

Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden

Ángel-Molina, J.X.

Estudiante tesista.

Departamento de Fitotecnia,

Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: jjenxi_22@hotmail.com

González-Cabrera, J.J.

Estudiante tesista.

Departamento de Fitotecnia,

Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: jjgc_1985@yahoo.com

Orellana-Núñez, M.A.

Docente Director,

Departamento de Fitotecnia,

Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

Correo electrónico: m_orellan@yahoo.com

Arévalo-Alvarado, C.R.

Laboratorio de Biotecnología

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova".

Correo electrónico: craabiotecnologia@yahoo.com

Resumen

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA) durante los meses de Noviembre de 2012 a Abril de 2013. Con el propósito de mejorar la propagación del material genético y la calidad de las plantas se evaluaron dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden, así como la determinación del tiempo de inmersión temporal que permita una mejor calidad y cantidad de explantes de piña y el método en estudio que presente la mejor relación beneficio-coste. El método convencional estuvo conformado por frascos de vidrio de 100 ml de capacidad con 25 ml de medio MS semisólido y cinco explantes iniciales. En el Sistema de Inmersión Temporal se utilizaron sistemas conformados por frascos de vidrio de 400 ml de capacidad con 125 ml de medio MS líquido y 25 explantes iniciales. Los resultados permitieron definir que para la fase de multiplicación el método convencional alcanzó el mayor peso fresco promedio de brotes de 215.1 g y número promedio de brotes por explante de 17.6. En la fase de enraizamiento y aclimatación el Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de 10 minutos de inmersión produjo el mayor número promedio de raíces por explante y longitud de explantes (cm) con valores de 6.83 y 8.8 cm respectivamente.

Económicamente el Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de cinco minutos de inmersión produjo la mejor relación beneficio-coste.

Palabras clave: Piña, Sistema, Inmersión, Temporal, micropropagación, masal, Bencilaminopurina, Acido Indól Butírico, (Murashige, Skoog), cultivo, semisólido.

Abstract

The research was developed in the Laboratory of Biotechnology, National Centre for Agricultural and Forestry Technology "Enrique Alvarez Córdova" (CENTA) during the months of November 2012 to April 2013. In order to improve the propagation of genetic material and quality of the plants, were evaluated two methods in pineapple variety Golden (*Ananas comosus* L. Merr.) by massal micropropagation, also the determination the temporary immersion time, that allow a better quality and quantity of pineapple explants, and the method of study that provides the best cost-benefit ratio. The conventional method was conformed by glass jars of 100 ml of capacity, with 25 ml of semisolid medium MS and five initial explants. In the Temporary Immersion System were used systems, conformed by glass jars of 400 ml capacity with 125 ml of liquid medium MS and 25 initial

explants. The results allowed to define that for the multiplication phase, the conventional method achieved the highest average buds fresh weight of 215.1 g and better average number of buds per explants, of 17.6. In the rooting and acclimatization phase, the Temporary Immersion System with 10 minutes of immersion gave the highest mean number of roots per explant and a length explant (cm) with values of 6.83 and 8.8 cm respectively. Economically the Temporary Immersion System of five minutes immersion produced the best cost-benefit ratio.

Key Words: Pineapple, Temporary, Immersion, System, micropropagation, masal, Benzylaminopurine, Indole butyric acid), Murashige, Skoog, semisolid, medium.

Introducción

La piña (*Ananas comosus* L. Merr.) pertenece a la familia de las Bromeliaceae, es comúnmente conocida como ananá, ananas, piña roja española, piña de agua y se propaga solo por vía vegetativa (León 2000).

Las variedades más conocidas en El Salvador son Cayena lisa, Champaca F 153, Azucarón, De Castilla y MD-2 (Sandoval 2010). Actualmente el cultivo de la piña posee una gran importancia comercial a nivel mundial, por tal razón en el país existen organizaciones que están aumentando la productividad de los asociados, generando valor agregado al producto y facilitando la comercialización de la piña y sus derivados, especialmente de la variedad Golden (Henríquez y Hernández 2008). Esto ha incentivado a la búsqueda de nuevos métodos de micropropagación de la piña. Roca y Mroginski (1993), señalan que los métodos de propagación *in vitro* permiten la obtención de una gran cantidad de plantas a partir de una planta madre en cortos periodos de tiempo, así como la disminución del espacio físico empleado para la propagación, disminución del tiempo de multiplicación de una planta y los costos del desarrollo que esta implica. En El Salvador para el año 2010 el cultivo de piña generó una producción de 3,145.77t en una superficie de 179.90 ha con un rendimiento de 17.48 t.ha⁻¹ y un consumo neto de 12,731.77t. La importación correspondió a 9,586.00t con un valor en fuga de divisas de US\$ 21032,000 (FAO 2013). Según Vicente Cruz presidente de la APPES este cultivo posee una alta rentabilidad para los productores, ya que para una ha se necesitan 35,714.28 hijos de los cuales se estima una pérdida del 5%, obteniendo al final un total de 33,928.57 piñas/

ha con un precio de US\$ 1.25 por unidad en el mercado local.¹

En esta investigación se evaluaron dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden, para mejorar la propagación del material genético y la calidad de las plantas.

