela piña. *Naturwissenschaftliche Wochenschrift. D.Sc.,Univ.Collins.Londres.,L.E.Holmes ,B.Sc.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1930.tb06990.x>.
- MINAGRI. (2017). *Guía rápida de identificación de plaga y enfermedad*. Salvador, El Salvador.
- Ming, R.; Man, CH.; y Guyot, R. . (2016). Pineapple Genome: A reference for Monocots and CAM Photosynthesis. *Nature Genetic. Universidad Illinois.*
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.08.008>.
- Ming, R.; Vanburen, R. . (2015). El genoma de la piña y la evolución de la fotosíntesis CAM y C3. *Revista Nature Genetics.* <https://doi.org/10.1038/ng.3435>.pub.
- Mogollon, N.; Diaz, J.; y Hernandez, N. . (2004). Multiplicación clonal y enraizamiento in vitro de (*Ananas comosus* L.Merr.)var.Queen australiana. *Programa de Horticultura. Unidad de Biotecnología. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Posgrado. Lara, Venezuela.*, pp 17.



- Montgoumeri, D. (2012). *Design and Analysis of Experiments*. New York, EUA.: EIGHT, Edition.
- Moreira, R.; y Uguña, F. . (2018). Diagnostico base del cultivo de piña en ecuador con énfasis en el cultivo del cultivar “Criolla o milagreña”. *Research Gate. Ecuador*.
- Murashige, T; y Scook, F. (1960). A revised medium for rapid growth and biottays with tobacco tissue cultures. *Phys Plants., Vol,15.*, pp,73-79.
- Mutte, S., Kato, H., Rothfels, C., Melkonian, M., Wong, G., & Weijirs, D. (2018). Origen y evolucion del sistema de respuesta nuclear de auxina. *Nature Plants*. <https://doi.org/10.7554/elife.33399>.
- Napoles, L; Cid, M; Hernandes, L; Alvarez, V; Samorra, G; Lorente, R; Rodriguez, O; y Concepcion, O. (2019). Escalado de la producción de vitroplantas de piña MD2 libre de “mealybug-wilt”-virus, para su introducción a escala productiva en cuba. *Journal Acta Horticulturae “ISHS”Nature*. <https://doi.org/10.17660/acta.hortic.2019.1239.15>.
- Nasution , F; y Hadiati, S. (2012). The effect of BAP and the leve lof aging stem on the growth of pineapple (*Ananas comosus L.*) stem cutting. *Agricultural and Biological Science, Vol.7.*, pp.190-196.
- Nee, G; Xiang, Y; y Soppe, W. (2017). Liberación de la latencia, un llamado de atención para que las semillas germinen. *Current Opinión in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/J.pbi.2016.09.002>.
- Ningli, Qi., Lina, Ma., Liuji, Li., Xiao, Gong., y Jianzhi, Y. (2017). *Producción y evaluación de calidad del vino de fruta de piña*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/100/1/012028>



- Olmedo, G; Fundora, Z; Molina, L; Abdunour, J; Desjardins, Y; y Escalona, M. (2005). Nuevas contribuciones a la propagación de la piña (*Ananas comosus* L.Merr.) en biorreactores de inmersión temporal. *Society for in Vitro Biology*.
- Omokolo, N; Fasto, M; Awah, T; y Niemenak, N. (2001). Regeneration directe in vitro de (*Ananas comosus* L.) var.cayenne desde las couronas ,cutives en milieu liquide. *Brasileña de Fruticultura*, Vol. 24., pp,296-306. <https://doi.org/10.1051/fruits:2001104>.
- PEPP. (2015). *Manual técnico para el cultivo de la piña en chanchamayo. Proyecto Especial Pichis-Palcazu*.
- Pineda, D. (2012). *Organogénesis in vitro en piña “española roja” y morfoanatomía foliar de las plantas Obtenidas en el proceso. Bioagro vo*.
- Pinto, A; Braga, E; Alves, M; y Saraiva, J. (2018). Micro propagación de piña ornamental (*Ananas comosus* var.Bracteatus),por inducción de etiolación y regeneración de plántulas. *SBFPO Sociedad Brasileira de Fruticultura de Plantas Ornamentales.*, Vol.11 (12(2447-536x.)). <https://doi.org/10.14295/rbho.v11i2.52>.
- Pinto, G. . (2005). Aspectos aplicados de la floración de la piña. *Bragantia Campinas.*, Vol. 64. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052005000400001>.
- Ponahanish, R. (2015). Indole-3-Butyric acid. In *Elsevier Agricultural Chemicals*. Oxford, United kindom.: 2da edición Oxford.
- R.A; (2017). *Nutrición de la Semántica ala Agronomía*. Red Agrícola.
- Ramirez, J; Gutierrez, D; Hernadez, O; Zuñiga, M. (2018). Prueba de viabilidad metodo flotacion. *Pronatura*. Retrieved from www.viverosdebiodiversidad.org



- Reinhardt, D; Duane, P; Souza, F; Carvalho, C; Padua, T; Junglans, D; y Matos, A. (2018). Advances in Pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018302>
- Reinhardt, D; Souza, A; Caldas, R; Alcantara, J; y Almeida, A. (2003). Management of slip and its effect on growth and production of perolera pineapple plants. *Revista Brasileira de Fruticultura.*, Vol. 25., pp.248-252.
- Salazar, R. (1993). *Situación del cultivo de la piña en Colombia*.
- Sanewski, G.; Bartholomew, D.; y Paull, R. . (2018). *The pineapple botany, production and uses*. Nambour, Australia.: 2nd Edition.
- Santa , LL; y Col, A. (2009). High Planting Density for the “smooth cayenne” pineapple crop grown under rainfed conditions. *Jouernal Brasileña de Cultivo de Frutas*, vol.23. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452001000200031>.
- Saucedo, S; Varas, E; Carmigniani, F; y Ramos, L. (2008). Propagación clonal in- vitro de piña (*Ananas comosus* L.Merr) variedad champaka y hawaiana. *ISHS Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.18779/cyt.v1i1.102>.
- Shapiro, R. (1995). ”The Prebiotic Role of Adenine, A Critical Análisis”. *Origins of Life and Evolution of Biospheres.*, vol.25., pp83-98. <https://doi.org/10.1007/BF01581575>
- Shu, J; Sether, D; Harrington, H; y Ullman, E. (1995). Two step heat treatment of pineapple crowns in creases thermotolerance. *American Society for Horticultural Science Technology.*, Vol.5, pp,63-66. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.5.1.63>.
- Silva, J. (2019). 6 benziladenine BAP o BA. *Researchgate Retrieved*.



