



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Micropropagación de piña cv. MD-2 (*Ananas comosus* L. Merrill) en dos modelos de biorreactores

Autores

Br. Ángel Osmar Vanegas López
Br. Gerardo Staidffer Araúz Pastora

Asesores

M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga
M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona
Ing. Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez

Managua, Nicaragua
Enero, 2023



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Micropropagación de piña cv. MD-2 (*Ananas comosus* L. Merrill) en dos modelos de biorreactores

Autores

Br. Ángel Osmar Vanegas López
Br. Gerardo Staidffer Araúz Pastora

Asesores

M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga
M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona
Ing. Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez

Presentado a la consideración del Honorable Comité
Evaluador como requisito final para optar al grado de
Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Enero, 2023

Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Honorable Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Miembros del Comité Evaluador

Presidente (Grado académico y nombre)

Secretario (Grado académico y nombre)

Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: Managua, Nicaragua.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo especialmente a Dios por haberme dado la vida, salud, sabiduría entendimiento para salir adelante y poder hacer realidad mi sueño.

A mis padres **Ángel Vanegas** y **Natalia López** por haberme brindado tanto apoyo moral y económico, ya que sin su confianza no hubiera podido salir adelante.

A mis hermanas **Johana Vanegas** y **Ana Vanegas** quienes me dieron su apoyo incondicional para salir adelante y poder culminar mis estudios.

A mis abuelitos **Francisco González Flora Calderón** quienes son personas emprendedoras y ejemplares por haberme apoyado con los gastos de transporte, por darme consejos y motivarme.

A mi novia **Danelia Rodríguez** quien me brindó su apoyo incondicional para salir adelante y culminar mis estudios.

Br. Ángel Osmar Vanegas López

DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico primeramente a Dios y a María Santísima por haberme dado la vida, acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi luz en mi camino y por darme la sabiduría, fortaleza y entendimiento para alcanzar todos mis objetivos.

A mis padres **Gerardo Arauz** y **Scarleth Pastora** porque son la razón de sentirme orgulloso de culminar mi meta para forjarme un futuro mejor y por el apoyo que me brindaron en todo momento.

A mis hermanas **Scarleth Arauz** y **Keylind Arauz** por motivarme para lograr mi carrera ya que gracias a esto puedo ser su gran ejemplo por seguir en la vida.

A mis abuelos **Boanerges Pastora** y **Migdalia Meneses** por haberme apoyado desde el primer momento y me enseñaron desde pequeño que siempre los sueños son posibles de alcanzar y porque jamás dejaron de creer en mí.

A mi abuelo **Gerardo Arauz** que está en el cielo, porque él me dio buenos consejos para ser mejor persona y siempre me brindó su apoyo para poder terminar mi carrera a pesar de todos los obstáculos.

A mi tía **Linda Pastora** por haberme apoyado incondicionalmente y por haberme motivado a realizar todos los proyectos que he hecho.

Br. Gerardo Staidffer Arauz Pastora

AGRADECIMIENTO

A Dios sobre todas las cosas por haberme dado la oportunidad de elegir esta profesión tan importante en mi vida por todas las cosas que me ha concedido, por darme salud energía y deseo de superación para terminar mis estudios universitarios.

A mis adorables padres **Ángel Vanegas** y **Natalia López** mi más sincero agradecimiento los que con sacrificio me apoyaron económicamente para poder terminar mis estudios.

A mis asesores **M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** y **M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona**, quienes dedicaron su tiempo en asistirnos, por brindarme su amistad, consejos y cariño, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible realizar la presente investigación.

A la **Universidad Nacional Agraria** en la que estuve alojado durante el período de mi carrera, su bello lugar de aprendizaje y por atenderme dándome la oportunidad de concluir mis estudios.

A mis compañeros de la UNA **Kevin Calixto Hidalgo** y **Lixania Treminio** por haberme brindado su apoyo, amistad, consejos y cariño durante mi carrera Universitaria.

A todas aquellas personas de forma directa e indirecta incidieron para que este proyecto de vida fuera ahora una realidad.

Br. Ángel Osmar Vanegas López

AGRADECIMIENTO

Infinitamente agradecido con Dios por haberme dado fuerzas y guiar mis pasos día a día en este periodo de estudio que estoy finalizando.

A mis padres **Gerardo Arauz** y **Scarleth Pastora**, a mis abuelos **Boanerges Pastora** y **Migdalia Meneses** les doy mi más sincero agradecimiento por el gran sacrificio que hicieron para que pudiera lograr terminar mi carrera.

A mis asesores **M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** y **M.Sc. Roxana Yadira Cruz Cardona**, quienes me apoyaron, me brindaron su amistad y dedicaron su tiempo para transmitirme sus enseñanzas ya que gracias ellos se pudo lograr el presente proyecto.

A la **Universidad Nacional Agraria** por haberme aceptado para ser parte de ella y abierto sus puertas de su seno para formarme y realizar mi carrera.

A mi mejor amiga Ing. **Leyla Rocha** por haberme aconsejado escoger esta universidad, por darme apoyo desde el primer momento y porque siempre estuvo para mí en los momentos que la necesite.

A mis demás familiares que de una u otra manera me dieron su apoyo y consejos para llegar hasta aquí donde estoy.

Br. Gerardo Staidffer Arauz Pastora

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1 Ubicación del Estudio	10
4.2 Lavado y esterilización de cristalería, materiales y equipos	10
4.3 Fase de multiplicación en BEIT	10
4.3.1 Medios de cultivo	11
4.3.2 Diseño estadístico	13
4.3.3 Variables evaluadas	13
4.4 Densidad de siembra en la fase de multiplicación con BIMOT	13
4.4.1 Medios de cultivo	13
4.4.2 Diseño estadístico	14

4.4.3 Variables evaluadas	15
4.5 Fase de enraizamiento	15
4.5.1 Medios de cultivo	15
4.5.2 Diseño estadístico	15
4.5.3 Variables evaluadas	16
4.6 Fase de aclimatación	16
4.6.1 Fertilización en fase de aclimatación	16
4.6.2 Diseño estadístico	17
4.6.3 Variables evaluadas	17
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 Fase de multiplicación en BEIT y BIMOT	19
5.1.1 BEIT sin soporte de los brotes	19
5.1.2 BEIT con soporte de los brotes	20
5.1.3 Densidad de siembra en BIMOT	23
5.2 Fase de enraizamiento en BIMOT	27
5.3 Fase de aclimatación	29
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. LITERATURA CITADA	34
IX. ANEXOS	38
Anexo 1. Ficha técnica del producto NATURAM 5.	38
Anexo 2. Ficha técnica del producto PROMET. ® Cu	39
Anexo 3. Ficha técnica del producto Carboxy® Min L	40

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Variantes de medio de cultivos utilizados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de piña cv. MD-2	12
2. Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de piña cv. MD-2	15
3. Productos fertilizantes y dosis suministradas durante la fase de aclimatación de plantas <i>in vitro</i> de piña cv. MD-2	17
4. Resultados de longitud de tallo, número de hojas, brotes y raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en BEIT sin soporte de los brotes a las cuatro semanas	19
5. Resultados de longitud de tallo, número de hojas, número de brotes y raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en BEIT con soporte a las cuatro semanas	21
6. Resultados de longitud de tallo, número de hojas y número de raíces producidas por plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT a las cuatro semanas en fase de enraizamiento	28
7. Resultados de longitud de tallo, número de hojas y número de raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en fase de aclimatación a las seis semanas	31

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Siembra de brotes de piña MD-2 en BEIT. a) BEIT sin soporte. b) BEIT con soporte.	11
2. a) Planta <i>in vitro</i> de piña MD-2. b) Corte transversal para eliminar hojas donde inicia distribución en roseta de las hojas.	12
3. Modelo de biorreactor BIMOT empleado para estudio de densidad de siembra con 70, 80, 90 y 100 tejidos de piña cv. MD-2 en la fase de multiplicación	14
4. Plantas <i>in vitro</i> de piña cv. MD-2 en fase de aclimatación: T ₁) Tratamiento testigo sin producto; T ₂) Aplicación con el producto Carboxy Min L con dosis de 1.00 ml L ⁻¹ ; T ₃) Aplicación con el producto NATURAM 5 en dosis de 1.00 ml L ⁻¹ ; T ₄) Aplicación con el producto PROMET® Cu (1 ml L ⁻¹).	18
5. Plantas de piña cv. MD-2 en fase de multiplicación en BEIT sin soporte. a) tratamiento sin adición de 6-BAP; b) plantas con 1 mg L ⁻¹ de 6-BAP; c) plantas con 2 mg L ⁻¹ de 6-BAP; c) plantas con 3 mg L ⁻¹ de 6-BAP.	20
6. Plantas de piña cv. MD-2 en fase de multiplicación en BEIT con soporte: a) tratamiento sin adición de 6-BAP; b) plantas con 1 mg L ⁻¹ de 6-BAP; c) plantas con 2 mg L ⁻¹ de 6BAP; d) plantas con 3 mg L ⁻¹ de 6-BAP.	21
7. Longitud de tallo de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras desiguales difieren para ≤ 0.05 .	24
8. Número de hojas de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras desiguales difieren para ≤ 0.05 .	24
9. Número de brotes axilares de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras difieren para $p \leq 0.05$.	25
10. Número de raíces de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras desiguales difieren para ≤ 0.05 .	25
11. Plantas de piña cv. MD-2 en fase de multiplicación correspondiente a las densidades de siembra de 70, 80, 90 y 100 tejidos a las cuatro semanas de permanecer en los BIMOT.	26

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
12. Plantas de piña cv. MD-2 formadas en la fase de enraizamiento: a) Tratamiento testigo sin AIA; b) Tratamiento con 0.25 mg L ⁻¹ de AIA; c) Tratamiento con 0.50 mg L ⁻¹ de AIA; d) Tratamiento con 0.75 mg L ⁻¹ de AIA; e) Tratamiento con 1.00 mg L ⁻¹ de AIA.	28
13. Plantas de piña cv. MD-2 a las seis semanas en fase de aclimatación tratadas con los productos: a) Tratamiento testigo; b) Carboxy Min L con dosis de 1.00 ml L ⁻¹ ; c) NATURAM 5 en dosis de 1.00 ml L ⁻¹ ; d) PROMET® Cu en dosis de 1 ml L ⁻¹ .	31
14. Plantas de piña cv. MD-2 a las seis semanas en fase de aclimatación: a) Tratamiento testigo; b) Con el producto Carboxy Min L; c) Con el producto NATURAM 5; d) Con el producto PROMET® Cu.	31

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Ficha técnica del producto NATURAM 5.	40
2. Ficha técnica del producto PROMET [®] Cu	41
3. Ficha técnica del producto Carboxy [®] Min L	42