Materiales y Métodos

Ubicación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería, desde el mes de Noviembre de 2012 hasta Abril de 2013. Las unidades en estudio fueron los Sistema de Inmersión Temporal con tiempos de cinco y 10 minutos de inmersión y el método convencional (medio semisólido).

Metodología de laboratorio

Material vegetativo

El material vegetativo de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) de la variedad Golden, que se utilizó para la investigación se obtuvo del Laboratorio de Biotecnología del CENTA, este material vegetal fue introducido al laboratorio a partir de yemas de la corona en el año 2010, utilizando un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) adicionado con 0.5 mg.l⁻¹ de BAP y 0.65 mg.l⁻¹ de Ácido Giberélico (AG3). Para el inicio de esta investigación se seleccionaron explantes en fase de multiplicación, que estaban en un medio semisólido MS adicionado con un mg.l⁻¹ de BAP. Los explantes seleccionados fueron aquellos con una altura promedio de dos cm, estos fueron cortados y separados de la base, desechando las partes necróticas y oxidadas. Posteriormente este material fue introducido al cuarto de incubación a temperatura promedio de 26 ± 1 °C, fotoperiodo de 16 horas luz e intensidad lumínica de 1500 lux. Después del periodo de establecimiento aséptico fueron transferidos al medio de multiplicación MS adicionado con un mg.l⁻¹ de BAP.

Fase de multiplicación

Para la elaboración de los medios de cultivo líquido y semisólido se usaron sales minerales de Murashige y Skoog (1962), adicionado con un mg.l⁻¹ de BAP (Bencilaminopurina), 30 g.l⁻¹ de sacarosa y pH de 5.7; en el caso de los medios semisólidos se adicionaron cuatro g.l⁻¹ de Phytigel una vez

¹ Cruz, V. 2012. Producción del cultivo de piña (entrevista). Santa María Ostuma, SV, APPES (Asociación de Productores de Piña de El Salvador).

fundido completamente, fue colocado en frascos de 100 ml de capacidad, dispensando 25 ml de medio por frasco y posteriormente fueron sellados con tapaderas magentas. El medio líquido fue colocado en frascos de vidrio de 400 ml de capacidad en donde se dispense 125, 150 y 300 ml de medio líquido en cada frasco para los ciclos I, II y III respectivamente y luego cada frasco fue tapado con papel aluminio. Los frascos con medio de cultivo líquido y semisólido, fueron esterilizados a 120 °C y 20 libras de presión durante 30 minutos en un autoclave marca YANG TA MIN®.

Una vez que los medios de cultivo semisólido y líquido fueron distribuidos en sus respectivos frascos y esterilizados en autoclave; en cada uno de los frascos de 400 ml para el medio líquido del Sistema de Inmersión Temporal, se sembraron la cantidad de 25 explantes con un peso promedio total de 7.52 g y una altura promedio de dos cm y en los frascos de 100 ml para medio semisólido del método convencional se sembraron cinco explantes con un peso promedio total de 1.55 g y una altura promedio de dos cm. Para esta actividad se utilizó la cámara de flujo laminar marca Thermo®, dicho equipo ayudo a mantener las condiciones asépticas idóneas para mantener un bajo porcentaje de contaminación. Para el método convencional medio semisólido al finalizar el segundo ciclo (56 días) después de la siembra en la fase de multiplicación se realizó una subdivisión de los brotes.

Al finalizar el tercer ciclo (84 días) después de la siembra en la fase de multiplicación para ambos métodos de micropropagación, Sistema de Inmersión Temporal y convencional, se realizó la toma de datos y las variables evaluadas fueron: peso fresco promedio de brotes (g), número promedio de brotes por explante y longitud promedio de brotes (cm).

Fase de desarrollo

Esta fase se realizó con el objetivo de favorecer el desarrollo de los brotes antes del enraizamiento; para dar inicio a esta fase se realizó nuevamente una selección de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación con una longitud aproximada de tres centímetros. El medio de cultivo líquido y semisólido empleado en la fase de desarrollo estuvo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) reducidas al 50% adicionado con 30 g.l⁻¹ de sacarosa, pH ajustado a 5.7 y sin la aplicación de hormona de crecimiento. Para el método convencional y el Sistema de Inmersión Temporal esta fase tuvo una duración de un ciclo de 28 días.