- Smith, R. (1961). *Notes on bromeliaceae phytologia*. Vol,9(1)., pp,12.
- Souza, G; y Lapa, M. (2000). Achmea Ruiz & Pav. bromeliaceae from Pernambuco State Brasil. *Scielo.*, Vol 14(1)., pp 70-97. <https://doi.org/10.1590/S01102-33062000000100008>.
- Steel, R., y Torrie, J. (1985). *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Bogotá, Colombia.: Editorial McGRAW-HILL LATINOAMERICANA S. A. Impreso en Colombia.
- Steigewald, J. (2011). "NASA Researchers DNA Building Blocks can be Made in Space". *NASA Retrieved*.
- Sun, G. (2019). Producción de piña e investigación en china. *Acta Horticulture.*, pp79-85. <https://doi.org/doi.10.17660/acta horticulture.2011.902.5>
- Trofani, H; Prina, A; Muiño, W; Tamame, M; y Beinticinco, M. (2017). *Botánica, Morfología Taxonomía y Fitogeografía*.
- UAK. University Agricultural of Kerala. (2013). *Varietades de piña, "Joy pp & Anjana."* Kerala, India.
- UNLPam. (2017). *Glosario de Términos Botánicos*.
- Upadhyay, A.; Prava, J.; y Tawata, S. . (2010). La utilización de residuos de piña. *Food Science Techno Nepal.*, Vol. 6.
- USDA. (2013). *Manual de bebidas funcionales y salud humana*. <https://doi.org/doi:10.1201/b19490-43>
- Ventura, H. (2018). *Efecto de la citocinina y auxina en la organogénesis directa in-vitro de (Ananás comosus L.) "roja trujillana"*. Universidad Nacional de Cajamarca. Perú.



- Villalobos, A; Olivera, J; Rodriguez, N; Bernabe, F; Souza, J; Olmedo, H; y Montero, M. (2019). Efecto de la temperatura en el preacondicionamiento de plantas in vitro donantes de piña para un protocolo de crioconservacion de ápices. *Hortic Nature.*, pp,113-120. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1239.14>.
- Wai, C.; y Vanbuneren, M. . (2017). Dinamica transcriptomica y microARN temporal y espacial de la fotosíntesis CAM en piña. *Science Nature*. <https://doi.org/10.1111/tpj.13630>. epub 2017 /08/21
- Winkelmann, T., Geir, T. y, & Preil, W. (2006). Commercial In Vitro Plant Production in Germany. *Google Academico*, 38, pp,123-426.
- Xu, H.; y Col, I. . (2018). Base de datos de genómica de piña. *Acta Horticulture*. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0078-2>ecollection.
- Xu, Q.;y Liu, Z. . (2015). Una Muestra de la Evolucion de la Piña a traves de la Secuenciacion del Genoma. *Natur Genetic.*, Vol. 6. <https://doi.org/10.1038/ng.3450>.
- Zhang, J; Liu, J; y Ming, R. (2014). Genomic analyses of the CAM plant of pineapple. *Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru101>. epub 2014.
- Zhang, J;Liu, J; y Ming, R. (2014). Genomic analyses of the CAM plant pineapple. *Journal of Experimental Botany*, Vol.65, pp.3395-3404. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru101>.

ANEXOS

Tabla 32 : Datos obtenidos del laboratorio para altura de brote de ex planté (ABE)
Var.SAM.

REP.	T1	T2	T3	T4	T5
I	2.8	3.0	2.9	2.8	2.7
II	2.8	3.0	2.9	2.8	2.7
III	3.0	3.0	2.9	2.8	2.9
IV	2.7	3.0	2.9	2.8	2.7
V	2.8	3.0	2.9	2.8	2.7
TOTAL	14.1	15.0	14.5	14.0	13.7
\bar{X}	2.82	3.0	2.9	2.8	2.74

Tabla 33: Datos obtenidos del laboratorio para diámetro de brote ex planté (DBE) Var.
MD-2.

REP.	T1	T2	T3	T4	T5
I	1.2	1.4	1.3	1.2	1.2
II	1.2	1.4	1.3	1.2	1.2
III	1.4	1.4	1.3	1.3	1.2
IV	1.2	1.4	1.3	1.2	1.2
V	1.2	1.4	1.3	1.2	1.2
TOTAL	6.2	7.0	6.5	6.1	6.0
\bar{X}	1.24	1.4	1.3	1.22	1.2

Tabla 34: Datos obtenidos del laboratorio para longitud de brote de raíz ex planté (LBRE)
Var.MD-2.

REP.	T1	T2	T3	T4	T5
I	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
II	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
III	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3
IV	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
V	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
TOTAL	1.6	2.0	2.0	1.5	1.5
\bar{X}	0.32	0.4	0.4	0.3	0.3

Tabla 35: Datos obtenidos del laboratorio para altura de brote ex plante (ABE) Var. SAM.

REP.	T1	T2	T3	T4	T5
I	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7
II	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7
III	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7
IV	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7
V	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7
TOTAL	9.0	10.0	10.0	9.0	8.5
□	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7

Tabla 36: Datos obtenidos del laboratorio para diámetro de brote ex plante (DBE) Var. SAM.