RESUMEN

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12.5 carretera panamericana norte Managua, Nicaragua entre los meses de marzo a agosto del 2022 con el objetivo de evaluar en (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. MD-2 los efectos de reguladores de crecimiento y de los modelos de Biorreactor Económico de Inmersión Temporal (BEIT) y Biorreactor de Movimiento Ondulatorio de Inmersión Temporal (BIMOT). En la fase de multiplicación se evaluó el efecto del tratamiento testigo y de tres dosis de la citoquinina 6-Bencil aminopurina (6-BAP) en tejidos establecidos en BEIT de 1 litro sin soporte y con soporte; además en la fase de multiplicación se experimentó con 4 densidades de siembra de tejidos en BIMOT. En la fase enraizamiento se evaluó el tratamiento testigo y 4 concentraciones de Ácido Indol Acético (AIA), mientras que en la fase de aclimatación se analizó el efecto en el crecimiento de las plantas de los productos PROMET® Cu, NATURAM 5 y Carboxy Min L. En la fase de multiplicación en BEIT de 1 litro con soporte y sin soporte en el tratamiento testigo se alcanzaron las mejores categorías estadísticas de las variables longitud de tallo y número de raíces. La brotación axilar fue superior en los tratamientos que contenían 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de 6-BAP con medias respectivas de 4.90, 5.00 y 4.95. Con densidades de siembra de 90 y 100 tejidos en BIMOT se lograron medias de brotación axilar de 2.28 y 2.55 cm, respectivamente. Entre las medias de la variable número de brotes axilares en las 4 densidades de siembra no se presentaron diferencias estadísticas, mientras que con densidad de siembra de 70 tejidos el número de hojas y de raíces con medias respectivas de 4.65 y 1.15 resultaron significativamente superiores a las medias de 4.15 hojas y 0.65 raíces producidas en densidad de siembra de 100 tejidos. En la fase de enraizamiento en BIMOT con adiciones de 0.75 y 1.00 mg L⁻¹ de AIA se presentaron las mejores categorías estadísticas en las variables longitud de tallo, número de hojas y número de raíces. El producto aportador de micronutrientes de alta asimilación Carboxy Min L. en las 3 variables evaluadas y en el porcentaje de supervivencia presentaron mejor respuesta morfogénica en relación con el tratamiento testigo y a la aplicación del producto fertilizante PROMET® Cu.

Palabras claves: Piña, micropropagación, yemas axilares, BEIT, BIMOT.

ABSTRACT

The study was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the National Agrarian University (UNA), km 12.5 Pan-American Highway North Managua, Nicaragua between the months of March and August 2022 with the objective of evaluating (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. MD2 the effects of growth regulators and the models of Bioreactor Economic of Temporary Immersion (BEIT) and Bioreactor of Wave Motion of Temporary Immersion (BIMOT). In the multiplication phase, the effect of the control treatment and three doses of the cytokinin 6-Benzylaminopurine (6-BAP) in tissues established in 1liter bioreactors BEIT without support and with support were evaluated; In addition, in the multiplication phase, experiments were carried out with 4 tissue sowing densities in BIMOT. In the rooting phase, the control treatment and 4 concentrations of Indole Acetic Acid (IAA) were evaluated, while in the acclimatization phase, the effect on plant growth of the PROMET® Cu, NATURAM 5 and Carboxy Min L products was analyzed. In the multiplication phase in 1liter bioreactors BEIT with support and without support in the control treatment, the best statistical categories of the variables stem length and number of roots were reached. Axillary sprouting was higher in the treatments containing 1, 2 and 3 mg L⁻¹ of 6-BAP with respective means of 4.90, 5.00 and 4.95. With sowing densities of 90 and 100 tissues in BIMOT, average axillary sprouting of 2.28 and 2.55 cm, respectively, was achieved. Among the means of the variable number of axillary shoots in the 4 planting densities, there were no statistical differences, while with a planting density of 70 tissues the number of leaves and roots with respective means of 4.65 and 1.15 were significantly higher than the means of 4.15 leaves and 0.65 roots produced at a seeding density of 100 tissues. In the rooting phase in BIMOT with additions of 0.75 and 1.00 mg L⁻¹ of IAA, the best statistical categories were presented in the variables stem length, number of leaves and number of roots. The product that provides high assimilation micronutrients Carboxy Min L. in the 3 variables evaluated and, in the survival, percentage presented a better morphogenic response in relation to the control treatment and to the application of the PROMET® Cu fertilizer product.

Keywords: Pineapple, micropropagation, axillary shoots, BEIT, BIMOT.

I. INTRODUCCIÓN

“La piña (*Ananas comosus* L. Merrill) por su aroma único y sabor dulce ácido es una de las mejores frutas tropicales, ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial. Su origen es suramericano de la Amazonía y Orinoquía, extendiéndose luego por toda la América Latina” (Cristancho *et al.*, 1991, p. 8). Por otro lado, Dane (2016) reafirma que tiene como origen América del Sur ya que no se conoce con certeza el país de procedencia, pero por su domesticación se cree que puede ser de una zona entre Brasil y Uruguay (p. 1).

La piña es una planta vivaz con una base formada por la unión compacta de varias hojas formando una roseta. De las axilas de las hojas pueden surgir retoños con pequeñas rosetas basales, que facilitan la reproducción vegetativa de la planta, las flores dan fruto sin necesidad de fecundación y del ovario hipógino se desarrollan unos frutos en forma de baya, que, junto con el eje de la inflorescencia y las brácteas, dan lugar a una infrutescencia carnosa (sincarpio) (Brenes, 2006, p. 28).

Según López (1996), “Esta especie se ha convertido en una de las principales frutas comerciales del trópico, se produce en numerosas regiones tropicales del mundo y se exporta sobre todo a Estados Unidos y la Unión Europea” (Citado por Zamora y Juárez, 2008, p. 49). El IICA (2004), afirma que “este cultivo es el futuro para los pequeños agricultores y para el país como generador de mayores ingresos, por la demanda internacional con posibilidad de exportación a Estados Unidos y Europa para el consumo fresco”.

La fruta de piña cv. MD-2, para el mercado internacional tiene excelentes cualidades como alto valor Brix (17% para fruta madura), baja acidez entre 0,4 y 0,45 (% ácido cítrico), tamaño de fruta mediano (1,5 a 2,0 kg), forma cilíndrica, tamaño de núcleo pequeño, exhibir una larga vida útil (alrededor de 30 días) frente a los 21 días de las variedades normales y es capaz de resistir en almacenamiento en frío hasta dos semanas. Es resistente al pardeamiento interno, sin embargo, es susceptible a la pudrición del núcleo de los frutos y sensible a pudrición del cogollo (*Phytophthora nicotianae*) (Assumi, *et al.*, 2021).

En el cultivo de piña el sistema de propagación que se da a través de retoños o hijuelos tiene la desventaja de que el material seleccionado baja su calidad en cada ciclo de cultivo, la

contaminación de plagas y enfermedades son heredadas de sus plantas madre e incluso este método de propagación induce a elevar los costos de producción (Suárez, 2011).

Sandoval (2001) citado por Chavarría y López, (2010, p. 2), “La micropropagación facilita transferir al campo material más sano, libre de plagas y enfermedades, disponer de material de siembra en cualquier época del año, multiplicar aceleradamente genotipos deseables, transportar fácilmente los propágulos, uniformar las plantaciones y obtener cosechas más precoces”.

En Nicaragua se reportan dos investigaciones realizadas en micropropagación de piña cv. MD-2: en organogénesis directa Zamora y Juárez (2008), en embriogénesis somática Rocha y Treminio (2008).

En los últimos años se han desarrollado investigaciones sobre automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas que reducen los costos, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* porque se mejora el metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Las ventajas de los Biorreactores en sistemas de inmersión en medio líquido sobre la micropropagación tradicional parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo debido al aporte más eficiente de los elementos nutritivos, mínima interrupción del intercambio de gases entre el explante o embrión y la atmósfera, no hay acumulación excesiva de gases nocivos para los tejidos y la dispersión de los tejidos por efecto del flujo de aire en recipiente (Pérez *et al.*, 1998).

El presente estudio se experimentó con dos modelos de biorreactores innovados en la Universidad Nacional Agraria (UNA) denominados como Biorreactor Económico de Inmersión Temporal (BEIT) y Biorreactor de Movimiento Ondulatorio de Inmersión Temporal (BIMOT). Estos modelos de biorreactores son una nueva herramienta tecnológica dirigida principalmente al segmento de productores dedicados a la multiplicación masiva asexual del cultivo de piña; considerando que puede mejorar tanto la eficiencia de los procesos de propagación *in vitro*, como la reducción del costo por unidad de planta producida.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar en el cultivar de piña MD-2 (*Ananas comosus* L. Merrill), las mejores concentraciones de los reguladores de crecimiento en los tejidos *in vitro* durante las fases de multiplicación y enraizamiento en condiciones de dos modelos de biorreactores y la respuesta del crecimiento de las plantas *in vitro* en la aclimatación.

2.2 Objetivos específicos

Definir en la fase de multiplicación la mejor respuesta morfológica de plantas *in vitro* en diferentes combinaciones del regulador de crecimiento 6-Bencil aminopurina (6-BAP) en condiciones de BEIT de 1 litro, sin y con soporte de tejidos.

Identificar en la fase de multiplicación las densidades de siembra de tejidos en BIMOT de 7 litros que determinen los mejores coeficientes de multiplicación y de crecimiento de las plantas obtenidas.

Determinar en la fase enraizamiento las mejores concentraciones de Ácido Indol Acético (AIA) que base a respuesta morfológica de las plantas producidas.

Identificar en la fase de aclimatación el producto Biofertilizante que mejor estimule el crecimiento y la supervivencia de las plantas.

III. MARCO DE REFERENCIA

“En Nicaragua el cultivo de la piña se inicia en los años 50 con la introducción de la variedad Monte Lirio en el municipio de Ticuantepe donde se cultivaba de manera tradicional”. El mismo autor recalca que “en los años 80 el cultivo toma auge considerándose como altamente rentable debido a sus características genéticas que hacen posible planificar la producción durante todo el año productivo” (Rose, 2006, p. 69).

Caicedo y Peñaranda (2013) destacan que “la piña es una de las frutas tropicales más consumidas en el mundo, su favoritismo es gracias a su delicioso sabor, ya sea en fresco o transformada, a esto se suma sus múltiples propiedades nutricionales y medicinales que posee” (Citados por Bustamante *et al.*, 2017, p. 127).

“La propagación de la piña es por brotes vegetativos que la misma planta emite en forma natural son utilizados para el establecimiento de nuevas áreas. Con el fin de depurar y conservar la pureza genética de las variedades utilizadas” (Superintendencia de Industria y Comercio, 2015, p. 11). Vargas (2009), afirma que “la propagación se realiza utilizando hijuelos ubicados en la base de la planta, tallo base del fruto (bulbillo) o de la corona; cada uno presenta un ritmo de crecimiento diferente” (p. 18).

La propagación por el método convencional de piña produce un número muy limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para la plantación a gran escala. Además de la limitación del método convencional, los cultivos son atacados por insectos y hongos (Blanco *et al.*, 2011).

“La propagación *in vivo* de piña puede considerarse fácil, pero la tasa de multiplicación de los propágulos es baja y se necesitarían 8 años para producir suficientes propágulos a partir de una planta madre”. Por otro lado, “los retoños producidos mediante este método no están libres de enfermedades. Así, la necesidad de mejorar las tasas de multiplicación de los genotipos elite se ha dirigido al desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos para la piña” (De Almeida *et al.*, 2002, p. 298).