Fase de enraizamiento

Los explantes provenientes de la fase de desarrollo fueron transferidos a un nuevo medio de cultivo fresco para su enraizamiento. Únicamente los explantes producidos y desarrollados en el método convencional fueron limpiados antes de su resiembra en un nuevo medio de cultivo semisólido. Los Sistemas de Inmersión Temporal únicamente se les cambiaron los frascos de mantención del medio, con un nuevo medio de cultivo líquido. El medio de cultivo semisólido y líquido de esta fase estuvo constituido por las sales de Murashige y Skoog (1962) reducidas al 50% adicionado con un mg.l⁻¹ de AIB, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y pH ajustado a 5.7, esta fase tuvo una duración de un ciclo de 28 días y al finalizar se realizó la toma de datos y las variables evaluadas fueron: longitud promedio de brote (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíces.

Metodología de vivero

En esta etapa se desarrolló la fase de aclimatación de las vitroplantas provenientes de la fase de enraizamiento.

Fase de aclimatación para ambos métodos

Se utilizaron muestras de 10 vitroplantas por repetición, es decir 60 vitroplantas por tratamiento, haciendo un total de 180 vitroplantas por los tres tratamientos provenientes de la fase de enraizamiento, estas fueron extraídas de sus respectivos frascos y sometidas a un lavado para retirar el exceso de medio de cultivo en las raíces. Posteriormente las vitroplantas fueron trasplantadas en bandejas plásticas de 200 celdas con un volumen de 14 cc cada una y se distribuyeron e identificaron en sus respectivos tratamientos. El sustrato utilizado para el llenado de las bandejas fue una mezcla para germinación con la siguiente composición turba de esfagno (grande), perlita hortícola, lana de roca, cal dolomítica y calcítica, carga fertilizante inicial y agente humectante, luego fueron trasladadas al macrotunel y colocadas en un microtunel utilizado como propagador, en donde días antes de su utilización fue preparado y cubierto con plástico especial que ayudo a mantener la humedad relativa alta y este fue destapado a los ocho días después de haberse colocado las bandejas al interior del propagador. La duración de esta fase fue de 30 días a partir del trasplante, el manejo que se les dio a las vitroplantas fue únicamente la aplicación de riego tres veces por semana, una vez al día y una evaluación semanal de la sobrevivencia de las

vitroplantas. Al finalizar la fase se realizó la toma de datos y las variables evaluadas fueron: longitud promedio de explante (cm), longitud promedio de raíz (cm), número promedio de raíces y porcentaje de sobrevivencia (%).

Metodología estadística

El factor en estudio de la investigación lo constituyeron los sistemas de micropropagación; los tratamientos lo conformaron los sistemas con sus respectivos tiempos de inmersión del Sistema de Inmersión Temporal y el medio semisólido del método convencional. Quedando de la siguiente manera: T1 Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de cinco minutos de inmersión cada dos horas, T2 Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión cada dos horas y T0 método convencional medio semisólido. Para el análisis de los datos se aplicó el diseño estadístico completamente al azar con tres tratamientos y seis repeticiones y para determinar cuál de los tratamientos produjo los mejores efectos se aplicó la prueba estadística de Tukey. Para el análisis de la información generada en la investigación se utilizó el software estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1. Se trabajó con un nivel de confianza de 95%. Se utilizó el modelo estadístico: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$.

Metodología económica

Para el análisis económico de la investigación se utilizó el análisis de presupuesto parcial propuesto por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT (1988), el cual se fundamenta en los rendimientos medios, rendimientos ajustados, beneficios brutos de laboratorio y los costos que varían. También se utilizó el presupuesto parcial de beneficio neto de Ramírez (1994), el cual se fundamenta en la comparación de ganancias o ingresos adicionales de las tecnologías propuestas contra la tecnología que se aplica al momento de la investigación. Para el caso de esta investigación el tratamiento testigo lo constituye el método convencional (medio semisólido) y las alternativas propuestas Sistema de Inmersión Temporal con tiempos de cinco y 10 minutos de inmersión.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos durante el proceso de micropropagación de la piña se analizaron por cada fase.

Fase de multiplicación

En esta fase, el método convencional medio semisólido fue el que presentó el mayor peso fresco promedio final (g) y número promedio de brotes por

explante (Cuadro 1). Al respecto Escalona *et al.* (1999), manifiesta que con la aplicación de medios líquidos en el cultivo de piña, se puede triplicar el coeficiente de multiplicación. Para la variable longitud promedio de brotes (cm), el tratamiento que presentó mejores resultados fue el Sistema de Inmersión Temporal con diez minutos de inmersión, seguido del tratamiento Sistema de Inmersión Temporal con cinco minutos de inmersión y el método convencional medio semisólido.

Cuadro 1. Efecto de la evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña variedad Golden para las variables de la fase de multiplicación. TesisUES, Ciencias Agronómicas, 2013.

