



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**Organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr.
Ecotipo Gobernadora. Indicadores morfo-
anatómicos foliares y bioquímicos fotosintéticos**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por el bachiller

Mariana Andrade Briceño como
requisito parcial para optar al título de

Licenciado en Biología.

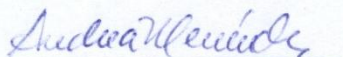
Tutores: Dra. Teresa Edith Vargas y Dr. Héctor Blanco

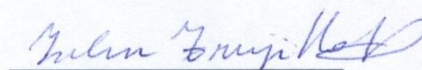
Caracas, Julio 2019

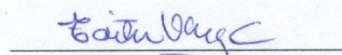
DEL EXÁMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA Br. Mariana
Gabriela Andrade Briceño

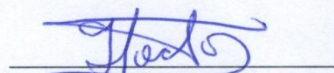
Quienes suscribimos, miembros del Jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Mariana Gabriela Andrade Briceño, C.I. V.- 22.440.773, titulado: "**Organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr. Ecotipo Gobernadora. Indicadores morfo-anatómicos foliares y bioquímicos fotosintéticos**", para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veinticinco días del mes de julio del año 2019, dejando constar que la Dra. Teresa Edith Vargas y el Dr. Héctor Blanco actuaron como coordinadores del Jurado Evaluador.


Dra. Andrea Menéndez
(Jurado)


Dra. Iselen Trujillo
(Jurado)


Dra. Teresa Edith Vargas
(Tutora)


Dr. Héctor Blanco
(Tutor)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme salud, fortaleza, constancia, firmeza y todas las condiciones que hicieron posible el poder culminar satisfactoriamente mi carrera universitaria.

A la Dra. Eva de García, por creer en mí y abrir las puertas del laboratorio en donde se llevó a cabo la realización de éste trabajo.

A mis queridos tutores, la Dra. Edith Vargas y el Dr. Héctor Blanco. Gracias por confiar en mí y saber guiarme con paciencia y dedicación a lo largo de toda mi experiencia como su asesorada. Gracias por su entrega en mi aprendizaje, por compartir su sabiduría y por impulsarme a ser cada día mejor teniendo siempre presentes la humildad y el cariño. Los admiro, respeto y también los considero grandes amigos.

A los miembros de mi jurado, la Dra. Andrea Menéndez y la Dra. Iselen Trujillo. Gracias por sus aportes y correcciones para que éste fuese un trabajo excelente.

A mi universidad, gracias por permitirme formarme en ella y finalmente convertirme en un ser profesional en lo que tanto me apasiona. Del mismo modo, gracias a cada profesor contribuyó con éste hermoso proceso de formación; solo ustedes pueden brindarnos el tesoro más valioso que existe y que nadie puede quitarnos, la educación.

A Ramírez, V. y a Castillo, J. Gracias por su confianza y por creer en mí desde el principio.

A mi familia, en especial a mis padres. Gracias mamá y papá por el amor brindado y por el interés con el que cada día se preocuparon por el desarrollo y avance de éste trabajo, gracias por ser los promotores de mis sueños y por creer en mí y en mis expectativas. Gracias

por siempre desear y anhelar lo mejor para mí y por cada una de sus palabras de guía y apoyo durante cualquier meta y escenario de mi vida.

A mis amigos, pues familia también son esas personas que crecen y se transforman contigo, así no tengan la misma sangre. Gracias a quienes estuvieron presentes durante toda y la mayor parte de ésta carrera, así como también a quienes llegaron durante la última etapa, la realización de éste trabajo. Gracias por formar parte de muchos de los mejores momentos de mi vida, hasta ahora, tanto dentro como fuera de mi universidad.

A todas las personas que la vida puso ante mí y fueron partícipes de éste proceso, ya sea de manera directa o indirecta, pues cada una de ellas realizó su aporte que el día de hoy se ve reflejado en la culminación de ésta carrera.

I. TABLA DE CONTENIDO

I.	TABLA DE CONTENIDO	5
II.	ÍNDICE DE TABLAS.....	7
III.	ABREVIATURAS	9
IV.	RESUMEN.....	11
1.	INTRODUCCIÓN.....	13
2.	ANTECEDENTES	18
2.1.	Descripción botánica de <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.....	18
2.1.1.	Taxonomía.....	18
2.1.2.	Origen.....	18
2.1.3.	Morfología y anatomía.....	18
2.2.	Importancia económica.....	20
2.3.	Cultivo tradicional de piña	21
2.4.	Cultivo <i>in vitro</i> de la piña.....	22
2.5.	Pigmentos fotosintéticos.....	34
3.	OBJETIVOS	39
3.1.	Objetivo General.....	39
3.2.	Objetivos Específicos.....	39
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.1.	Material Vegetal	40
4.2.	Obtención del explante.....	40
4.3.	Medios de cultivo	41
4.3.1.	Medios de inducción de Organogénesis.....	41
4.3.2.	Medio de cultivo utilizado para la multiplicación <i>in vitro</i>	42
4.4.	Siembra de los explantes	42
4.5.	Observaciones	42
4.6.	Aclimatización.....	43
4.7.	Estudio morfo-histológico del proceso y morfo-anatómico foliar	43
4.8.	Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos	44
4.8.1.	Extracción de pigmentos fotosintéticos	44
4.8.2.	Cuantificación de los pigmentos.....	46

4.8.3.	Análisis morfométrico	46
4.9.	Caracterización microclimática del ambiente <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	46
4.9.1.	Condiciones de cultivo	47
4.10.	Análisis de resultados	48
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1.	Establecimiento del cultivo	49
5.2.	ORGANOGENÉESIS	52
5.2.1.	Inducción de callo	52
5.2.2.	Regeneración	56
5.2.3.	Multiplicación	67
5.3.	Aclimatación	74
5.4.	Estudio morfo-anatómico foliar	78
5.5.	Pigmentos fotosintéticos	88
5.5.1.	Análisis morfométrico	95
5.6.	Caracterización microclimática del ambiente <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	97
6.	CONCLUSIONES	102
7.	RECOMENDACIONES	103
8.	BIBLIOGRAFÍA	104

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la inducción de callo organogénico en <i>A. comosus</i> Ecotipo Gobernadora.....	41
Tabla 2. Medio de cultivo utilizado en la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes obtenidos durante la fase de regeneración	42
Tabla 3. Efecto de los diferentes medios de cultivo sobre la inducción de la formación de callo organogénico en explantes de <i>Ananas comosus</i> ecotipo Gobernadora.	54
Tabla 4. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de organogénesis en los explantes de <i>Ananas comosus</i> ecotipo Gobernadora a los 4 meses de cultivo.	60
Tabla 5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la etapa de regeneración de brotes a partir de los segmentos de callo formados en los distintos explantes en cada medio ensayado a los 6 meses de cultivo.....	62
Tabla 6. Longitud promedio de los brotes a los 4 y a los 6 meses de cultivo.	65
Tabla 7. Comparación estadística de la respuesta organogénica al final de las etapas de inducción de CO (8 semanas) y regeneración (6 meses).	67
Tabla 8. Multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de piña ecotipo Gobernadora obtenidos durante la etapa de regeneración a partir del CO inducido en el medio MS5.....	70
Tabla 9. Datos de las raíces obtenidas durante la multiplicación de los brotes para un tiempo de cultivo de 6 meses.	72
Tabla 10. Caracterización morfo-anatómica foliar de las plantas de <i>Ananas comosus</i> ecotipo Gobernadora.	82
Tabla 11. Contenido de PF en los 4 grupos de plantas de <i>Ananas comosus</i> ecotipo Gobernadora.	88

Tabla 12. Caracteres morfométricos evaluados en plantas de piña ecotipo Gobernadora: plantas madre, plantas hijas obtenidas por organogénesis mantenidas *in vitro* y luego de 30 y 45 días de transferidas a condiciones de vivero. 95

III. ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético

2ip: 2-isopentilamina

AG3: ácido giberélico

AIA: ácido indolacético

ANA: ácido naftalenoacético

BA: benciladenina

Cl a: clorofila a

Cl b: clorofila b

Cl (a+b): clorofilas totales

C (x+c): carotenoides (xantofilas + carotenos)

CO: callo organogénico

HCl: ácido clorhídrico

NaOH: hidróxido de sodio

IBA: ácido indolbutírico

KIN: cinetina

MS: medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (1962)

PF: pigmentos fotosintéticos

PIC: picloram

TDZ: thidiazuron

TOI: tejidos organogénicamente inducidos

IV. RESUMEN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), es una planta perteneciente a la familia Bromeliaceae, cuyo fruto es apreciado por ser una fuente importante de vitaminas C, B1, B6, ácido fólico y minerales. Sin embargo, la disminución de la producción anual en Venezuela debida, en gran medida, a que el mercado de la piña está restringido al método de cultivo tradicional (siembra de propágulos) y a su susceptibilidad al ataque de una amplia gama de patógenos, postulan a ésta especie como candidato ideal para el cultivo *in vitro*. En Venezuela, dentro de los 11 ecotipos de piña cultivables en el estado Amazonas, Gobernadora destaca por presentar una serie de características favorables desde el punto de vista productivo. El presente trabajo tuvo como objetivo regenerar plantas de piña del Ecotipo Amazónico Gobernadora vía Organogénesis *in vitro*, estudiar cambios morfo-anatómicos foliares que puedan derivar de las condiciones de cultivo *in vitro* y evaluar si el contenido de pigmentos fotosintéticos (PF) puede emplearse como indicador bioquímico confiable de aclimatación *ex vitro* de las plantas regeneradas. Bases de hojas se cultivaron en medio MS, suplementado con combinaciones distintas de 2,4-D y BA. Adicionalmente, se determinó el contenido de PF en la planta madre, en las plantas hijas mantenidas *in vitro* y las transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación. Las secciones de base foliar solo formaron CO en los medios MS suplementados con 2,4-D en combinación con BA. La regeneración de los brotes ocurrió en los mismos medios empleados en la etapa de inducción y de todos los medios ensayados, el medio MS1 (MS con 0,5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BA) se sugiere como mejor sistema de regeneración. Se logró un 100% de aclimatación utilizando como sustrato arena lavada y tierra negra abonada en proporciones 1:1. El análisis anatómico foliar permite sugerir que, las plantas obtenidas *in vitro* reducen la heterotrofia y se vuelven fotosintéticamente competentes a los 3 meses de transferidas a vivero. En cuanto al contenido de PF, se obtuvo que 45 días

bajo condiciones *ex vitro*, fue un tiempo insuficiente para la aclimatación del aparato fotosintético del ecotipo Gobernadora. De modo que, el contenido de PF fue un indicador bioquímico confiable de aclimatación.

Palabras clave: aclimatación *ex vitro*, cultivo *in vitro*, ecotipo, morfo-anatomía foliar, organogénesis *in vitro*, pigmentos fotosintéticos, piña.

1. INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne perteneciente a la familia Bromeliaceae, compuesta de 46 géneros y 2.000 especies aproximadamente. A ésta especie pertenecen todos los cultivares, variedades e híbridos de uso comercial y la misma es originaria de las zonas tropicales de Brasil (Cerrato, 2013). La piña es el segundo cultivo tropical más importante en la producción mundial después del banano (*Musa sp*), aportando más del 20% del volumen mundial de frutos tropicales (Renata, 2015).

Durante los últimos 100 años, la piña se ha convertido en uno de los principales cultivos frutícolas comerciales de los trópicos y éste incremento en su demanda surge por presentar ciertas características y propiedades tales como su agradable sabor y alto contenido de fibra, pero, sobre todo, porque es una fuente importante de vitaminas C, B1, B6, ácido fólico y minerales como el potasio. Principalmente, se le conoce por ser una fruta diurética que contribuye a la eliminación de toxinas y por constituir una excelente fuente de fibra (Cerrato, 2013). En adición, la piña contiene enzimas dentro de las que destaca la bromelaína o bromelina, un complejo enzimático de acción proteolítica que contiene azufre y se extrae del tallo y del fruto, el cual ya ha sido utilizado en la industria farmacéutica como un favorecedor en el proceso digestivo y, adicionalmente, en el campo clínico tiene potencialidades antiinflamatorias, antitrombóticas y fibrinolíticas (Chinchilla, 2014).

La piña que se produce a nivel mundial se consume, tradicionalmente, como fruta fresca, aunque con la evolución de los mercados y el cambio en las preferencias de los consumidores, el rubro se ha ido industrializando encontrándose hoy día como rodajas envasadas, jaleas, mermeladas y jugos (Cerrato, 2013).

Los cultivares de piña de mayor importancia cultivados en el ámbito mundial son: ‘Cayena Lisa’, ‘Queen’ y ‘Española Roja’ (Saucedo y col., 2008). En Venezuela, el mercado de piña es dominado por el cultivar ‘Española Roja’ y otros grupos de piña sólo están restringidos a las localidades donde son cultivadas (Montilla de Bravo y col., 1997). En el estado Amazonas, la piña es el segundo rubro de mayor predominancia dentro de las áreas de siembra tradicionales, siendo los aborígenes, principalmente de la etnia PIAROA, quienes cultivaban distintos ecotipos de piña lo cual constituye parte de su cultura ancestral y su principal sustento económico (Betancourt, 2006). A pesar de ser ésta la principal actividad económica, el cultivo de piña por los aborígenes se ha venido realizando a menor escala debido a carencias tecnológicas que no le permiten aumentar la producción de este rubro vegetal (Montilla de Bravo y col., 1997).

Dentro de los 11 ecotipos de piña cultivables en el estado Amazonas, el ecotipo Gobernadora destaca por presentar características favorables desde el punto de vista productivo, como un fruto que puede llegar a pesar hasta 3 kg, pero cuyas proporciones no afectan el sabor de la pulpa, y un color y forma que son considerados atractivos para los productores. Debido a esto, de los 6 ecotipos más sembrados en la comunidad Betania de Topocho del municipio Atures (estado Amazonas), destaca, con un aporte porcentual significativo (77,58%), el ecotipo Gobernadora. (Betancourt, 2006).

En la mayoría de las plantaciones comerciales, las plantas no pueden producir más de dos o tres cultivos, debido a una reducción en el tamaño y la uniformidad de los frutos. Entonces, una nueva plantación debe ser establecida regularmente. (Coppens y col., 2003). La semilla de piña (propágulos que se desarrollan a lo largo del eje de la planta, el pedúnculo y la parte superior de la infrutescencia) que es utilizada por los agricultores para la siembra de nuevas áreas, es obtenida de sus propias plantaciones y/o de otros piñicultores. En general, los

productores no realizan un buen manejo a la semilla, (no hacen selección de plantas madres, ni la clasifican por tamaño). Sumado a esto, en el cultivo de piña se presentan algunas enfermedades que causan daños económicos, y en algunos casos son de difícil control por medio de labores culturales y químicas (Botero, 2015; Balza, 2016). Debido a ésta serie de factores, la propagación de plantas de piña por el método convencional (siembra de propágulos) produce un número muy limitado de propágulos lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para el cultivo a gran escala.

Toda ésta problemática que deriva de la propagación de plantas de manera convencional, ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de propagación que permitan acelerar la producción de propágulos para la siembra en el campo, entre los cuales cabe señalar el cultivo “*in vitro*” de tejidos vegetales, el cual constituye una técnica que permite mejorar sustancialmente el proceso de multiplicación y su éxito a escalas comerciales depende de la habilidad de transferir las plantas a condiciones *ex vitro* y la obtención de una alta tasa de supervivencia de las plantas (Hazarika, 2006; Saucedo y col., 2008).

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (Universidad Central de Venezuela), se logró el establecimiento de un protocolo de micropropagación de plantas de piña de los ecotipos amazónicos Tabë Känä, Eruwä Känä y Gobernadora, mediante el cultivo de yemas axilares y apicales de coronas e hijuelos basales de infrutescencia provenientes del campo de cultivo (Blanco y col., 2011). Este material sirvió para estudios posteriores sobre regeneración de plantas de piña. En el mismo laboratorio se logró establecer protocolos adecuados para la regeneración *de novo* de plantas de piña de Tabë Känä (ecotipo amazónico) y ‘Española Roja’ (cultivar comercial) mediante embriogénesis somática y organogénesis (Pineda, 2009). Por otra parte, Blanco (2015) logró establecer sistemas eficientes de regeneración *in vitro* de plantas de piña de los ecotipos

Gobernadora y Erüwä Känä, vía Embriogénesis Somática y Organogénesis, caracterizando ambas vías morfogénicas mediante estudios morfo-histológicos, y evaluó el efecto de los sistemas de cultivo *in vitro* sobre la estabilidad estructural y genética de las plantas regeneradas mediante análisis morfo-anatómico foliar, citogenético y molecular. Dentro de las recomendaciones del trabajo realizado por Blanco (2015), se tiene la de ensayar medios de cultivo con ANA y BA para organogénesis en el ecotipo Erüwä Känä y medios con 2,4-D y BA para organogénesis en el ecotipo Gobernadora, con el objetivo de evaluar el efecto del genotipo sobre la respuesta organogénica del explante. En la presente investigación, se realizara la evaluación de la respuesta organogénica para el ecotipo Gobernadora haciendo uso de dichos medios.

Aunado a lo anterior, se tiene que en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales las plántulas micropropagadas necesitan un período de aclimatación inmediatamente después de su remoción del ambiente *in vitro*, el cual les permitirá adaptarse a las condiciones de cultivo en campo. La dificultad de transición del mecanismo heterotrófico al autotrófico en plantas micropropagadas, en virtud de las alteraciones genéticas, anatómicas y fisiológicas inducidas por las condiciones *in vitro*, puede afectar la sobrevivencia de las plantas, por lo que se requiere la realización de determinadas investigaciones para lograr el éxito en la aclimatación (Campostrini y Otoni, 1996; citado por Santa Cruz y col., 2006).

Santa Cruz y col. (2006), señalan que el término adaptación ha sido utilizado en botánica para describir caracteres asociados a determinadas condiciones ambientales. De acuerdo con esto, se tiene que el estudio de las adaptaciones fisiológicas de los organismos al medio ambiente permite comprender los mecanismos o procesos que explican algunas respuestas ecológicas, siendo posible de este modo determinar las condiciones para desarrollo de una especie, ecotipo, cultivo o incluso, de variedades dentro de un cultivo, contribuyendo así a

mejorar su productividad (Melgarejo y col., 2010). Dentro de estos estudios, se tiene que el contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de área de las hojas constituye uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que el mismo representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y de su eficiencia (Huang y col., 2004; García y col., 2005), por lo tanto, la evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos podría constituir una herramienta capaz de ser empleada como un indicador confiable de aclimatación de las plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro*.

Con base en los motivos antes expuestos, se planteó como objetivo general del presente trabajo regenerar plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. Ecotipo Gobernadora) vía Organogénesis *in vitro*, estudiar los cambios morfo-anatómicos foliares que puedan presentar las plantas producto de las condiciones de cultivo *in vitro* y evaluar si el contenido de pigmentos fotosintéticos se puede emplear como un indicador bioquímico confiable de aclimatación *ex vitro* de las plantas regeneradas.

2. ANTECEDENTES

2.1.Descripción botánica de *Ananas comosus* (L.) Merr.

2.1.1. Taxonomía

La piña es una planta herbácea perenne de la clase Liliopsida (monocotiledóneas) perteneciente al orden Bromeliales, familia Bromeliaceae, subfamilia Bromelioideae y su nombre científico es *Ananas comosus* (L.) Merril (Contreras, 2001; Dias y col., 2007). Recientemente, Coppens d'Eeckenbrugge y Leal (2003) han revisado la taxonomía de la piña, proponiendo un género, *Ananas*, con dos especies *Ananas comosus* (L.) Merr., y *Ananas macrodontes* Morren. Sin embargo, *Ananas comosus* es la única especie en la familia Bromeliaceae cultivada comercialmente por su fruto. Dentro de sus nombres comunes se encuentran: piña (español), abacaxi (portugués), annachi pazham (tamil) o nanas (malayo) (Paull y Duarte, 2011).

2.1.2. Origen

La piña de América o ananás era una planta esencial para los indígenas americanos, siendo un cultivo precolombino antiguo que los europeos solo conocerían después del segundo viaje de Colón y sus hombres, cuando desembarcaron en la isla de Guadalupe en 1493 (Coppens y col., 2003). La exploración temprana realizada por botánicos en América del Sur, indicó que el área de origen era el sureste de Brasil, Paraguay y el norte de Argentina, esto debido a la abundancia de especies silvestres.

2.1.3. Morfología y anatomía

Ananas comosus es una planta herbácea, perenne, cuya inflorescencia terminal da origen a un fruto múltiple. Después de la maduración del primer fruto, *A. comosus* produce varios propágulos, uno de ellos se origina de yemas axilares ubicadas por encima del suelo (brotes

laterales o bulbos), otros se originan de yemas ubicadas en la base de la planta (bulbillos) y otros a partir del pedúnculo floral y la corona. Todo esto da origen a nuevos ejes de crecimiento capaces de producir otra infrutescencia. Por último, el pedúnculo se dobla debido a esta masa y las coronas y los bulbillos alcanzan el suelo y pueden enraizarse. De éste modo, la misma planta puede dar una secuencia de varios ciclos de producción y es así como la mayoría de las poblaciones naturales parecen consistir en un solo clon, que se expande como si se propagara por estolones (Coppens y col., 2003).

Ananas comosus presenta un tallo alargado con una longitud de 25 a 50 cm (Coppens y col., 2003). El sistema radicular subterráneo es relativamente denso y por lo general se extiende hasta una profundidad de 15 a 30 cm (Paull y Duarte, 2011).

Las hojas se producen en espiral alrededor del tallo en una roseta compacta. Al contar desde una hoja o brote en un nodo seleccionado en el tallo hacia arriba en una espiral, la hoja número 13 o brote estará directamente arriba de la hoja o brote inicial, tras lo cual se habrán realizado cinco vueltas alrededor del tallo, lo que resultará en una filotaxis del tipo 5/13 (Bartholomew y Kadzimin, 1977, citado por Paull y Duarte, 2011). Las hojas son ensiformes (forma de espada; hoja con bordes paralelos), excepto las apicales jóvenes, más anchas en su base (Coppens y col., 2003).

La inflorescencia es terminal y puede consistir en hasta 200 flores individuales. Los frutos se desarrollan a partir de flores que no se desprenden y cada flor está subtendida por una bráctea carnosa (Paull y Duarte, 2011).

El fruto (infrutescencia), definido como conocarpo (un fruto múltiple derivado de ovarios, partes florales y receptáculos de muchas flores fusionadas), está coronado por un tallo frondoso denominado corona. El exocarpo de la fruta está compuesto principalmente por los

tejidos de los sépalos y las brácteas, mientras que la porción carnosa comestible está compuesta principalmente por ovarios (Paull y Duarte, 2011).

2.2.Importancia económica

La piña es una de las frutas tropicales más importantes en la producción mundial, después del banano y los cítricos. Debido a su agradable sabor, alto contenido en fibras, y por constituir una fuente importante de vitaminas C, B1, B6, ácido fólico y minerales como el potasio, la piña ha sido reconocida por los consumidores en todo el mundo. Los principales productos del fruto en el comercio internacional son las rebanadas enlatadas, los trozos (en empaques plásticos sólidos) el jugo y la fruta fresca (Coppens y col., 2003; Cerrato, 2013).

De acuerdo con estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), para el año 2016 Costa Rica fue el primer productor mundial de piña con 2.930.661 TA, Seguido por Brasil, Filipinas y China con 2,694.555, 2.612.474, y 2.078.126 TA, respectivamente.