“La micropropagación comprende un conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas en forma rápida y en grandes cantidades. A partir de una planta seleccionada, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente

idénticas”. El mismo autor argumenta que “el término *in vitro* se refiere a la introducción de los explantes en un frasco o recipiente sellado donde se sumerge en un medio de cultivo estéril” (Castillo, 2004, p. 1).

Perea (2009), afirmó que:

Los procesos de propagación clonal en el cultivo de tejidos vegetales se caracterizan por obtener un gran número de plantas genéticamente idénticas a partir de pequeños segmentos de una planta donante, acorde con el sistema del cultivo y su mantenimiento. Sin embargo, el tipo de explante y su estado fisiológico, la composición del medio de cultivo y las características de la especie, son factores que influyen en la respuesta órgano genética del tejido. (p. 23)

Las principales técnicas de cultivo de tejidos vegetales son la propagación clonal a gran escala de plántulas (micropropagación), la regeneración de plantas libres de virus y patógenos (limpieza clonal), la conservación de los recursos genéticos de las plantas (conservación de germoplasma), producción haploide y doble haploide y la producción de plantas transgénicas (Torres *et al.*, 1998, p. 509).

“La micropropagación de plántulas de piña tiene muchas ventajas sobre los métodos convencionales de propagación vegetativa. Por ejemplo, esta técnica permite un aumento rápido y eficiente de variedades de piña élite seleccionadas”. Estos investigadores destacan que “muchos autores han informado sobre la producción exitosa de piña a través del sistema de micropropagación durante los últimos años” (Danso *et al.*, 2008, p. 615).

“Los sistemas *in vitro* agrupan básicamente cinco etapas que consisten en: 1) selección de la especie, 2) establecimiento del medio de cultivo, 3) desarrollo del tejido, 4) enraizamiento y 5) acondicionamiento. Cada una de estas etapas son importantes dependiendo del objetivo que el investigador se proponga realizar” (Perea, 2009, p. 2).

“Los sistemas de micropropagación de plantas utilizan medios semisólidos de forma convencional. Sin embargo, la manipulación y lavado de gran número de recipientes durante el cultivo *in vitro* incrementa los costos de operación” (Castillo, 2004, p. 6).

“El empleo de medios líquidos es primordial para lograr la automatización de los procesos de cultivo *in vitro*. Sin embargo, el contacto constante de los explantes con el medio de cultivo

líquido puede producir hiperhidricidad”. Estos mismos autores recomiendan “para reducir o eliminar este problema se proponen sistemas donde el explante esté en contacto intermitente con el medio líquido y se produzca una renovación continua de la atmósfera del envase para evitar acumulación de gases tóxicos como el etileno” (Chávez *et al.*, 2018, p. 553).

“Para resolver estos problemas se desarrollaron los recipientes para la inmersión temporal, los cuales son sistemas de cultivo que se basan en el contacto intermitente del medio líquido con los explantes por un corto período de tiempo”. “Mediante el uso de este sistema de micropropagación se puede incrementar considerablemente el coeficiente de multiplicación de brotes en comparación con las formas convencionales de propagación” (George, 1993, p. 640).

Desventajas de la micropropagación en medios de cultivo estacionarios:

1. La micropropagación empleando medios de cultivo solidificados con agar consumen tiempo y trabajo.
2. No contar con meristemas (tejidos) o en poco número, dificulta su escalado.
3. La producción de un gran número de plantas a partir de unas pocas iniciales es riesgoso, pues puede llegar a aumentar la variación somaclonal (mutaciones).
4. Se incrementan los costos de producción por el empleo de mucha mano de obra.

“La micropropagación además de ser una tecnología de alto costos requiere de transferencias periódicas del material plantado a un medio fresco, después de 4-6 semanas, debido al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo y por él continuo crecimiento y proliferación de los cultivos, la cual es rápidamente limitado por el tamaño de los contenedores de cultivo” (Etienne y Berthouly, 2002, p. 220).

Un aspecto para tener en cuenta acerca de la multiplicación masiva de plantas mediante cultivo de tejidos es que, en ocasiones puede inducir la aparición de eventos mutacionales como consecuencia de las nuevas condiciones ambientales, que imponen un estrés a las células sometidas a cultivo *in vitro* (Phillips *et al.*, 1994). El término variación somaclonal es aceptado para referirse a las variaciones que ocurren en el cultivo *in vitro* y que esta variación podría resultar por la ocurrencia de mutaciones, de cambios epigenéticos, o una combinación de ambos mecanismos.

Etienne y Berthouly, (2002) señalan que:

Las ventajas del cultivo *in vitro* en un medio líquido son frecuentemente contrarrestadas por problemas técnicos como asfixia, hiperhidricidad, fuerzas de corte y la necesidad de equipamiento complejo. Para evitar tales problemas se han desarrollado varios procedimientos que dan soporte al cultivo, siendo los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) uno de los métodos más implementados y el objeto de estudio de esta investigación.

Los biorreactores son aparatos para el cultivo a gran escala de células, tejidos u órganos en medio líquidos. Para un creciente número de especies, estos han mostrado ventajas sobre la micropropagación en medio semisólido, resultando en mayores tasas de multiplicación, reducción de espacio, energía y mano de obra (FAO/IAEA, 2004).

Takayama y Akita, (1996) reportan que “los primeros intentos de utilizar biorreactores para la producción de brotes fueron realizados por Takayama y Mizawa (1981), con Begonias, a partir de ese momento se produjeron varios trabajos con el empleo de esta técnica para la propagación de brotes, bulbos, microtubérculos y cormos”.

Aitken-Christie *et al.*, (1995) afirman que se han desarrollado investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, ya que reducen el costo por explantes, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las vitroplantas en condiciones *ex vitro* como resultado de un mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro*.

Cruz (2018) cita varios actores que han empleado en sus investigaciones diferentes modelos de Sistemas de Inmersión Temporal entre ellos:

El Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®), Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT®), Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG), conocido como Biorreactor de Flujo Reflujo, Monobloc Advance Temporary Immersion System (MATIS®) y biorreactor SETISTM (p. 70).

Entre los tipos de biorreactores, los de inmersión temporal se diseñaron basándose en el uso de medios de cultivo líquido y la automatización del proceso de micropropagación con la finalidad de aumentar las tasas de multiplicación de especies vegetales de interés agrícola, forestal y

medicinal; de esta manera se obtiene un mayor número de plantas por recipiente, el reemplazo del medio de cultivo es sencillo y demanda poca mano de obra (Navarro, 2019, p. 24).

Escalona. (1999) describe “el funcionamiento de un sistema que está constituido por dos frascos, de los cuales, uno se utiliza para colocar el inoculo y en el otro frasco, el medio de cultivo”. El mismo autor fundamenta que “ambos frascos poseen dos vías de acceso: la primera es para la ventilación y la segunda para el intercambio del medio de cultivo entre ambos frascos. En cada frasco, la circulación del aire es esterilizada mediante filtros hidrofóbicos” (p. 102).

“La micropropagación automatizada a través de los Biorreactores con Sistema de Inmersión Temporal (SIT), tiene la posibilidad de producir grandes volúmenes de plantas y mayor facilidad del escalado, los brotes están siempre en contacto con el medio de cultivo y, por tanto, la absorción de los nutrimentos y la tasa de crecimiento se ven estimulados”. Los mismos autores menciona que “estos sistemas poseen la ventaja (frente a los sistemas en medios semisólidos) de minimizar el tiempo dedicado a la manipulación del material y el requerimiento de personal” (Georgiev *et al.*, 2014, p. 611).

Con la automatización de los SIT se garantiza una mayor uniformidad de las plantas desarrolladas y la posibilidad de controlar en tiempo real las condiciones de cultivo y modificarlas de acuerdo con las necesidades específicas de cada fase de la propagación *in vitro* y del ensayo que se desee llevar a cabo. La monitorización en tiempo real de las variables relevantes para dicho proceso hace que se eviten posibles incidentes negativos y con ello la obtención de cultivos deficientes (Orellano *et al.*, 2016).

De acuerdo con Teisson *et al.*, (1996), entre las ventajas de los Biorreactores en inmersión temporal se encuentran: evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tiene bajo costo.

Los biorreactores tradicionales han sido modificados para la propagación masiva de plantas, diseñando diferentes tipos de recipientes y validados en diferentes especies de plantas. Entre los tipos de biorreactores, los de inmersión temporal se diseñaron basándose en el uso de medios de cultivo líquido y la automatización del proceso de micropropagación con la finalidad de

aumentar las tasas de multiplicación de especies vegetales de interés agrícola, forestal y medicinal (Albarrán *et al.*, 2014).

“El sistema de inmersión temporal en biorreactores constituye una herramienta tecnológica interesante, principalmente para el sector dedicado a la multiplicación masiva asexual de plantas; dado que permite mejorar tanto la eficiencia de los procesos de propagación *in vitro* en distintas especies, como la reducción del costo por unidad de planta producida” (Aguilar y Cruz, 2015).

Con los biorreactores de inmersión temporal, aunque se dinamizan los procesos de la propagación *in vitro*, tienen el inconveniente de que algunos modelos son difíciles de adquirir; debido a su alto costo en el mercado nacional. Además del alto costo de adquisición que tienen biorreactores como los RITA®, su diseño tiene varios accesorios que, al manipularlos, incrementan considerablemente los riesgos de contaminación por bacterias y hongos.

“Con el modelo RITA®, la inmersión de los tejidos se realiza en un solo recipiente de plástico y con inyección de aire comprimido permite que el medio de cultivo líquido que está al fondo del biorreactor llegue por capilaridad hasta la parte superior de la rejilla de malla plástica donde se colocan los tejidos”. “La entrada del flujo de aire provoca un burbujeo en el medio de cultivo, permitiendo que se remuevan los tejidos y se oxigenen durante el tiempo de inmersión” (Aguilar y Cruz, 2013, p. 22).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del Estudio

El estudio de micropropagación de plantas de piña cv. MD-2 se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km. 12 ½ carretera norte, coordenadas 12°08` Latitud Norte y 86°10` Longitud Oeste, a 56 msnm en el departamento de Managua, República de Nicaragua. Los experimentos se realizaron en el período comprendido de marzo a diciembre 2022.

4.2 Lavado y esterilización de cristalería, materiales y equipos

Para el lavado de los frascos de vidrio transparente utilizados como Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) con volumen de 1 litro, se sumergieron durante 24 horas en una palangana con capacidad de 30 litros de agua que se le agregó la cantidad correspondiente de hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración del 1 %; posteriormente se realizaron enjuagues continuos con detergente diluido en agua por 20 minutos. Finalizada esa actividad se procedió a la eliminación de los residuos de detergente a través de la sumersión de los frascos en una palangana que contenía solamente agua. Una vez que se lavaron los frascos, se colocaron de forma invertida sobre una mesa durante una hora para lograr el escurrimiento completo del agua.

Las bandejas de acero inoxidable, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperatura de 180 °C durante 1 hora. El área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 90 % y posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos antes de proceder a la siembra de tejidos en los diferentes experimentos.

4.3 Fase de multiplicación en BEIT

Respuesta morfogénica de tallos de piña cv. MD-2 por efecto de cuatro variantes de medios de cultivo, se realizó en condiciones de consistencia líquida sin soporte de brotes en los BEIT y en medios líquidos con soporte de los brotes sobre material de poliuretano, como se observa en la Figura 1 (a y b).