Variables evaluadas	Tratamientos	Calificación**	Medias	CV%
Peso fresco promedio final (g).	Medio semisólido	A	215.10*	20.28
	Inmersión 5 min.	B	96.45	
	Inmersión 10 min.	B	92.01	
Número promedio de brotes por explante.	Medio semisólido	A	17.60*	23.70
	Inmersión 5 min.	B	9.41	
	Inmersión 10 min.	B	8.58	
Longitud promedio de brote (cm).	Inmersión 10 min.	A	2.52*	12.90
	Inmersión 5 min.	B	2.03	
	Medio semisólido	C	1.37	

Significancia= 0.05 %; *Indican diferencias estadísticamente significativas; **Se aplicó la prueba de Tukey para visualizar el efecto de las medias en cada tratamiento en estudio.

Escalona *et al.* (1999), compararon la tasa de multiplicación en relación al peso fresco generado por los brotes de piña de la variedad Cayenne lisa, evaluando los medios de cultivo semisólido, líquido permanente y en inmersión temporal, obteniendo mejores resultados de peso fresco en el tratamiento con medio líquido en inmersión temporal con 200 ml/explante y con inmersiones de dos minutos cada tres horas, seguido del tratamiento con medio líquido permanente y medio semisólido; con medias de la masa por cultivo de 11 g, 2.75 g y 1.75 g respectivamente, en periodos de cuatro y siete semanas.

Estudios realizados por Jiménez (2005), al evaluar la respuesta de la longitud promedio de brotes de piña de la variedad MD-2 utilizando dos sistemas de propagación *in vitro* medio semisólido y líquido en Sistema de Inmersión Temporal, obtuvo después de ocho semanas de inoculados que los explantes iniciales presentaron longitudes promedios de 3.3 cm/brote en medio líquido en Sistema de Inmersión Temporal y 1.1 cm/brote en medio semisólido.

Los resultados presentados en la investigación al emplear el Sistema de Inmersión Temporal para las variables peso fresco promedio de brotes (g), número promedio de brotes por explante y longitud promedio de brotes

(cm) no concuerdan con los autores antes mencionados; posiblemente a los siguientes factores: en un principio para la fase de multiplicación se obtuvo estadísticamente un mayor número de brotes producidos en medio semisólido, esto se debió a que al desarrollar la metodología de subdivisión del material vegetativo para T0 (método convencional medio semisólido) demandó un mayor área de siembra aumentando de 0.84 m² a 2.52 m² generando por tal razón un mayor número de brotes al finalizar la fase de multiplicación. Posiblemente esto le permitió a T0 (método convencional medio semisólido) obtener más ventaja sobre T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de cinco minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) en donde no se realizó ninguna subdivisión del material vegetativo en la fase de multiplicación. Otro factor que pudo haber influido en los resultados obtenidos, fue el volumen de los frascos de vidrio utilizados en el Sistema de Inmersión Temporal, provocando la aglomeración del material vegetativo al interior de los frascos ya que no se realizó una subdivisión del material durante los tres ciclos que duró la fase, esto fue un factor negativo que inhibió la multiplicación y desarrollo de nuevos brotes de piña. Finalmente otro factor que incidió directamente a los resultados obtenidos en la investigación fueron las frecuencias y los tiempos de inmersión realizados, ya que por razones de logística administrativa donde se llevó a cabo la investigación no se complementaron las doce inmersiones como se recomienda técnicamente. Las inmersiones realizadas en el experimento se hicieron de forma manual, ya que no se contó con un sistema automatizado que ayuda a realizar las frecuencias y los tiempos de inmersión de forma continua para lograr las óptimas de un 100%, realizándose solamente el 33% de estas; siendo esto una de las limitantes en el Sistema de Inmersión Temporal para la multiplicación de brotes.

Fase de desarrollo

Esta fase no se evaluó estadísticamente ya que el objetivo fue favorecer el desarrollo y acondicionamiento de los explantes antes del traslado a la fase de enraizamiento, además se utilizó el medio Murashige y Skoog (1962) reducido al 50% y sin reguladores de crecimiento; obteniendo el 100% de sobrevivencia de los explantes para esta fase y se observó que no hubo formación de nuevos brotes en la base del explante.

Orellana (1997), utilizó el medio Wood Plant Medium (WPM) en presencia de 0.5% de carbón activado, 0.8% de agar y dos por ciento de sacarosa y libre de regulador de crecimiento, obtuvo un 100% de sobrevivencia de los brotes de plantas de Caoba (*Swietenia macrophylla*. King) y un 10%

de formación de raíces, observando también brotes bien desarrollados con buena coloración de hojas y tallos gruesos, no hay caída de hojas, mínima formación de callo en la base.