En Venezuela, la piña se cultiva en los estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Monagas, Anzoátegui, Sucre y los márgenes del río Orinoco en el estado Amazonas, siendo el cultivar ‘Española Roja’, el más cultivado y con éste se cubre gran parte de la demanda nacional (Leal y Antoni, 1981, citado por Pineda y col., 2012). Sin embargo, en el país otros grupos de piña son producidos y comercializados a nivel local. En el estado Amazonas, la etnia Piaroa de Betania del Topocho cultiva piñas autóctonas las cuales tienen un valor agrícola, social y etnobotánico, pues varias comunidades de esa etnia utilizan el fruto como alimento o medicina, y las hojas como fuente de fibra para la elaboración de chinchorros, telas y otros artículos de interés para la comunidad (Coppens d’Eeckenbrugge y col., 2011). La población

Piaroa consta de unas 521 personas, de las cuales, el 75% se dedica a la actividad comercial y al cultivo de frutas en general, principalmente al cultivo de piña (García y col., 2008).

Según cifras reportadas en el 2017 por la FAO, en el año 2016, Venezuela se posicionaba en el puesto 15 a nivel mundial, con una producción de 452.654 TA, mientras que para el año 2015, la producción anual fue mayor, siendo ésta de unas 481.374 TA (FAOSTAT, 2017).

Un inconveniente que afecta recurrentemente a los cultivos de piña, es la susceptibilidad de ésta especie al ataque de una amplia gama de patógenos. Las plantas de piña pueden desarrollar enfermedades ocasionadas por hongos, por bacterias y por nematodos, roedores, entre otros; lo cual hace que disminuya el número de plantas por hectáreas disminuyendo, consecuentemente, la producción comercial del fruto (Santos y Matos 1995, Coppens y col. 1997, Rodríguez y col. 2002, citados por Medina y col., 2014).

2.3.Cultivo tradicional de piña

El método convencional del cultivo de la piña en campo consiste en la siembra de propágulos (reproducción vegetativa), utilizando los retoños que emergen de las diferentes partes de la planta, conocidos como coronas, bulbillos (que crecen en la base de la planta) y brotes que emergen de las yemas axilares. El número de brotes producidos por la planta, lo determina la variación genética que existe entre clones y cultivares. El tiempo desde la siembra hasta la cosecha, depende principalmente del peso del propágulo; las coronas producen frutos en 18 a 24 meses, los bulbillos en 15 a 20 meses y retoños o brotes en 12 a 17 meses (Paull y Duarte, 2011).

La semilla de piña que generalmente es utilizada por los agricultores para el establecimiento de nuevos cultivos, es obtenida de sus propias plantaciones y/o de otros piñicultores. En general, los productores no realizan un buen manejo a la semilla, es decir, no

hacen selección de plantas madres, ni clasifican por su tamaño o por su calidad a la semilla (Balza y col., 2016).

De acuerdo con Balza y col. (2016), dentro de las buenas prácticas agrícolas aplicadas en el cultivo de piña, se tiene que es indispensable que el material de propagación que se vaya a utilizar en la siembra provenga de semilleros certificados. Éstas semillas generalmente provienen de plantas seleccionadas con el fin de preservar caracteres de interés y el proceso para su obtención se basa principalmente en realizar la selección de plantas madres sanas, con buen vigor, obteniéndose además semillas libres de enfermedades y plagas.

Antes de la siembra se recomienda desinfectar la semilla haciendo una inmersión en un insecticida y fungicida, para prevenir el ataque de plagas y enfermedades.

Treinta días después de la siembra, la piña comienza a emitir raíces que están en 5 a 7 centímetros de la base. Ésta información se utiliza para saber dónde se aplica la fórmula completa de abono, ya sea 12-24-12 ó 10-30-10.

Para determinar el momento de la cosecha de la piña, se tienen en cuenta aspectos básicos como la edad del cultivo, y principalmente el color de la piña que pasa de una tonalidad verde amarillo a un amarillo brillante (Botero, 2015).

2.4.Cultivo *in vitro* de la piña

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte o porción separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida, y se incuba en condiciones ambientales controladas (Cuéllar y Somoza,

2015). Los principios en los que se fundamentan éstas técnicas son el de totipotencialidad, y el de regulación hormonal (Rojas y col., 2004).

Dentro del proceso de propagación *in vitro* se pueden diferenciar varias fases o etapas, las cuales abarcan el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro* (Murashige, 1974; Rojas y col., 2004). De acuerdo con Suárez (2011), dichas etapas son las siguientes:

Etapla 0: Selección y Preparación de la planta madre. Consiste en el acondicionamiento del explante para garantizar su supervivencia en condiciones de laboratorio. Es la fase más importante desde el punto de vista aséptico, pues se debe evitar al máximo problemas de contaminación y de oxidación que pueden causar la muerte del explante.

Etapla preparativa: Desinfección de los explantes, de la planta y/o desinfección de semillas. Una vez seleccionados la planta y el explante, se limpia y lava cuidadosamente, luego se elimina parte del tejido externo y posteriormente se procede a la desinfección superficial.

Etapla 1: introducción del material seleccionado *in vitro*. Se debe hacer todo dentro de la cámara de flujo laminar y con todo el material esterilizado; luego de que el tejido esté desinfectado se puede colocar unos segundos sobre un papel filtro para que se seque un poco, luego se procede al aislamiento del explante que deseamos cultivar (embrión, meristemo, etc.), y lo introducimos en el medio destinado para su desarrollo en esta etapa.

Etapla 2: Multiplicación de brotes. Una vez que el explante se ha adaptado a las condiciones del medio artificial que le ofrece el laboratorio, sin presentar ningún tipo de contaminación endógena o exógena, el mismo es transferido a un nuevo medio de cultivo, con adición de algunas fitohormonas. A medida que el explante comienza a crecer y multiplicarse, el mismo es ‘subdividido’ y cada nuevo explante es cultivado individualmente en medio de cultivo

fresco, una vez multiplicado y desarrollado, nuevamente es ‘subdividido’; a esta ‘subdivisión’ se le llama subcultivo. El número de subcultivos depende de la especie, pero en general este proceso tiene un límite que al excederse puede ocasionar efectos negativos en las vitroplantas.

Etapas 3: Enraizamiento. Luego de realizar los subcultivos necesarios para garantizar una cantidad determinada de vitroplantas, las mismas se dejan crecer por un período de tiempo, según sea la especie, y posteriormente se transfieren a un nuevo medio de cultivo en el cual el cambio del balance hormonal favorece a las auxinas, con el fin de inducir la formación y desarrollo de raíces. Para el enraizamiento *in vitro* se recomienda reducir a 50 % la concentración de las sales, así como también disminuir la concentración de citocininas y aumentar de auxinas y reducir la de sacarosa de 30 a 10 - 15 g/L.

Etapas 4: Aclimatación. Las plantas formadas en condiciones *in vitro* crecen sometidas a un ambiente controlado y si son llevadas a su ambiente natural pueden deshidratarse fácilmente y morir, por tanto, es muy importante que sean sometidas a un pre-acondicionamiento llamado aclimatación. Al ser retiradas de la condición *in vitro*, sus raíces deben ser lavadas y las plantas se deben colocar en sustratos de vivero para aclimatación en una mezcla balanceada estéril; además, deben ser almacenadas en un invernadero bajo condiciones de humedad constante y baja radiación solar.

En la propagación *in vitro*, las etapas de enraizamiento y aclimatación son las más importantes para la propagación comercial, cuyo éxito se encuentra determinado por el número de plantas que sobreviven el paso de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Raya y col., 2009).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales, se encuentran distintas técnicas de propagación *in vitro*:

- La micropropagación, la cual abarca una serie de técnicas de cultivo en un medio estéril de distintos segmentos de la planta; se puede utilizar como explante el cotiledón, hipocotilo, porciones del tallo, yemas, entre otros. La micropropagación se ha constituido es una técnica muy eficiente para producir plantas enteras fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre de la que derivaron, libres de plagas y enfermedades (Flores 1998; Palma y Montero 2002, citados por Jiménez, 2005).
- La organogénesis, que constituye un proceso de regeneración que implica la formación de órganos *de novo* a partir de pequeños grupos celulares meristemáticos, llamados meristemoides (Villalobos, 1990 y Orellana, 1998).
- La embriogénesis somática, la cual es otra técnica de singular importancia y constituye una herramienta versátil de gran eficiencia en la multiplicación masiva de diferentes especies. La embriogénesis somática es un proceso biológico a partir del cual una célula o un grupo de células somáticas se comportan como un cigoto originando un embrión que posteriormente formará una planta (Aguilar, 2006, citado por Rocha y Trementino, 2008).

Los procesos de regeneración *in vitro* están regulados por un balance auxina/citocinina en el medio de cultivo. Los medios con una alta relación auxina/citocinina promueven la formación de raíces. Por otra parte, los medios con una baja relación auxina/citocinina inducen la formación de vástagos. Ahora bien, una relación auxina/citocinina que se aproxime a la proporción 1:1 va a promover la formación de callos (Christianson y Wamick, 1983). Las citocininas son hormonas estimuladoras de la división y diferenciación celular que intervienen en procesos de desarrollo de las plantas. Por su parte, la auxina es la principal hormona en el control del desarrollo de la raíz (Valderrama, 2011).

La organogénesis *in vitro* y la embriogénesis somática han sido clasificadas dependiendo de si el proceso ocurre de manera directa o indirecta. En el proceso del tipo directo, se tienen explantes competentes para responder al estímulo de los reguladores de crecimiento, y como resultado ocurre el crecimiento sin previa formación de callo. Cuando ocurre formación de callo antes de inducir la respuesta organogénica o embriogénica, se dice que se está ante un proceso del tipo indirecto (Radice, 2010).

Los callos son masas no organizadas de células tanto diferenciadas como no diferenciadas, que se forman como consecuencia de una herida en la planta, o inducida en el explante cultivado en un medio provisto de factores de crecimiento (Zaid y col., 2004). Dentro de las características importantes de un callo, desde un punto de vista funcional, resalta su irregular crecimiento el cual le otorga el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que dan origen a plántulas (Lallana y col., 2003).

Casale y de García (1987), estudiaron la multiplicación clonal acelerada de piña, empleando como explantes yemas axilares de hojas de plantas maduras del cultivar Española Roja y de las variedades Brecheche y Nacional, encontrando que el medio con mayor éxito en el rompimiento de la latencia e inducción de crecimiento resultó ser el de Murashige y Skoog, 1962 (MS), suplementado con 1,0 mg/L de ANA, 1,0 mg/L de IBA y 0,5mg/L de BA para el cultivar Española Roja, mientras que para las variedades Nacional y Brecheche el mejor medio de cultivo fue el MS suplementado con 2,0 mg/L de ANA, 2,0 mg/L de IBA y 1,0 mg/L de BA. Posteriormente, García y col. (2008), usando los mismos tratamientos, lograron resultados exitosos en la micropropagación de yemas del cultivar Española Roja y el ecotipo autóctono del Amazonas, Tabë Kanä.

Jiménez (2005), realizó un estudio para determinar las respuestas morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*) micropropagada en dos sistemas de cultivo diferentes: medio sólido y medio líquido, este último conectado a un compresor de aire encargado de oxigenar el medio con una frecuencia de 3 veces por día, con una duración de 1 minuto. Utilizó yemas axilares de piña de la variedad MD-2 como explante y la composición del medio de cultivo fue MS (1962) suplementado con 2 mg/L de AIB, 2mg/L de ANA, 2 mg/L de KIN y 7 g/L de agar para el medio sólido. Como resultado, obtuvo una mayor eficiencia para el medio líquido, teniendo un mayor número de brotes, y brotes con la mayor longitud. Con relación al número de hojas, observó diferencias significativas entre los dos sistemas, teniendo que en el medio líquido se duplicaba al valor obtenido en medio sólido.

Saucedo y col. (2008), establecieron un protocolo para la propagación clonal *in vitro* de piña para las variedades Champakana y Hawaiana, y obtuvieron como resultado que para el establecimiento del cultivo la mejor concentración fue en un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con 0,5 mg/L de BA, 1,0 mg/L de AIB y 1,0 mg/L de ANA, obteniendo el 47 y 56 % de supervivencia respectivamente. Para la proliferación de brotes, la mejor concentración fue en un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con 3,5 y 4,0 mg/L de BA en la var. Champaka y la var. Hawaiana con 3,5 mg/L de BA.

Blanco y col. (2011), establecieron un sistema de propagación clonal eficiente de tres ecotipos de piña autóctonos del Amazonas venezolano. Cultivaron *in vitro* yemas apicales y laterales de los ecotipos Eruwä Kanä, Tabë Kanä y Gobernadora. Los explantes fueron cultivados en seis medios con diferentes concentraciones de auxinas, citocininas y tiamina, y probaron dos valores de pH: 5,4 y 5,8. A las cuatro semanas observaron brotación de una yema axilar en Tabë Kanä en el medio designado como MI3, una yema apical en Eruwä Kanä

en el MI4 y una yema axilar en Gobernadora, en el MI6. Los medios MI1, MI4 y MI6 contenían 5mg/L de tiamina, con pH 5,4. No observaron un patrón común en relación a las proporciones de auxinas y citocininas requeridas para la inducción de brotes. Observaron brotación solo en medios con tiamina 5mg/L y pH 5,4 independientemente de la concentración de auxinas y citocininas presente en los medios. La multiplicación de los brotes en los tres ecotipos se obtuvo en medios con iguales concentraciones de auxinas y citocininas. El ecotipo Tabë Kanä presentó la mayor cantidad de brotes por explante.

Suárez (2011), estableció cuatro sistemas para determinar cuál el mejor origen del explante (yemas apicales o yemas axilares) para introducir el material a micropropagar, obteniendo resultados más eficientes a partir de las yemas laterales, al presentar estas la menor contaminación bacteriana. Los explantes introducidos fueron multiplicados por dos tipos de corte, el longitudinal y el transversal, siendo el corte longitudinal el mejor para la obtención de un mayor número de brotes a la par de la mejor dosis de citocininas (2.5 ppm de BA), lo que genera más brotes y hojas por explante multiplicado.

Medina y col. (2014), propagaron masivamente tres cultivares de piña del departamento del Chocó, Colombia. Realizaron la multiplicación *in vitro* de brotes provenientes de ápices caulinares extraídos de hijos basales y de corona, y se cultivaron en un medio de iniciación semisólido MS que contenía: 4 mg/L de tiamina-HCl, 0,5 mg/L de ANA, 0,5 mg/L de IBA y 0,5 mg/L de BA y pH ajustado a 5,8; 10 g/L de carbón activado y posteriormente en un medio de multiplicación con cuatro tratamientos hormonales; (1) 0,3 mg/l de ANA + 1,0 mg/L de BA, (2) 0,5 mg/L de ANA + 1,5 mg/l de BA, (3) 1,0 mg/l de ANA + 3,0 mg/L de BA, (4) 1,0 mg/L de ANA + 3,0 mg/L de BA + 2 mg/L de ácido giberélico (AG3). A los 90 días, el número de brotes y tamaño de los brotes por explantes fue: cultivar 1 C1 (78,4±05) brotes y longitud del brote (2,5±0,03 cm); cultivar 2 C2: (85,7±0,5) brotes y longitud del brote

($2,1 \pm 0,11$ cm), Cultivar3 C3 ($92,8 \pm 0,1$) brotes y longitud del brote ($1,6 \pm 0,07$ cm). La mejor combinación de los reguladores de crecimiento empleada fue de 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BA, lo cual indica que es necesaria la presencia de auxina y citocinina para la brotación.

En la actualidad, existen reportes de que se han desarrollado métodos para la organogénesis *in vitro* en piña como mecanismo de propagación masiva. Entre ellos se encuentra el estudio realizado por Sripaoraya y col. (2003), quienes reportaron la obtención de brotes adventicios a partir de bases de hojas cultivadas en un medio MS suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-D y 2,0 mg/L de BA. Por otra parte, Roostika y Mariska (2003) lograron establecer un sistema de organogénesis en piña, empleando el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA, mientras que Akbar y col. (2003), establecieron un sistema de organogénesis empleando meristemas apicales de coronas de piña cultivadas en medio MS suplementado con 1,5 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de KIN, obteniendo los primeros callos en un período de tiempo de tres semanas, los cuales fueron subcultivados en medio MS con 1,5 mg/L de K y 0,5 mg/L de ANA, produciendo un gran número de brotes.

Firoozabady y col. (2004), reportaron la obtención de organogénesis directa e indirecta en piña. La mayor regeneración por organogénesis directa la obtuvieron en medio MS suplementado con 5mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA, logrando un 99% de regeneración, mientras que por organogénesis indirecta, en el mismo medio, obtuvieron un 86% de regeneración.

Pineda y col., en el año 2012, establecieron y analizaron un proceso de organogénesis para la propagación de plantas de piña del cultivar ‘Española Roja’ utilizando como explantes secciones de hojas de la planta. Para comprobar la naturaleza organogénica del proceso, realizaron un análisis histológico y anatómico del material vegetal cultivado *in vitro*. Así

mismo, evaluaron la existencia de posibles variaciones morfo-anatómicas en la estructura foliar de la población clonal obtenida mediante el proceso organogénico. Los resultados mostraron, rizogénesis directa, y formación de vástagos vía callo en el medio de cultivo que contenía 2,5 mg/L de 2,4-D, a la vez que hubo formación de raíces y vástagos, vía organogénesis indirecta, en el medio que contenía 5 mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA. Obtuvieron un 100% de plantas aclimatadas. Por otra parte, observaron que los cambios morfológicos y anatómicos presentados por las vitroplantas fueron revertidos durante la aclimatación, y su posterior paso a condiciones de vivero, por lo que se puede considerar que los mismos son cambios fenotípicos temporales, producto de las condiciones del cultivo *in vitro*.

Pineda y col. (2014), establecieron un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis para la multiplicación de piña del ecotipo Amazónico Venezolano Tabë Kanä, utilizando como explante secciones de bases de hoja de vitroplantas. Utilizaron tres medios, constituidos por las sales MS: a) sin añadir reguladores de crecimiento (MS1), b) suplementado con 5mg/L de ANA y 0,25mg/L de BA (MS2), y c) suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D (MS3). En MS2 y MS3 observaron la formación de callo a las 4 semanas. A los meses de cultivo, los callos presentaron indicios de desarrollo de órganos, siendo el tratamiento más eficiente para inducción de organogénesis el MS2 (promedio de 4,98 brotes y 5,54 raíces por explante en 7 meses).

Por otra parte, Rodrigues y col. (2014) evaluaron los efectos de varios tipos y concentraciones de citocininas en la multiplicación y en la estructura de la hoja de *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith, una especie de la familia Bromeliaceae con interés comercial, durante el crecimiento *in vitro*. Las plantas de *N. concéntrica*, establecidas previamente *in vitro*, se cultivaron en medio MS suplementado con BA o KIN con

concentraciones de 0.0, 5.0, 10.0 y 15.0 μM . Encontrando, que el aumento en las concentraciones de citocinina indujo un mayor porcentaje y número promedio de explantes con brotes; BA proporcionó promedios más altos en comparación con KIN. El uso de citocininas modificó la estructura epidérmica e indujo un mayor engrosamiento de los parénquimas clorofílico y de almacenamiento de agua.

Ananas erectifolius es una especie perteneciente a la familia Bromeliaceae, estrechamente relacionada con la piña. En el año 2016, Moreira y col., presentaron un estudio en el cual reportan la primera regeneración eficiente *in vitro* de *A. erectifolius* vía organogénesis indirecta. Utilizaron como explante segmentos de hoja (base de la hoja, centro y ápice), tomados de plántulas *in vitro* de 3 a 5 semanas de edad, los cultivaron en medio MS de 1/4 de concentración complementado con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento. Los resultados mostraron que el uso de explantes juveniles en lugar de ‘viejos’ aumentó la frecuencia de inducción del callo (35.0% y 16.0%, respectivamente). Entre los tipos de explantes probados, solo los segmentos de la base de la hoja indujeron callos; la frecuencia más alta se produjo a través del tratamiento de cultivo que contenía picloram (48.57%), 2,4-D (40%) o TDZ (35.71%). Sin embargo, solo los callos generados en los tratamientos que contienen TDZ o N6 isopenteniladenina (2ip) pudieron desarrollar brotes (máximo 35.71% y 14.28%, respectivamente).

Blanco y col. (2017), realizaron la propagación *in vitro* de plantas de piña del ecotipo Amazónico Gobernadora, vía organogénesis adventicia, utilizando como explante secciones basales e intermedias de hojas. Como resultado obtuvieron que solo las secciones de base foliar fueron morfogénicamente inducidas. El mayor número de plantas por explante (5 plantas/explante) por vía directa se obtuvo en un medio MS suplementado con 5 mg/L de

ANA y 0,25 mg/L de BA, siendo estas las mayores concentraciones de ambos reguladores de crecimiento utilizadas durante éste estudio.

Ahora bien, los primeros investigadores en obtener y desarrollar embriones somáticos *in vitro*, fueron Steward y col. (1958) y Reinert y col. (1985), a partir de tejidos de zanahoria. Luego de estos primeros estudios, el número de especies de plantas superiores a partir de las cuales los embriones somáticos podrían ser obtenidos, ha aumentado continuamente (Shinoyama y col., 2004, citado por Pineda, 2009).

En el año 1996, Daquinta y col., lograron establecer por primera vez un sistema de embriogénesis somática indirecta en *Ananas comosus* variedades ‘Cayena Lisa’ y ‘Española Roja’, empleando como explantes hojas de plantas cultivadas *in vitro*. Para ello, los investigadores emplearon un medio MS suplementado con una combinación de 2,5 mg/L de Dicamba y 0,5 mg/L de BA. Obtuvieron un 42% de formación de callos embriogénicos y un 45% de plantas obtenidas por embriogénesis somática.

Sripaoraya y col. (2003), desarrollaron un sistema de embriogénesis somática indirecta en bases de hojas de piña cultivadas en medio MS suplementado con 3 mg/L de Picloram, y obtuvieron embriones somáticos en la superficie de los callos inducidos luego de 21 días de la formación de los mismos. Alcanzaron un máximo número de plantas al transferir los embriones somáticos en estado globular a un medio MS suplementado con 1 mg/L de BA.

Por otra parte, Firoozabady y Moy (2004), lograron inducir la embriogénesis somática en bases de hojas de piña utilizando medio MS suplementado con 10mg/L de PIC y 2 mg/L de TDZ. Éste sistema fue poco eficiente ya que en 3 meses solo el 15-30% de los explantes respondieron hacia la formación de embriones somáticos luego de una previa formación de callo.

En el año 2017, Blanco y col. realizaron la propagación *in vitro* de plantas de piña del ecotipo Amazónico Gobernadora, vía embriogénesis somática, utilizando como explante secciones basales e intermedias de hojas. Como resultado obtuvieron que solo las secciones de base foliar fueron morfogénicamente inducidas. El mayor número de vitroplantas (1,58 plantas/explante) lo obtuvieron del callo embriogénico inducido en medio MS con 10 mg/L de Picloram y 2 mg/L de Tidiazuron, transferido a MS sin hormonas.

Kouadio y col. (2018), presentaron un estudio que consistió en resaltar los efectos de la naturaleza y la concentración de los carbohidratos en la proliferación de callos en la piña var. ‘Cayena Lisa’ (Cultivar ‘CI 16’), como un preludeo a la embriogénesis eficiente. Usaron como explantes bases de hojas de vitroplantas de piña. Emplearon medio MS suplementado con vitamina Gamborg B5 como medio base, al cual se agregaron 0,05 mg/L de BA, 3,00 mg/L de picloram, 2,00 mg/L de glicina, 1,00 mg/L glutamina, 100 mg/L de hidrolizado de caseína y 30 g/L de sacarosa. Luego de 6 semanas de cultivo, transfirieron los callos a medios con diferentes concentraciones de sacarosa (20, 25, 30, 35 y 40 g/L), así como también medios de composición basal MS con distintas fuentes de carbono en lugar de la sacarosa (glucosa, maltosa, manitol, fructosa y galactosa). Los resultados revelaron que la proliferación de callos está fuertemente influenciada por la naturaleza y la concentración de carbohidratos, observando que la sacarosa tiene un potencial callogénico más alto que los otros carbohidratos estudiados y que la concentración de 30 g/L de sacarosa mejoró significativamente la proliferación de callos en la variedad estudiada. La galactosa y la maltosa fueron los menos favorables durante la proliferación.