Figura 1. Siembra de brotes de piña MD-2 en BEIT. a) BEIT sin soporte. b) BEIT con soporte.

4.3.1 Medios de cultivo

En la fase de multiplicación como medio básico se emplearon las sales propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962) de consistencia líquida a las que se agregaron las dosis de citoquinina 6-bencil aminopurina (6-BAP) de acuerdo con el tratamiento correspondiente. En la fase de enraizamiento también se empleó como medio básico las sales MS y como regulador de crecimiento la auxina Ácido indol-3 acético (AIA). Una vez preparados los medios de cultivos en las fases de multiplicación y de enraizamiento, el pH se ajustó a 5.8 con KOH (hidróxido de potasio) 1 molar (M) o HCl (Ácido clorhídrico) 1 M. Los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 1 atmósfera de presión.

Para iniciar el estudio de multiplicación se tomaron plantas *in vitro* formadas en la fase de establecimiento con promedio de 3 a 5 hojas bien desarrolladas (Figura 2a). En el área de trabajo de la cámara de flujo laminar, se extrajeron las plantas de frascos de vidrio con volumen de 220 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo de consistencia semisólida. Las plantas se colocaron sobre bandejas de acero inoxidable y con ayuda de escalpelos se procedió a hacerles cortes transversales para eliminar las hojas justamente donde inicia el ángulo de distribución en forma de roseta, producto del corte transversal el tallo presenta una longitud aproximada de 1 cm (Figura 2b).

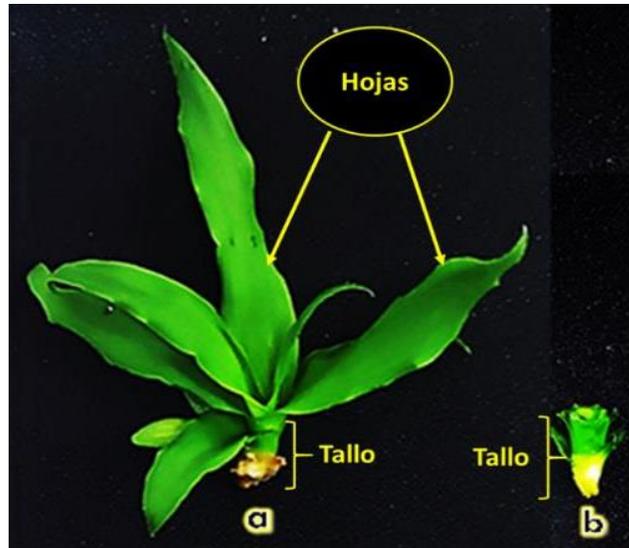


Figura 2. a) Planta *in vitro* de piña MD-2. b) Corte transversal para eliminar hojas donde inicia distribución en roseta de las hojas.

Una vez preparados los tejidos se procedió a la siembra en biorreactores modelo BEIT con capacidad de 1 litro sin soporte (solo medio líquido) y con soporte (material de poliuretano) de los brotes como se observa en la Figura 1a y 1b; posteriormente se trasladaron al cuarto de crecimiento en condiciones de luz natural por un período de 12 horas luz y 12 en oscuridad, la temperatura osciló entre los 24 y 27 °C. A los BEIT se les inyectó aire filtrado con frecuencia de inmersión de 1 cada 24 horas y con tiempo de inmersión de 3 minutos.

Para definir el mejor comportamiento de los tejidos en la fase de multiplicación en BEIT (1 litro) se experimentó con cuatro tratamientos caracterizados por la adición diferentes concentraciones de 6-Bencil aminopurina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variantes de medio de cultivos utilizados en la fase de multiplicación *in vitro* de piña cv. MD-2

Tratamientos	BAP* (mg L ⁻¹)	BEIT
T ₁	0	
T ₂	1	Sin soporte
T ₃	2	Con soporte
T ₄	3	

*BAP: 6-bencil amino purina

4.3.2 Diseño estadístico

En los dos tipos de modelo de BEIT sin soporte de los brotes y con soporte de los brotes con material de poliuretano se establecieron de forma independiente en un diseño completo al azar (DCA) con arreglo unifactorial con 20 observaciones por cada variante de medio de cultivo, para un total de 80 observaciones por modelo de BEIT. Con los datos obtenidos por cada variable evaluada en las cuatro variantes de medios de cultivo, se les realizó un ANDEVA por modelo de BEIT y para encontrar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan $p < 0,05$. Los datos se procesaron y analizaron en el paquete estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.3.3 Variables evaluadas

A las cuatro semanas de establecido el experimento se evaluaron las variables longitud del tallo, número de hojas, número de brotes y número de raíces.

Longitud de tallo (cm): Se midió con una regla milimetrada desde la base hasta donde se distribuyen las hojas en roseta; la longitud se midió en cm.

Número de hojas: Se contabilizaron únicamente las hojas enteras emitidas y caracterizadas por presentar ápice lanceolado.

Número de brotes axilares: Se contó el número de brotes axilares que se formaron en el tallo.

Número de raíces: Se contó el número de raíces formadas en la base del tallo.

4.4 Densidad de siembra en la fase de multiplicación con BIMOT

4.4.1 Medios de cultivo

Se seleccionó como medio de cultivo la variante que contenía 3 mg L^{-1} de BAP que presentó buenos resultados de brotación axilar a las cuatro semanas de permanecer en los BEIT con y sin soporte de brotes de acuerdo con el acápite 4.3.1 de la fase de multiplicación.

En el segundo experimento se empleó el modelo de Biorreactor de Movimiento Ondulatorio de Inmersión Temporal (BIMOT) que es un recipiente de material plástico traslúcido de alta densidad y con resistencia a altas presiones y temperaturas, además tiene dimensiones de 32 cm

de largo, 21 cm de ancho y 10 cm de alto. Para el soporte de los tejidos se colocó en el fondo de cada BIMOT una plataforma plástica con orificios cuadrados de 3 mm.

El modelo de biorreactor BIMOT se caracteriza porque funciona en un solo recipiente donde se distribuye el medio de cultivo líquido y los tejidos que se sostienen sobre una plataforma adaptada a las dimensiones del biorreactor. A cada BIMOT se le agregaron 700 ml de medio de cultivo de consistencia líquida conteniendo las sales, MS (1962) y la dosis correspondiente de 6-BAP.

Con el modelo BIMOT, la inmersión se realiza con la inyección de aire comprimido que permite que el medio de cultivo líquido realice un movimiento ondulatorio que garantiza que el medio llegue hasta la malla plástica que sostiene los tejidos. La entrada del flujo de aire estéril garantiza la oxigenación del medio de cultivo y el baño de los tejidos durante el tiempo que se aplique la inmersión. En el experimento se aplicó la inmersión una vez cada 24 horas con una duración de 3 minutos. El modelo de biorreactor BIMOT con capacidad de 7 litros se observa en la Figura 3.



Figura 3. Modelo de biorreactor BIMOT empleado para estudio de densidad de siembra con 70, 80, 90 y 100 tejidos de piña cv. MD-2 en la fase de multiplicación.

4.4.2 Diseño estadístico

En el experimento de densidad se sembraron por BIMOT en número de 70, 80, 90 y 100 tejidos en una sola variante de medio de cultivo de consistencia líquida. Se empleó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo unifactorial. Se seleccionaron al azar 20 plantas por cada densidad de siembra y se les evaluaron las variables longitud del tallo, número de hojas, número de brotes y número de raíces. A cada variable se le realizó análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan. El procesamiento de los datos se hizo en Excel y para el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.4.3 Variables evaluadas

Cuatro semanas de establecido el experimento; por cada densidad de tejidos se analizaron 20 plantas y se les evaluaron las siguientes variables:

Longitud de tallo (cm): haciendo uso de una regla se midió desde la base hasta donde se distribuyen las hojas en roseta.

Número de hojas: Se contabilizaron únicamente hojas enteras y ápice lanceolado.

Número de brotes: Se contó el número de brotes axilares formados en la parte inferior del tallo.

Número de raíces: Se contó el número de raíces formadas en el tallo.

4.5 Fase de enraizamiento

En esta fase se estudió el efecto de cinco tratamientos a diferentes dosis de Ácido indol acético (AIA) suministradas al medio de cultivo. Se empleó el modelo de biorreactor BIMOT, con frecuencia y tiempo de inmersión como se describe en el acápite 4.4.1.

4.5.1 Medios de cultivo

A cada BIMOT se le agregaron 700 ml de medio de cultivo conteniendo las sales MS (1962) de consistencia líquida y las dosis correspondientes de AIA. Los tratamientos se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento *in vitro* de piña cv. MD-2

Tratamientos	AIA* (mg L ⁻¹)
T ₁	0.00
T ₂	0.25
T ₃	0.50
T ₄	0.75
T ₅	1.00

*AIA: ácido indolacético

4.5.2 Diseño estadístico

En el experimento de enraizamiento se emplearon plantas formadas a las que se les eliminaron las hojas de forma similar a la descrita en el acápite 4.3.1. Los tratamientos evaluados fueron el testigo y 4 dosis de AIA (0.00, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 mg L⁻¹) cada tratamiento conformado por

un BIMOT de 70 tejidos para un total de 300 observaciones. Para la evaluación de las diferentes variables y por tratamiento se seleccionaron al azar 20 plantas. Se empleó un diseño completo al azar (DCA) y a cada variable se le realizó análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan. El procesamiento de los datos se hizo en Excel y para el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.5.3 Variables evaluadas

A las cuatro semanas se escogieron al azar 20 plantas y a cada una se le evaluaron las variables longitud de tallo (cm), número de hojas y número de raíces de acuerdo a la descripción siguiente:

Longitud de tallo (cm): Se midió con una regla milimetrada desde la base hasta donde se distribuyen las hojas en roseta, la longitud se midió en cm.

Número de hojas: Se contabilizaron únicamente las hojas enteras emitidas, caracterizadas por presentar ápice lanceolado.

Número de raíces: Se contó el número de raíces formadas en el tallo.

4.6 Fase de aclimatación

Para el experimento de aclimatación de la piña cv. MD-2 se utilizaron plantas *in vitro* desarrolladas en la fase de enraizamiento. Una vez extraídas las plantas de los biorreactores BIMOT se procedió al lavado de las raíces con agua potable para eliminar los residuos de los medios de cultivo, posteriormente fueron desinfectadas sumergiéndolas durante 15 minutos en el producto fungicida/bactericida Kasugamycin a una dosis de 2 ml por litro de agua.

4.6.1 Fertilización en fase de aclimatación

Para la fertilización de las plantas en la fase de aclimatación se probó el efecto de los productos NATURAM 5 (fertilizante orgánico bioestimulante), PROMET® Cu (fertilizante indicado para prevenir y corregir la deficiencia de cobre en cualquier cultivo) y Carboxy Min L (aportador de micronutrientes de alta asimilación) en base a la respuesta en supervivencia, longitud del tallo, número de hojas y el número de raíces producidas a las cuatro semanas de aclimatadas.