Fase de enraizamiento

Estadísticamente después de realizado el análisis de varianza se observó diferencias significativas entre los tratamientos en estudio. Es decir, que el Sistema de Inmersión Temporal y método convencional medio semisólido produjeron efectos diferentes para las variables: longitud promedio de explante (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíces y según la prueba de Tukey, los tratamientos que presentaron los mejores efectos fueron T2 (sistema de inmersión temporal con 10 minutos de inmersión) y T1 (Sistema de Inmersión Temporal con cinco minutos de inmersión, seguido de T0 (método convencional medio semisólido) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña variedad Golden para las variables de la fase de enraizamiento. Tesis. UES. Ciencias Agronómicas. 2013.

Variables evaluadas	Tratamientos	Calificación**	Medias	CV%
Longitud promedio de explante (cm).	Inmersión 10 min.	A	6.43*	16.72
	Inmersión 5 min.	A	5.94	
	Medio semisólido	B	3.63	
Longitud promedio de raíz (cm).	Inmersión 10 min.	A	2.15*	25.75
	Inmersión 5 min.	AB	1.85	
	Medio semisólido	B	1.28	
Número promedio de raíces	Inmersión 10 min.	A	6.83*	20.13
	Inmersión 5 min.	B	4.91	
	Medio semisólido	B	4.76	

Significancia= 0.05 %; *Indican diferencias estadísticamente significativas; **Se aplicó la prueba de Tukey para visualizar el efecto de las medias en cada tratamiento en estudio.

Suárez (2011), realizó estudios en micropropagación *in vitro* utilizando piña Híbrido MD-2 en medio líquido permanente, en donde evaluó dos tipos de corte y 10 concentraciones de AIA más sacarosa. Presentando la mayor longitud promedio de explante, el tratamiento con corte transversal, concentraciones de 0.75 mg.l⁻¹ de AIA y 45 g.l⁻¹ de sacarosa obteniendo un valor promedio de 2.18 cm. Estudios realizados por Blanco *et al.* (2011), al evaluar tres variedades de piña Eruwã Cana, Tabe Cana y Gobernadora utilizando medio semisólido sin reguladores de crecimiento en un periodo de ocho a 10 semanas; determinaron que las longitudes de las raíces formadas por las variedades de piña fueron significativas entre ellas.

Estudios realizados por Jiménez (2005), sobre la respuesta morfológicas de la piña (*Ananas comosus* L. Merr) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, menciona que a pesar de que los medios de cultivos en el que se desarrollaron los brotes de piña no fueron preparados para inducir el enraizamiento *in vitro*, aun así esta variable fué evaluada debido a la presencia de raíces a partir de la cuarta semana después de la siembra, obteniendo mejores resultados en medio líquido con un número promedio de raíz 2.3 y 0.80 en medio semisólido al termino de ocho semanas.

Los resultados presentados en la investigación al emplear el Sistema de Inmersión Temporal para las variables longitud promedio de explante (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíz por explante no concuerdan con los autores antes mencionados; posiblemente a los siguientes factores: finalizada la fase de multiplicación, se realizó una fase previa antes de la fase de enraizamiento denominada fase de desarrollo, ya que es de gran importancia para mejorar el desarrollo de los brotes como etapa previa de acondicionamiento para la formación de raíces en los brotes; se utilizó medio de cultivo con sales minerales MS reducido al 50% más 30 gr.l⁻¹ de sacarosa y un pH ajustado a 5.7 sin adición de hormona de crecimiento. Algunas veces es muy difícil enraizar los brotes después de la multiplicación debido al exceso de citocininas usadas en la fase de multiplicación o a la presencia de inhibidores endógenos; por tal razón la eliminación de estos factores puede realizarse mediante la transferencia de los brotes a un medio libre de hormona por un periodo corto, antes de exponerlos a la auxina que estimule el enraizamiento (Krikorian citado por Orellana 1997). Por tal motivo en la investigación se decidió realizar esta etapa ya que favoreció el desarrollo de los explantes, así mismo el enraizamiento de estos. Orellana (1997), menciona que los altos porcentajes de enraizamiento que se obtienen, así como también el número y longitud de raíces producidas, demuestran la efectividad no solo del procedimiento de enraizamiento utilizado, sino también de la integración de una etapa previa de desarrollo de los brotes o fase de acondicionamiento antes del enraizamiento.

La utilización del medio líquido en el Sistema de Inmersión Temporal permitió el baño constante de los explantes con el medio de cultivo, favoreciendo además al intercambio gaseoso en el interior de los frascos. Esto probablemente generó una mayor longitud promedio de explantes (cm), longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíces; superando al método convencional.