REP.	T1	T2	T3	T4	T5
I	1.2	1.3	1.3	1.2	1.1
II	1.2	1.3	1.3	1.2	1.1
III	1.2	1.3	1.3	1.2	1.1
IV	1.2	1.3	1.3	1.2	1.1
V	1.1	1.3	1.3	1.2	1.1
TOTAL	5.9	6.5	6.5	6.0	5.5
\bar{X}	1.18	1.3	1.3	1.2	1.1

Tabla 37: Datos obtenidos del laboratorio para longitud de brote ex planté (LBRE) Var. SAM.

REP.	T1	T2	T3	T4	T5
I	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
II	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
III	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
IV	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
V	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
TOTAL	1.5	2.0	2.0	1.5	1.5
\bar{X}	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3

Tabla 38: Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas contaminados (NEC) Var. SAM.

REP.	T1	T2
I	2	2
II	3	2
III	3	2
IV	3	2
V	3	2
TOTAL	14	10
\bar{X}	2.8	2

Tabla 39: Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas viables (NEV) Var. MD-2.

REP.	T1	T2
I	5	6
II	4	5
III	5	6
IV	5	6



V	4	6
TOTAL	21	29
\bar{X}	4.6	5.8

Tabla 40: Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas oxidados (NEO) Var. MD-2.

REP.	T1	T2
I	3	2
II	3	3
III	2	2
IV	2	2
V	3	2
TOTAL	13	11
\bar{X}	2.6	2.2

Tabla 41: Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantas contaminados (NEC) Var. SAM.

REP.	T1	T2
I	4	3
II	4	3
III	4	3
IV	4	3
V	4	3
TOTAL	20	15
\bar{X}	4	3



Tabla 42: Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantes viables (NEV) Var. SAM.

REP.	T1	T2
I	6	7
II	6	6
III	5	7
IV	6	6
V	6	7
TOTAL	29	33
\bar{X}	5.8	6.6

Tabla 43: Datos obtenidos del laboratorio para N° de ex plantes oxidados (NEO) Var. SAM.

REP.	T1	T2
I	0	0
II	0	1
III	1	0
IV	0	1
V	0	0
TOTAL	1	2
\bar{X}	0.2	0.4

Tabla 44: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas germinadas (SG) Var. MD-2.

REP.	T1	T2
I	0	1
II	0	1
III	0	1
IV	0	1
V	0	1
TOTAL	0	5
\bar{X}	0	1



Tabla 45: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas no germinadas (SNG) Var.MD-2.

REP.	T1	T2
I	5	4
II	5	4
III	5	4
IV	5	4
V	5	4
TOTAL	25	20
\bar{X}	5	4

Tabla 46: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas germinadas (SG) Var. SAM.

REP.	T1	T2
I	1	2
II	1	2
III	1	2
IV	1	2
V	1	2
TOTAL	5	10
\bar{X}	1	2

Tabla 47: Datos obtenidos del laboratorio para porcentaje de semillas no germinadas (SNG) Var. SAM.

REP.	T1	T2
I	4	3
II	4	3
III	4	3
IV	4	3
V	4	3
TOTAL	20	15
\bar{X}	4	3



Tabla 48: Composición de Macro y Micronutrientes de Murashige & Skoog del medio de cultivo.

Componente	Concentraciones X(mg/L)
MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCL ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ .4H ₂ O	15.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KL	0.83
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCL ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
VITAMINAS	
Glicina	2
Tiamina	0.1
Piridocxina	0.5
Ácido nicotínico	0.5

Fuente: Laboratorio de Biotecnología UNALM.

Tabla 49: Tratamiento 1 de reguladores de crecimiento.

Componente	Concentración del M.S. en mg/L/gr./L
Murashige y skoog	1.1 gr.
ANA	0.7 mg.
BAP	2.4 mg.
Myoinositol	0.05 gr.
Adn	2.0 mg.
Agar	1.5 gr.
Sacarosa	30 gr.

Tabla 50: Tratamiento 2 de reguladores de crecimiento.

Componente	Dosis de concentración del M.S. en mg/L/gr./L
Murashige y skoog	1.1 gr.
ANA	0.6 mg.
BAP	2.3 mg.
IBA	2 mg.
KIN	1.8 mg.
B9	9 mg.
Adn	4 mg.
Agar	1.5 gr.
Sacarosa	30 gr.
Myoinositol	0.05 gr.



Tabla 51: Tratamiento 3 de reguladores de crecimiento.

Componente	Concentración del M.S. en mg/L/gr./L
Murashige y skoog	1.1 gr
ANA	0.5 mg.
BAP	2.2 mg
IBA	1 mg.
Myoinositol	0.05 gr.
B9	8 mg.
Adn	6 mg.
Agar	1.5 gr.
Sacarosa	30 gr.

Tabla 52: Tratamiento 4 de reguladores de crecimiento.

Componente	Concentración del M.S. en mg/L/gr./L
Murashige y skoog	1.1 gr.
ANA	1 mg.
BAP	2 mg.
IBA	2 mg.
KIN	2 mg.
B9	10 mg.
Adn	2 mg.
Agar	1.5 gr.
Sacarosa	30 gr.
Myoinositol	0.05 gr

Fuente: elaboración propia.

Tabla 53: Tratamiento 5 (testigo).

Componente	Concentración del M.S. en gr/L
Murashige y skoog	1.1 gr.
Agar	1.5gr.
sacarosa	30gr.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 54: Tratamiento 1, primera etapa de desinfección antes de la cámara de flujo.

Dosis	Detergente	NaCLO	Tiempo	Fungicida	Bactericida
1.	2gr./100 ml	2.5%/100 ml	5 min.	Benlate 0.50 mg/250 ml	No se utilizo
2.	2gr/100 ml	1.5%/100 ml	5 min.	Benlate 0.62 mg/250 ml	No se utilizo



Tabla 55: Tratamiento 2, segunda etapa de desinfección durante la introducción del tejido meristemático.

Dosis	NaClO	Alcohol	Tiempo	cortes	enjuague
1.	0.9%/100 ml	70°	2 min.	1 cm.	3
2	0.5%/100 ml	70°	2 min.	1 cm.	3

Tabla 56: Tratamientos para inducción de germinación.