2.5.Pigmentos fotosintéticos

2.5.1. Clorofilas

En el proceso de fotosíntesis las plantas utilizan como componentes esenciales de la maquinaria pigmentos tetrapirrólicos denominados clorofilas (Melgarejo, 2010). En general, los cloroplastos contienen tanto clorofila *a* como clorofila *b*, pero la mayoría contiene el doble de clorofila *a* con respecto a *b*. Aunque las dos son verdes, sus espectros de absorción son suficientemente diferentes como para permitir que los dos pigmentos complementen sus gamas de absorción de la luz en la región PAR (Radiación Fotosintéticamente Activa) (Stryer y col., 2002). La clorofila captura la energía de la luz en longitudes de onda que abarcan el espectro del visible (400 a 700 nm), tiene dos picos máximos de absorción ubicados en el azul y el rojo, y absorbe muy poco en el verde (el cual es reflejado). Al incidir la luz en la molécula de clorofila, esta se excita por la absorción de la energía cuantizada, y, luego, la energía es canalizada hacia reacciones de biosíntesis (Lozano, 1997). Las clorofilas son extraídas generalmente de sus complejos lipoprotéicos con solventes orgánicos polares como acetona, metanol o etanol.

2.5.2. Carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenos, moléculas lineales constituidas por múltiples enlaces dobles conjugados a los cuales deben su coloración. El término carotenoides incluye a los carotenos y las xantofilas, presentando máxima absorción en la región azul del espectro visible, entre 400 y 500 nm. Los carotenos son pigmentos grasos anaranjados, dentro de los cuales el principal carotenoide de las hojas es el β -caroteno. Las xantofilas se distinguen de los carotenos básicamente por contener oxígeno. Los carotenoides tienen dos funciones: capturar energía en su condición de pigmentos accesorios y disipar el exceso de energía y los

estados excitados del oxígeno en las membranas vegetales en condiciones de alta radiación (Melgarejo, 2010).

El contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de área en las hojas, constituye uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y de su eficiencia (Huang y col., 2004; García y col., 2005 citado por Suárez y col., 2017).

2.5.3. Pigmentos fotosintéticos en plantas cultivadas *in vitro*

Durante el cultivo *in vitro*, las plántulas crecen en condiciones muy especiales en recipientes de cultivo relativamente herméticos, en donde la humedad del aire es mayor y la PPF (Densidad de flujo fotónico fotosintético) más baja que en el cultivo convencional. El uso de estos recipientes cerrados para prevenir la contaminación microbiana disminuye la turbulencia del aire, lo que limita la entrada de CO₂ y la salida de los productos gaseosos. En adición, los medios de cultivo a menudo se complementan con sacáridos como fuentes de carbono y energía. Esta adición disminuye considerablemente el potencial hídrico del medio, y aumenta el riesgo de contaminación bacteriana y fúngica. Además, a las plántulas se le suministran generalmente grandes dosis de reguladores del crecimiento. Estas condiciones favorecen la formación de plántulas de morfología, anatomía y fisiología anormales (Ariguita y col., 1999; Pospíšilová y col., 1999).

Las condiciones del cultivo *in vitro* pueden influir sobre la magnitud de los parámetros fotosintéticos. Además, un aumento en el contenido de clorofila, la eficiencia fotoquímica máxima, el rendimiento cuántico real del fotosistema 2 y la tasa fotosintética neta dependen generalmente de las condiciones ambientales del medio *ex vitro*. Debido a esto las

condiciones del cultivo *in vitro* pueden influir negativamente en la sobrevivencia de las plantas al proceso de aclimatación (Pospíšilová y col., 1999).

Melgarejo y col. (2010), consideran que el estudio de las adaptaciones fisiológicas de los organismos al medio ambiente, permite comprender los mecanismos que explican algunas respuestas ecológicas, señalando que mediante estudios ecofisiológicos es posible determinar las condiciones para el desarrollo de una especie, ecotipo o cultivo, e incluso de variedades dentro de un cultivo, contribuyendo a mejorar su productividad.

Isaac y col. (2010) evaluaron la actividad fotosintética de las plántulas de *Coffea arabica* var. Catuai y Caturra rojo, obtenidas *in vitro* en fase de multiplicación. Determinaron la tasa de fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática y concentración de pigmentos clorofílicos para cada una de las variedades a las ocho semanas de cultivadas; las vitroplantas crecieron en condiciones controladas en un medio MS suplementado con 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de AIA y 5 $\mu\text{mol/L}$ de 6-BA. Los resultados de su estudio mostraron que ambas variedades desarrolladas *in vitro* presentaron tasas de fotosíntesis neta similar a las plantas de cafeto adultas cultivadas en condiciones de campo, lo que demostró la capacidad de fotosíntesis de las plántulas, y su capacidad para el intercambio gaseoso en el proceso fotosintético durante la etapa de multiplicación *in vitro*.

Villalobo y col. (2012) evaluaron los cambios morfo-fisiológicos en las plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. 'MD-2') durante la fase de aclimatación. Las plántulas se aclimataron a una humedad relativa del 80%, temperatura de 25,5 ° C y una PPF de 400-500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como promedio de 45 días en fotoperíodos naturales. Todas las mediciones (longitud de la planta, número de hojas y raíces, peso fresco, ancho y longitud de la hoja 'D', fotosíntesis neta y tasa de transpiración total) se realizaron al final de la fase de enraizamiento

in vitro coincidente con 0 días de aclimatación y a los 15, 30 y 45 días. La actividad fotosintética de las plántulas *in vitro* no aumentó durante los primeros 30 días de la fase de aclimatación. Después de 30 días, la actividad fotosintética varió de 5.72 a 9.36 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que la transpiración total varió de 6.0 a 1.42 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante los primeros 30 días no hubo diferencias significativas en el número de hojas, longitud o anchura de la hoja más larga ('D') (cm) o longitud de la planta (cm). Sin embargo, después de 45 días, el peso fresco de la planta (g), la longitud y el ancho de la hoja "D" (cm) y el número de raíces aumentaron significativamente, mientras que la transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) disminuyó. Hubo pequeñas pero significativas disminuciones en la clorofila a y b ($\mu\text{g g}^{-1}$ masa foliar.). Ellos concluyen que el aumento de la actividad fotosintética después de 30 días, muestra que el aumento en la intensidad de la luz y la reducción de la humedad relativa durante la aclimatación no constituyen factores inhibidores.

Pérez y col. (2016), caracterizaron desde el punto de vista bioquímico e histológico plantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem. cv. 'Sac Ki'). Dentro de los indicadores bioquímicos analizados se encontraba el contenido de clorofilas totales, el cual cuantificaron en plantas de un mes en medio de cultivo de enraizamiento ('aclimatadas *in vitro*') y en plantas aclimatadas *ex vitro*. Además, realizaron un análisis histológico de la epidermis de ambos grupos de plantas. Los autores reportan que los contenidos de clorofilas disminuyeron en las plantas *ex vitro*, en relación con las plantas *in vitro* enraizadas durante 30 días. La epidermis de las plantas aclimatadas *in vitro* mostró un mayor desarrollo del aparato estomático que pudo incidir positivamente en la aclimatación *ex vitro*, donde obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 87% y una reducción del tiempo de aclimatación.

En el año 2018, Linares estudió si el contenido de pigmentos fotosintéticos puede servir como un indicador bioquímico confiable de aclimatación *ex vitro* en plantas micropropagadas

de *Solanum lycopersicum* L., para lo que determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos mediante espectrofotometría en plantas obtenidas por germinación *in vitro* (control), las obtenidas a partir de microesquejes de plantas *in vitro* en fase de enraizamiento y las transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación. En el caso de las plantas en fase de aclimatación, las mediciones de contenido de pigmentos fotosintéticos se realizaron a los 7 días de estar expuestas a condiciones *ex vitro*, debido a que las mismas no sobrevivieron más de ese tiempo. Los valores del contenido de clorofilas a (Cl a) y b (Cl b) fueron significativamente mayores en las plantas en fase de enraizamiento con respecto a las germinadas (control) y no hubo diferencias en el contenido de carotenoides (Cx+c) para estos dos grupos de plantas. Al comparar las plantas en fase de enraizamiento con aquellas en la fase de aclimatación *ex vitro*, encontró que en las de la fase de enraizamiento los valores del contenido de Cl a y clorofilas totales (Cl a+b) fueron significativamente mayores a los encontrados en las plantas en fase de aclimatación. Mientras que, los valores del contenido de (Cx+c) fueron significativamente menores en las plantas en fase de enraizamiento con respecto a aquellas en fase de aclimatación. Estos dos grupos de plantas no mostraron diferencias significativas en el contenido de Cl b. Sin embargo, la no aclimatación de las vitroplantas de tomate fue un impedimento para la determinación y estimación de la confiabilidad del contenido de pigmentos fotosintéticos como indicador de aclimatación *ex vitro*, por lo que dicho autor sugiere que para continuar con estos estudios, es prioritario que se logre una aclimatación eficiente de las plantas micropropagadas.

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo General

Regenerar plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr. Ecotipo Gobernadora vía Organogénesis *in vitro*, analizando aspectos morfo-anatómicos foliares y evaluar si el contenido de pigmentos fotosintéticos puede emplearse como un indicador bioquímico confiable de aclimatación *ex vitro* de las plantas regeneradas.

3.2.Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica *in vitro* de bases de hoja de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora.
- Determinar la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro* de *Ananas comosus* Ecotipo Gobernadora.
- Realizar la aclimatación *ex vitro* de las plantas regeneradas.
- Realizar la caracterización morfo-anatómica foliar de la planta madre y efectuar la comparación de dichos caracteres morfo-anatómicos entre las plantas regeneradas bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro* para evaluar la estabilidad estructural.
- Determinar el contenido de pigmentos fotosintéticos y evaluar si dicho contenido puede emplearse como indicador bioquímico confiable de aclimatación (o potencial para aclimatación) a condiciones *ex vitro* de las plantas de piña regeneradas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal y de Ecofisiología de Xerófitas. Ambos pertenecientes al Instituto de Biología Experimental (IBE), adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

4.1. Material Vegetal

Se utilizaron plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr. Ecotipo Gobernadora, obtenidas y mantenidas en condiciones *in vitro*, proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

4.2. Obtención del explante

Los explantes empleados en la etapa de inicio del cultivo fueron segmentos de bases de hojas de un área aproximada de 25 mm² (Fig. 1) provenientes de plantas de piña ecotipo Gobernadora micropropagadas y mantenidas en condiciones *in vitro*.



Fig. 1. Sección foliar utilizada como explante.

4.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados durante la investigación tenían la siguiente composición básica: sales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementados con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol, 30 g/L de sacarosa, el pH fue ajustado a 5,4 con NaOH o HCl y como agente gelificante, 8 g/L de agar. Los medios se esterilizaron en autoclave bajo condiciones estándar de presión y temperatura (1,1 Kg/cm² y 121 °C) durante 20 minutos.

4.3.1. Medios de inducción de Organogénesis

La constitución final de los medios empleados difiere entre sí por el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal (Ver tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la inducción de callo organogénico en *A. comosus* Ecotipo Gobernadora

Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg/L)	
	2,4-D	BA
MS0	0	0
MS1	0,5	2
MS2	0,5	3
MS3	1	-
MS4	1	1
MS5	1	2

MS6	1	3
------------	---	---

El medio MS0 corresponde al medio control (medio MS sin reguladores de crecimiento).

4.3.2. Medio de cultivo utilizado para la multiplicación *in vitro*

Durante ésta etapa, se transfirieron a medio líquido de multiplicación 30 brotes, a razón de un brote/fiola, los cuales estuvieron bajo condiciones de agitación continua a 137rpm.

Tabla 2. Medio de cultivo utilizado en la multiplicación *in vitro* de los brotes obtenidos durante la fase de regeneración

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg/L)			Tiamina	pH	Estado físico del medio
	BA	ANA	AIB			
MM1	1,0	0,5	0,5	5,0	5,4	Líquido

MM1: medio utilizado por Blanco y col. (2011) para la multiplicación de brotes.

4.4.Siembra de los explantes

Los explantes, provenientes de las plantas mantenidas *in vitro* de *Ananas comosus*, se sembraron en los medios de inducción en cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia, a razón de 5 explantes por frasco con 7 réplicas cada uno, a fin de obtener un total de 35 explantes por cada tratamiento.

4.5.Observaciones

Para cada uno de los tratamientos se llevaron a cabo observaciones semanales de los cambios morfológicos del explante como respuesta de estos a los medios de inducción, tomando en cuenta tanto aspectos cualitativos como cuantitativos del proceso. Dentro de las observaciones cualitativas se consideraron los siguientes aspectos: coloración del explante, coloración del callo, neoformaciones e hiperhidricidad. Dentro de las observaciones

cuantitativas evaluadas se encuentran: tiempo de respuesta del explante, porcentaje de explantes contaminados, porcentaje de explantes oxidados, porcentaje de explantes con formación de callo, promedio de brotes regenerados por explante, porcentaje de plantas con raíces, promedio de raíces/ planta y porcentaje de plantas aclimatadas.

4.6.Aclimatización

Las vitroplantas obtenidas fueron transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación. Un total de 36 plantas fueron cultivadas en recipientes de plástico con una mezcla de arena lavada y tierra negra abonada en proporciones 1:1 y colocadas durante 15 días en propagadores de alta humedad relativa y baja luminosidad. Posteriormente, fueron transferidas a condiciones de vivero.

4.7.Estudio morfo-histológico del proceso y morfo-anatómico foliar

Se realizaron cortes transversales a mano alzada de los tejidos: callos y brotes obtenidos para comprobar la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro* y determinar si el proceso ocurrió de forma directa o indirecta.

Además, se realizó un estudio comparativo de la morfología foliar y de secciones foliares transversales de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora a fin de establecer diferencias entre la morfología de las hojas de la planta madre y las plantas hijas mantenidas *in vitro* y *ex vitro*.

Cada grupo de estudio estuvo conformado por las siguientes plantas de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora: planta madre cultivada por la comunidad Piaroa de Betania del Topocho, estado Amazonas, mantenida en condiciones de vivero; planta hija mantenida en condiciones *in vitro* (10 meses) y planta hija mantenida en condiciones *ex vitro* (3 meses). Se seleccionaron las hojas correspondientes a la parte media de la planta, es decir, las ubicadas

en la región comprendida entre las hojas más juveniles y las que pudiesen llegar a estar senescentes. Se evaluaron los caracteres morfológicos: color, forma y presencia de espinas en el borde de cada hoja seleccionada.

Para los estudios anatómicos se tomó la porción media de cada una de las hojas seleccionadas, y se fijó en alcohol etílico al 70%, luego las muestras se utilizaron para las preparaciones epidérmicas, cortes transversales y cortes horizontales superficiales (paradérmicos) a mano alzada. Los mismos fueron teñidos con azul de toluidina (1% en solución acuosa, durante 1 min). La densidad estomática fue determinada por el método de Jáuregui (2008).

La morfología externa fue observada a través de un microscopio estereoscópico marca ZEISS KL1500, mientras que los cortes anatómicos se observaron a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2.

4.8. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

4.8.1. Extracción de pigmentos fotosintéticos

La extracción de pigmentos fotosintéticos (PF) se realizó tanto en la planta madre (*ex vitro*) utilizada para la propagación *in vitro* de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora, como en las plantas hijas (obtenidas vía organogénesis en la presente investigación) y mantenidas *in vitro* y en las plantas hijas obtenidas *in vitro* pero transferidas a condiciones *ex vitro* (fase de aclimatación). En el caso de las vitroplantas, se realizó en plantas de una sola edad: 8 meses en condiciones *in vitro*. Ahora bien, en las plantas en fase de aclimatación, se realizó en dos edades distintas: 30 días de transferidas a tierra y 45 días de transferidas a tierra.

El protocolo empleado para la extracción de PF fue el descrito por Bruinsma (1963) con modificaciones de Cáceres y col. (2016), el cual consta de los siguientes pasos:

Planta madre:

- Se desprendieron dos hojas por planta y, haciendo uso de un horador, se tomaron 5 discos de hoja de cada una de ellas.
- Se determinó el área de los discos (cm^2).

Plantas hijas (*in vitro* y *ex vitro*):

- Se desprendió 1 hoja de cada una de las plantas, cortando a 3cm de distancia medidos a partir del ápice.
- Se midió la base en cada una de las hojas desprendidas y se determinó el área foliar (cm^2), aproximándola a la de un triángulo isósceles.

Una vez obtenidas las muestras foliares, realizó el siguiente procedimiento tanto para la planta madre como para las plantas hijas (*in vitro* y *ex vitro*):

- Se maceró la muestra en un mortero, agregando una pequeña cantidad de carbonato de calcio. Éste paso se realizó a 4 °C.
- Una vez macerada la hoja, se agregaron en el mortero 10-15 ml de acetona fría al 80 % para preparar un homogenizado de muestras foliares.
- El homogenizado se filtró empleando un embudo y papel de filtro. El volumen final (del filtrado) se recogió y midió en un cilindro graduado de 10 o 25 ml.
- Se determinó la concentración de PF ($\mu\text{g PF/ml}$) en el filtrado mediante espectrofotometría, midiendo la densidad óptica (DO) a 4 diferentes longitudes de onda: 663, 652, 645 y 470 nm. Se utilizó para ello un espectrofotómetro de luz visible marca Genesys 20, Thermo Scientific.

4.8.2. Cuantificación de los pigmentos

Las ecuaciones utilizadas para determinar las concentraciones de PF ($\mu\text{g PF/ml}$) fueron las descritas tanto por Bruinsma (1963), para calcular las concentraciones de clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b) y clorofilas totales (Cl(a+b)) como la descrita por Wellburn (1994) para los carotenoides totales (C(x+c)). Dichas ecuaciones son las que se presentan a continuación:

$$\text{Ec. 1) Cl a} = 12,7 A_{663} - 2,7 A_{645}$$

$$\text{Ec. 2) Cl b} = 22,9 A_{645} - 4,7 A_{663}$$

$$\text{Ec. 3) Cl (a+b)} = 27,8 A_{652}$$

$$\text{Ec. 4) C (x+c)} = (1000A_{470} - 1,82\text{Cl a} - 85,02\text{Cl b})/198$$

Se utilizó un n= 10 por tratamiento y el contenido de pigmentos fue expresado en masa de PF por área foliar ($\mu\text{g PF/cm}^2$).

4.8.3. Análisis morfométrico

A fin de complementar los resultados obtenidos en la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos, se llevó a cabo un análisis morfométrico en los mismos grupos de plantas. Para ello, se determinaron los promedios de tamaño de la planta, N° de hojas, y densidad foliar (calculada como el cociente entre N° de hojas y la altura de planta). El análisis morfométrico se realizó en las plantas madres y en las plantas hijas (de todas las edades) para un mínimo de 10 plantas en cada uno de los grupos monitoreados.

4.9. Caracterización microclimática del ambiente *in vitro* y *ex vitro*

Se caracterizaron las condiciones de crecimiento de las plantas tanto en el ambiente *in vitro* como en el ambiente *ex vitro*. Para ello, se monitorearon las variables ambientales:

temperatura (°C) y DFF ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), durante 7 días. La temperatura se monitoreó desde las 4:00 hasta las 22:00 hs, y la DFF desde las 7:00 hasta las 14:00 hs.

Para medir la intensidad lumínica, se utilizó el radiómetro (LI-COR, Modelo 250A) con un sensor cuántico (LI.COR Q 26180). Para medir la temperatura del aire, se empleó un termómetro termistor (8402-10, Cole-Parmer Instrument Company) con sensor de temperatura (YSI 04B0618-409B; Switch Craft LN4153-405).

Las mediciones se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología experimental de la UCV. Latitud $10^{\circ}30'N$ – Longitud $65^{\circ}53'W$, 1050-1100 msnm.

4.9.1. Condiciones de cultivo

- Condiciones del ambiente *in vitro*:

El material vegetal sembrado fue incubado en cámara de crecimiento con luz fluorescente continua ($23,36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura de $25,15\pm 1,86^{\circ}\text{C}$ durante el período de tiempo necesario para el desarrollo de las distintas etapas del proceso de regeneración.

Los brotes obtenidos en la fase de iniciación fueron cuidadosamente separados y transferidos al medio de multiplicación (MM1) bajo condiciones de constante agitación a 137rpm, luz fluorescente continua ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura de $24,00\pm 1,00^{\circ}\text{C}$.

- Condiciones del ambiente *ex vitro*:

Las vitroplantas obtenidas fueron transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación. Se mantuvieron durante 15 días en propagadores de alta humedad relativa (80-93% de humedad relativa) baja luminosidad ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura de $26,22\pm 2,54^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, las plantas fueron transferidas a condiciones de vivero, bajo una temperatura promedio de $24,67 \pm 3,56^{\circ}\text{C}$ y bajo fotoperíodo natural ($139,47 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

4.10. Análisis de resultados

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Past versión 3.20 para Windows. Las pruebas consistieron en comparaciones de medias mediante la aplicación de ANOVA de una vía, para lo cual fue necesaria la comprobación previa de los supuestos de normalidad y homogeneidad gracias a las pruebas de Shapiro-Wilk W. y Levene. En caso de obtenerse diferencias significativas, se realizaron pruebas a posteriori de Tukey. Por el contrario, en caso de no cumplirse los supuestos, se procedió a aplicar pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. El nivel de significancia fue 0,05 en todas las pruebas aplicadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Establecimiento del cultivo

La selección de los mejores explantes para la inducción de callo y la regeneración de brotes ha sido el factor más crítico en la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas (Sripaoraya y col., 2003 y Mohammed y col., 2015, citado por Moreira y col., 2016). De acuerdo con esto, se debe resaltar que en el presente trabajo las secciones de base foliar resultaron ser un material vegetal adecuado para emplearse como explante en la regeneración de piña del ecotipo Gobernadora vía organogénesis.

Pineda y col., llevaron a cabo experimentos empleando bases de hojas de vitroplantas de piña del cultivar Española Roja (año 2014) y del ecotipo Tabë Kanä (año 2012), obteniendo resultados satisfactorios en la propagación vía organogénesis de ambas variedades de piña estudiadas.

Por otra parte, se tienen diversos estudios que se realizaron empleando secciones de diferentes regiones de hoja (el ápice, la región media y la base) encontrando que la única región que respondió al proceso de regeneración fue la base de la hoja. Tal es el caso de Moreira y col. (2016), quienes probaron distintos tipos de explantes de *Ananas erectifolius*, un miembro de la familia Bromeliaceae nativo del Amazonas, estrechamente relacionado con (*Ananas comosus*); ellos encontraron diferencias significativas en la inducción de callo dependiendo de donde los explantes fueron escindidos (base de la hoja, medio o ápice), obteniendo que el callo solo fue inducido al usar las bases foliares. Estos resultados también coinciden con los de Blanco y col. (2017), quienes probaron emplear como explante secciones de la base y parte media de hojas jóvenes (posiciones 4ta y 5ta desde el ápice) de vitroplantas de piña del ecotipo Gobernadora que tenían 12 meses de crecimiento, obteniendo respuesta

morfogénica solo por parte de las bases foliares. De lo antes expuesto, todos los autores alegan que la efectividad del empleo de la sección de base foliar como explante en la regeneración de *Ananas* sp., podría deberse al balance endógeno de hormonas en los tejidos de la planta, ya que los segmentos de base de hoja se encuentran en las proximidades de los meristemas axilares, los cuales tienen células jóvenes, poco diferenciadas con alta actividad meristemática, que son candidatas adecuadas para la morfogénesis en el cultivo de tejidos vegetales.

Durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*, se obtuvo un porcentaje de 0% de contaminación, resultado que era de esperarse ya que el material vegetal del cual fueron extraídos los explantes estaba constituido por plantas que fueron obtenidas y mantenidas *in vitro*, teniéndose un 100% de explantes libres de contaminación en la inducción de organogénesis en la piña del ecotipo Amazónico Gobernadora. Éste resultado demuestra la importancia que tiene la selección del material vegetal a utilizar y su repercusión en las etapas de iniciación y establecimiento del cultivo, teniéndose que para el cultivo *in vitro* se recomienda utilizar de forma mayoritaria plantas madres que se encuentren mantenidas en buenas condiciones, ya que con esto hay altas probabilidades de que se encuentren libres de agentes contaminantes. Sin embargo, en el segundo repique se observó un mínimo porcentaje de contaminación (2%); en este caso la presencia de dichos agentes contaminantes también se le puede atribuir a la introducción de hongos y/o bacterias durante la manipulación del material de vidrio y el manejo no adecuado de las condiciones de asepsia.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Pineda y col. (2014), quien obtuvo un 100% de explantes libres de contaminación durante el establecimiento del cultivo *in vitro* para la regeneración de plantas de piña del cultivar Española Roja vía organogénesis, partiendo de material obtenido y mantenido en condiciones *in vitro*.

Por último, se debe mencionar que en el material vegetal se observó indicios de oxidación específicamente hacia los bordes del explante lo cual ocurrió en algunos explantes (14 %) y en todos los medios de cultivo. Del mismo modo, se observó como en todos los medios los explantes se deformaban durante las primeras semanas del cultivo, presentando una conformación cóncava con respecto a la superficie del medio de cultivo. Lo antes descrito no se observó en el caso de los explantes que fueron cultivados en el medio MS3 (1mg/L de 2,4-D) ya que en el mismo no se logró la obtención de respuesta morfogénica.

5.2.ORGANOGENESIS

5.2.1. Inducción de callo

En éste ecotipo de piña Amazónico no se observó la formación de callo ni ningún tipo de estructuras en el medio control sin reguladores de crecimiento (MS0), lo cual sugiere que para lograr la inducción de respuesta morfogénica es necesario aplicar un estímulo hormonal a los explantes a fin de modificar el balance hormonal de los mismos, ya que con esto se puede inferir que el existente no era el adecuado para generar por si solo la formación de callo en los explantes de piña empleados. Del mismo modo, en el caso de los explantes que fueron cultivados en el medio MS3 (1mg/L de 2,4-D), no se observó ningún tipo de respuesta, lo cual sugiere que la presencia de BA exógena es necesaria para la inducción del proceso organogénico en los explantes de piña del ecotipo Gobernadora. Aunado a esto, se debe resaltar que se observó respuesta hacia la formación de callo en los medios en donde se adicionó 2,4-D en combinación con BA a las dos semanas de cultivo.

A la primera semana de cultivo, se observó como los explantes se deformaban en los medios MS1, MS2, MS3 y MS5, sin embargo, a las dos semanas se observó respuesta (formación de callo) en los medios MS1, MS2, MS4 y MS5, siendo los porcentajes de formación de callo 3%, 14%, 3% y 6%, respectivamente.

Conforme iba transcurriendo el tiempo, se observó un incremento el porcentaje de respuesta de los explantes hacia la formación de callo, teniéndose que a las 4 semanas de cultivo, el medio en el cual se tenía un mayor porcentaje de formación de callo era el MS5 (con un 29%), estando en segundo lugar el medio MS2, en tercer lugar el medio MS1 y, por último, el medio MS4, en el cual no hubo un incremento, con el tiempo, en la cantidad de explantes que formaron callo (Tabla 3).

La respuesta por parte de los explantes cultivados en el medio MS6 se obtuvo a las 5 semanas, reportándose un porcentaje de formación de callo del 2,86%.

A los dos meses de cultivo, el porcentaje de explantes con callo era de un 54% en el medio MS5 y 40% en el medio MS2; en el resto de los medios de cultivo el porcentaje era menor, encontrándose el medio MS1 en tercer lugar, el medio MS4 en cuarto lugar y, en último lugar, el medio MS6 (Tabla 3). Se debe resaltar que estos porcentajes se mantuvieron a lo largo de todo el período de experimentación, pero con incremento en el tamaño de los callos.

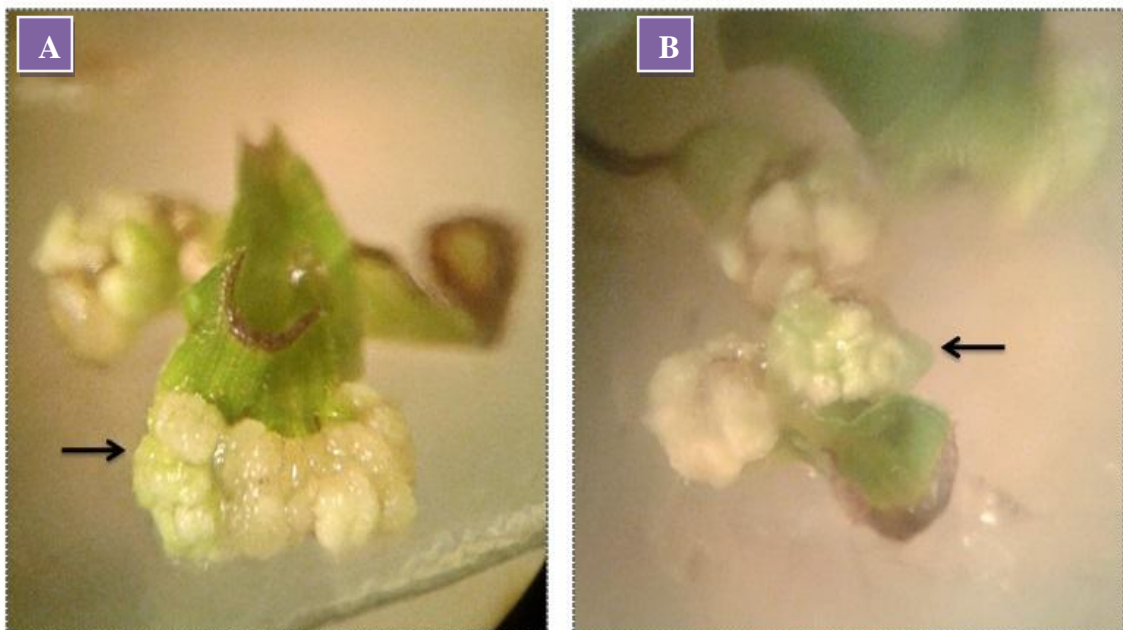


Fig. 2. Segmento de hoja con respuesta morfogénica en el ecotipo de piña Gobernadora a las 3 semanas de cultivo. **A:** la flecha señala la formación del callo por el extremo basal del explante. **B:** la flecha indica masas conformadas por estructuras amorfas con coloración verde claro.

En cuanto a los cambios morfológicos, a las 3 semanas de cultivo se observó en el extremo basal del explante la formación un callo con aspecto granular, consistencia compacta y coloración amarillenta o beige (Fig. 2 A). Luego, para el mismo período de tiempo (en

algunos medios), a simple vista se lograron apreciar masas conformadas por estructuras amorfas con coloración verde claro (Fig. 2 B).

Tabla 3. Efecto de los diferentes medios de cultivo sobre la inducción de la formación de callo organogénico en explantes de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora.

Medio de cultivo	% formación de CO		
	Semana 2	Semana 4	Semana 8
MS0	0,00	0,00	0,00
MS1	2,86	14,29	20,00
MS2	14,29	20,00	40,00
MS3	0,00	0,00	0,00
MS4	2,86	2,86	8,57
MS5	5,71	28,57	54,29
MS6	0,00	0,00	14,29

Estos resultados difieren de los reportados por Pineda y col., quienes ensayaron medios para la inducción del proceso de organogénesis en *Ananas comosus* tanto del cultivar Española Roja (año 2012) como del ecotipo Amazónico Tabë Kanä (año 2014). A diferencia de lo reportado en el presente trabajo, estos autores lograron inducir la formación de callo organogénico en ambas plantas de piña empleadas y en todos los medios ensayados, incluyendo un medio que estaba constituido únicamente por la auxina 2,4-D, lo cual difiere de lo mencionado al inicio del presente apartado, en donde se resalta que la presencia de BA exógena es necesaria para la inducción del proceso organogénico en los explantes de piña. Resultados similares fueron los obtenidos por Roostika y col. (2012), quienes reportaron la

formación de callo organogénico empleando en su ensayo bases foliares *Ananas comosus* ‘Cayena lisa’, en medios MS suplementados con la auxina 2,4-D.

En contraste con lo anterior, se tienen los resultados reportados por Blanco (2015), quien al igual que en el presente trabajo, tampoco obtuvo respuesta organogénica en un medio MS suplementado únicamente con 2,4-D, pero con una concentración de 0,5mg/L. Lo antes descrito lo obtuvo tanto para explantes provenientes de plantas de piña del ecotipo Amazónico Gobernadora, como del ecotipo Amazónico Erüwä Känä. En Adición, en cuanto al medio MS suplementado únicamente con 2,4-D (1mg/L) empleado en el presente trabajo, Blanco (2015) también ensayó dicho medio únicamente para el ecotipo Amazónico Erüwä Känä y, del mismo modo que en el presente trabajo, no obtuvo respuesta por parte de los explantes cultivados en el medio en cuestión.

Con respecto a los medios que fueron empleados en la presente investigación que coinciden con los usados por Blanco (2015) para Erüwä Känä, el autor reporta que observó respuesta organogénica en los medios MS con 0,5 mg/L de 2,4-D en combinación con 3 mg/L de BA (medio designado como MS2 en el presente trabajo) y MS con 1 mg/L de 2,4-D en combinación con 1 mg/L de BA (o medio MS4), siendo el porcentaje de formación de CO en las secciones de bases foliares de 32,5% y 2,5 %, respectivamente. En su trabajo, Blanco obtuvo organogénesis directa en los explantes cultivados en el medio MS4, lo cual no se obtuvo en ninguno de los explantes cultivados en los medios aquí empleados.

Los resultados obtenidos sugieren que los medios de inducción MS2 y MS5 fueron los más adecuados para la inducción de CO en las secciones de bases foliares de Gobernadora. Blanco (2015), reporta que el medio más adecuado empleado por él fue el MS con 0,5 mg/L de 2,4-D en combinación con 3 mg/L de BA (medio MS2), para el ecotipo Erüwä Känä.

Ahora bien, sugiere que el más adecuado para Gobernadora fue el medio MS con 2 mg/L de ANA en combinación con 5 mg/L de BA, en donde obtuvo un 100 % de explantes con CO; ésta respuesta supera a cualquiera de los resultados aquí reportados para la etapa de inducción.

De lo obtenido se deben resaltar dos resultados importantes para Gobernadora; Blanco (2015) no obtuvo respuesta morfogénica alguna en los medios suplementados con 2,4-D sólo y tampoco la obtuvo en los medios suplementados con 2,4-D en combinación con BA, mientras que para ésta última combinación, en éste trabajo sí se obtuvo respuesta. Ahora, si bien en ésta investigación no se ensayaron medios con la auxina ANA, de todos los medios empleados para éste ecotipo amazónico, se concluye que el medio más adecuado para la inducción de CO en las secciones de bases foliares de plantas de piña del ecotipo Gobernadora, es el medio MS suplementado con 2 mg/L de ANA en combinación con 5 mg/L de BA utilizado por Blanco (2015).

Lo obtenido durante ésta etapa, nos permite corroborar el efecto del genotipo sobre la respuesta de los explantes, al contrastar cómo varía la respuesta hacia la formación de callo organogénico entre distintas variedades, ecotipos y cultivares de la misma especie, *Ananas comosus*, incluso ante la presencia de medios suplementados con los mismos reguladores de crecimiento.

5.2.2. Regeneración

Luego de transcurridos 1,5 meses de cultivo, se observaron en los callos los primeros indicios de desarrollo de órganos, evidenciados en la formación de estructuras más o menos redondeadas, de color verde translúcido (meristemoides; Fig. 3 A y B), a partir de las cuales en algunos medios para ese momento se logró observar la formación de brotes (Fig. 3 C y D) y, en otros medios, ocurriría más adelante la formación de brotes y/o raíces.

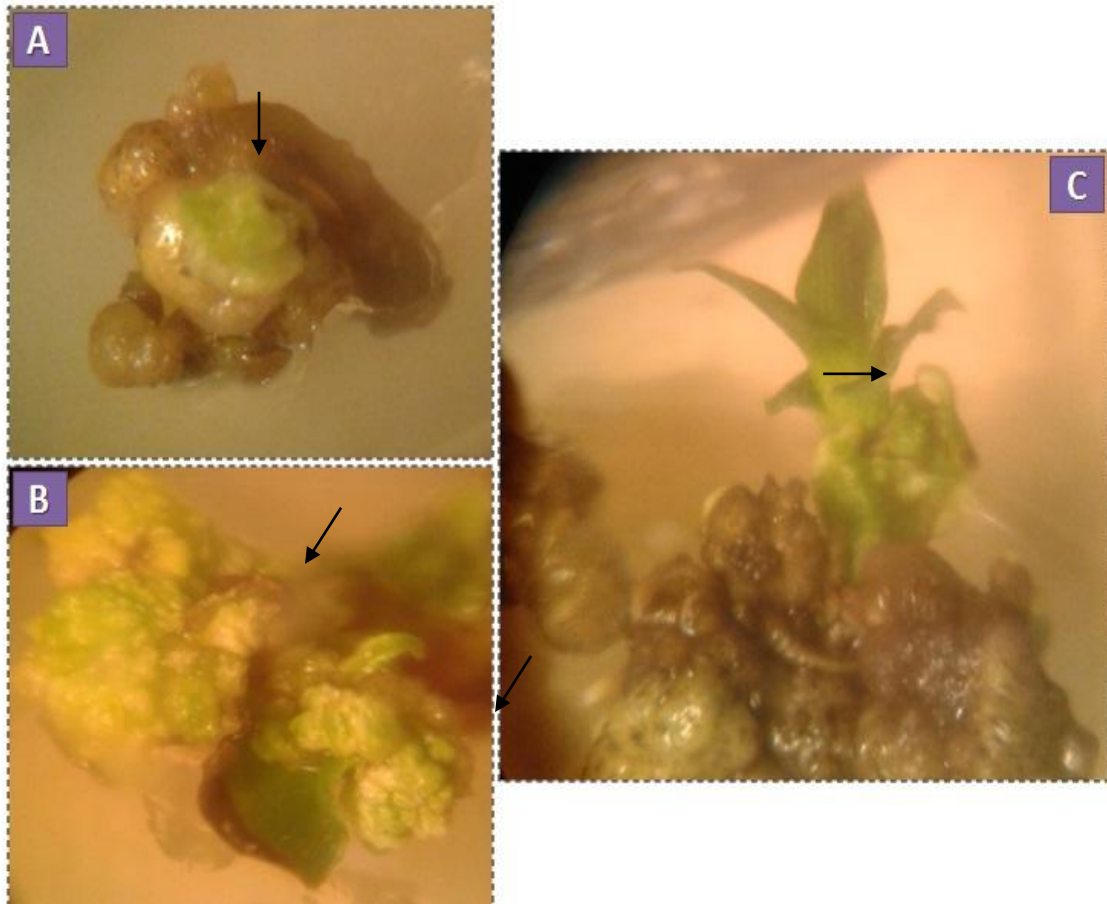


Fig. 3. Etapa de regeneración. **A:** Estructuras redondeadas color verde (meristemoides) (flecha), **B:** Yemas (flecha). **C:** Brote formado a partir de callos a las 6 semanas (1,5 meses) de cultivo en el medio MS5 (flecha).

Adicionalmente, se realizaron cortes longitudinales de las yemas formadas *de novo* en los medios MS5 y MS6, a partir de callo organogénico a los 6 meses de cultivo (Fig. 4 A y 4 B). Los cortes muestran la conexión vascular de distintos brotes formados en la base callosa, lo cual nos indica que se está ante un proceso de organogénesis que ocurrió por vía indirecta, esto debido a que los haces vasculares observados no se originan a partir de un tejido diferenciado preexistente. Lo mismo se observó para los explantes cultivados en el resto de los medios ensayados, en los cuales previamente al crecimiento de brotes, se observó la formación de callos. Estos resultados, en conjunto con los cortes anatómicos, permiten

afirmar que durante el proceso de regeneración se logró la organogénesis de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora por vía indirecta.

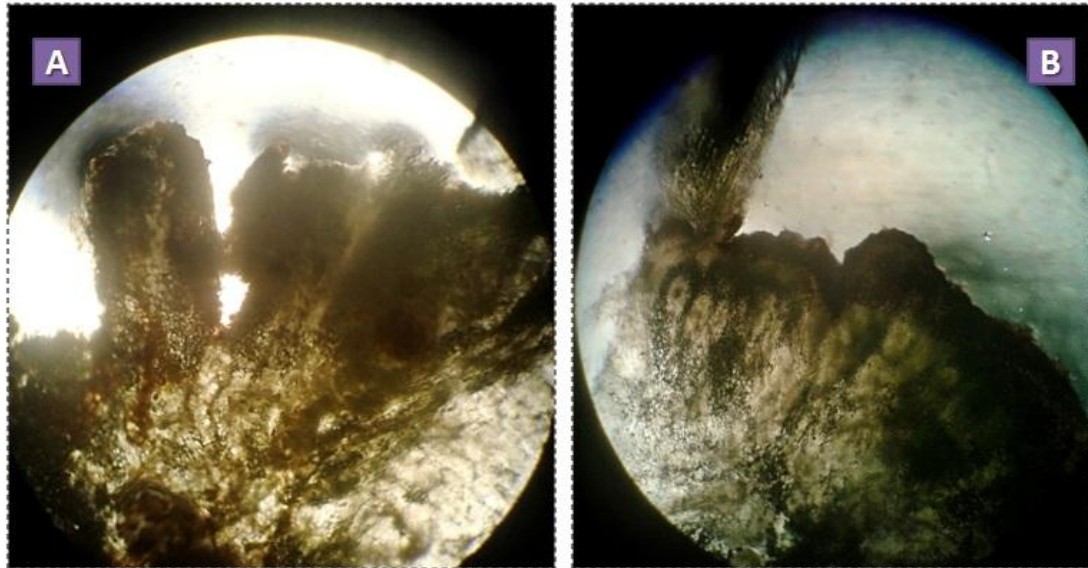


Fig. 4. Corte longitudinal de las yemas formadas en la periferia de CO. A: medio MS5 (40X). B: Medio MS6 (100X).

A partir de éste punto, es importante resaltar que, en contraposición con lo reportado por otros autores, en el presente estudio no fue necesaria la transferencia de los callos a un medio de regeneración de brotes para así observar la emergencia de los mismos, ya que ocurrió la formación de raíces y/o brotes en los mismos medios empleados para la inducción de callo organogénico.

De acuerdo con lo mencionado en el párrafo anterior, es muy importante destacar que este resultado difiere de lo reportado por Blanco y col. (2017) para *Ananas comosus* del mismo ecotipo (Gobernadora), quienes en su estudio seccionaron y transfirieron los CO obtenidos en los medios de inducción, a medios de composición basal MS sin suplementar con reguladores de crecimiento, esto con el fin de promover el desarrollo de brotes.

A las seis semanas (1,5 meses), se logró apreciar la formación de los primeros brotes en los medios de cultivo que respondieron durante la etapa de inducción de callo (Fig. 3). A los dos meses se llevó a cabo el primer subcultivo, transfiriendo los explantes con respuesta organogénica a sus respectivos medios (los mismos usados en la etapa de inducción). Posteriormente, a los 4 meses de cultivo (Fig. 6), se determinó el promedio de brotes/explante y el promedio de raíces/planta (Tabla 4).

Con respecto al promedio de raíces/planta, se tiene que solo en los medios MS2 y MS5 se formaron raíces (Tabla 4), teniéndose un mayor promedio (un poco más del doble) de raíces/planta en el medio de cultivo MS5. Por otra parte, en cuanto al promedio de brotes/explante, también el medio MS5 fue el que arrojó el mayor promedio, siendo éste de 2,89 brotes/explante.



Fig. 5. Raíces formadas en los medios MS5 (A) y MS2 (B) a los 4 meses de cultivo.

Las raíces formadas en los medios MS2 y MS5 eran morfológicamente distintas (Fig. 5), siendo las del medio MS5 de color marrón claro a beige (Fig. 5 B) mientras que las raíces observadas en el medio MS2 eran en su mayoría de color marrón oscuro, presentando una mayor rigidez (aspecto ‘leñoso’) (Fig. 5 A) que las raíces formadas en el medio MS5.

Tabla 4. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el proceso de organogénesis en los explantes de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora a los 4 meses de cultivo.

Medio de cultivo	N° de raíces/explante	N° de brotes/explante
MS0	0,00	0,00
MS1	0,00	0,83
MS2	3,20	1,66
MS3	0,00	0,00
MS4	0,00	0,34
MS5	6,80	2,89
MS6	0,00	1,17

Sripaoraya y col. (2003), reportaron la regeneración de brotes adventicios a partir de bases de hojas cultivadas en un medio de cultivo que tenía la misma combinación y concentración de reguladores de crecimiento que el medio MS1 aquí empleado (MS suplementado con 0,5mg/L de 2,4-D y 2,0mg/L de BA). Sin embargo, en el presente trabajo no se obtuvo la regeneración de brotes directamente sobre el explante sin que hubiese formación previa de callo.

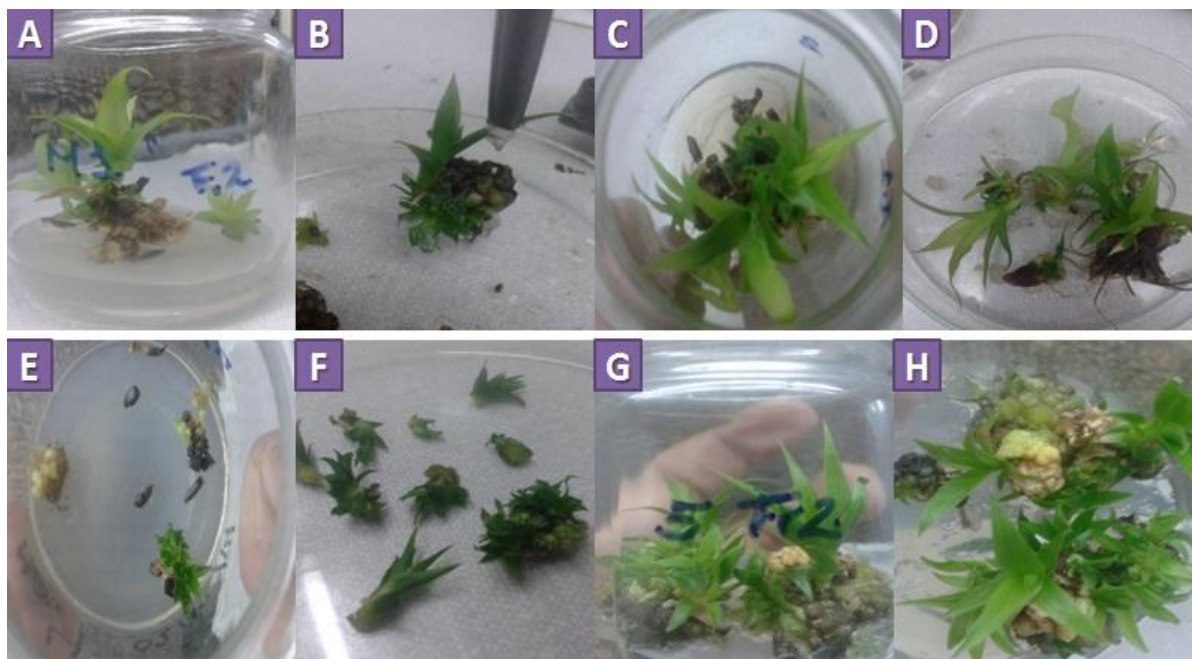


Fig.6. Brotes regenerados a los 4 meses de cultivo. A-B: Medio MS1. C-D: medio MS2. E-F: medio MS4.
G-H: medio MS5.