Como sustrato se utilizó compost que se agregó en bolsas de polietileno color negro con dimensiones de 4 pulgadas de alto y 4 pulgadas de diámetro. Previo a la siembra de las plantas, el sustrato se humedeció hasta alcanzar su capacidad de campo, además se regó sobre el sustrato

el mismo producto fungicida/bactericida con similar dosis como la descrita en el acápite 4.6. Además, a las plantas aclimatadas se aplicó por aspersión el fungicida/bactericida Kasugamycin en las hojas y en la base de las plantas a una frecuencia de dos veces por semana.

Los tratamientos definidos para la fertilización semanal de las plantas y las dosis correspondientes se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Productos fertilizantes y dosis suministradas durante la fase de aclimatación de plantas *in vitro* de piña cv. MD-2

Tratamientos	Producto	Dosis (ml L⁻¹)
T₁	Testigo	0.00
T₂	Carboxy Min L	1.00
T₃	NATURAM 5	1.00
T₄	PROMET® Cu	1.00

Nota: En anexos se presentan las descripciones técnicas de cada producto biofertilizante.

4.6.2 Diseño estadístico

Cada tratamiento lo conformaron 20 plantas y un total de 4 tratamientos para un total de 80 plantas. El experimento se estableció en un diseño completo al azar DCA unifactorial, por cada variable evaluada se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó la prueba de Duncan $\alpha = 0.05$. Se empleó el paquete estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.6.3 Variables evaluadas

A las seis semanas de aclimatadas las plantas de piña cv. MD-2 se evaluó la respuesta a la supervivencia, además de las variables longitud del tallo, número de hojas y número de raíces producidas.

En la Figura 4 se observan plantas *in vitro* de piña cv. MD-2 una vez sembradas en el sustrato de compost. Las letras y números que aparecen en las bolsas representan el tratamiento de fertilización correspondiente que se aplicó una vez por semana.



Figura 4. Plantas *in vitro* de piña cv. MD-2 en fase de aclimatación. T₁) Tratamiento testigo sin producto. T₂) Aplicación con el producto Carboxy Min L con dosis de 1.00 ml L⁻¹. T₃) Aplicación con el producto NATURAM 5 en dosis de 1.00 ml L⁻¹. T₄) Aplicación con el producto PROMET® Cu (1 ml L⁻¹).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fase de multiplicación en BEIT y BIMOT

5.1.1 BEIT sin soporte de los brotes

En la fase de multiplicación empleando BEIT de 1 litro de volumen se realizaron dos experimentos, uno en la base del BEIT como soporte de los brotes y el otro sin soporte para los brotes en el BEIT, en las dos variantes se inocularon 20 plantas. Se emplearon plantas de piña formadas en el primer subcultivo.

En longitud de tallo no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos testigo y a los que se le agregaron 1 y 2 mg L⁻¹ de 6-BAP con medias respectivas de 2.75, 2.48 y 2.30 cm. El tratamiento con 3 mg L⁻¹ de 6-BAP con media de 2.05 cm únicamente resultó inferior en respuesta estadística al tratamiento testigo. En número de hojas las medias de los cuatro tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí.

En número de brotes solamente la media de 1.67 brotes axilares obtenida en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ de 6-BAP superó estadísticamente al tratamiento testigo cuya media fue de 0.80 brotes axilares. En número de raíces, el tratamiento testigo con media de 1.60 superó significativamente a los tratamientos que se les adicionaron 2 y 3 mg L⁻¹ de 6-BAP con medias respectivas de 0.60 y 0.50 raíces.

Los resultados se presentan en el Cuadro 4 y en la Figura 5 se observan las plantas en BEIT sin soporte de los brotes en los tratamientos con 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de 6-BAP.

Cuadro 4. Resultados de longitud de tallo, número de hojas, brotes y raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en BEIT sin soporte de los brotes a las cuatro semanas

Tratamientos	Regulador de crecimiento	Variables evaluadas			
	6-BAP* (mg L ⁻¹)	Longitud de Tallo (cm)	Número de hojas	Número de brotes axilares	Número de raíces
T ₁	0	2.75 a	4.90 a	0.80 b	1.60 a
T ₂	1	2.48 ab	4.90 a	1.35 ab	1.10 ab
T ₃	2	2.30 ab	5.00 a	1.40 ab	0.60 bc
T ₄	3	2.05 b	4.95 a	1.67 a	0.50 c

*BAP: 6-bencil amino purina. Letras desiguales por columna difieren para $p \leq 0.05$

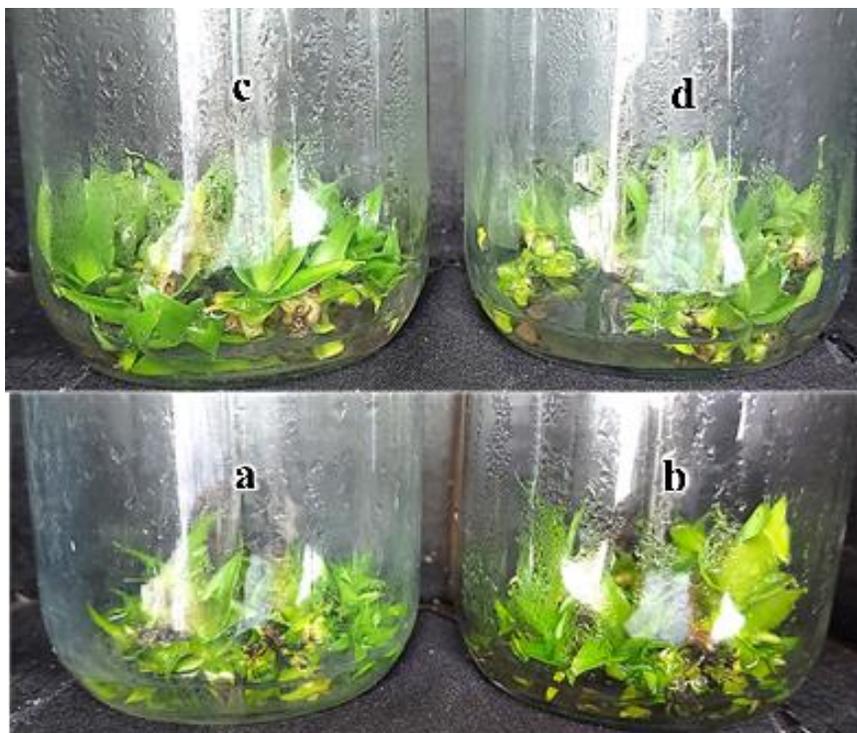


Figura 5. Plantas de piña cv. MD-2 en fase de multiplicación en BEIT sin soporte. a) tratamiento sin adición de 6-BAP. b) plantas con 1 mg L⁻¹ de 6-BAP. c) plantas con 2 mg L⁻¹ de 6-BAP. d) plantas con 3 mg L⁻¹ de 6-BAP.

5.1.2 BEIT con soporte de los brotes

En la variable longitud de planta la media de 2.70 cm lograda en el tratamiento testigo fue superior estadísticamente solo a la media de 2.05 cm que se obtuvo en el tratamiento que contenía 3 mg L⁻¹ de 6-BAP. La longitud de planta en los tratamientos con 1 y 2 mg L⁻¹ de 6-BAP obtuvieron medias respectivas de 2.48 cm y 2.30 cm, resultando similar estadísticamente a los tratamientos sin adición de 6-BAP y con 3 mg L⁻¹ de 6-BAP.

En la variable número de hojas no se presentaron diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos. En número de brotes axilares los tratamientos que se les agregó 6-BAP presentaron medias significativamente superiores al tratamiento testigo que registró una media de 0.70, mientras que en la variable número de raíces la respuesta fue inversa porque los tratamientos que se le adicionaron 6-BAP resultaron con medias significativamente inferiores a la media de 1.85 obtenida en el tratamiento testigo. Los resultados se presentan en el Cuadro 5 y en la Figura 6 se observan las plantas en BEIT con soporte de los brotes en los tratamientos con 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de 6BAP.

Cuadro 5. Resultados de longitud de tallo, número de hojas, brotes y raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en BEIT con soporte de los brotes a las cuatro semanas

Tratamientos	Regulador de crecimiento	Variables evaluadas			
	6-BAP* (mg L ⁻¹)	Longitud de Tallo (cm)	Número de hojas	Número de brotes axilares	Número de raíces
T ₁	0	2.75 a	3.75 a	0.70 b	1.85 a
T ₂	1	2.48 ab	3.95 a	1.25 a	0.70 b
T ₃	2	2.30 ab	3.70 a	1.50 a	0.65 b
T ₄	3	2.05 b	3.65 a	1.55 a	0.55 b

*BAP: 6-bencil amino purine. Letras desiguales por columna difieren para $p \leq 0.05$

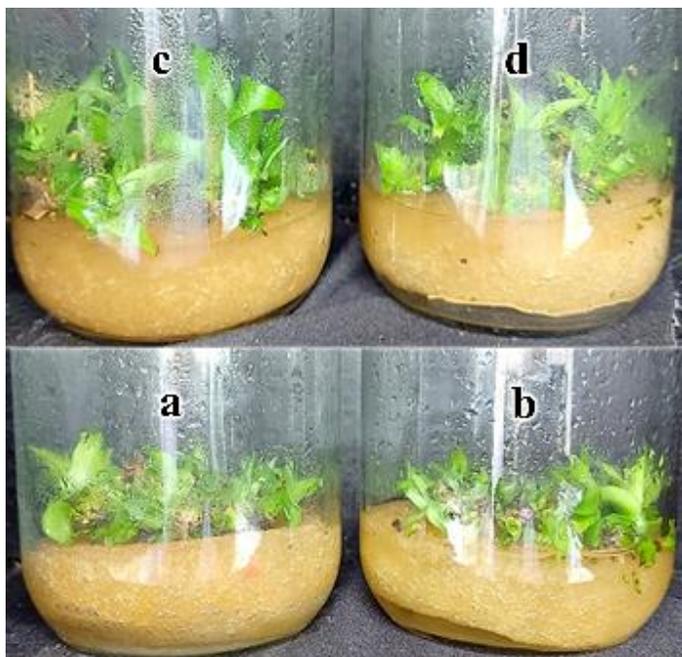


Figura 6. Plantas de piña cv. MD-2 en fase de multiplicación en BEIT con soporte. a) tratamiento sin adición de 6-BAP. b) plantas con 1 mg L⁻¹ de 6-BAP. c) plantas con 2 mg L⁻¹ de 6BAP. d) plantas con 3 mg L⁻¹ de 6-BAP.

A las cuatro semanas de permanecer los tejidos del cv de piña MD-2 en fase de multiplicación en los cuatro tratamientos (sin y con adición de 1, 2, y 3 mg L⁻¹ de 6-BAP) el rango medio de producción de brotes axilares fue entre 0.80 y 1.67 en los BEIT sin soporte y entre 0.70 y 1.55 en el BEIT con soporte.

En los BEIT sin y con soporte el tratamiento testigo se caracterizó por presentar mejores valores de las medias en las variables longitud del tallo y número de raíces, respuesta que posiblemente

es producto del contenido endógeno de auxina que favorece el crecimiento de las plantas y de la emisión de raíces, mientras que los tratamientos con 6-BAP estimulan una mayor brotación axilar. George, (1993) afirma que el efecto de las citoquininas en el cultivo de tejidos u órganos puede variar en dependencia al tipo de compuesto que se utilice, el tipo de cultivo, la variedad de planta y si el explante proviene de un tejido juvenil o maduro.