Tratamiento	Semilla botánica	temperatura	Tiempo	Condición de Agua
1.	Con pericarpio	28°C	2 min.	Tipia
2	Con pericarpio	28°C	2 min.	Hirviendo

Tabla 57: Primera etapa de desinfección antes de la introducción de semilla.

Dosis	Detergente	NaClO	Tiempo	Fungicida	Bactericida
1.	2gr./100 ml	2.5%/100 ml	5 min.	Benlate 0.50 mg/250 ml	No se utilizo

Tabla 58: Segunda etapa de desinfección durante la introducción de germinación de semilla.

Dosis	NaClO	Alcohol	Tiempo	Agua	enjuague
1.	0.9%/100 ml	70°	2 min.	5ml	3

ANEXO 2

PANEL FOTOGRAFICO



FIGURA 38: Observación de ex plantas en estereoscopio.

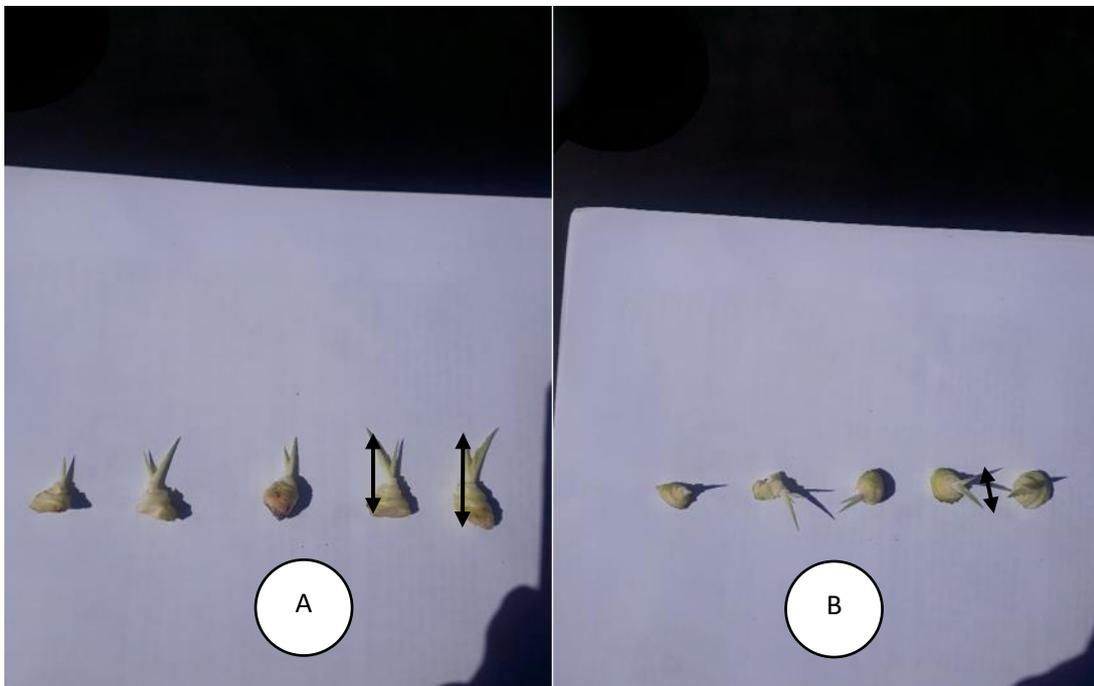


FIGURA 39: A) Altura de brote de ex plante var. SAM. B) Diametro de brote de explante var. SAM.

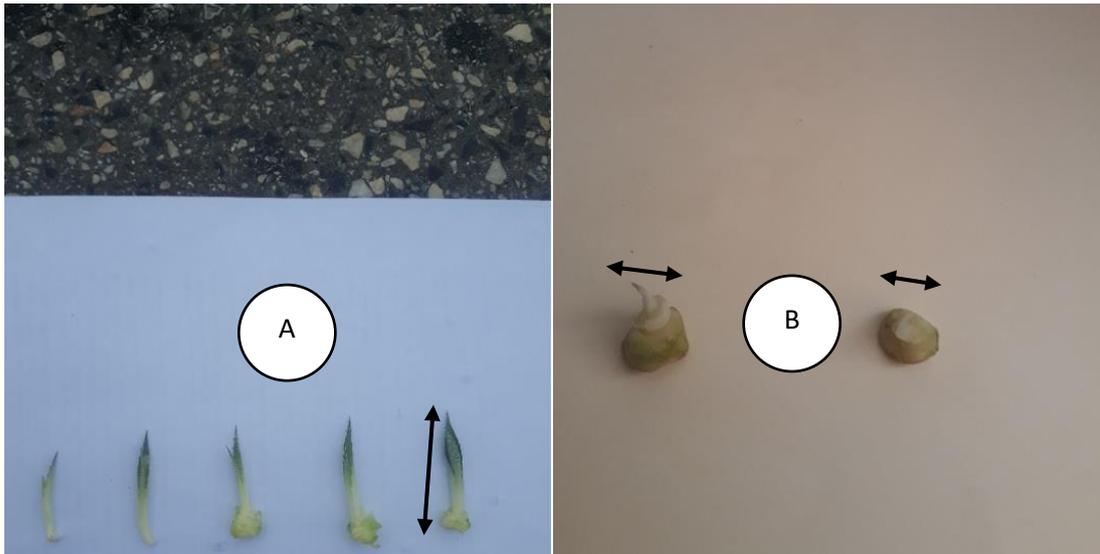


FIGURA 40: A) Altura de brote de ex plante var. MD-2. B) Diámetro de brote de ex plante var. MD-2.