Firoozabady y col. (2004), reportan la obtención de organogénesis directa e indirecta en piña. La mayor regeneración (99%) vía organogénesis directa la obtuvieron en medio MS suplementado con 5mg/L de ANA en combinación con 0,25mg/L de BA. En el mismo medio también obtuvieron el mayor porcentaje de regeneración (86%) vía organogénesis indirecta.

En el año 2012, Pineda y col., reportan en sus resultados la obtención de raíces y brotes vía organogénesis directa en bases de hoja de piña del cultivar ‘Española Roja’ en un medio MS suplementado únicamente con 2,5mg/L de 2,4-D. Por otra parte, reportan también organogénesis (brotes y raíces) vía indirecta en dos medios de cultivo, siendo uno de ellos el antes mencionado y el otro, un medio MS suplementado con 5mg/L de ANA y 0,25mg/L de BA, reportando para éste medio el mayor promedio de raíces/explante (1,34) y el mayor promedio de brotes/explante (4,7). Esos resultados son contrastantes con los obtenidos en ésta

investigación para el ecotipo Gobernadora, ya que en el medio MS3 (MS suplementado únicamente con 2,4-D), no se obtuvo respuesta por parte de los explantes.

Pineda y col. (2014), utilizando los mismos medios descritos en el párrafo anterior, reportaron que el tratamiento más eficiente para la inducción de callo y la regeneración de brotes es el medio de cultivo de composición basal MS suplementado con 5mg/L de ANA y 0,25mg/L de BA, reportando un 100% de formación de callo organogénico, un promedio de 4,98 brotes/explante y un promedio de 5,54 raíces/explante (raíces adventicias). En contraposición con los resultados de Pineda y col., se debe resaltar que los medios aquí ensayados presentaban en todos los casos una mayor concentración de citocinina (BA) con respecto a la de auxina (2,4-D), con lo cual, a pesar de ser una proporción contraria a la empleada por Pineda y col., se logró la regeneración de brotes a partir de todos los segmentos de callo formados en todos los medios con ésta combinación de reguladores de crecimiento en éstas proporciones.

Tabla 5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la etapa de regeneración de brotes a partir de los segmentos de callo formados en los distintos explantes en cada medio ensayado a los 6 meses de cultivo.

Medio de cultivo	N° de Brotes/TOI	N° de brotes/ explante
MS0	-	-
MS1	64,00	5,49
MS2	15,00	3,00
MS3	-	-
MS4	17,00	0,97
MS5	11,30	2,91
MS6	11,00	1,57

TOI: tejidos organogénicamente inducidos.

Rodrigues y col. (2014), evaluaron los efectos de varios tipos y concentraciones de citocininas en la multiplicación y en la estructura de la hoja de *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith, una especie de la familia Bromeliaceae con interés comercial, durante su crecimiento *in vitro*. Las plantas de *N. concéntrica*, establecidas previamente *in vitro*, se cultivaron en medio MS suplementado con BA o KIN a distintas concentraciones. Los autores verificaron diferencias significativas en las características evaluadas entre los distintos tratamientos, de lo que es importante resaltar que encontraron una tendencia por parte de la respuesta organogénica, en la que un aumento en las concentraciones de citocinina, parecía ser el factor responsable de inducir un mayor porcentaje de regeneración y número promedio de brotes por explante. Ahora bien, en el presente trabajo se observó la importancia de las citocininas, evidenciada en cómo su presencia podría ser indispensable para la inducción de organogénesis en las bases foliares de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora; sin embargo, los resultados obtenidos para ésta etapa no coinciden con lo reportado por Rodrigues y col., ya que el proceso de regeneración no presentó un patrón específico en las respuestas que se pudiese atribuir al aumento o disminución de la concentración de citocininas en el medio de cultivo.

Blanco (2015), para el ecotipo Amazónico Erüwä Känä, obtuvo el mayor número de vástagos/TOI (10,62) y vástagos/explante (3,45) en el CO generado en el medio de cultivo MS suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-D y 3 mg/L de BA. En cuanto al ecotipo Gobernadora, los callos obtenidos fueron transferidos medio MS sin sustancias de crecimiento a fin de lograr la regeneración de brotes.

El autor reporta que a las 6 semanas de transferencia al medio de cultivo MS sin suplementar, el mayor número de vástagos/TOI en MS (30,00) lo observó en los tejidos provenientes del medio suplementado con 2 mg/L de ANA y 2 mg/L de BA, mientras que el

mayor número de vástagos/explante fue para aquellos explantes inducidos en el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA (5,00 vía Organogénesis directa).

De lo anterior, es importante resaltar que en el presente trabajo no fue necesaria la transferencia de los callos a medio MS sin sustancias de crecimiento para lograr la regeneración de brotes, ya que la misma ocurrió en los mismos medios empleados para la inducción de CO.

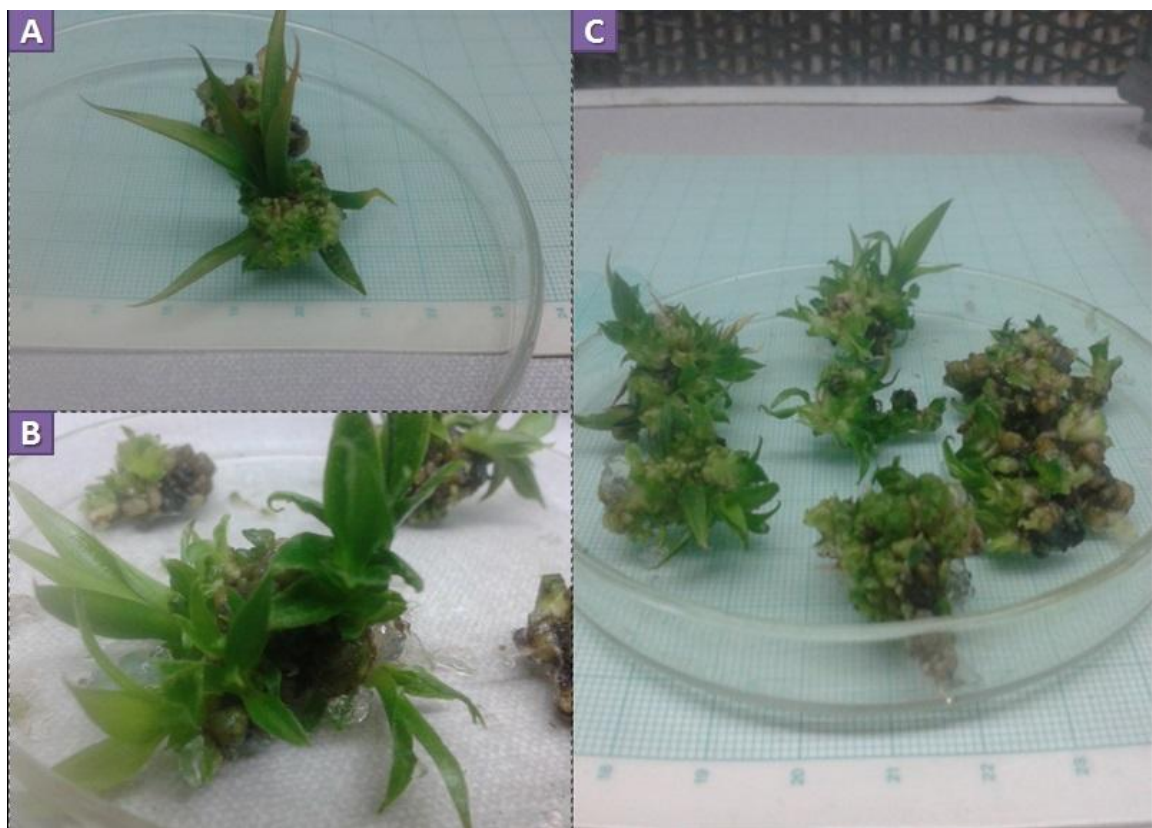


Fig. 7. Brotes regenerados a los 6 meses de cultivo. A y C: Segmentos de callo con brotes (se determinó con la ayuda de papel milimetrado que un segmento de callo mide aproximadamente $1,56 \text{ mm}^2$). B: detalle de brotes.

A los 6 meses de cultivo (Fig. 7), se determinó el N° de brotes/explante y el N° de brotes/TOI (Tabla 5). El mayor N° de brotes/explante se obtuvo en los medios MS1 (5,49) y MS2 (3,00), mientras que el mayor N° de brotes/TOI se obtuvo en los medios MS1 (64,00) y MS4 (17,00).

Por otra parte, Blanco (2015), obtuvo por vía directa tanto caulogénesis como rizogénesis a las 6 semanas de transferencia del material vegetal a medio MS sin sustancias de crecimiento, mientras que en el caso de la organogénesis vía indirecta, observó la formación de raíces a las 9 semanas de cultivo en el mismo medio. Ahora, es importante destacar que, si bien en el presente trabajo se obtuvo en el medio MS5 valores similares (brotes/explante) a los reportados por éste autor para el medio MS con 2 mg/L de ANA y 2 mg/L de BA, no se obtuvo organogénesis vía directa.

Tabla 6. Longitud promedio de los brotes a los 4 y a los 6 meses de cultivo.

Medio de cultivo	Longitud promedio de los brotes regenerados (cm)	
	4 meses	6 meses
MS0	-	-
MS1	0,86	1,21
MS2	0,68	0,88
MS3	-	-
MS4	1,98	2,21
MS5	2,30	2,56
MS6	1,00	1,63

De los medios ensayados en ésta investigación, el medio MS5 parecía constituir la mejor opción como sistema de regeneración para éste Ecotipo, esto al presentar tanto un mayor número de brotes/explante, como la mayor longitud promedio de brotes (Tabla 6); esto a los 4 meses de cultivo.

Luego de transcurridos 6 meses de cultivo, el medio MS5 pasó a ser el tercero en cuanto al N° de brotes/TOI y al N° de brotes/explante, mientras que, para éste mismo tiempo, el medio MS1 pasó a posicionarse en el primer lugar entre los medios aquí empleados y es el que se sugiere como mejor sistema de regeneración (a mediano plazo), ya que en el mismo se obtuvo el mayor N° de brotes/TOI y el mayor N° de brotes/explante (64,00 y 5,49, respectivamente), valores que superan a los reportados por Blanco y col. (2017) para los medios empleados por dichos autores en el establecimiento de protocolos de regeneración *in vitro* de plantas de piña del ecotipo Gobernadora.

Sin embargo, de todos los resultados obtenidos durante la etapa de regeneración para el ecotipo Gobernadora, se concluye que la organogénesis directa que reportan Blanco y col. (2017), específicamente la inducida en el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 0,25 mg/L de BA, en el cual obtuvieron, además, el mayor valor brotes/explante (entre todos los tratamientos que ensayaron), podría designarse como el sistema de regeneración *in vitro* más productivo y eficiente en cuanto a proliferación de vástagos de piña de éste ecotipo amazónico, ya que la formación de plantas por vía directa, a partir de cultivo de tejidos vegetales, minimiza la probabilidad de inestabilidad genética y/o epigenética derivada de la formación previa de callo durante la organogénesis indirecta.

Tabla 7. Comparación estadística de la respuesta organogénica al final de las etapas de inducción de CO (8 semanas) y regeneración (6 meses).

Medio de cultivo	% de formación de CO (8 semanas)	Regeneración (6 meses)	
		Altura (cm)	Brotos/explante
MS0	0	0	0
MS1	20,00 ^{a,b}	1,21 ^{a,b}	5,49 ^a
MS2	40,00 ^a	0,88 ^{a,b}	3,00 ^a
MS3	0	0	0
MS4	8,57 ^b	2,21 ^{a,c}	0,97 ^a
MS5	54,29 ^a	2,56 ^c	2,91 ^a
MS6	14,29 ^{a,b}	1,63 ^{a,b,c}	1,57 ^a

Las letras a, b y c indican grupos de tratamientos estadísticamente diferentes.

Comparando entre los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos ensayados, estadísticamente, se encontró que: en cuanto al % de formación de CO, sólo en el medio MS4 el % fue significativamente menor en comparación con los medio MS2 y MS5. En el caso de la altura de los brotes regenerados, en el medio MS5 la altura promedio fue significativamente mayor que en los medios MS1 y MS2, mientras que en el medio MS4 fue mayor con respecto al medio MS2 únicamente. Por último, con respecto al promedio de brotes/explante, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

5.2.3. Multiplicación

A los cuatro meses de cultivo, el medio MS5 proyectaba como el sistema de cultivo *in vitro* más productivo entre todos los ensayados para la etapa de regeneración, no sólo por obtenerse en éste medio el mayor número de brotes/explante (Tabla 4) para ese momento, sino también una mayor longitud promedio para los brotes regenerados (Tabla 6). De acuerdo

con esto, se decide llevar a cabo una etapa de multiplicación de los brotes regenerados a partir del CO inducido en el medio en cuestión. Es así como los brotes obtenidos en la fase de regeneración fueron cuidadosamente separados y transferidos a medio de multiplicación MM1, a razón de un brote/fiola, tal como se describe en la metodología.

Luego de 3 meses, se llevó a cabo el primer subcultivo, transfiriendo los brotes a un medio fresco de multiplicación. En éste momento se determinó el N° de brotes en cada fiola, obteniéndose un valor promedio de 12 brotes multiplicados a partir de un único brote inicial. Éste primer repique en MM1 sirvió para aumentar el número de brotes adventicios, obteniéndose al sexto mes, justo antes de realizar la aclimatación de las vitroplantas (Fig. 8), un promedio de 36,6 brotes/explante (Tabla 7).



Fig. 8. Brotes en medio de multiplicación (MM1) a los 6 meses de cultivo.

Dentro de las ventajas del empleo de medio líquido, se tienen el favorecimiento de la absorción de nutrientes, la inducción del crecimiento del material vegetal y la dilución de los metabolitos excretados por los explantes, lo que reduce los inconvenientes que estos ocasionan. Por otra parte, debido a que los nutrientes se movilizan por difusión hasta los tejidos, se tiene que el medio líquido ofrece poca resistencia a su movilización por difusión en comparación con el medio sólido, lo cual favorece la asimilación de nutrientes por parte de la planta y explica el mayor crecimiento (elongación) de los brotes de piña (Jiménez, 2005). Entonces, con relación al número de brotes de piña aquí obtenidos, así como la calidad del desarrollo de las vitroplantas, se tiene que ambos son producto de una mayor asimilación de nutrientes del medio de cultivo lo cual se ve favorecido por la consistencia del mismo en la etapa de multiplicación.

Sin embargo, la diferencia en la consistencia del medio de cultivo, no representa, por sí sola, un factor determinante para el incremento en la multiplicación de los brotes. En este caso, no se debe dejar de lado otro factor que juega un rol fundamental en la inducción de la formación de brotes, el cual es el balance auxina/citocinina.

De acuerdo con lo anterior, se tiene que el desarrollo y la proliferación de brotes son posibles gracias a la acción sinérgica entre las auxinas y citocininas añadidas en el medio de cultivo, en conjunto con el balance hormonal endógeno presente en el explante inicial. De esta forma, ya que las citocininas son sintetizadas principalmente en las raíces, la adición exógena de las mismas es usualmente requerida en el cultivo de meristemas; por otra parte, en las zonas de crecimiento activo (meristemas, yemas, ápices) son sitios donde ocurre la síntesis de auxina, por lo que la concentración endógena en estos explantes es alta, requiriéndose una baja o ninguna adición exógena de auxinas en el medio de cultivo, aunque esto va a depender también del tamaño del explante y la especie vegetal. No obstante, cuando el balance

endógeno entre auxinas y citocininas es apropiado, puede ocurrir igualmente el desarrollo de brotes sin la adición de auxinas o citocininas al medio de cultivo (Jiménez, 1998).

Considerando lo antes expuesto, se atribuye el número de brotes de piña aquí obtenidos, así como la calidad del desarrollo de las vitroplantas, a la combinación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo empleado en la fase de multiplicación (medio MM1), el cual consta de medio MS suplementado con una proporción 1:1 auxina/citocinina. Esto sugiere que dicha proporción de reguladores de crecimiento, en combinación con las concentraciones endógenas de auxinas y citocininas y el estado físico del medio de cultivo empleado durante ésta etapa, constituyen el conjunto de factores que indujeron la multiplicación de los brotes.

Tabla 8. Multiplicación *in vitro* de los brotes de piña ecotipo Gobernadora obtenidos durante la etapa de regeneración a partir del CO inducido en el medio MS5.

Tiempo de multiplicación	N° de brotes/explante	Longitud promedio de los brotes (cm)
0 meses	1,00	2,30
3 meses	12,00	3,45
6 meses	36,60	9,11

*0 meses representa la condición inicial de los brotes al momento del establecimiento de la multiplicación *in vitro*.

Blanco y col. (2011) establecieron un sistema de micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales, para lo cual ensayaron dos medios de cultivo en la etapa de multiplicación. Los medios de cultivo empleados en dicho estudio eran el aquí utilizado (designado como MM1) y un medio de cultivo líquido de composición basal MS suplementado con 2 mg/L de BA. En

su trabajo, obtuvieron como resultado que el medio MM1 indujo la multiplicación clonal de los ecotipos de piña empleados y que el otro medio ensayado, que carecía de auxinas, no funcionó como inductor de la multiplicación pero sí resultó ser excelente como promotor de la elongación de los vástagos obtenidos durante la etapa de iniciación.

De lo expuesto en el párrafo anterior, se debe destacar que en la presente investigación el medio MM1 no sólo resultó ideal para llevar a cabo la multiplicación de los brotes obtenidos durante la etapa de regeneración, sino que además se obtuvo un hallazgo que difiere de lo reportado por Blanco y col. (2011), ya que en dicho medio también se obtuvo la elongación de los brotes cultivados (Tabla 7) así como también su enraizamiento (Tabla 8), lo cual los postuló como candidatos ideales (Fig. 9) para ser transferidos directamente a la siguiente etapa en el cultivo *in vitro*, la aclimatación, sin tener que llevar a cabo una etapa previa de enraizamiento.



Fig. 9. Brotes provenientes del medio de multiplicación (MM1) a los 6 meses de cultivo, justo antes de ser transferidos a tierra.

Tabla 9. Datos de las raíces obtenidas durante la multiplicación de los brotes para un tiempo de cultivo de 6 meses.

Medio de cultivo	N° raíces/explante	Longitud de las raíces (cm)
MM1	10,20	3,86

Con respecto a la obtención de raíces durante la etapa de multiplicación, se debe mencionar lo señalado por Saucedo y col. (2008), quienes manifiestan que un mayor número de raíces, aún de poca longitud, es de vital importancia antes de llevar a cabo la etapa de aclimatación de las vitroplantas de piña, esto debido a que las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* requieren de un buen sistema radicular (mayor número de raíces) para tener éxito en la transferencia y adaptación a condiciones de vivero, lo cual difiere de lo requerido por plantas que son propagadas convencionalmente en forma asexual y que no requieren de raíces o muy pocas para ser transferidas a sustrato.

En cuanto a lo que se puede mencionar de la etapa de enraizamiento, se tiene que la misma es llevada a cabo de diferentes maneras por los diversos autores. En éste sentido, se tiene el trabajo realizado por Blanco y col. (2011), quienes obtuvieron buenos resultados de enraizamiento de las vitroplantas de piña de tres ecotipos nativos de la región Amazónica en medio MS sin suplementar con reguladores de crecimiento.

En estudios más recientes, se tienen los resultados reportados Blanco (2015) quien utilizó medio MS sin suplementar con reguladores de crecimiento para inducir el enraizamiento *in vitro* de los brotes de piña de dos ecotipos amazónicos (Erüwä Känä y Gobernadora), y los resultados expuestos por Moreira y col. (2016), quienes luego de obtener la regeneración de brotes a partir de callos formados en explantes (bases foliares) de *Ananas erectifolius*, separaron dichos brotes y los transfirieron a medio MS (con $\frac{1}{4}$ de los constituyentes) sin

suplementar con reguladores de crecimiento y fue entonces cuando lograron la obtención de raíces en los brotes regenerados.

En contraste con lo anterior, se tiene que existen trabajos hacen referencia al mejoramiento del enraizamiento de vitroplantas de piña haciendo uso de auxinas. Tal es el caso del estudio realizado por Saucedo y col. (2008), quienes obtuvieron porcentajes de enraizamiento significativamente altos de vitroplantas de *Ananas comosus* variedad Hawaiana (93,75%) suplementando el medio MS con 50mg/L de ANA.

Para concluir con ésta etapa, cabe destacar que no fue necesaria la implementación de medios MS sin suplementar para el enraizamiento *in vitro* de las plantas de piña; del mismo modo, no fue imprescindible el uso de auxinas para enraizamiento de las vitroplantas de piña Ecotipo Gobernadora, ya que en un mismo medio ocurrió la multiplicación, la elongación y el enraizamiento de los brotes, lo cual representa una ventaja económica para el sistema de propagación masiva aquí presentado.

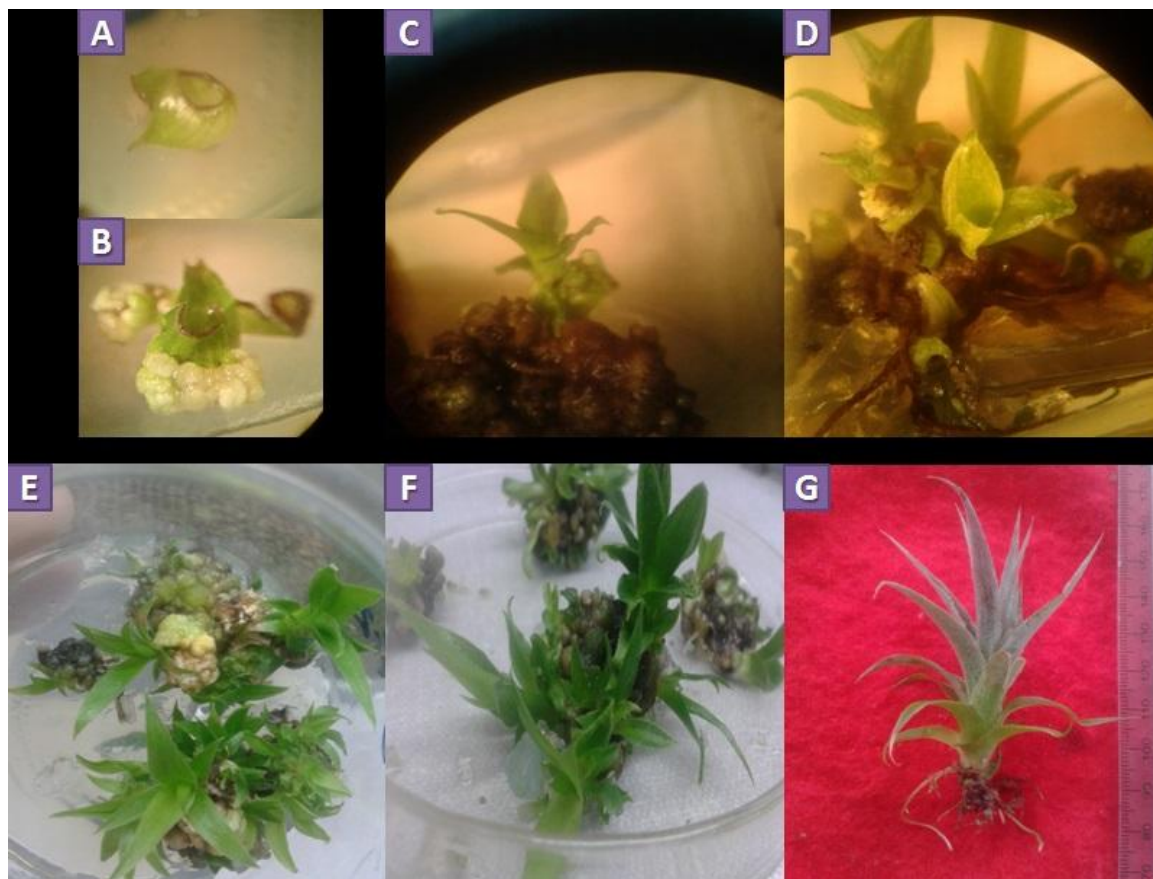


Fig. 10. Diferentes etapas del proceso de regeneración *in vitro* de piña del ecotipo Amazónico Gobernadora vía organogénesis. A: Etapa de establecimiento del cultivo (explante). B: Etapa de inducción del callo. C: Etapa de regeneración de brotes (1,5 meses de cultivo). D: Etapa de regeneración de brotes (3 meses de cultivo). E: Etapa de regeneración de brotes (4 meses de cultivo). F: Etapa de regeneración de brotes (6 meses de cultivo). G: Vitroplanta al final de la Etapa de multiplicación (10 meses: 4 en medio MS5 y 6 meses en MM1).