Los resultados de brotación axilar obtenidos en el presente estudio se debieron a 5 factores: 1- El regulador de crecimiento (6-BAP) agregado en diferentes dosis a los medios de cultivo, 2- Del modelo de biorreactor empleado (BEIT), 3- De la frecuencia de inmersión 4- Del tiempo de inmersión 5- Del genotipo.

En la fase de multiplicación en BEIT la definición de las 3 dosis de 6-BAP se hizo considerando que el empleo de dosis mayores puede ser una causa de variación genética conocida como variación somaclonal. Marulanda y Márquez, (2002) señalan que la propagación de plantas a partir del cultivo de tejidos es un posible origen de inestabilidad genética debido al número de subcultivos o bien a las concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados para la propagación.

Atawia, *et al.*, (2016) experimentando con la variedad de piña *Smooth Cayenne* lograron las mejores proliferaciones de brotes con la combinación de diferentes concentraciones de 6- BAP (0.25, 0.5, 1.0 mg L⁻¹) con 2.0 mg L⁻¹ de la citoquinina Kinetina (Kin) durante dos subcultivos sucesivos. No obstante, nuestros resultados fueron superiores a los reportados por Zamora y Juárez (2008) que empleando similares variantes de medios de cultivo estacionarios de consistencia líquida en frascos de vidrio, obtuvieron rangos de medias de brotación axilar entre 0.23 y 1.20 y con medios estacionarios de consistencia semisólida medias entre 0.33 y 0.68 brotes axilares. Saucedo *et al.*, (2008) reportan que 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⁻¹ de BAP en la var. Champaka y la var. Hawaiana con 3.5 mg L⁻¹ de BAP.

En el estudio no se alcanzó el promedio de 11 brotes después de permanecer los tejidos durante 2 meses en biorreactores de inmersión temporal que emplea dos recipientes, uno que contiene el medio de cultivo y otro que contiene los tejidos como

lo reporta Llanos (2015), ese resultado se obtuvo en un medio de cultivo que contenía las sales MS (1962) a las que agregó 2.10 mg L⁻¹ de BAP más 0.30 mg L⁻¹ de ANA y 20 g L⁻¹ de sacarosa; además, la frecuencia de inmersión que programó a realizar cada 3 horas con un tiempo de inmersión de 3 minutos. La frecuencia y el tiempo de inmersión en nuestro estudio fueron de 1 inmersión cada 24 horas con 3 minutos de duración y las plantas se evaluaron a las cuatro semanas.

En el cultivo de piña el empleo del modelo de Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) es eficiente porque cuando ocurre la inmersión tiene la ventaja que los tejidos se sumerjan completamente en el medio de cultivo, permitiendo que esos tejidos floten en un movimiento continuo durante se aplica la inmersión, efecto que puede contribuir a que los tejidos sean favorecidos con la reducción significativa de la dominancia apical permitiendo que se produzca una mayor proliferación o brotación axilar, de acuerdo a lo descrito por Escalona *et al.*, (1999) y Llanos (2015).

En los BEIT con suministro de inmersión los tejidos permanecen al fondo del frasco cuando no se usa soporte y si se usa los tejidos solo son mojados, en ambos casos el movimiento de esos tejidos es mínimo, por tanto, es posible que la dominancia apical tenga una expresión fuerte y es difícil reducirla con una sola frecuencia y un tiempo de inmersión de tres minutos que resultan insuficientes para lograr un mayor estímulo de la brotación axilar.

5.1.3 Densidad de siembra en BIMOT

En la variable longitud de tallo con densidad de siembra de 100 tallos se obtuvo media de 2.55 cm que resultó superior estadísticamente a las medias de 1.90 y 2.03 cm que se registraron en las densidades de 70 y 80 respectivamente. Con media de 2.28 cm la densidad de siembra de 90 tallos solo fue superior a la media obtenida con la densidad de 70 tallos.

En la Figura 7, se presentan los resultados de la variable longitud de tallo en la fase de multiplicación de piña MD-2 con densidades de siembra de 70, 80, 90 y 100 tejidos a las cuatro semanas de permanecer en los BIMOT.

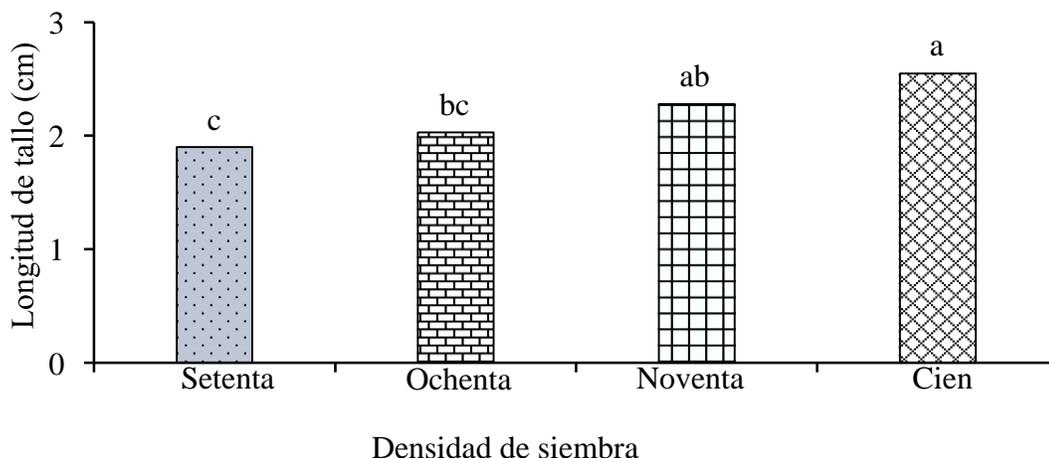


Figura 7. Longitud de tallo de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras difieren para $p \leq 0.05$.

En número de hojas con media de 4.65 en densidad de siembra de 70 tejidos resultó superior estadísticamente a las medias de 4.30 y 4.15 hojas que se produjeron con 90 y 100 tejidos. Resultó similar la respuesta estadística de las medias 4.65 y 4.45 hojas obtenidas respectivamente con la siembra de 70 y 80 tejidos. En la Figura 8, se presentan los resultados de la variable número de hojas en la fase de multiplicación de piña MD-2 con densidades de siembra de 70, 80, 90 y 100 tejidos a las cuatro semanas de permanecer en los BIMOT.

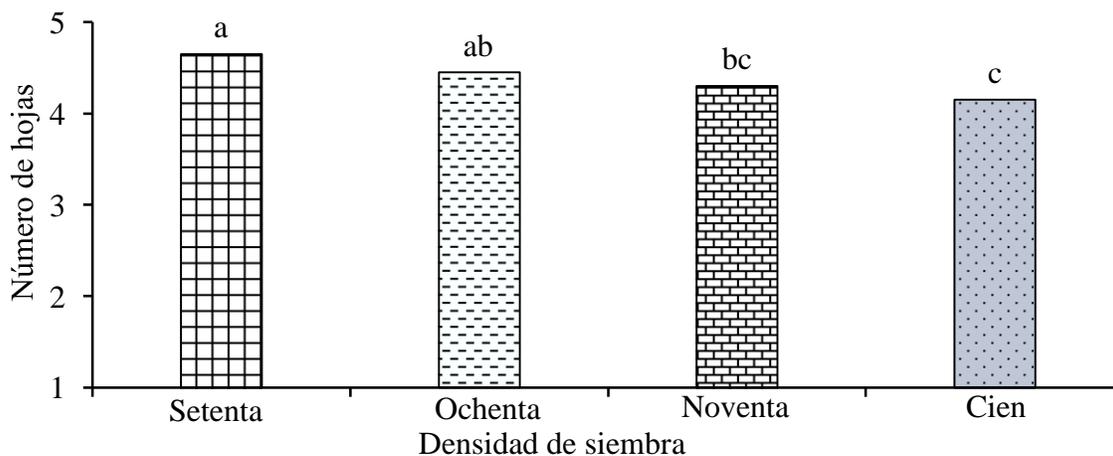


Figura 8. Número de hojas de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras difieren para $p \leq 0.05$.

En la variable número de brotes axilares las medias de las densidades de 70, 80, 90 y 100 tejidos presentaron similar comportamiento estadístico entre sí con medias respectivas de 1.60, 1.73, 1.90 y 2.35 brotes axilares a las cuatro semanas.

En la Figura 9 se presentan los resultados de la variable número de brotes axilares en la fase de multiplicación de piña MD-2 a las cuatro semanas de permanecer en los BIMOT.

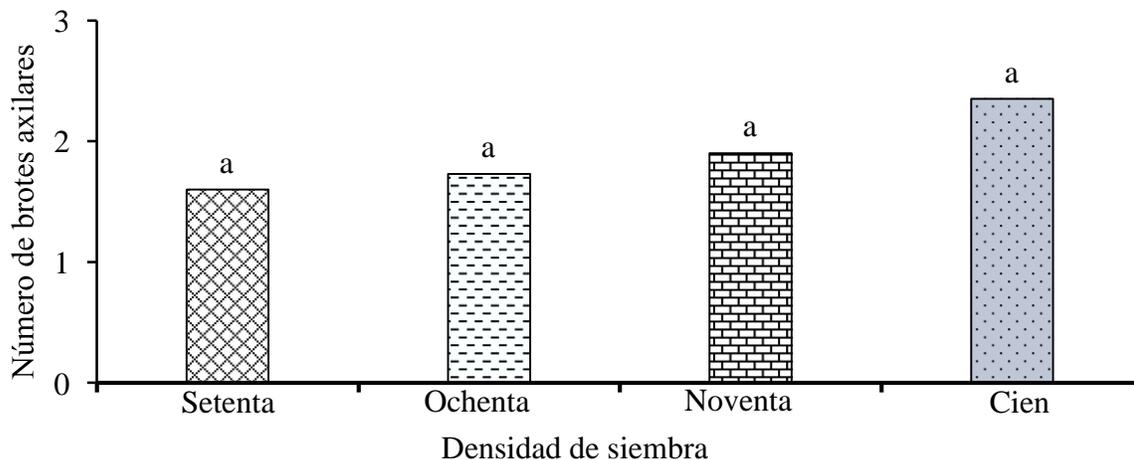


Figura 9. Número de brotes axilares de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras difieren para $p \leq 0.05$.

En la densidad de 70 tejidos se obtuvo una media de número de raíces de 1.15 que únicamente fue superior estadísticamente a la media de 0.65 alcanzada con densidad de siembra de 100 tejidos. Las medias de densidades de siembra de 80, 90 y 100 tejidos presentaron similares categorías estadísticas con medias respectivas de 0.90, 0.75 y 0.65 raíces. En la Figura 10 se presentan los resultados de la variable número de raíces. En la Figura 11, se observan plantas formadas en la fase de multiplicación de piña MD-2 correspondiente a las cuatro densidades de siembra.