Fase de aclimatación

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, es decir, que el método del Sistema de Inmersión Temporal y el método convencional produjeron efectos diferentes en la longitud promedio de explantes (cm) y según la prueba estadística de Tukey el tratamiento que presentó el mejor efecto fué el Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos con una media igual a 8.80 cm, seguido de cinco minutos de inmersión y medio semisólido con medias de 7.81 y 7.23 cm respectivamente. Para las variables longitud promedio de raíz (cm) y número promedio de raíces no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, es decir que el método del Sistema de Inmersión Temporal y método convencional produjeron los mismos efectos en las variables evaluadas y que según la prueba estadística de Tukey, el tratamiento que presentó el mejor efecto fué T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión), seguido de T0 (método convencional medio semisólido) y T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de cinco minutos de inmersión) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña variedad Golden para las variables de la fase de aclimatación. Tesis. UES. Ciencias Agronómicas. 2013.

Variables evaluadas	Tratamientos	Calificación**	Medias	CV%
Longitud promedio de explante (cm).	Inmersión 10 min.	A	8.80*	10.77
	Inmersión 5 min.	AB	7.81	
	Medio semisólido	B	7.23	
Longitud promedio de raíz (cm).	Inmersión 10 min.	A	2.22	21.85
	Medio semisólido	A	2.05	
	Inmersión 5 min.	A	2.03	
Número promedio de raíz	Inmersión 10 min.	A	6.90	15.24
	Medio semisólido	A	6.75	
	Inmersión 5 min.	A	5.76	

Significancia= 0.05 %; *Indican diferencias estadísticamente significativas; **Se aplico la prueba de Tukey para visualizar el efecto de las medias en cada tratamiento en estudio.

Pineda *et al.* (2012), demostraron que utilizando un sustrato compuesto de tierra negra y arena lavada en una relación de 1:1 se obtienen longitudes promedios por explante de nueve y 15 cm; además presentó un 100% de sobrevivencia. Pérez *et al.* (1996), evaluaron cuatro sustratos; arena, escoria volcánica, pómez y mezcla a base de estiércol de bovino, tierra orgánica y arena de río en una relación 2:1:1 en el endurecimiento de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) propagadas *in vitro*, mostrando que el sustrato que mejor número promedio de raíz fué la arena con 12.17 raíces.

Estudios realizados por Garita y Gómez (2000), sobre la Micropropagación de piña variedad Champaka F-153 evaluaron en la fase de aclimatación el efecto de diferentes sustratos y observaron que el sustrato de fibra de coco molida presentó los mejores resultados en longitud promedio de raíz (2.06 cm).

Los resultados presentados en la investigación al emplear el Sistema de Inmersión Temporal y método convencional para la variable longitud promedio de raíz (cm) fueron muy similares a los obtenidos por Garita y Gómez (2000); los datos presentados en las variables longitud promedio de explantes (cm) y número promedio de raíces no coincidieron con los de Pineda *et al.* (2012) y Pérez *et al.* (1996), siendo estos mayores que los obtenidos por ambos métodos en la investigación y para la variable porcentaje de sobrevivencia (%) los resultados concuerdan con los planteados por Pineda *et al.* (2012), posiblemente a los siguientes factores: al trasladar las vitroplantas del laboratorio de cultivo de tejidos al área de invernadero requieren que se les proporcionen las condiciones idóneas para que puedan aclimatarse y desarrollarse, una de estas es la humedad relativa ya que las plantas cultivadas *in vitro* tienen generalmente la cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa, 90-100% que se da *in vitro* (Hartman y Kester 1985). Por tal razón los primeros días son determinantes ya que las vitroplantas deben ser colocadas en un propagador que debe estar cerrado por un cierto tiempo (ocho días), para que las vitroplantas se acostumbren a las condiciones *ex vitro*.

Ahuja citado por Orellana (1997), menciona que la transición entre el ambiente *in vitro*, con un 100% de humedad relativa, a un ambiente *ex vitro* con un porcentaje de humedad menor, es un factor crítico para la sobrevivencia de las plántulas. Además las plántulas *in vitro* viven en un ambiente heterótrofo, donde el medio de cultivo suple los azúcares y otros nutrientes para su desarrollo. Las hojas de estas plántulas, a pesar de ser verdes, probablemente no son completamente activas para fotosintetizar, no poseen capa cerosa ni cutícula, los que las hace más susceptibles durante la fase de aclimatación. Otro factor importante es el tipo de sustrato donde se trasplantarán las vitroplantas de piña.

Hepton citado por Pérez *et al.* (2011), menciona que el drenaje y eliminación del agua son necesarios para el crecimiento de la piña, ya que el sistema radical es intolerante a los suelos mal aireados y que los ideales deben tener alto contenido de materia orgánica con excelente drenaje interno y alto contenido de aire para proveer cantidades óptimas de agua, nutrientes y

oxígeno a las raíces de la plantas.

Con esta fase se cierra la micropropagación de plantas de piña por medio de cultivo de tejidos; y los resultados muestran que a los 12 meses están listas para su trasplante a campo (Fig. 1).