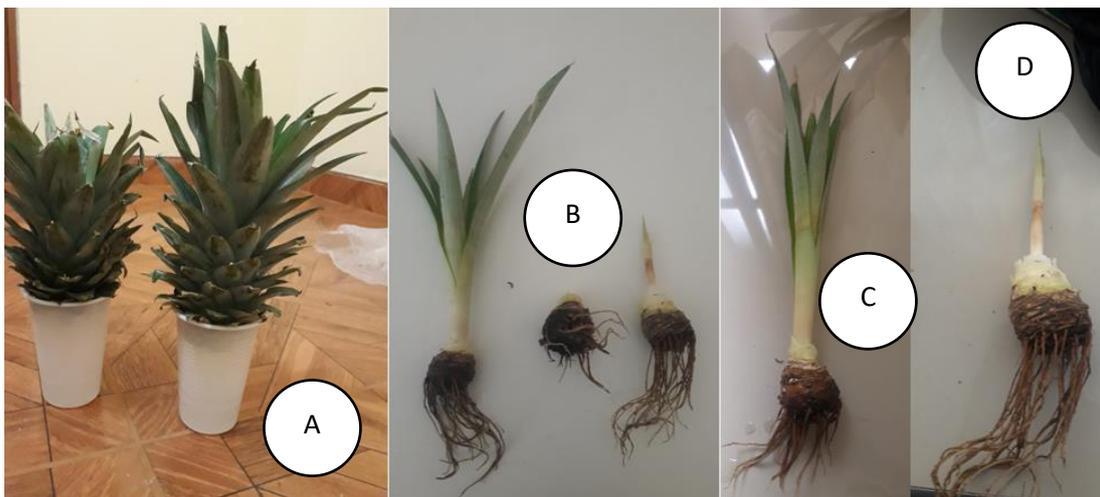


FIGURA 41: A) Hojas equitantes. B), C) y D) Vitro planta de var. MD-2.

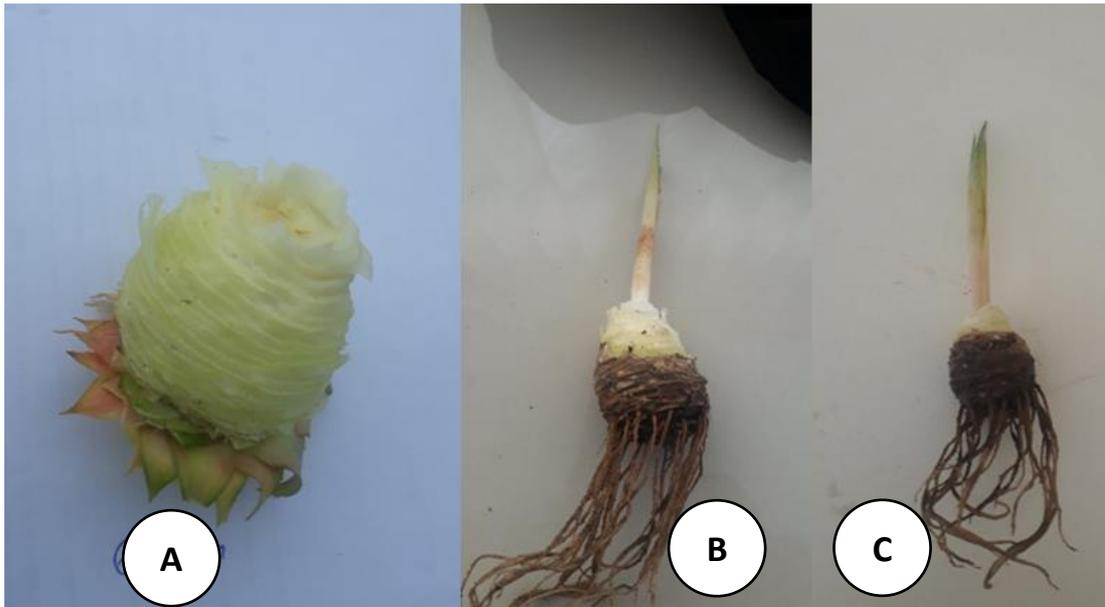


FIGURA 42: A) Yema meristemática Var. MD-2. B) Longitud de raíz T3. C) Longitud de raíz T2.

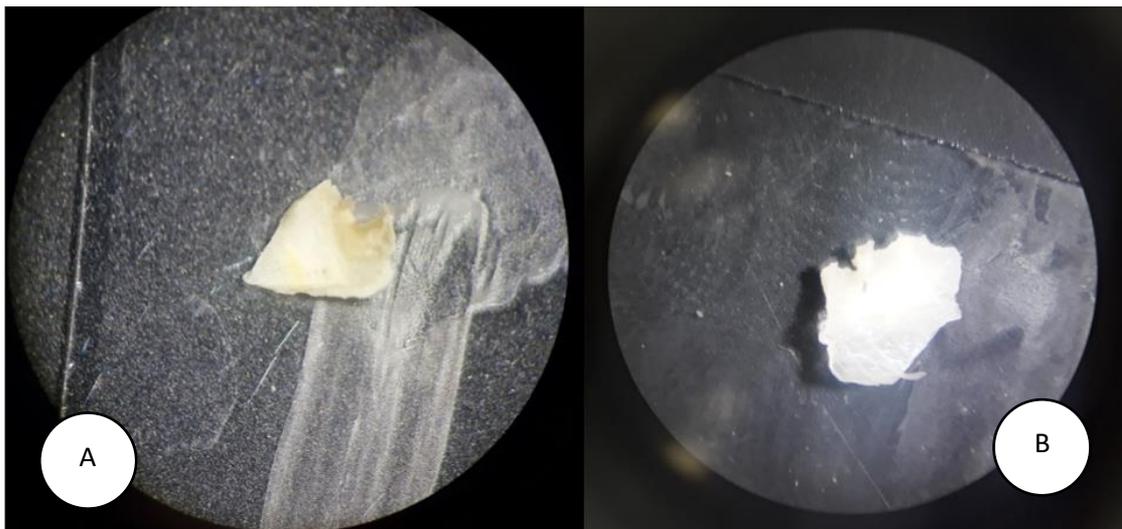


FIGURA 43: A) Formación de Callo B) Longitud de brote de raíz Var. MD-2.