5.3.Aclimatación

Del total de las 36 plantas de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora que fueron transferidas a tierra (Fig. 11), se obtuvo un 100% de supervivencia a las condiciones *ex vitro* al final de los 3 meses que duró el período de aclimatación. Las mismas se mantuvieron en propagadores durante 15 días y posteriormente fueron transferidas a condiciones de vivero.



Fig. 11. Plantas de piña transferidas a tierra (día 0).

Las plántulas propagadas *in vitro* requieren de un período de aclimatación inmediatamente después de su remoción del ambiente *in vitro*, el cual les permitirá adaptarse a las condiciones de cultivo en el campo. La importancia de que se lleve a cabo una fase de aclimatación radica en lograr la adaptación de las vitroplantas a condiciones autótrofas, en donde se promueve la adecuada regulación de sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua (Hurtado y Merino, 1987; Santa Cruz y col., 2006).

Tal y como se ha mostrado en los resultados antes expuestos, la presencia de raíces fue observada en todas las vitroplantas que se encontraban en el medio de cultivo empleado durante la etapa de multiplicación, por lo que no fue necesaria la implementación de medios específicos para el enraizamiento *in vitro* de las plantas, antes de la etapa de aclimatación. Esto representa una ventaja al realizar estudios de propagación *in vitro* con plantas de piña del ecotipo Gobernadora, ya que se pueden llevar a cabo sin emplear medios y reguladores de crecimiento adicionales para la etapa de enraizamiento, lo cual encarecería el costo de

producción de las plantas. Del mismo modo, éste resultado representa una ventaja en cuanto al ahorro de tiempo, esto al lograrse la obtención de raíces al mismo tiempo que se llevó a cabo la etapa de multiplicación.

De acuerdo con esto, se debe enfatizar en que un requisito importante para las vitroplantas que serán aclimatadas es la presencia de raíces, ya que esto aumenta la probabilidad de supervivencia en condiciones *ex vitro*. Aunado a esto, se tiene que para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, las etapas de enraizamiento y aclimatación son las más importantes para la propagación masiva, cuyo éxito se encuentra determinado por el número de plantas que sobreviven la transición de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Raya y col., 2009).

En estudios realizados en plantas micropropagadas de piña cv. Pérola, Dal Vesco y col. (2001) evaluaron distintos factores tales como el tamaño de las vitroplantas justo antes de su paso a tierra y la composición del sustrato, empleando en su trabajo una mezcla de compost orgánico y arena en proporciones 1:5. Estos investigadores encontraron como resultado que independientemente del sustrato empleado, la mayor tasa de supervivencia, la cual fue de un 93,8%, la obtuvieron cuando los brotes a aclimatar tenían una altura mayor a 7 cm.

Moreira y col. (2006), llevaron a cabo estudios en plantas micropropagadas de piña del cv. 'Pérola', empleando tres tipos de sustratos: compost orgánico, una combinación de 50 % de tierra negra y 50 % de estiércol bovino y una combinación de 40 % de tierra negra, 30 % de estiércol bovino y 30 % de Plantmax (turba negra comercial cribada y tratada), obteniendo un 95 % de supervivencia en los tres casos reportados. Ahora, en la etapa de aclimatación realizada en esta investigación, se obtuvieron resultados superiores para la piña del ecotipo Gobernadora (100% de supervivencia) sin emplear compuestos adicionales (como el Plantmax), lo cual representa un ahorro en el costo del paso a tierra exitoso de las plantas.

Saucedo y col. (2008) utilizaron para ésta etapa vitroplantas de piña de las variedades Champaka y Hawaiana con una altura comprendida entre los 4 y 5 cm, obteniendo como resultado una sobrevivencia de 93.75 % para la variedad Hawaiana y de 79.16 % para la variedad Champaka. Por su parte, Pineda y col. (2012) realizaron estudios en plantas de piña del ecotipo Tabë Kanä del cultivar Española Roja (en éste caso, en el año 2014) propagadas *in vitro* vía organogénesis y embriogénesis somática, utilizando para la etapa de aclimatación *ex vitro* brotes de 6 cm de altura promedio. En dichas investigaciones, se obtuvieron resultados de aclimatación de un 100% de plantas aclimatadas para el cultivar Española Roja y de un 90% para el ecotipo Tabë Kanä, empleando para ello un sustrato compuesto por tierra negra y arena lavada en proporciones 1:1. Ahora bien, en la presente investigación se obtuvieron resultados de aclimatación exitosos para plantas de piña del ecotipo Gobernadora propagadas *in vitro* vía organogénesis (100% de plantas aclimatadas), empleando para ésta etapa brotes con una altura promedio de 9 cm y como sustrato la misma mezcla utilizada por Pineda y col. (2012 y 2014).

5.4. Estudio morfo-anatómico foliar

En cuanto al análisis morfológico foliar de las plantas de *Ananas comosus*, se obtuvo que la estructura de las hojas es, en general, la reportada para el género *Ananas*, de la familia Bromeliaceae. De acuerdo con Brito y col. (2016), los ecotipos Amazónicos de piña se caracterizan por poseer adaptaciones xeromórficas, tales como la disposición de las hojas en una roseta, la cual está asociada a la acumulación de agua y los nutrientes disueltos en ella, epidermis e hipodermis con paredes engrosadas (en el caso de las plantas que se encuentran en condiciones de vivero o ambientes naturales), y tejido acuífero bien desarrollado. Estas plantas, cuando se encuentran bajo condiciones naturales, presentan también caracteres de ambientes húmedos tales como el aerénquima (Fig. 14); las combinaciones de estos atributos permiten diferenciar entre las subfamilias, e incluso entre los géneros de la subfamilia Bromelioideae (Derwidueé y González 2010).

Con respecto a las variaciones que se obtuvieron en los caracteres comparados, las mismas se observaron dependiendo de la condición de cultivo en la cual se encontraban las plantas, lo cual permite afirmar que la condición *in vitro* sí influye sobre los caracteres en cuestión.

Tanto las plantas mantenidas en vivero como las que se encontraban en condiciones *in vitro*, presentaron hojas ensiformes (forma de espada), sésiles, con una disposición arrosetada, nerviación paralela, con los márgenes de las hojas curvados proporcionándole una concavidad a la lámina foliar, la cual fue más pronunciada en las plantas mantenidas en vivero con respecto a las que se encontraba en condiciones *in vitro*; en ambas condiciones de cultivo las hojas eran lisas en la haz, siendo su consistencia coriácea, en las plantas *ex vitro*, y blanda, en las plantas mantenidas *in vitro*.

Las hojas de las plantas mantenidas *in vitro* son de color verde claro, mientras que tanto en la planta madre como en las plantas hijas *ex vitro*, la coloración presentada es un verde más intenso. En las hojas de todas las plantas de piña estudiadas, se lograron apreciar los escudos de las escamas peltadas, las cuales estaban presentes en ambas caras de la superficie foliar, pero en mayor grado en el envés de las hojas, el cual estaba casi completamente cubierto por las mismas (Fig. 12).



Fig. 12. Escamas en la superficie foliar de las plantas hijas mantenidas *in vitro*. A: superficies adaxial y abaxial. B: detalle de superficie abaxial.

Brito y col. (2016) señalan que la presencia de escamas podría aumentar la eficiencia para la captación del agua depositada en forma de rocío o de otras fuentes, en especial en ambientes secos y resaltan que la importancia de las mismas en hojas de piña se debe a que son estructuras altamente especializadas (tricomas modificados) no solo para absorber agua de lluvia o rocío, sino que adicionalmente, evitan la transpiración excesiva por la manera en la que se incrustan en la epidermis, originando así superficies húmedas que ayudan a disminuir la difusión de gases.

Estas escamas son típicas del género *Ananas* (Tomlinson, 1969). Pineda (2009) y Blanco (2015) obtuvieron resultados similares en plantas de piña regeneradas *in vitro*. Podemos sugerir que, la presencia de escamas peltadas son un carácter fijo de *Ananas comosus*, que se manifiesta independientemente del ambiente en que se desarrolla la planta.

Por último, se debe destacar que el carácter de presencia/ausencia de espinas en los márgenes de las hojas de piña ha constituido un elemento importante, no solo desde el punto de vista taxonómico para la elaboración de claves de identificación (Brito y col., 2016), sino también desde el punto de vista fisiológico y de evaluación de la plasticidad fenotípica de dicho carácter dependiendo del ambiente o de la condición de cultivo en el que se encuentren las plantas (Ebel y col., 2016).

De acuerdo con lo anterior, Coppens d'Eeckenbrugge y col. (2011) señalan que la presencia de estas espinas está determinada por un conjunto de genes, sin embargo, su expresión está relacionada con el estrés hídrico u otros factores ambientales. Por otra parte, Ebel y col. (2016) hacen referencia a que la presencia de espinas y la separación entre las mismas está atribuida al cese y reanudación del crecimiento de las hojas y que cuando ocurre un período con alguna situación de estrés, se produce un cese en el crecimiento de la hoja que al reanudarse viene acompañado de la formación de nuevas espinas. Esto explica entonces los grupos dispersos varios pares de espinas a diversos intervalos a lo largo de los márgenes de las hojas totalmente desarrolladas de la planta madre (mantenida en condiciones de vivero).

Sin embargo, una observación importante es que en el caso de las plantas de piña mantenidas en condiciones *in vitro* y en las plantas hijas aclimatadas a condiciones *ex vitro* durante tres meses, los márgenes de las hojas eran totalmente lisos (Fig. 13). Los resultados observados para las plantas mantenidas en condiciones *in vitro* indican que esta condición de cultivo, en general, sí influye sobre los caracteres estudiados; en éste caso, lo obtenido se

puede deber a que a que al estar en un ambiente o entorno en el que se provee a las plantas de todas las condiciones óptimas necesarias para su crecimiento y esta ausencia de los factores estresantes que normalmente se presentan en ambientes naturales, se traduce en la ausencia de espinas en los márgenes de las hojas.

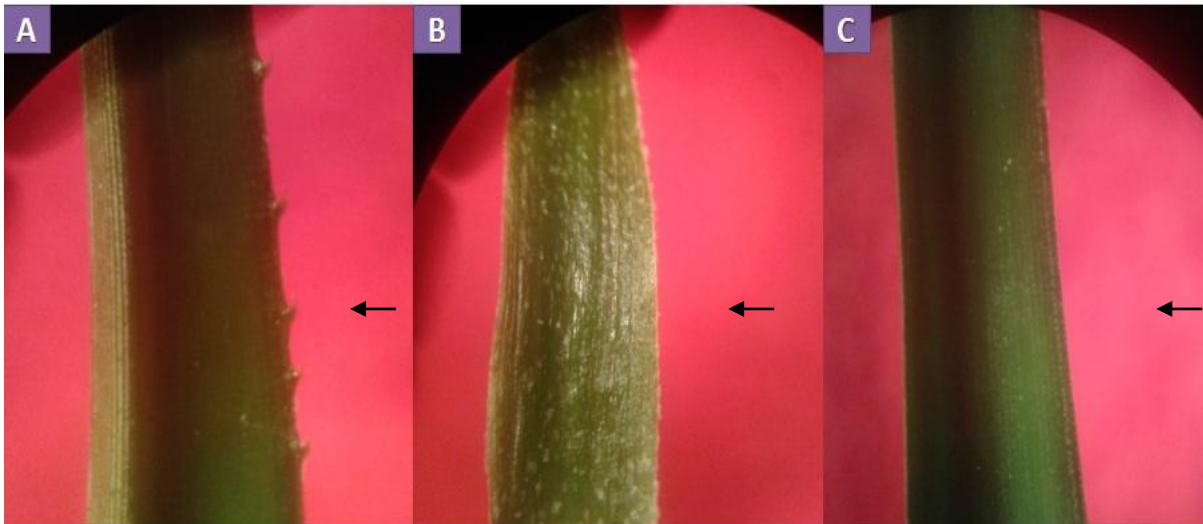


Fig. 13. Morfología general de las hojas de piña ecotipo Gobernadora. A: Hoja de planta madre mostrándose las espinas distribuidas irregularmente en los márgenes foliares. B: Hoja de planta hija mantenida *in vitro* donde se muestra margen sin espinas. C: Hoja de planta hija aclimatada *ex vitro* donde se observa la ausencia de espinas en el margen foliar.

Ahora bien, de los resultados obtenidos para las plantas de piña aclimatadas a condiciones de vivero durante tres meses, se concluye que el tiempo de exposición a las condiciones de vivero no es suficiente como para apreciar a nivel morfológico la expresión del carácter ‘presencia de espinas’ incluso aún estando la planta bajo condiciones naturales, por lo que se sugiere que es necesario más tiempo para detectar algún cambio en éste patrón morfológico.

Tabla 10. Caracterización morfo-anatómica foliar de las plantas de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora.

Característica morfológica o anatómica	Planta madre <i>ex vitro</i>	Planta hija mantenida <i>in vitro</i>	Planta hija mantenida <i>ex vitro</i>
Coloración de la hoja	Verde oliva	Verde pálido	Verde oliva
Forma de la hoja	Cóncava	Aplanada	Cóncava
Espesor de la lámina	Grueso	Delgado	Grueso
Margen espinoso	Sí	No	No
Escamas peltadas	Presentes	Presentes	Presentes
Cristales tipo rafidio	Presentes	Presentes	Presentes
Aerénquima	Presente	Ausente	Presente
Cutícula	Gruesa	Delgada	Gruesa
Estomas (mm²)	30,26	17,11	22,37

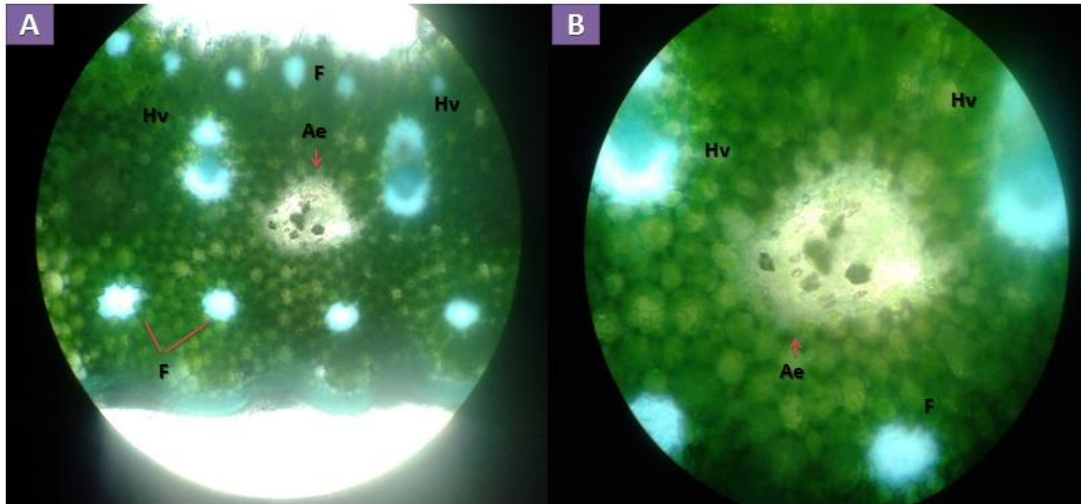


Fig. 14. Hoja de planta madre. A: disposición de aerénquima entre los haces vasculares (100X). B: detalle de aerénquima (200X). Ae: Aerénquima en cámaras; F: Paquetes de fibras extravasculares; Hv: Haces vasculares.

La sección transversal de la lámina foliar de plantas piña *in vitro* y de las plantas mantenidas en vivero, presentó en ambos grupos un mesófilo equifacial en donde no se distinguen parénquima en empalizada y parénquima esponjoso. Ahora bien, luego de realizar el estudio comparativo de las diferencias anatómicas de las hojas de las plantas mantenidas en condiciones *ex vitro* y las plantas que se encontraban *in vitro*, se lograron observar una serie de diferencias importantes, tales como el grado de engrosamiento de la pared de las células epidérmicas y la densidad de cloroplastos, los cuales vienen determinados por el grado de exposición al sol. Dicho esto, se debe resaltar que en los cortes transversales de las hojas de las plantas madre y las plantas hijas aclimatadas *ex vitro*, se observó un mayor grado de engrosamiento de las células epidérmicas y una mayor densidad de cloroplastos en el mesófilo que en los cortes transversales de las hojas de las plantas hijas mantenidas *in vitro*, tal y como se observa en la Fig. 15. Esto indica una mayor proporción de tejido fotosintéticamente activo en las plantas en condiciones *ex vitro*, lo cual coincide con lo esperado debido a que están en ambientes de elevada luminosidad, ocurriendo además, debido a la exposición a dichas condiciones, un aumento en el espesor de la lámina foliar.

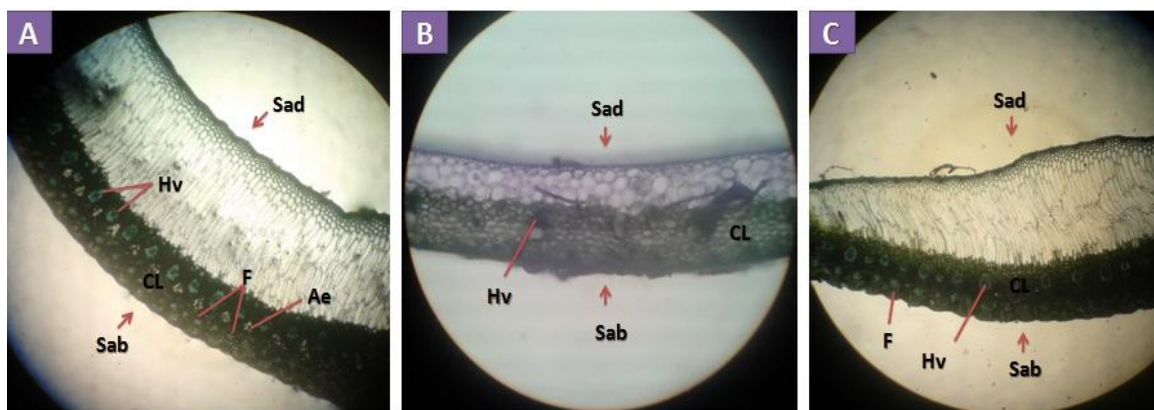


Fig. 15. Secciones transversales de las plantas de piña ecotipo Gobernadora comparadas (40X). A: Plnta madre. B: Planta hija mantenida *in vitro*. C: planta hija transferida a condiciones de vivero. Sad: Superficie adaxial de la epidermis; Sab: Epidermis inferior (sinuosa); Ae: Aerénquima en cámaras; CL: Clorénquima; F: Paquetes de fibras extravasculares; Hv: Haces vasculares.

Al observar los cortes transversales de las plantas *in vitro*, las plantas madre y las plantas hijas aclimatadas *ex vitro*, se constata la presencia de hipodermis bajo la superficie adaxial de la epidermis en todos los casos (Fig. 16). La hipodermis se considera la estructura más común para el almacenamiento de agua, estando presente en las especies xeromórficas (Santa Cruz y col., 2006). En adición, de acuerdo con éste autor, la hipodermis también desempeña un papel importante en la “economía” de calor, especialmente en las especies con metabolismo ácido crassuláceo y atribuyen su presencia a la exposición a la luz. Sin embargo, en el caso de las plantas hijas mantenidas *in vitro*, la presencia de la hipodermis en las hojas no podría atribuirse a ninguno de los factores mencionados, ya que las plantas *in vitro* están en condiciones de menor luminosidad y alta humedad relativa.

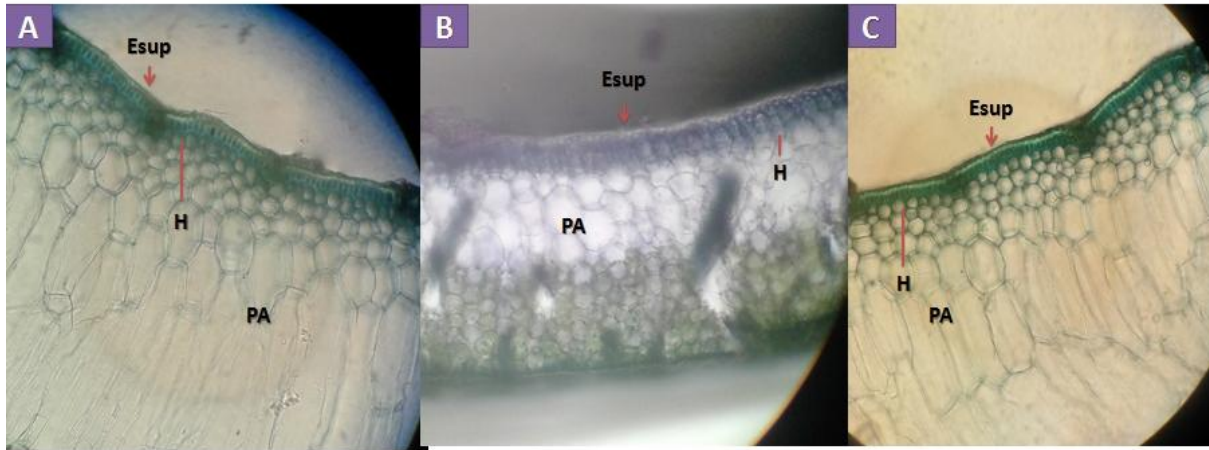


Fig. 16. Detalle de cutícula, epidermis superior (Esup), hipodermis (H) y parénquima acuífero (PA) de las hojas de plantas de piña del ecotipo Gobernadora. A: planta madre. B: planta hija *in vitro*. C: planta hija *ex vitro* (200X).

En las hojas de las plantas mantenidas *in vitro*, se observa una cutícula poco desarrollada en las caras adaxial y abaxial de la epidermis, lo cual puede atribuirse al hecho de que bajo estas condiciones de cultivo están ausentes los factores ambientales estresantes.

En los cortes correspondientes a la planta hija *in vitro*, la lámina foliar muestra un parénquima acuífero constituido por células de forma redondeada y paredes delgadas, justo por debajo de la hipodermis; se apreciaron de tres a cuatro estratos de células conformando éste tejido. Por otra parte, las células del clorénquima presentan forma redondeada, observándose que los cloroplastos no están distribuidos homogéneamente en la totalidad de la célula, sino más bien están agrupados, en sentido centrífugo, por toda la pared de la misma.