Figura 1. Fases para la micropropagación de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad Golden en el laboratorio de cultivo de tejido y aclimatación en invernadero. 1. Brotes de piña multiplicados en el Sistema de Inmersión Temporal; 2. Inmersión de los explantes durante la fase de desarrollo; 3. Desarrollo de raíces en brotes multiplicados y desarrollados *in vitro*; 4. Aclimatación de vitroplantas en condiciones ambientales semicontroladas; 5. Plantas de piña listas para trasplante a campo doce meses después de iniciada la multiplicación *in vitro*.

Análisis económico

En toda investigación aquellos tratamientos que pueden presentar los mejores efectos desde el punto de vista estadística, no son siempre los que presentan la mejor relación beneficio-costos. Además un elemento que es determinante para que un productor seleccione este tipo de material es la rentabilidad que genere la tecnología. Por tanto, un análisis económico le permite al productor tomar la mejor opción tecnológica. Esta mejor opción se determina muy fácilmente a través del análisis de presupuesto parcial (Cuadro 4) y el beneficio neto que se obtiene de comparar las ganancias o ingresos adicionales de cada una de las tecnologías propuestas en comparación con los costos adicionales de la tecnología que se aplica en el momento de la investigación (tratamiento testigo) (Cuadro 5). Para cada fase de micropropagación se obtuvieron resultados del presupuesto parcial, seguido del presupuesto neto y se presentan a continuación.

Cuadro 4. Análisis de presupuesto parcial para las fases de multiplicación, desarrollo y enraizamiento mediante dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananás comosus* L. Merr) variedad Golden.

Fases	Tratamientos	Beneficios brutos de laboratorio USDS.	Total de costos que varían USDS.
Multiplicación	Medio semisólido.	212.18	51.19
	Inmersión 5 min.	355.82	31.35
	Inmersión 10 min.	324.57	31.95
Desarrollo	Medio semisólido.	56.70	13.71
	Inmersión 5 min.	56.70	10.15
	Inmersión 10 min.	56.70	10.35
Enraizamiento	Medio semisólido.	75.60	13.71
	Inmersión 5 min.	75.60	10.15
	Inmersión 10 min.	75.60	10.35

Cuadro 5. Presupuesto parcial de beneficio neto para T1 y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 5 y 10 minutos de inmersión) comparado con T0 (Testigo método convencional medio semisólido) en las fases de multiplicación, desarrollo y enraizamiento.

Fases	Tratamientos	Cambio en el ingreso neto USDS.
Multiplicación	Inmersión 5 min.	163.48
	Inmersión 10 min.	131.63
Desarrollo	Inmersión 5 min.	3.56
	Inmersión 10 min.	3.36
enraizamiento	Inmersión 5 min.	3.56
	Inmersión 10 min.	3.36

Para la fase de multiplicación se obtuvo rendimiento medio para T0 (método convencional medio semisólido) de 1684 brotes, T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de cinco minutos de inmersión) y T2 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) de 2824 y 2576 brotes, para cada uno de los tratamientos, se utilizó un área de 0.84 m². Para las fases de desarrollo y enraizamiento se mantuvieron las mismas unidades experimentales de 300 brotes iniciales en un área de 0.84 m² para cada uno de los tratamientos en estudio. El Sistema de Inmersión Temporal utilizado en la investigación no logró igualar la eficiencia óptima de los Sistemas de Inmersión Temporal Automatizados como RITA® y BIT® en relación a una mayor producción de brotes, a pesar de todas las limitantes antes mencionadas en el Sistema de Inmersión Temporal se logró evidenciar en todas las fases la superioridad económica sobre el método convencional medio semisólido obteniendo beneficios netos para T1 (Sistema de Inmersión Temporal con tiempo de cinco minutos de inmersión) y T2 (Sistema de