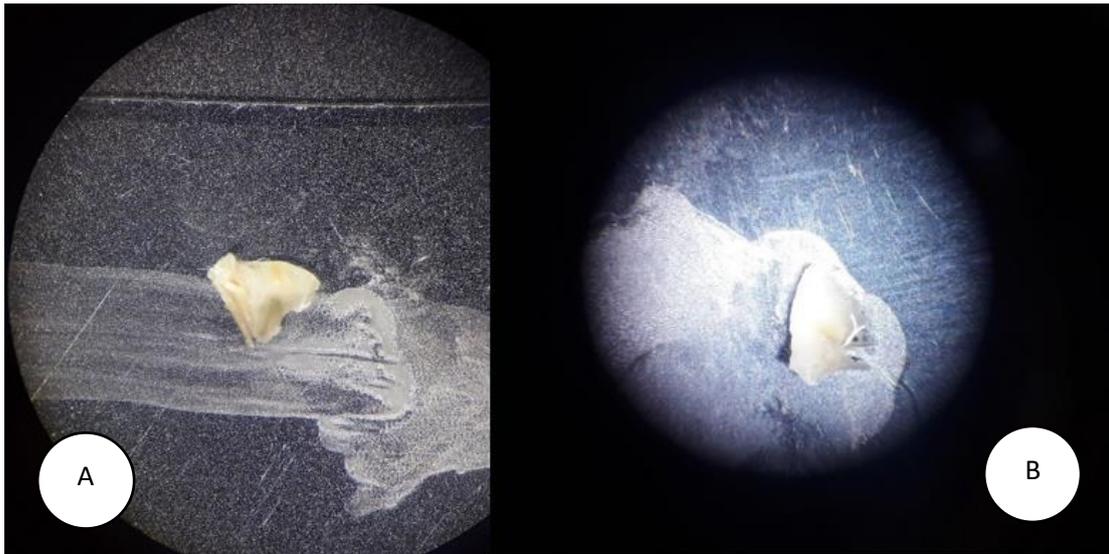


FIGURA 44: A) Formación del Callo. B) Longitud de brote raíz de ex plante var. SAM.



FIGURA 45: Resultado de protocolo de desinfección de 30 días.



FIGURA 46: Semillas no germinadas Var.MD-2.



FIGURA 47: Semillas no germinadas Var.MD-2.

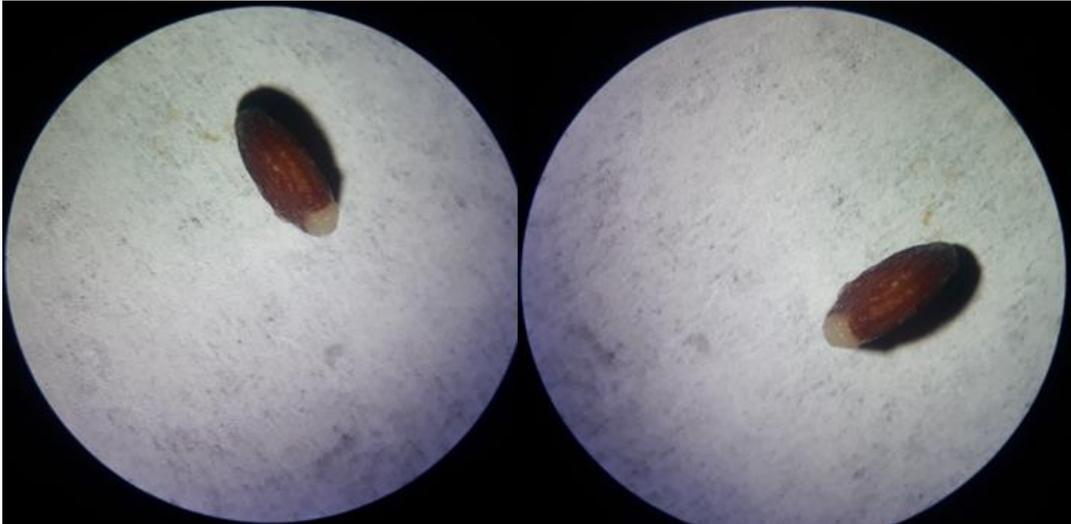


FIGURA 48: Nacencia de semilla del embrión Var. SAM.

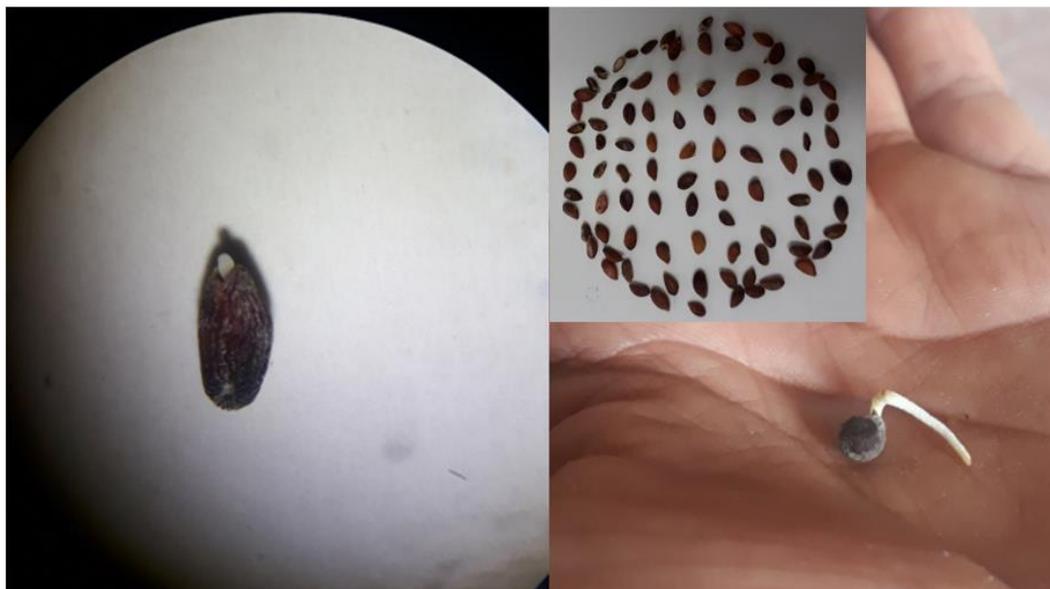


FIGURA 49: Semillas germinadas Var. SAM.