Ahora bien, en las hojas de plantas mantenidas en vivero, en la cara adaxial, se observa, justo debajo de la hipodermis, un parénquima acuífero constituido por células de mayor tamaño que las observadas en el corte de las hojas de las plantas mantenidas *in vitro*, pero con paredes delgadas. En adición, se observan tres o cuatro estratos de células conformando dicho tejido, sin embargo, a pesar de observarse aproximadamente el mismo número de estratos tanto en las plantas *in vitro* como en las plantas *ex vitro*, en éstas últimas el tamaño de las

células del parénquima acuífero es mayor, lo cual contribuye con el espesor de la lámina, siendo éste mayor en las plantas en condiciones *ex vitro*.

De acuerdo con Tavares y col. (2014), la hipodermis acuífera puede representar un carácter adaptativo o respuesta a las condiciones de suministro de agua, lo cual podría constituir un soporte para los resultados obtenidos, ya que en las plantas que se encuentran en condiciones *ex vitro*, éste tejido presentó un mayor espesor.

Por otra parte, según Pineda y col. (2012), la presencia de hipodermis y parénquima acuífero es un carácter fijado genéticamente y muestra plasticidad fenotípica en el número de capas y tipos celulares. Estos autores señalan, también, que el grado de desarrollo podría ser efecto de las condiciones de iluminación controladas y alta humedad en el caso de las plantas *in vitro*, justificando que la presencia en menor proporción de hipodermis y parénquima acuífero en las hojas de las plantas cultivadas y mantenidas *in vitro*, podría ser debido a que estos caracteres facilitan e incrementan la supervivencia de estas plantas cuando son transferidas a las condiciones de vivero.

Santa Cruz y col. (2006), resaltan que las hojas de plantas de piña son hipoestomáticas, esto independientemente del ambiente de cultivo. Estos autores encontraron que los estomas están distribuidos en bandas paralelas por toda la extensión de la cara abaxial, presentando cámara subestomática. En contraposición con esto, en un estudio realizado por Rodrigues y col. (2014) en plantas de *N. concentrica*, una planta perteneciente a la familia Bromeliaceae, se hace referencia a que los estomas están irregularmente distribuidos en ambas caras epidérmicas en las plantas pertenecientes a esta familia independientemente del ambiente de cultivo. Sin embargo, en el presente trabajo se observó una distribución irregular de los estomas en la superficie abaxial de la lámina foliar.

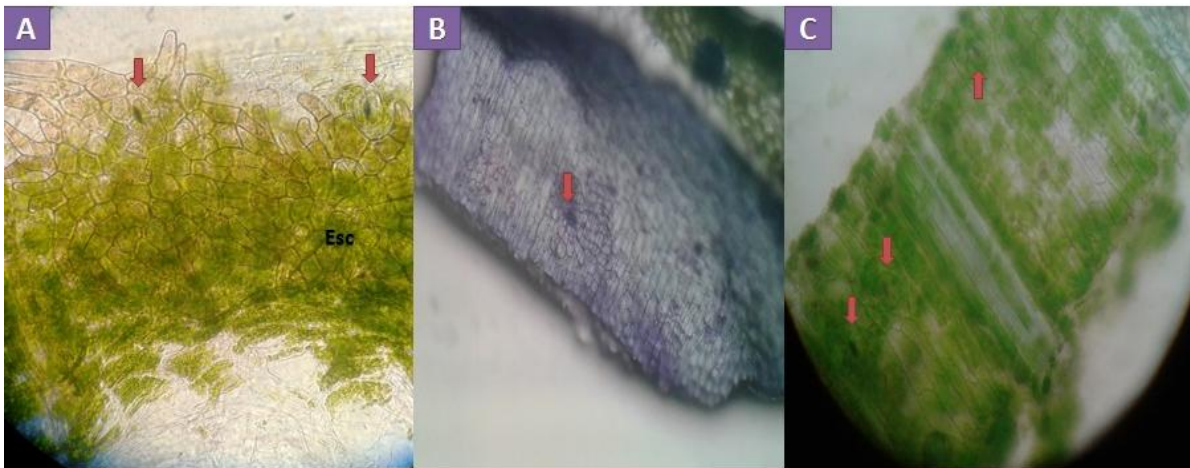


Fig. 17. Vista paradérmica de la epidermis de las hojas de las plantas de piña ecotipo Gobernadora (100X). A: Hojas de planta madre *ex vitro* donde se muestran estomas (flecha roja) y escamas (ESC). B: Hoja de planta hija *in vitro* donde muestra un estoma anormal (flecha roja). C: Hoja de planta hija *ex vitro* donde se observan estomas (flecha roja).

En el caso de las plantas de piña cultivadas *in vitro*, se observaron pocos estomas (17,11 estomas/mm²) en los cortes paradérmicos realizados; en la imagen B de la Fig. 17, se aprecia lo que se presume sea un estoma anormal en proceso de formación, tipo de estoma característico de ésta condición de cultivo. Por otra parte, en el corte paradérmico de la hoja de la planta madre y de la planta hija mantenida en vivero, si se lograron apreciar estomas (Fig. 17 A y C), teniéndose una densidad de aproximadamente 30,26 estomas/mm² y 22,37 estomas/mm², respectivamente (Tabla 9). Esta densidad estomática puede ser considerada baja cuando se compara con especies con características xeromórficas (Santa Cruz y col., 2006), sin embargo, el resultado coincide con lo esperado ya que se apreció una densidad estomática mayor en las plantas madre y en las plantas hijas aclimatadas *ex vitro*, las cuales sí se enfrentan a condiciones naturales adversas.

5.5. Pigmentos fotosintéticos

Se realizó la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos para evaluar desde el punto de vista bioquímico la aclimatación de las plantas de piña Gobernadora. Dicha determinación se llevó a cabo en los siguientes grupos de plantas: Plantas madre, las cuales provienen de los sembradíos ubicados en el estado Amazonas (designadas como grupo 'control' por permanecer durante años en las mismas condiciones de vivero a las cuales se transfirieron las plantas hijas), plantas hijas mantenidas *in vitro* en medio de multiplicación durante 8 meses (Plantas F.M), y plantas mantenidas bajo condiciones de vivero a los 30 días (Plantas F.A.30) y a los 45 días (Plantas F.A.45). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10.

Tabla 11. Contenido de PF en los 4 grupos de plantas de *Ananas comosus* ecotipo Gobernadora.

Tratamiento	(µg/cm ²)					C(x+c)/ Cl(a+b)
	Cl _a	Cl _b	Cl (a+b)	Cl _a /Cl _b	C(x+c)	
Planta madre (Control)	48,30 ± 10,14 ^a	10,50 ± 9,55 ^a	63,60 ± 23,63 ^a	5,21 ± 5,12 ^a	17,00 ± 5,77 ^a	0,24 ± 0,13 ^a
Plantas F.M.	24,35 ± 7,03 ^b	9,95 ± 4,82 ^a	34,25 ± 11,59 ^b	2,67 ± 0,72 ^a	5,40 ± 2,45 ^b	0,16 ± 0,06 ^{a,b,c}
Plantas F.A.30	23,10 ± 7,35 ^b	9,15 ± 3,11 ^a	33,45 ± 10,20 ^b	2,53 ± 0,29 ^a	4,80 ± 1,70 ^b	0,14 ± 0,03 ^b
Plantas F.A.45	30,05 ± 6,15 ^b	11,10 ± 2,07 ^a	42,90 ± 8,83 ^b	2,70 ± 0,18 ^a	7,35 ± 1,79 ^b	0,17 ± 0,02 ^{a,c}

X ± error estándar. Las letras a, b y c denotan diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parámetro.

Los resultados mostraron que las plantas control tienen cantidades significativamente mayores de Cla, Cl(a+b) y C(x+c), con respecto a los otros tratamientos. Para la Clb no hubo diferencias significativas entre tratamientos.

El contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de área de las hojas, constituye uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y de su eficiencia (García y col., 2005). Bajos contenidos o la degradación de la clorofila reducen la capacidad fotosintética de la hoja, debido a que esto limita la absorción de energía radiante por parte del aparato fotoquímico (Pezeshki, 2001, citado por Suárez y col., 2017).

Aunque no existen diferencias significativas entre las plantas *in vitro* y las plantas mantenidas en condiciones de vivero a los 30 y 45 días, se observa una tendencia del contenido de Cla y de carotenoides a incrementar con el paso del tiempo, por lo que, si se mantienen más tiempo las plantas en vivero, éstas, probablemente, alcanzarán valores del contenido de PF similares a los obtenidos en las plantas control.

Es de destacar que los PF fueron extraídos de hojas que se desarrollaron en el ambiente *in vitro* y persistieron en la planta durante el período *ex vitro* (podemos denominarlas hojas persistentes, según lo descrito por Hazarika, 2006 y Pospíšilová y col., 1999). Según Hazarika (2006), una hoja persistente puede o no aclimatarse a las nuevas condiciones, lo cual influye o determina la competencia fotosintética de las plantas en el ambiente *ex vitro*. Por lo que, es conveniente sugerir que, para una mejor evaluación de la confiabilidad del contenido de pigmentos como indicador de aclimatación, se debe determinar dicho contenido tanto en hojas persistentes con tiempos mayores a 45 días como en hojas nuevas (formadas en el vivero).

No hubo diferencias significativas en el contenido de Clb entre los tratamientos. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para la relación Cla/Clb, sin embargo, de acuerdo con ésta relación, en todos los grupos de plantas el contenido de Cla es mayor que el de Clb. Estos resultados son un indicativo de que el contenido de Clb no se ve afectado por las condiciones de crecimiento de las plantas en ninguna de las etapas. Las plantas de piña crecieron expuestas a una intensidad lumínica comprendida entre los 23,36 – 139,47 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por lo que se puede sugerir que el contenido de Clb en todas las plantas de piña del presente estudio es eficiente como antena dentro del intervalo de intensidades lumínicas antes mencionado.

En cuanto al contenido de carotenoides, la planta madre presentó un valor promedio significativamente distinto, diferenciándose estadísticamente del resto por ser el mayor valor obtenido, por lo que se presume éste tratamiento presenta un mejor desarrollo de funciones como la disipación del exceso de energía de las clorofilas excitadas y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Lawlor, 2001), cuya formación indica condiciones de estrés oxidativo.

No se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de C(x+c) en las plantas hijas (de todas las edades). Sin embargo, el mismo aumenta al transcurrir el tiempo en la fase de vivero. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la relación C(x+c)/Cl(a+b) entre las plantas bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*, sin embargo, se observa un incremento significativo en ésta relación durante la fase de aclimatación. El incremento en ambos casos podría ser indicativo de que la exposición de las plantas a las condiciones *ex vitro* induce gradualmente el restablecimiento de las funciones fotoprotectoras del aparato fotosintético.

En todo caso, la relación $C(x+c)/Cl(a+b)$ obtenida para todos los grupos de plantas podría ser el reflejo de una mayor síntesis de clorofilas que de carotenoides, lo cual nos indica que las plantas no necesitan altos valores de estos pigmentos y que, a las intensidades lumínicas bajo las cuales se encuentran expuestas todas las plantas estudiadas ($23,36 - 139,47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no es necesaria la activación de los mecanismos de disipación de exceso de energía.

Diversos autores han realizado estudios similares, pero encontrando resultados contrastantes entre ellos. Tal es el caso del estudio realizado por Grout y Millam (1985), quienes trabajaron con plántulas de fresa cultivadas *in vitro*. Estos autores reportan que el contenido de clorofilas era menor en las plantas mantenidas *in vitro* con respecto a las plantas que fueron transferidas a condiciones *ex vitro*. Encontraron, además, que después de transferir las vitroplantas de fresa al vivero, la mayoría de las hojas persistentes se deterioraron rápidamente y las que permanecieron en las plantas no mostraron un aumento en la fijación de carbono, lo cual señalan que es un indicativo de la falta de desarrollo de la competencia fotosintética. Estos resultados también coinciden con los reportados por Grout y Aston (1978), quienes en su estudio encontraron que las plántulas regeneradas *in vitro* también tenían menor contenido de clorofila en comparación con plántulas de 4 semanas de transferidas a condiciones de vivero. Fila (2006), también registró altos contenidos de clorofila durante el crecimiento de plántulas en condiciones *in vitro* en comparación con aquellas en fase de aclimatación *ex vitro*.

En contraste con lo anterior, se tienen los resultados reportados por Pospilova y col. (1999), quienes realizaron una recopilación de información sobre aclimatación al ambiente *ex vitro* de plantas propagadas mediante cultivo *in vitro*, encontrando como resultado que los contenidos de Cl a aumentan después del trasplante en plantas de *Nicotiana tabacum*.

Los resultados aquí obtenidos difieren de los reportados por Linares (2018), quien en su estudio llevó a cabo la determinación del contenido de PF en plantas de *Solanum lycopersicum* mantenidas *in vitro* y en plantas a los 7 días de transferidas a condiciones *ex vitro*. La autora encontró que en aquellas en fase de enraizamiento (*in vitro*) los valores del contenido de Cl a y clorofilas totales (Cl (a+b)) fueron significativamente mayores a los encontrados en las plantas en fase de aclimatación (*ex vitro*). Los resultados obtenidos en dicho estudio, sugieren que algunos factores presentes en el medio de cultivo inducen la síntesis de clorofilas, atribuyendo lo obtenido a la presencia de citocininas y sacarosa. Sin embargo, la no aclimatación de las vitroplantas de tomate, fue un impedimento para la determinación de la confiabilidad del contenido de PF como indicador de aclimatación *ex vitro*.

De acuerdo con lo anterior, se tiene que las citocininas intervienen en la formación de cloroplastos, promoviendo un mejor desarrollo del aparato fotosintético. Las mismas, a su vez, promueven la movilización de sacarosa y otros nutrientes hacia la hoja, los cuales pueden ser utilizados por la misma en la síntesis de clorofila y otros componentes cloroplastídicos (Taiz y Zeiger, 2010).

En diversos estudios en los cuales han estimado el contenido de PF en plantas de *Ananas comosus* mantenidas en condiciones de cultivo *in vitro* y *ex vitro*, se han reportado los resultados que se presentan a continuación.

Aragón y col. (2012), evaluaron parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de *Ananas comosus* bajo dos condiciones de cultivo distintas, basándose en el hallazgo de que *A. comosus* cultivada *in vitro* a temperatura constante se comporta como C3; evaluaron el efecto de dos condiciones de aclimatación *ex vitro* (una induce el metabolismo

C3 y la otra el CAM) sobre las respuestas de plantas de piña micropropagadas, obteniendo un mayor contenido de clorofilas totales en plantas de piña con características típicas de un ambiente *in vitro* en comparación con las plantas en condiciones *ex vitro*.

Por otra parte, Villalobo y col. (2012), estudiaron los cambios morfo-fisiológicos en plántulas de piña durante la fase de aclimatación. Estos autores después de la transferencia de las plántulas a la condición de aclimatación, observaron una disminución que señalan como ‘brusca’, aunque no significativa, en la clorofila a y b durante los primeros 15 días y su contenido continuó disminuyendo hasta los 45 días (8.1 y 3.8 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Según estos autores, una mayor concentración de clorofila se asocia con una mayor inversión de la planta en el complejo de recolección de luz del PSII y los pigmentos de la antena.

Ambos trabajos, en general, muestran que en las plantas de *Ananas comosus* en fase de aclimatación disminuyen el contenido de clorofilas con respecto a las plantas *in vitro*, lo cual difiere de los resultados aquí reportados. Al considerar las distintas condiciones de crecimiento *in vitro* y *ex vitro* que utilizaron los autores (Aragon y col. 2012; Villalobo y col. 2012) y compararlas con las mediciones realizadas en el presente estudio, se pudo observar que la densidad de flujo de fotones fue menor en comparación con la reportada por dichos autores.

En el estudio realizado por Aragon y col. (2012), las plantas de piña en fase de aclimatación se mantuvieron en cámaras de crecimiento. Las vitroplantas que se mantuvieron bajo condiciones inductoras de metabolismo CAM (equiparables a las condiciones de vivero), crecieron bajo un fotoperíodo de 16h de luz/8 h de oscuridad con luz proporcionada por lámparas fluorescentes (DFF: $260 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Por otra parte, Villalobo y col. (2012), en la fase de aclimatación mantuvieron las plantas de piña en ‘contenedores para aclimatación’,

bajo fotoperíodos naturales y expuestas a una DFF que oscilaba entre los 400-500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las intensidades lumínicas bajo las cuales crecieron las plantas en los estudios mencionados, son mayores a las reportadas para el presente trabajo para las plantas *ex vitro* (139,47 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), lo cual se vio reflejado en las diferencias en los contenidos de clorofila entre los ambientes *in vitro* y *ex vitro* entre los trabajos previos y el presente trabajo.

5.5.1. Análisis morfométrico

Adicionalmente, a fin de complementar los resultados obtenidos para éste apartado, se llevó a cabo un estudio morfométrico en los mismos grupos de plantas, es decir, plantas en las mismas etapas de cultivo *in vitro* y mismas edades en las cuales se realizó la cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos.

Tabla 12. Caracteres morfométricos evaluados en plantas de piña ecotipo Gobernadora: plantas madre, plantas hijas obtenidas por organogénesis mantenidas *in vitro* y luego de 30 y 45 días de transferidas a condiciones de vivero.

	Plantas Madre	Plantas F.M.	Plantas F.A. 30	Plantas F.A. 45
Altura (cm)	45,00 ± 2,73 ^a	9,11 ± 2,31 ^b	10,83 ± 1,53 ^{b,c}	13,00 ± 1,04 ^c
N° de hojas	17,42 ± 1,24 ^a	12,00 ± 0,85 ^b	13,08 ± 0,79 ^b	15,75 ± 1,14 ^c
N° de hojas/ altura	0,39 ± 0,04 ^a	1,41 ± 0,40 ^b	1,23 ± 0,21 ^b	1,22 ± 0,16 ^b

X ± error estándar. Las letras a, b y c denotan diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parámetro.

La Tabla 12 indica que hubo alargamiento vertical neto en las plantas de piña transferidas a condiciones de vivero a los 45 días. Dicho incremento no fue significativo con respecto a las plantas de la edad anterior (30 días); sin embargo, si se toma como punto de partida la longitud promedio de las Plantas F.M. (plantas mantenidas *in vitro*), se tiene un alargamiento significativo, en promedio, de 3,89 cm luego de transcurridos los 45 días.

En cuanto a la densidad de follaje (N° de hojas/altura) de las plantas, no se obtuvieron diferencias significativas entre las plantas hijas de distintas edades. Sin embargo, se puede apreciar cómo la misma presenta una tendencia a disminuir en condiciones de vivero, conforme pasa el tiempo, con respecto a la densidad reportada para las plantas bajo condiciones *in vitro* (Tabla 12). Éste resultado coincide con lo reportado por Blanco (2015) para el ecotipo Gobernadora, quien también obtuvo que la densidad de follaje de las plantas disminuye en condiciones de vivero con respecto a las plantas mantenidas bajo condiciones *in*

vitro. El autor señala que éste resultado sugiere que las plantas aclimatadas tienden hacia los mismos valores obtenidos para sus respectivas plantas madres.

Por otra parte, la formación de nuevas hojas luego de la transferencia de las vitroplantas a condiciones de vivero, está asociada a la recuperación de la condición autotrófica de las plantas (Villalobo y col., 2012), de ahí deriva la importancia de determinar el N° de hojas y emplear el mismo como indicador de aclimatación de las plantas a condiciones *ex vitro*.

Los valores reportados en la Tabla 12 muestran cómo va incrementando el N° de hojas conforme transcurre el tiempo en condiciones de vivero. En las plantas en F.A., a los 45 días, se obtuvo un incremento significativo, en promedio, del N° de hojas, el cual fue de 3, 75 hojas nuevas.

Debido a la tendencia presentada por los resultados obtenidos en la determinación del contenido de PF, no se logró establecer ninguna relación entre el mismo y la fase de aclimatación a condiciones *ex vitro* de las vitroplantas de *Ananas comosus*. Sin embargo, de los valores obtenidos en el análisis morfométrico, se tiene que el desarrollo de nuevas hojas en el ambiente de vivero es indicativo de aclimatación o de que la planta se está aclimatando a la nueva condición; por tanto, se concluye que el tiempo (si bien podría considerarse corto) de exposición de las plantas a condiciones de vivero, permitió la aclimatación de las mismas, al menos a nivel morfológico. Por último, se debe resaltar que éste parámetro (N° de hojas) también nos muestra la tendencia de las plantas aclimatadas hacia los mismos valores obtenidos para sus respectivas plantas madres.

5.6. Caracterización microclimática del ambiente *in vitro* y *ex vitro*

Las condiciones de cultivo determinadas presentaron valores contrastantes de DFF y temperatura entre los ambientes *in vitro* y *ex vitro*.

Se midió la DFF durante el día a diferentes horas en ambas condiciones de crecimiento. Se hace énfasis en la luz y su influencia en el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido a que éstas plantas provienen del laboratorio, donde se mantuvieron expuestas a una DFF regulada de $23,36 \mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$, pero en el invernadero ésta cifra, en promedio, incrementó considerablemente ($139,47 \mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$) llegando a alcanzar a las 12:00 hs un máximo de $209,36 \mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$. Es importante resaltar que la temperatura máxima ($31,70 \text{ }^\circ\text{C}$) se alcanzó a una hora cercana al máximo de DFF. Esto puede deberse a diversos factores; el vivero al cual son transferidas las vitroplantas para su aclimatación se clasifica, con relación al control de los factores meteorológicos, como un vivero no automatizado, es decir, no se utiliza ningún tipo de equipamiento para el control de las condiciones microclimáticas, exponiendo las plantas a las condiciones de los factores físicos propios de la naturaleza. De acuerdo con esto, la temperatura en el interior de un invernadero va a estar en función a la radiación solar.

Existen dos dimensiones de la radiación que deben ser resaltadas. La primera es la intensidad de la luz y la segunda el fotoperiodo (periodo de la duración de la luz). La intensidad es responsable de la maximización del crecimiento de la planta y el fotoperíodo es responsable del metabolismo (Rojas y Paul, 2007). En cuanto al fotoperíodo, las plantas del ambiente *ex vitro* estuvieron expuestas a condiciones de fotoperíodo natural y su relación con la temperatura y el metabolismo se discute más adelante. Ahora, en cuanto a la intensidad lumínica, tiene que las mediciones de DFF efectuadas en el invernadero dentro del intervalo de tiempo estudiado arrojaron una alta variación diaria (figura 18) la cual se sugiere que

benefició a las plantas que crecieron bajo éste tratamiento, esto debido a que los parámetros que más se modificaron, de acuerdo con el análisis morfométrico, fueron la altura y el N° de hojas, los cuales incrementaron significativamente a los 45 días con respecto a los valores encontrados para las plantas mantenidas bajo condiciones *in vitro* (Tabla 12), observándose además una tendencia de los valores de esos mismos parámetros hacia los obtenidos para la planta madre.