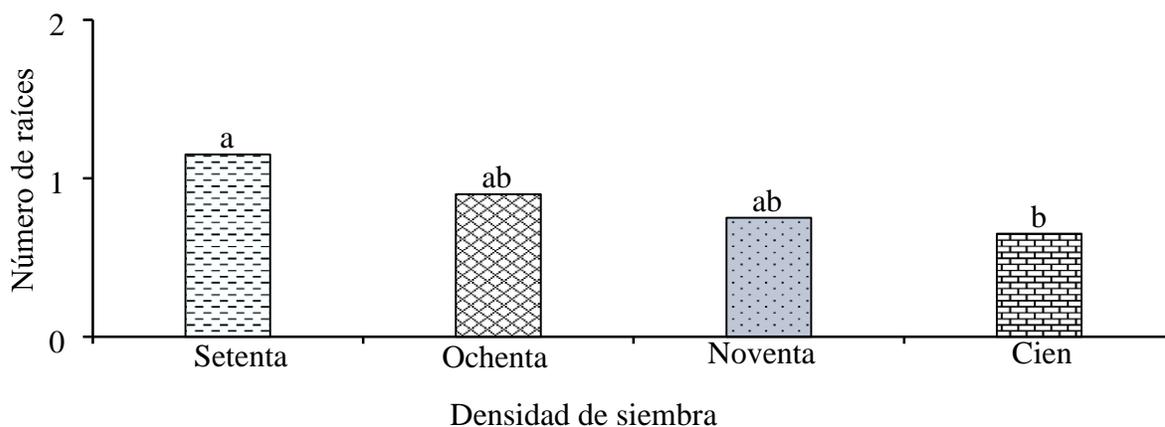


Figura 10. Número de raíces de plantas de piña cv. MD-2 en BIMOT formadas en la fase de multiplicación a las cuatro semanas. Letras difieren para $p \leq 0.05$.



Figura 11. Plantas de piña cv. MD-2 en fase de multiplicación correspondiente a las densidades de siembra de 70, 80, 90 y 100 tejidos a las cuatro semanas de permanecer en los BIMOT.

El BIMOT al igual que el BEIT es un modelo de biorreactor innovado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA) ubicada en Managua, Nicaragua que se puede armar fácilmente y sus componentes se localizan en establecimientos de acceso popular, además tiene la ventaja de permitir la multiplicación o enraizamiento de una buena cantidad de tejidos.

Los resultados obtenidos a las 4 semanas de permanecer los tejidos en fase de multiplicación en densidades de siembra de 70, 80, 90 y 100, se presentaron valores de las medias similares a las variables evaluadas en el experimento con el modelo de biorreactor BEIT sin y con soporte de los brotes y en la variante de medio de cultivo que contenía 3 mg L^{-1} . Esta respuesta nos indica que es posible hacer los mismos ajustes y manejo de los tejidos que sugerimos para los acápite 5.1.1 y 5.1.2. En la fase de multiplicación en particular con los biorreactores BIMOT, se puede prescindir de la plataforma de malla plástica que sirve de soporte de los tejidos para lograr un movimiento de estos.

“El coeficiente de multiplicación está determinado por el promedio de brotación axilar que presente un cultivo y el reto actual de los propagadores de plantas está en la

disminución de los costos y la diversificación de las producciones ampliando el rango de especies beneficiadas con la micropropagación” (Jiménez, 1998).

En el presente estudio de micropropagación de piña MD-2 una forma de disminuir costos es emplear en los biorreactores BIMOT una densidad de siembra de 100 tejidos y con una media de 2.35 se pueden obtener 235 plantas por biorreactor en cuatro semanas.

5.2 Fase de enraizamiento en BIMOT

El objetivo del enraizamiento es promover la inducción, iniciación y diferenciación radical en los explantes provenientes de la fase de multiplicación. Durante el enraizamiento se emplean procedimientos como reducir la concentración de sales minerales del medio a la mitad de su composición, aumentar la concentración de auxinas, eliminando las citoquininas, disminuir la concentración de azúcares, disminuir la intensidad luminosa, adición de carbón activado, entre otros.

“La formación de raíces *in vitro* es una práctica generalizada y en ocasiones es el único método para enraizar una planta. La principal dificultad está en inducir un sistema radical que sea completamente efectivo cuando la planta se transfiere al suelo”. (George, 1993)

El crecimiento de las plantas a las cuatro semanas presentó medias de longitud de tallo con similar respuesta estadística en los tratamientos que se le adicionaron 0.50, 0.75 y 1 mg L⁻¹ de AIA con medias respectivas de 1.81, 1.93 y 2.04 cm. El tratamiento testigo con media de 1.28 cm resultó inferior a todos los tratamientos que se les adicionó AIA. Los resultados se presentan en el Cuadro 3.

En número de hojas no se observaron diferencias estadísticas entre sí cuando se adicionaron cantidades de 0.50, 0.75 y 1 mg L⁻¹ de AIA con medias respectivas de 4.45, 4.20 y 4.35. Con 0.25 mg L⁻¹ de AIA y media de 3.90 resultó significativamente superior a la media de 3.35 hojas que se obtuvo sin la adición de AIA. Todos.

En el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de AIA se obtuvo una media de 4.50 raíces que superó estadísticamente a las medias logradas en los tratamientos que se les agregaron 0.25 y 0.50 mg L⁻¹ de AIA con medias respectivas de 3.50 y 3.70 raíces. Los tratamientos que se les agregó AIA resultaron significativamente superiores al tratamiento testigo sin AIA que tuvo una media

de 2.20 raíces. Los resultados se presentan en el cuadro 6 y en la figura 12 se observan plantas de los cinco tratamientos evaluadas a las 4 semanas.

Cuadro 6. Resultados de longitud de tallo, número de hojas y raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en BIMOT a las cuatro semanas en fase de enraizamiento

Tratamientos	Regulador de crecimiento	Variables evaluadas		
	AIA* (mg L ⁻¹)	Longitud de Tallo (cm)	Número de hojas	Número de raíces
T ₁	0.00	1.28 c	3.35 c	2.20 c
T ₂	0.25	1.62 b	3.90 b	3.50 b
T ₃	0.50	1.81 ab	4.45 a	3.70 b
T ₄	0.75	1.93 ab	4.20 ab	4.05 ab
T ₅	1.00	2.04 a	4.35 a	4.50 a

*AIA: Ácido indol acético. Letras diferentes por columna difieren para $p \leq 0.05$

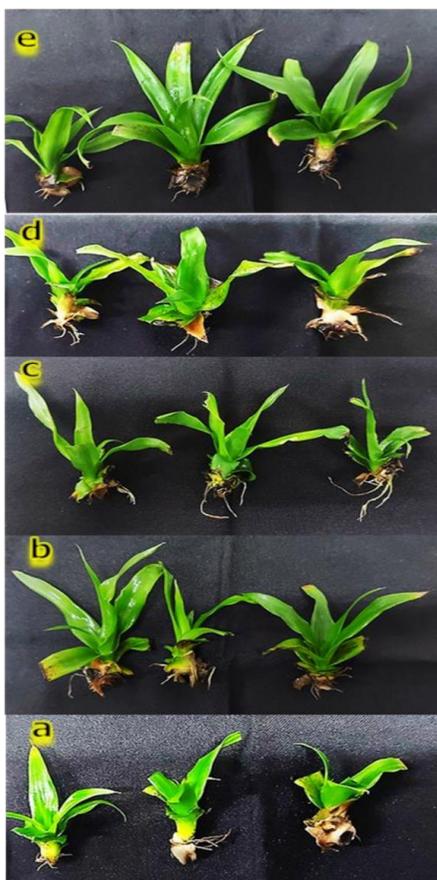


Figura 12. Plantas de piña cv. MD-2 formadas en la fase de enraizamiento. a), Tratamiento testigo sin AIA. b) Tratamiento con 0.25 mg L⁻¹ de AIA. c) Tratamiento con 0.50 mg L⁻¹ de AIA. d) Tratamiento con 0.75 mg L⁻¹ de AIA. e) Tratamiento con 1.00 mg L⁻¹ de AIA.

Los resultados del presente estudio superaron a los obtenidos por Jiménez (2005) en la micropropagación de piña cv. MD-2, comparando un medio semisólido (7 g L⁻¹ de agar) con un medio líquido en biorreactores, utilizando una sola variante de medio de cultivo MS (1962) suplementado con 2 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB) + 2 mg L⁻¹ ácido naftaleno acético (ANA) + 2 mg L⁻¹ de kinetina, tuvo resultados después de 2 semanas con promedios de 1 raíz en medio semisólido y de 2 con medio líquido en biorreactores.

En las variables número de hojas la media de hojas estuvo entre 3.35 y 4.45 hojas que resultaron superiores a las medias producidas en biorreactores BIT que fue entre 2.58 y 2.91 en dos meses en el cv. MD-2 reportado por Llanos (2015).

La piña cv. MD-2 no produjo las raíces esperadas en número y diámetro debido posiblemente a que las concentraciones de AIA adicionadas a las variantes de medios de cultivo no fueron las óptimas, aunque estos resultados fueron superiores al número de raíces que se indujo en las plantas obtenidas después de 4 semanas de permanecer en fase de multiplicación, donde la adición de auxinas es nula y la fitohormona que se adicionó fue la citoquinina 6-BAP. En cultivos como plátano (*Musa* spp.) cv. CEMSA ¾, Castro y Maradiaga (2015) reportan buenos resultados empleando biorreactores del modelo BEIT.

5.3 Fase de aclimatación

A las seis semanas de evaluadas las plantas en fase de aclimatación se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, favoreciendo en longitud del tallo la aplicación del producto biofertilizante Carboxy Min L lográndose una media de 2.78 cm que superó significativamente a las medias que se obtuvieron con los tratamientos sin aplicación de producto (testigo) y con el producto biofertilizante PROMET® Cu con medias respectivas de 2.15 y 2.38 cm. El producto fertilizante orgánico NATURAM 5 con una media de longitud de tallo de 2.52 cm, presentó similar comportamiento estadístico al producto Carboxy Min L.

El número de hojas producidas fue mejor por efecto del tratamiento Carboxy Min obteniéndose una media de 7.25 hojas que resultó superior a los otros tratamientos. No se presentaron diferencias entre las medias logradas en los tratamientos testigo, PROMET® Cu y NATURAM 5 con medias respectivas de 5.10, 4.80 y 4.85 hojas.

Con media de 9.25 raíces producidas en el tratamiento Carboxy Min L. superó estadísticamente a las medias de raíces de 5.90 y 7.30 obtenidas en los tratamientos testigo y PROMET® Cu respectivamente. Con media de 8.55 raíces producidas en el tratamiento NATURAM 5 superó significativamente a la media que se obtuvo en el tratamiento testigo.

Solamente con la aplicación de Carboxy Min L. las plantas presentaron el 100 % de supervivencia, mientras que con los productos PROMET® Cu y NATURAM 5 la supervivencia fue del 90 %. En el tratamiento testigo la supervivencia de las plantas fue del 85 %.

En el Cuadro 7, se presentan los resultados y en las Figuras 13 y 14 se observan plantas de los cuatro tratamientos evaluadas a las 6 semanas de su aclimatación.