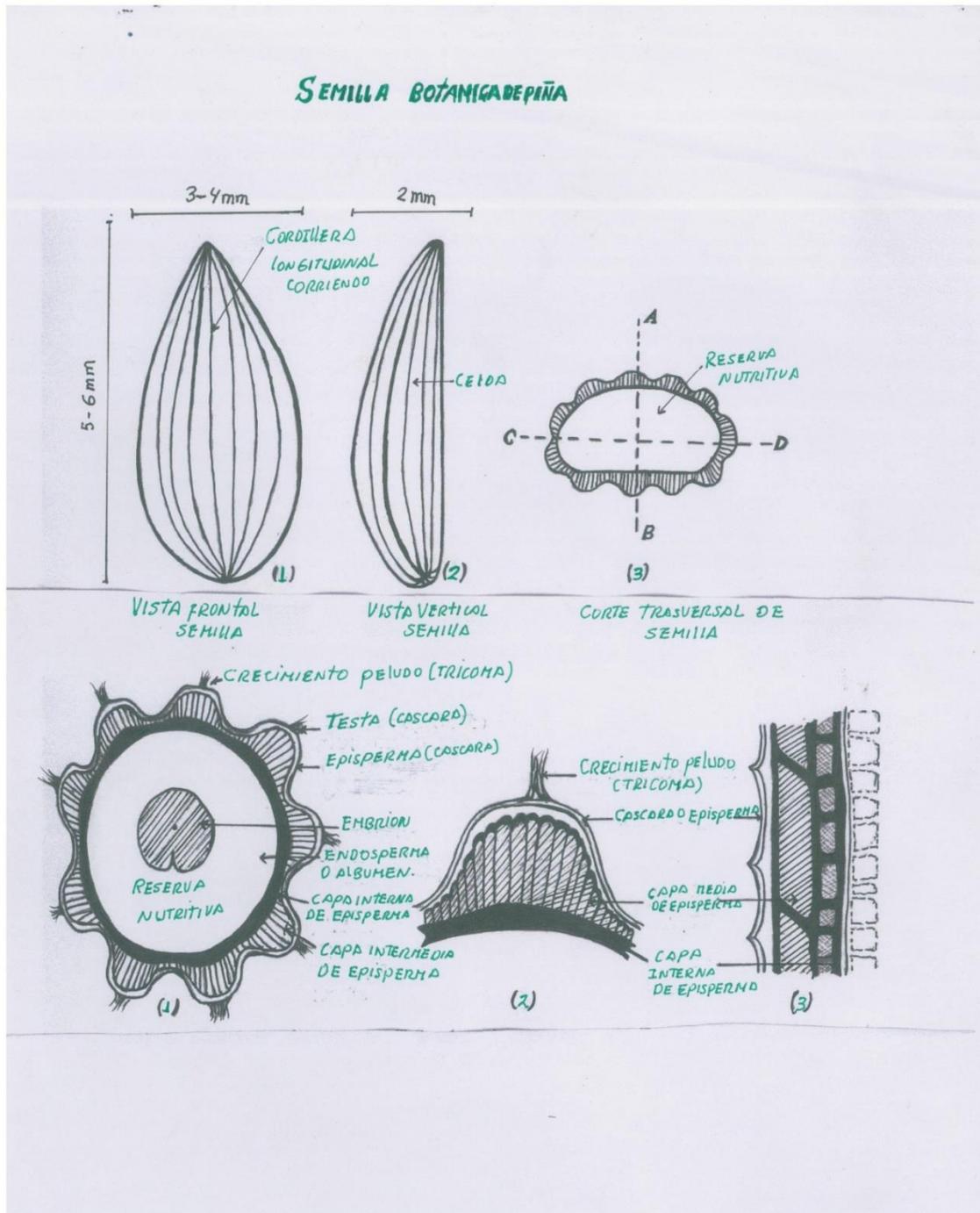


FIGURA 50: Descripción de las partes de la semilla de interés botánico.