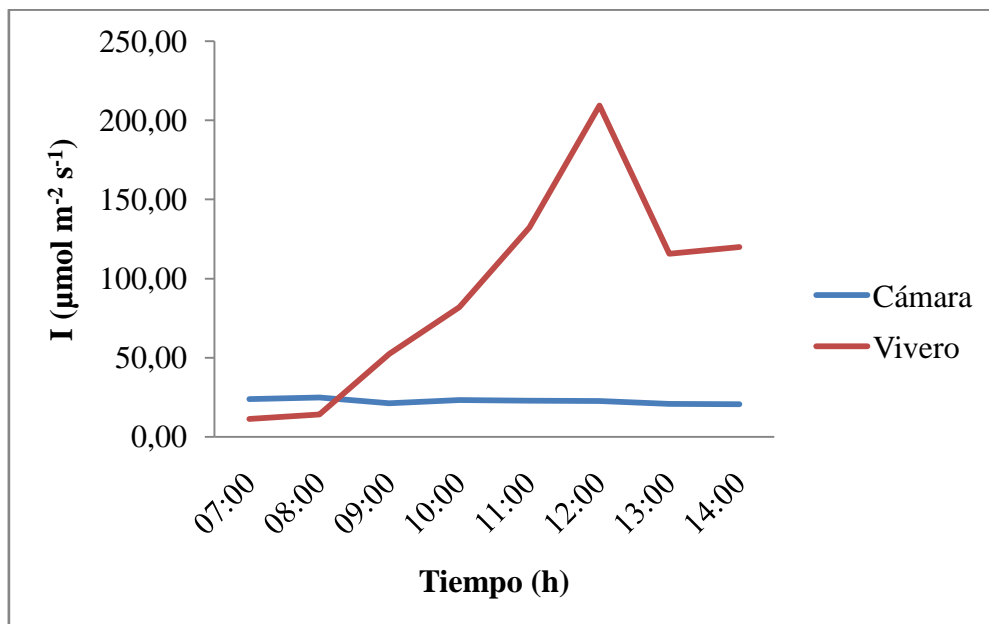


Fig. 18. Tendencia de la DFF en la cámara de crecimiento y el vivero durante las horas de medición (n=7 días).

En el ambiente *in vitro*, se obtuvo que las plantas crecieron bajo condiciones relativamente constantes de temperatura (25,15°C, Fig. 19) y las mismas estuvieron expuestas a luz fluorescente continua. Por el contrario, en el vivero, las plantas crecieron bajo condiciones de fotoperiodo natural, observándose variaciones en la temperatura ambiental

entre los períodos de luz y oscuridad durante los días en los que se llevaron a cabo las mediciones (Figura 19).

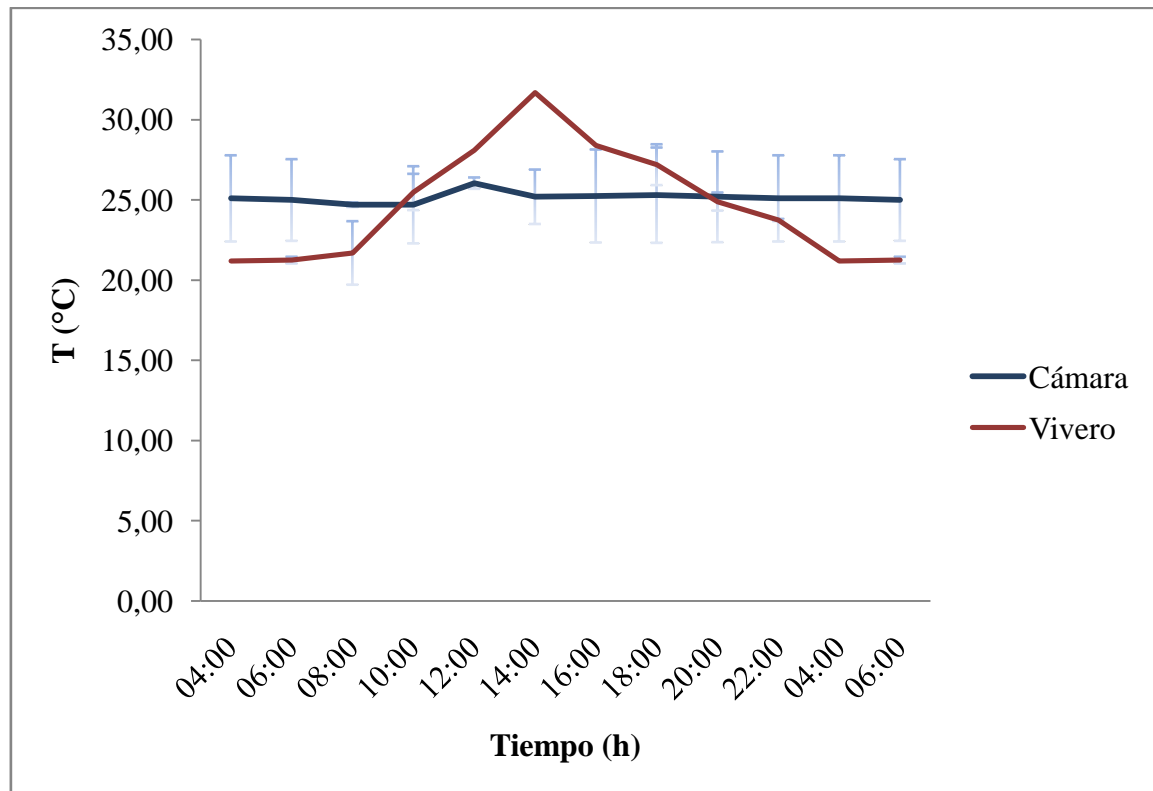


Fig. 19. Tendencia de la temperatura ambiental en la cámara de crecimiento y el vivero durante las horas de medición (n=7 días).

La temperatura es el factor más importante en el cultivo de las plantas de piña y variaciones en la misma influyen en las tasas de crecimiento y desarrollo, y también, en la estructura morfológica interna y externa de *Ananas comosus*. Variaciones en la temperatura entre el día y la noche, con temperaturas diurnas más altas y nocturnas más bajas son favorables para la expresión del metabolismo CAM (Lüttge, 2004). En éste sentido, se tienen algunos trabajos (Nievola y col., 2005; Aragón y col., 2012) que permiten concluir que el estrés causado por las condiciones ambientales contrastantes influye sobre el metabolismo de

las plantas, proporcionando a las plantas de piña la capacidad de comportarse como una planta CAM facultativa, es decir, una planta capaz de cambiar su metabolismo del C3 al CAM.

Nievola y col. (2005), demostraron que plantas de *Ananas comosus*, cv. Cayena Lisa, cultivadas a diferentes regímenes de temperatura *in vitro* pueden expresar metabolismo CAM o C3. Vitroplantas creciendo en condiciones de termoperíodo (28 °C luz/15 °C oscuridad) y temperatura constante las 24 horas del día (28 °C) expresaron metabolismo CAM y C3, respectivamente.

Aragón y col. (2012), basándose en el hallazgo de que *A. comosus* cultivada *in vitro* a temperatura constante se comporta como C3; evaluaron el efecto de dos condiciones de aclimatación *ex vitro* (una induce el metabolismo C3 y la otra el CAM) sobre las respuestas de plantas de piña micropropagadas. Sus resultados demostraron la plasticidad fenotípica de las plantas de piña bajo condiciones *ex vitro* (pueden desviar su metabolismo de C3 a CAM, modificando las condiciones ambientales).

Los resultados mostrados anteriormente sobre la piña han demostrado que puede ocurrir la alteración del metabolismo de carbono C3/CAM, cuando se presentan cambios en la temperatura ambiental durante los períodos de luz y oscuridad. De acuerdo con esto, en el presente trabajo se concluye que, dado que la temperatura promedio tiende a ser constante en el ambiente *in vitro*, lo cual no ocurre en el vivero, en donde sí existe un termoperíodo, se sugiere que las plantas de piña Ecotipo Gobernadora podrían comportarse como plantas C3 cuando se encuentran bajo condiciones *in vitro*, mientras que, al ser transferidas a condiciones de vivero, podría ocurrir el restablecimiento de su metabolismo (plantas CAM). Sin embargo, esto es una hipótesis que debe confirmarse realizando diversos estudios que la apoyen, tales como determinación del índice de succulencia, acidez titulable, actividad enzimática (PEPC),

entre otros; la comprobación de ésta hipótesis constituye un factor clave para el manejo de la fase de aclimatación con propiedad, en contraposición con el alcance que tiene reportar únicamente el porcentaje de plantas aclimatadas.

6. CONCLUSIONES

- Los resultados confirman que se requiere de la presencia de BAP, en combinación con auxinas, para lograr la inducción organogénica en el ecotipo de piña Gobernadora a partir de bases foliares.
- Estudios histológicos demostraron que el proceso de regeneración *in vitro* de *Ananas comosus* Ecotipo Gobernadora ocurrió vía organogénesis indirecta.
- Durante la etapa de multiplicación, se logró también la elongación y el enraizamiento de los brotes regenerados, por lo cual no fue necesaria la implementación de medios especiales para el enraizamiento *in vitro* de las plantas.
- 45 días bajo condiciones *ex vitro* (vivero) fue un tiempo insuficiente para la aclimatación del aparato fotosintético del ecotipo de piña Gobernadora. De modo que, el contenido de PF fue un indicador bioquímico confiable de aclimatación. Para ese mismo lapso de tiempo, si se observaron cambios a nivel morfológico en las plantas transferidas a vivero.
- El análisis anatómico foliar permite sugerir que, las plantas obtenidas *in vitro* reducen la heterotrofia y se vuelven fotosintéticamente competentes a los 3 meses de transferidas a condiciones de vivero.
- El alcance del presente estudio es que contribuye a un mayor entendimiento de la aclimatación *ex vitro* de las plantas de *Ananas comosus* derivadas del cultivo de tejidos vegetales.

7. RECOMENDACIONES

- Se debe realizar la caracterización genética de las plantas aquí regeneradas para conocer la estabilidad genética de las mismas.
- Es importante realizar la transferencia de las plantas a condiciones de campo para conocer su viabilidad en su ambiente natural y así poder llevar a cabo una comparación más completa del proceso.
- Las plantas de piña del Ecotipo Gobernadora presentes en el banco de germoplasma tanto *in vitro* y las mantenidas en condiciones *ex vitro* (vivero), pueden ser utilizadas para una evaluación más exhaustiva de la aclimatación desde el punto de vista fisiológico.
- Se sugiere que para una mejor evaluación de la confiabilidad del contenido de pigmentos como indicador de aclimatación, se debe determinar dicho contenido tanto en hojas persistentes con tiempos mayores a 45 días como en hojas nuevas (formadas en el vivero).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, A., Karmakar, B. y Roy, S. (2003). Callus Induction and High-frequency Plant Regeneration of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Plant Cell Tissue Cult.* 13: 109-116.
- Antoni, M.G. and Leal, F.J. (1980) Species of the genus *Ananas*: origin and geographic distribution. *Tropical Region, American Society for Horticultural Science* 24, 103–106.
- Arangon, C., Carvalho, L., Gonzalez, J., Escalona, M., Amancio, S. 2012. *The physiology of ex vitro pineapple (Ananas comosus L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions.* Laboratorio de Células y Cultivo Tejidos Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Instituto Superior de Agronomía. Universidad Tecnica de Lisboa, Lisboa, Portugal e-mail: samport@isa.utl.pt.
- Ariguita, L., González, A., Sánchez, R. (1999). Aclimatación negativa en Rubisco frente a enriquecimiento en CO₂. Laboratorio de Fisiología Vegetal. Dpto. B.O.S. Fac. Biología C/catRodrigo Uria s/n. 33071. Oviedo.
- Baker, N. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59:89-113.
- Balza, R., Alvarado, C., Rodríguez, E., Durán, D. y Solarte, J. (2016). INIA divulga. Cultivo de la piña: aplicación de buenas prácticas agrícolas.
- Blanco, H. (2015). Regeneración *in vitro* de plantas de dos ecotipos amazónicos de *Ananas comosus* (L.) Merr., vía embriogénesis somática y organogénesis: Estudios morfohistológicos. Análisis de estabilidad estructural y genética de las plantas obtenidas.

- Blanco, H., Vargas, T., de García, E. (2011). Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales.
- Blanco, H., Vargas, T., de García, E. (2017). Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIX No. 1 Enero – Junio 2017. Pp. 7-20.
- Betancourt, D. (2006). Diversidad y Producción de la Piña en el Municipio Atures del estado Amazonas. *Agronomía de la producción*. INIA divulga 8: 33-36.
- Botero, D. (2015). Factibilidad de un cultivo de piña variedad MD2 en Caucasia para exportación a USA. Tesis de grado. Universidad EAFIT, Medellín.
- Brito, A., Blanco, H., Escala, M., Vargas, T., de García, E. (2016). Morfoanatomía foliar de dos ecotipos de *Ananas comosus* (L.) Merr. del Amazonas Venezolano: Amarilla y Yärä känä. *Acta Botanica Venezuelica*, vol. 39, núm. 2, 2016, pp. 158-179.
- Bruinsma, J. (1963). The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochem and Photobiol.* 2:241-249.
- Cáceres, A., Marcano, A. K., Smits, G., Blanco, H., Cáceres, K., Oropeza, M., Vargas, T.E. (2016). *Guía de prácticas*. Laboratorio de fisiología I (Vegetal). Dpto. de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Casale, I. y García, E. (1987). Multiplicación acelerada de tres variedades de piña. *ACEVIV*. Boletín científico, 2: 3-15.
- Cerrato, I. (2013). Panorama mundial de la piña. PANOAGR.

- Chinchilla, M. (2014). Acción de la enzima bromelina en la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación.
- Christianson, M. y Wamick, A. (1983). Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Environmental Biology*. 95: 228-293.
- Contreras, R. (2001). Plan Estratégico de Exportación de Piña. Universidad Agraria del Ecuador - Facultad de Economía Agrícola del Ecuador - Tesis de grado.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leal, F., Rohrbach, K., (2003). The Pineapple Botany, Production and Uses. History, Distribution and World Production
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., G.M. Sanewski., M.K. Smith., M.F Duval & F. Leal. (2011). *Ananas*. In: Kole, C. (ed.). *Wild crop relatives Genomic and breeding resources, Tropical and Subtropical Fruits*, pp. 21-41. Springer. Heidelberg, Germany.
- Cuéllar, J. y Somoza, C. (2015). Multiplicación *in vitro* de piña MD-2 (*Ananas comosus* (L.) Merril) haciendo uso de fertilizantes comerciales. El Salvador.
- Dal Vesco, L., A. de Almeida, G. Zaffari, R. Onofre, M. Dos Reis y M. Guerra. (2001). Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. *Fruits* 56: 143-154.
- Daquinta, M., Cisneros, A., Rodríguez, Y., Escalona, M., Pérez, M., Luna, I. y Borroto, C. (1996). Embriogénesis somática en Piña (*Ananas comosus* (L.) Merr).
- Derwidueè, F. & A. González. (2010). Anatomía foliar en Bromeliaceae del nordeste Argentino y Paraguay. *Bonplandia* 19(2): 153-173.

- Dias, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leitão, J. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Pineapple.
- Ebel, A.I., L.I. Giménez, A.M. González & P.A. Luaces. (2016). Evaluación morfoanatómica de hojas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) en respuesta a la implantación de dos sistemas de cultivo en Corrientes, Argentina. *Acta Agron.* 65(4): 1-24.
- FAOSTAT (2017). Recuperado el 11 de julio de 2018 de Knoema Production Statistics-Crops, Crops Processed: <http://www.knoema.es>
- Firoozabady, E. y Moy, Y. (2004). Regeneration of Pineapple Plants via Somatic Embriogenesis and Organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 40: 67-74.
- García, E. Garay, A. Vargas, T. y Blanco, H. (2008). Micropropagación Clonal Masiva de Piña (*Ananas comosus*). *MIBE.* 5: 181-184.
- García, X., García, E., Rascón, Q., Herrera, L., and Aguado, G. (2005). Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyllic cells. *J. Plant Physiol.* 162:650-667.
- Grout, B. Aston, M. (1978) Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. - *Ann. Bot.* 42: 993-995.
- Grout, B. Millam, S. (1985). Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.* 55, 129–131.
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Hort.* 108: 105-120.

- Huang, X., Alawi, Y., Penrose, D., Glick, B., and Greenberg, B. (2004). Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environ. Poll.* 130:453-459.
- Hurtado, D. y Merino, M. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas, S.A. de C.V. México D.F., México. 49-81, 154-158 pp.
- Isaac, E., Gonzalez, J.L., Rivas, M. y Moreno, A. (2010). Evaluación de la actividad fotosintética asociada con el intercambio gaseoso de dos variedades de *Coffea arabica* obtenidas por cultivo *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, vol. 31, num. 2, pp. 74-76. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.
- Jáuregui, D. (2008). Guía ilustrada de las epidermis de Angiospermas presentes en Venezuela. Trabajo de ascenso a la categoría titular. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 393p.
- Jiménez, E. (1998). Cultivo de ápices y meristemas. En *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Editor J. Pérez. Capítulo 3, páginas 45-56.
- Jiménez, R. (2005). Respuestas morfogénicas de la piña (*Ananas comosus*) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.
- Kouadio, S., Yapo, S., Silue, O., Adou, Ch. y Kouakou, H. (2018). Influence of Carbohydrates on Callus Proliferation During Somatic Embryogenesis in Pineapple [*Ananas Comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae) Var. Cayenne Smooth Cultivar CI 16]. *European Scientific Journal*. May 2018. Edition Vol.14, No.15, pp. 287-297.
- Lallana, V.H. y Lallana, Ma. del C. (2003). Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal -Edición digital.

Lawlor, D. (2001). *Photosynthesis*. 3th ed. BIOS Sci. Publishers, Oxford, GBR.

Linares, Y. (2018). Estudio de la micropropagación de *Solanum lycopersicum* L considerando el análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos.

Lozano, J. A.(1997). Ciencia y salud. “La alimentación: Carotenoides para la salud”.

Lüttge, L. (2004) Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Ann. Bot.* 93. Pp. 629–652.

Medina, M., Mosquera, H., Aguilar, C. (2014). Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de tres cultivares de piña *Ananas comosus* (L. Merr.) del Chocó, Colombia.

Melgarejo, L.M., M. Romero, S., Hernandez, J., Barrera, M.E., Solarte, D., Suarez, L.V., Perez, A., Rojas, M., Cruz, A.L., Moreno, S.C., Crespo, y W.H. Perez. (2010). Experimentos en fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.

Montilla de Bravo I., Fernández S., Alcalá de Marcano D. y Gallardo M. (1997) El cultivo de la piña en Venezuela. *Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Lara. FONAIAP. IICA/CReA/PROCIANDINO/FRUTHEX*. P: 155. Maracay, Venezuela.

Moreira, C., de Andrade, H., Bertolucci, S., Lameira, O., Mohammed, A. y Pinto, J.E. (2016). Plantlet regeneration from young leaf segments of curaua (*Ananas erectifolius*), an Amazon species. *Turk. J. Biol.* (2016) 40: pp. 1227-1234.

Moreira, M., J. Guedes, M. Pasqual, C. Borges y A. Bortolotti. (2006). Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de Abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras. 30: 875-879.

- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*. Vol. 15: 473-497.
- Nievola, J., Kraus, L., Freschi, B., Souza, M. y Mercier, H. (2005). Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias, Universidad de Sao Paulo. SP, Brasil. Pp 832-837.
- Orellana, P. (1998). Propagación vía organogénesis. En: J.N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biología de las plantas. Cuba. Pp. 151-178.
- Paull, R.E., Duarte, O., (2011). Pineapple. In: Paull, R.E., Duarte, O. (Eds.), *Tropical Fruits*, vol. 1, 2nd ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Perez Y., Sosa del Castillo M., Fuentes L., Rubio Y., Valdivia A. y Avila, J. (2016). Caracterización bioquímica e histológica de plantas aclimatizadas *in vitro* de *Agavefourcroydes* Lem. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. MES. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154
- Pineda, A. (2009). Establecimiento de un sistema de embriogénesis somática y de organogénesis *in vitro* en *Ananas comosus* (L.) Merr.
- Pineda, A., Vargas, T., Escala, M. y de García, E. (2012) Organogénesis *in vitro* en piña ‘Española Roja’ y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso.

- Pineda, A., Vargas, T. y de García, E. (2014). Regeneración de *Ananas comosus* (L.) Merr, Ecotipo Tabë Kanä, mediante organogénesis indirecta.
- Pospisílová, J., Catsky, J. y Sestak, Z. (1999). Photosynthesis in plants cultivated in vitro. In: Pessaraki M. (ed). Handbook of photosynthesis New York: Marcel Dekker; Hong Kong: Basel, 1997. p. 525-540. [Books in soils, plants and the environment] ISBN: 0-8247-9708-6.
- Radice, S. (2010). Herramientas Básicas. Parte II. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal.
- Raya, Y., Villegas, A., Arellano, G. (2009). Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 32. Núm. 2. Abr. - Jun. 2009. Pp 111-117.
- Reeve, H. y Sherman, P. (1993). Adaptation and the goals of evolutionary research. Quarterly Review of Biology, v.68, p.1-32.
- Renata, J. (2015). Manual agronómico de cultivo de de la Piña. Asociación de productores de piña de Cevicos, Inc. (Apropic).
- Rodrigues, J., Rommais, E., Sobreira, R., De Castro, E., Furtado, T., Ferreira, M. y Pasqual, M. (2014). Direct organogenesis and leaf-anatomy *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith (Bromeliaceae). *Pak. J. Bot.*, 46(6): pp. 2179-2187.
- Rocha, D., Trementino, S. (2008). Embriogénesis somática en reproducción *in vitro* del cultivo de piña (*Ananas comosus*. L. Merr) cultivar MD-2.
- Rojas, H. y Paul, M. (2007). Simulación y control de la temperatura dentro de un invernadero. T.E.G. Universidad de La Salle, Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. 86 pp.

- Rojas, S., García, J., Alarcón, M. (2004). Propagación asexual de plantas. CORPOICA, Ministerio de agricultura y Desarrollo rural de Colombia, PRONATTA. Colombia.
- Roostika, I. y Mariska, I. (2003). *In vitro* Culture of Pineapple by Organogenesis and Somatic Embriogenesis: Its Utilization and Prospect. *Buletin AgroBio*. 6: 34-40.
- Roostika, I., Mariska, I., Khumaida, N., & Wattimena G. (2012). Indirect organogenesis and somatic em-bryogenesis of pineapple induced by *Dichloro-phenoxy Acetic Acid*. *Journal Agro Biogen*, 8(1), 8-18.
- Saucedo, G., Ramos, L., Varas, E. y Carmigniani, F. (2008). Propagación Clonal *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merr) Variedades Champaka y Hawaiana.
- Sripaoraya, S., Marchant, R., Brian, P., y Davey, M. (2003). Plant Regeneration by Somatic Embriogenesis and Organogenesis in Commercial Pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro cell. Dev. Biol. – Plant*. 39: 450-454.
- Stryer, L., Berg, J. y Tymoczko J. (2002). *Biochemistry*. 5a edicion. Freeman, New York, 974 pp.
- Suárez, F. (2011). Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) híbrido MD-2 a partir de cortes de yemas laterales y apicales.
- Suarez, J., Duran, E., Rojas, J. y Ortiz, N. (2017). Pigmentos fotosintéticos y conductancia estomática en ecotipos de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex. Spreng K. Schum.) Universidad de la Amazonia, Facultad de Ingenieria, Programa Ingenieria Agroecologica. Sede principal Cll 17 Diag 17 Cra 3F Barrio Porvenir. Florencia-Caqueta, Colombia.

- Taiz L, Zeiger E. 1(2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Tomlinson P. B. (1969) Commelinales-Zingiberales. *Anatomy of the Monocotyledons III*. C.R. Metcalfe (ed). *Oxford at the Clarendon Press*. 193-274.
- Valderrama S., Chico J., Quispe J., Sanchez R. (2011). Regeneración *in vitro* de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. a partir de explantes foliares. Artículo Científico. Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Villalobo, A., Gonzalez, J., Santos, R., Rodriguez R. (2012). Morpho Physiological Changes in Pineapple Planlets (*Ananas comosus* (L.) Merr.) During Acclimatization. University of Ciego de Avila – Agronomic Department – Ciego de Avila– Cuba.
- Villalobos, V. (1990). Organogénesis. En Rosell, C. y Villalobos, V. (ed.). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal. 105: 29- 32.
- Wellburn, A. (1994).The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307-313.
- Zaid, A., Hughes, H.G., Porceddu, E., Nicholas F. (2004). Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Organización de la Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.