Inmersión Temporal con tiempo de 10 minutos de inmersión) de USDS\$ 163.48 y 131.63. Con estos resultados se confirma una vez más que el cambio propuesto de utilizar el Sistema de Inmersión Temporal con tiempos de cinco y 10 minutos de inmersión son rentables y producen un aumento considerable en el ingreso neto que al utilizar el método convencional medio semisólido. De acuerdo con Cruzat (2009), el uso de las técnicas de propagación actuales se ha fundamentado en optimizar las herramientas de micropropagación *in vitro* con la finalidad de obtener mejoría tanto en los procesos como en la inversión económica enfocándose principalmente en la reducción de los costos y mejoramiento de la rentabilidad de los sistemas de micropropagación. Si bien la micropropagación convencional representa un sistema adecuado para la masificación de la producción de plantas en periodos cortos de tiempo, presenta también una limitante que corresponde al alto costo de la planta (Paredes citado por Albarracín 2012). Este costo se atribuye principalmente a dos factores tales como: agente gelificante y alto costo por mano de obra. Albarracín (2012), determinó que para la multiplicación de plantas de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) utilizando el método convencional y Sistema de Inmersión Temporal, al efectuar el análisis de costo, obtuvo que el porcentaje correspondiente a costo por el uso de agar asciende a un 84.28% del medio de cultivo; es decir, este compuesto utilizado en el medio semisólido, y respecto al medio de cultivo líquido empleado en el sistema de inmersión temporal se prescinde de agar. Además el costo por planta multiplicada en medio semisólido es de 0.10 centavos de dólar mientras que al emplear sistemas de inmersión temporal el costo se reduce a 0.01 centavos de dólar, si bien la inversión inicial de implementación del Sistemas de Inmersión Temporal es alta, el beneficio-costos de su uso aumenta significativamente en cuanto al costo de producción.

Conclusiones

Esta investigación concluye que para la micropropagación de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden, utilizar en la fase de multiplicación un tiempo de inmersión de cinco minutos cada dos horas. Para el mejor desarrollo de brotes y raíces de buena calidad el tiempo de inmersión óptimo es de 10 minutos cada dos horas. En la fase de aclimatación se obtuvo un 100% de sobrevivencia de las vitroplantas de piña utilizando un sustrato para germinación.

El Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de cinco minutos de inmersión cada dos horas presento la mejor relación Beneficio-Costo para la micropropagación masal de piña variedad Golden.

Recomendaciones

En la fase de multiplicación, para el Sistema de Inmersión Temporal utilizar frascos de mayor volumen que permita la multiplicación y desarrollo de nuevos brotes, sin necesidad de realizar subdivisiones del material vegetativo durante tres ciclos. Es necesario contar con un sistema automatizado que realice las frecuencias y tiempo de inmersión programada para obtener una mejor eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal en las fases de multiplicación, desarrollo y enraizamiento.

Agradecimientos

Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) por brindarnos sus instalaciones para la ejecución de la investigación.

Bibliografía

- Albarracín Acosta, CP. 2012. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC, 203 p.
- Blanco HA; Vargas TE; Garcia E de. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. Revista Interciencia. 36(6)437-443.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, MX). 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. Distrito Federal, MX. 79 p.
- Cruzat, GR. 2009. Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Chile. Ograma Ltda. p. 8-10.
- Escalona M; Lorenzo JC; Gonzalez B; Daquinta M; González J; Borroco GC; Disjardins Y. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). Plant propagation in temporary inmersión system. Plant Cell Rep. 18:743-748.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2013. FAOSTAT: División de estadística (en línea). Roma, IT. Consultado 10 Abr. 2013. Disponible en <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>.
- Garita H; Gómez L. 2000. Micropropagación de la variedad piña champaka F-153. Revista Agronomía costarricense. 001(24):63-73.
- Hartman, HT; Kester, DE. 1985. Propagación de las plantas: principios y prácticas. Trad. A Marino. México, CONTINENTAL. p 639-666.
- Henríquez, P; Hernández, C. 2008. IV concurso de sistematización de experiencias exitosas en agronegocios rurales en América Latina: asociación de productores de piña de El Salvador (APPES), iniciativa de asociatividad y gestión. San Salvador, SV, IICA. p. 1-6.
- Jiménez Palma, R. 2005. Respuesta morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Bach. Ing. en Agro. San Carlos, CR. Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica. 64 p.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José, CR, IICA. 522 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Orellana Núñez MA. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla*, King). Tesis Mag. Sci. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. p. 17-21.
- Pérez Fernández, N; Galindo Menéndez, L; Peláez Peláez; M; Rodríguez Obrador; E. 2011. Evaluación del comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en fase de aclimatación. Innovación Tecnológica. 17(4):1-11.
- Pérez Flores JR; Flores Coto JC; Correa Guillen BM. 1996. Evaluación de cuatro sustratos y tres tamaños de plantas diferentes en el endurecimiento de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) propagadas *in vitro*. Tesis Ing. Agr. San Salvador, SV. UES. p. 56-99

- Pineda A; Vargas TE; Escala M; García E de. 2012. Organogénesis *In vitro* en piña “Española Roja” y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro* 24(3):175-186.
- Ramírez, O. 1994. El uso de presupuestos parciales en el manejo integrado de plagas (Hoja Técnica). *Manejo integrado de plagas*. 11: i-iv.
- Roca, WM; Mroginski, LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CO, CIAT. p. C3.41-C5.95-C10.239.
- Sandoval Delgado, IA. 2010. Guía técnica del cultivo de la piña. Múltiples. El Salvador, CENTA. 23 p.
- Suárez Haro, FE. 2011. Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Tesis Ing. Agr. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 61 p.