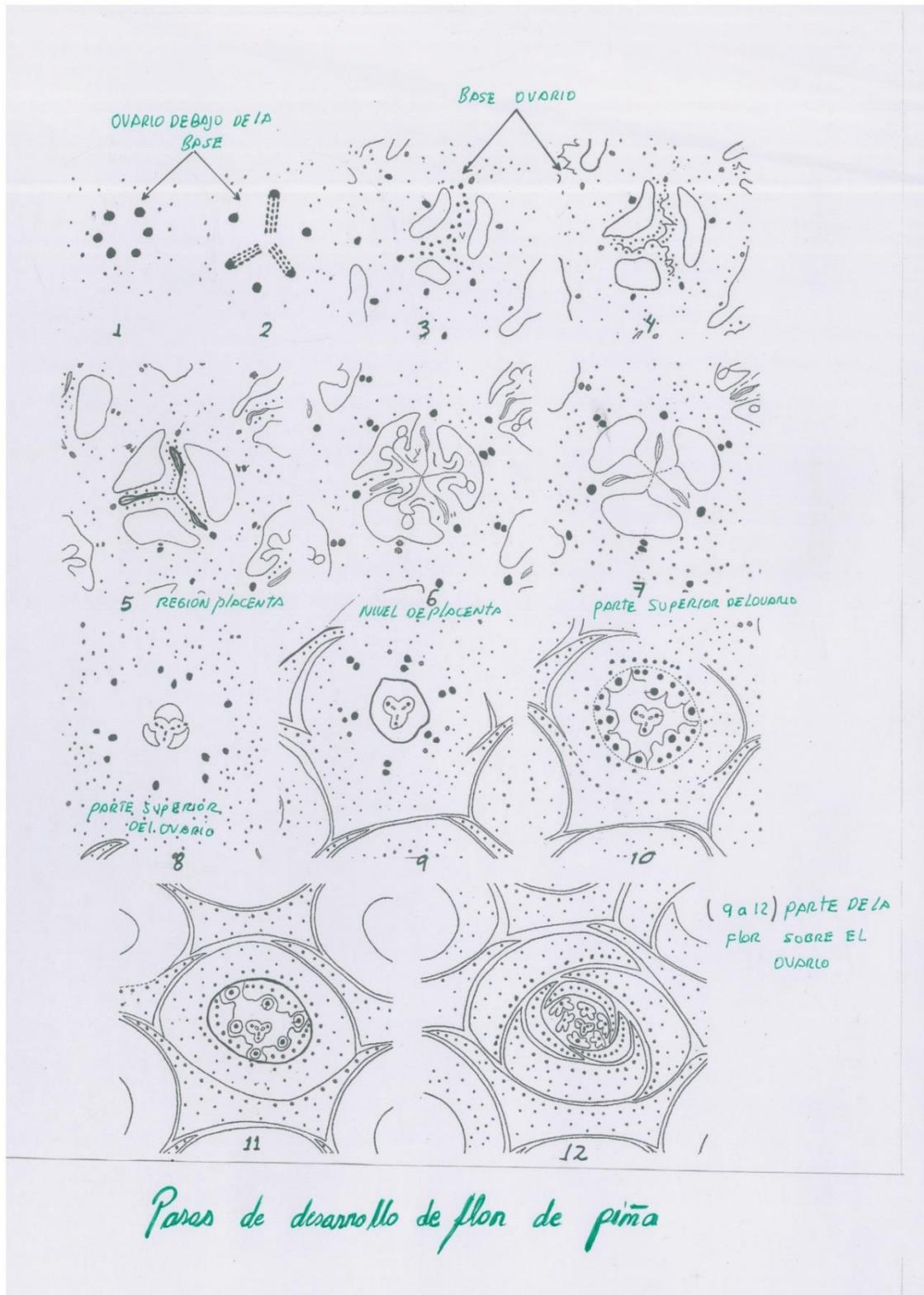


FIGURA 51: Descripción de la flor de la piña.

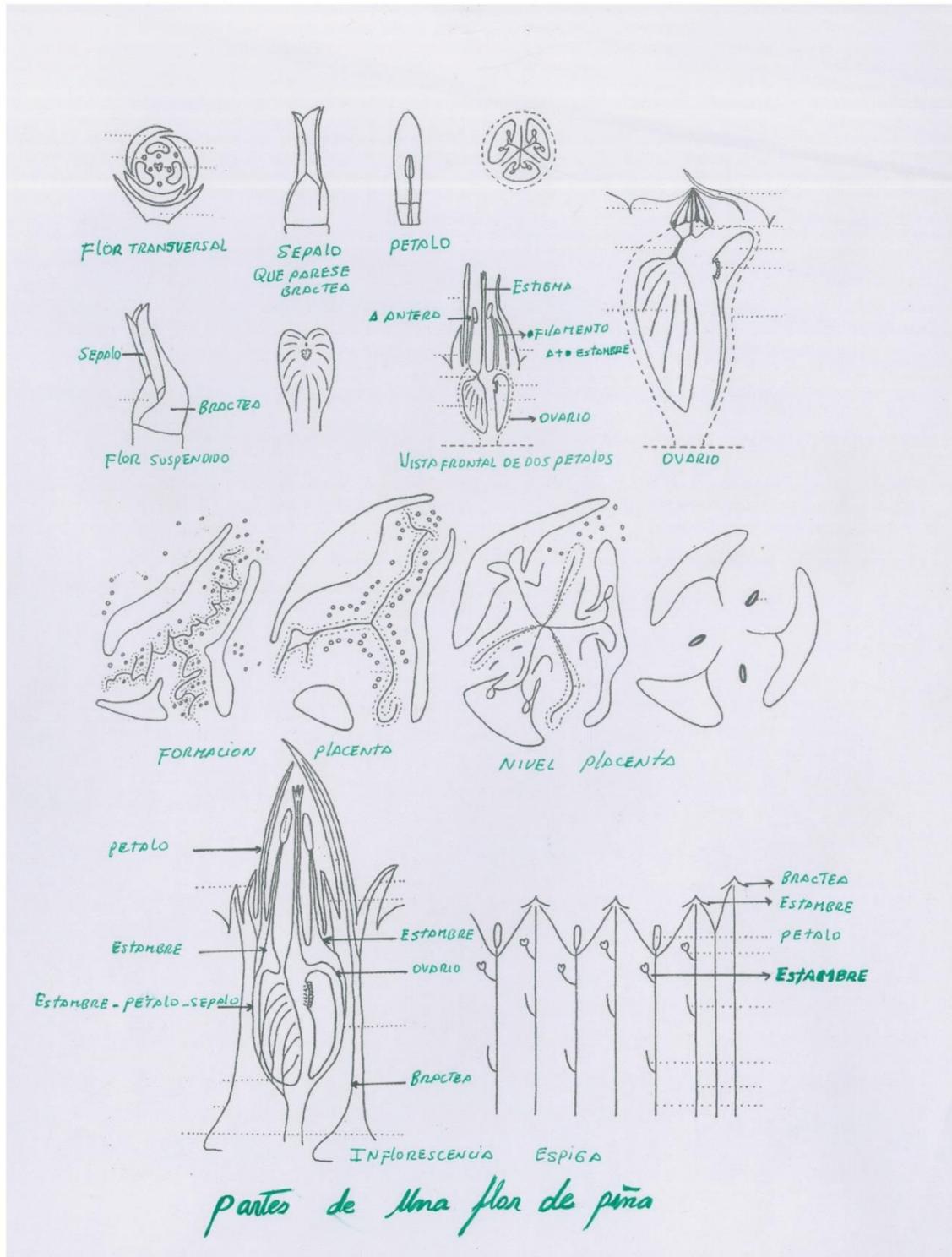


FIGURA 52: Cortes transversales y frontales de la flor, formación de la placenta y Partes de la inflorescencia.