Cuadro 7. Resultados de longitud de tallo, número de hojas y número de raíces producidas por planta de piña cv. MD-2 en fase de aclimatación a las seis semanas

Tratamientos	Variables evaluadas				
	Dosis (ml L ⁻¹)	Longitud de Tallo (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Supervivencia (%)
Testigo	0.00	2.15 c	5.10 b	5.90 c	85
PROMET® Cu	1.00	2.38 bc	4.80 b	7.30 bc	90
NATURAM 5	1.00	2.52 ab	4.85 b	8.55 ab	90
Carboxy Min L	1.00	2.78 a	7.25 a	9.25 a	100

Letras diferentes por columna difieren para $p \leq 0.05$

Fue mínima la literatura encontrada que trate de la aplicación de productos biofertilizantes para ser asperjados o suministrados en la base de la planta que se esté aclimatando. Navarro (2019) experimentando en caña de azúcar con diferentes frecuencias de aplicaciones de los productos biofertilizantes PROTIFERLMW y MILAGRO PROMET en la fase de aclimatación (una aplicación semanal durante seis semanas) estimularon que las plantas tuvieran los mayores promedios en las variables longitud de plantas y volumen de raíces.



Figura 13. Plantas de piña cv. MD-2 a las seis semanas en fase de aclimatación tratadas con los productos: a) Tratamiento testigo; b) Carboxy Min L con dosis de 1.00 ml L^{-1} ; c) NATURAM 5 en dosis de 1.00 ml L^{-1} ; d) PROMET® Cu en dosis de 1 ml L^{-1} .



Figura 14. Plantas de piña cv. MD-2 a las seis semanas en fase de aclimatación: a) Tratamiento testigo; b) Con el producto Carboxy Min L; c) Con el producto NATURAM 5; d) Con el producto PROMET® Cu.

El producto biofertilizante Carboxy Min L en las 4 variables evaluadas alcanzó la mayor categoría estadística aun cuando fue suministrado a una menor dosis semanal en relación a los productos biofertilizantes NATURAM 5 y PROMET® Cu. Conforme a las especificaciones de las fichas técnicas de los productos (ver anexos 1, 2 y 3) el Carboxy Min L resultó más efectivo en el crecimiento de las plantas *in vitro* de piña debido a que está constituido principalmente ácidos alifáticos que forman quelatos y evitar que estos se vuelvan insolubles garantizando que los microelementos estén disponibles, mecanismo que resultó efectivo para la aclimatación de piña., mientras que los biofertilizantes NATURAM 5 y el PROMET® Cu con su aplicación aportan a las plantas aminoácidos y en el caso de NATURAM 5 proporciona peptidato de cobre y el PROMET® Cu además de los aminoácidos proporciona sulfato de cobre pentahidratado y nitrógeno orgánico.

VI. CONCLUSIONES

La multiplicación en biorreactores del modelo BEIT de 1 litro con y sin soporte de brotes, la brotación axilar presentó similar respuesta estadística por efecto de las adiciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de BAP.

Con densidad de siembra de 100 tejidos la variable longitud de tallo presentó una media de 2.55 cm que resultó significativamente superior a las medias de 1.90 y 2.03 cm que se alcanzaron con densidades de 70 y 80 tejidos respectivamente. Mientras que en la variable número de brotes axilares no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias de las cuatro densidades de siembra. Con densidades de siembra de 70 y 80 tejidos en las variables número de hojas y número de raíces se obtuvieron categorías estadísticas superiores a las que se presentaron con densidades de siembra de 100 tejidos.

En la fase de enraizamiento realizada en BIMOT con adiciones de 0.75 y 1.00 mg L⁻¹ de AIA se presentaron las mejores categorías estadísticas en las variables longitud de tallo, número de hojas y número de raíces.

El producto aportador de micronutrientes de alta asimilación Carboxy Min L favoreció en la respuesta morfogénica en las variables longitud de tallo, número de hojas, número de raíces y porcentaje de supervivencia, superando a los resultados obtenidos con el tratamiento testigo y con la aplicación del producto fertilizante PROMET® Cu.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar un experimento con la alternativa del corte del tejido longitudinalmente en dos partes en las fases de multiplicación y enraizamiento, práctica que puede contribuir a eliminar la dominancia apical y favorecer el incremento del coeficiente de multiplicación.

Incrementar la frecuencia y el tiempo de inmersión en los tejidos inoculados tanto en biorreactores BEIT y BIMOT.

En la fase de multiplicación experimentar con otras citoquininas con el objetivo de mejorar la brotación axilar.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. y Cruz, R. (2013). *Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) para la producción de plantas in vitro a escala comercial*. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Aguilar, M. y Cruz, R. (2015). *Empresa nacional de producción de plantas in vitro de café (Coffea spp.) con alta calidad genética y fitosanitaria en beneficio socioeconómico de pequeños productores*. Universidad Nacional Agraria, Managua.
- Aitken-Christie, J., Davies, H.E., Kubota, C & Kosai, T. (1995). Automation in Plant Tissue Culture. General introduction overview: Automation and environment control in Plant Tissue Culture Kluwer, Academic Publisher, Dordrech, pp.1-19.
- Albarrán, J. Salazar, E. Trujillo, I. Silva, A. INIA-CENIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Unidad de Biotecnología). Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. 2014. Maraca, Aragua. 2-5 p. Recuperado de http://sian.inia.gob.ve/inia_divulga/divulga_28/rid28_albarran_2-8.pdf
- Assumi, Shiwoto., Singh, P.T & Jha, Anjani Kumar. (2021). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: Tropical Fruit Crops: Theory to Practical. S.N, Ghosh and R.R Sharma (Eds.). Edition: 1st Edition (pp. 487-541).
- Atawia, A.R., F.M. Abd EL-Latif, EL-Gioushy, S.S. Sherif and O.M. Kotb, (2016). Studies on Micropropagation of Pineapple (*Ananas comosus* L.). Middle East J. Agric. Res., 5(2): 224-232.
- Bairu, MW, Aremu, A.O & Van Staden J. (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul 63: 147-173.
- Blanco, H., Vargas, T. y García, E. (2011). *Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales*. En: Revista Interciencia, vol. 36 N° 6.
- Brenes, G. S. (2006). Caracterización vegetativa y productiva del cultivar MD-2 de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) bajo las condiciones climáticas de Turrialba. Revista de las Sedes Regionales, 6 (11). pp. 27-34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=66658949002>.
- Bustamante, M., Zuleta, D. y Giraldo, R. (2017). Cultivo de piña en el Urabá antioqueño: Fortalezas y dificultades de Agrofuturo en el montaje del cultivo y su sostenimiento a largo plazo. https://www.academia.edu/35153061/Agronegocios_Estudios_de_Caso.

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>.
- Castro, E y Maradiaga, E. (2015). Micropropagación tradicional y en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal del cultivar de plátano (*Musa spp.*) Tesis. CEMSA. Universidad Nacional Agraria. Managua-Nicaragua.
- Chavarría Castillo, D y López Montenegro, G. J. (2010). Micropropagación de ápices caulinares en Plátano (*Musa spp* AAB) cultivar Cuerno Gigante. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria
- Chávez-García, J. A., Andrade-Rodríguez, M., Juárez-López, P., Villegas-Torrez, O. G., Sotelo Nava, H., y Perdomo-Roldan, F. (2018). Evaluación de tres sistemas de cultivo in vitro para la multiplicación de microcormos de gladiolo. *Revista Fitotec.*, 41(4): 551-554. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v41n4a/0187-7380-rfm-41-4a-551.pdf>
- Cristancho, V. J., Buitrago, A. A., y Corredor, L. R. (1991). Cultivo de piña. https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/5505/cultivo_de_pi%c3%b1a.PDF?sequence=1&isAllowed=y
- Cruz, V. I. (2018). Innovación en la micropropagación comercial de banano (*Musa AAA cv. Gran Enano*) utilizando un sistema de inmersión temporal [Tesis de Maestría, Colegio de postgraduados]. Archivo digital.
- Dane. (2016). Principales características del cultivo de piña (*Anana comosus* L.). https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_dic_2_016.pdf
- Danso, K. E., Ayeh, K. O., Oduro, V., Amiteye, S. & Amoatey, H. M. (2008). Effect of 6 benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on in vitro production of MD-2 pineapple planting materials. *World Appl. Sci. J.* 3(4): 614-619.
- De Almeida, W. B., Santana, G. S., Rodriguez, A. P. M. & De Carvalho Costa, A. P. (2002). Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Rev. Bras. Fruit*, 24(2): 296-300.
- Etienne, H. & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231.
- Escalona M. 1999. Propagación de la piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] en sistemas de inmersión temporal. Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas. Cuba. 102 p.

- Escalona, M., Lorenzo, J.C, González, B., Daquinta, M., González, J.L., Desjardins, Y., Borroto, C.G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18:743-751.
- FAO/IAEA (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries Proceedings of a Technical Meeting organized by the joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna 26-30 August 2003 February 2004.
- George, E. (1993). Plant Propagation by tissue culture: Part II The technology. (Ed) Exegetics limited, Edington, Wills. Inglaterra. 639-650 pp.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. (2014). Review temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering Life Sciences* 14(6): 607-621.
- IICA. (2004). Guía de exportación para los mercados estadounidense de piña. http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Guia_Export_Pina.pdf
- Jiménez, R. (2005). Respuesta morfogénica de la piña (*Ananas comosus*) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Bach. Ing. en Agro. San Carlos, CR. Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica. 64 p.
- Jiménez, G.E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. In: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp. 45-56
- Llanos Buendia, C. I. (2015). Micropropagación *in vitro* de piña, (*Ananas comosus* L. Merrill) cv MD-2 (*Bromeliaceae*) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Archivo digital. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3944/Llanos_bc.pdf?s equence=1&isAllowed=y
- Marulanda, M. L. y Márquez, M del P (2002). Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* mediante marcadores moleculares (RAPD). *Actual boil.* 24(76):31-36. Archivo digital. [https://Julia%20Esther%20Yah%20Chulim%20\(1\).pdf](https://Julia%20Esther%20Yah%20Chulim%20(1).pdf)
- Navarro González, J. E. (2019). Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) del cultivar CCO6-791 [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Archivo digital. <https://repositorio.una.edu.ni/3821/1/tnf02n322.pdf>
- Orellano, J., Dellagiovanna, A., Imanishi, L., Mazzone, V. & Faedo, N. E. (2016). Sistema de Inmersión Temporal: Automatización de propagación *in vitro* de plantas utilizando herramientas libres.
- Perea, M. (2009). Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de

- Pérez, J. N; E. Jiménez y D. Agramonte. 1998. Aumento de la Eficiencia de la Propagación Masiva: En Propagación y Mejora Genética de las plantas por biotecnología (e d) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp 179 -190.
- Phillips, R. L., S. M. Kaepler & P. Olhof. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5222-5226. Archivo digital. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S185130182010000200002
- Rocha, D. R y Treminio, Santiago (2008). Embriogénesis somática en reproducción *in vitro* del cultivo de piña (*Ananas comosus* L. Merr) cultivar MD-2. Ingeniería tesis, Universidad Nacional Agraria-UNA.
- Saucedo, S.G., Ramos, E.L., Varas, E., Carmigniani, F. (2008). Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. Cienc. Tecnol. 1: 49-54.
- Superintendencia de Industria y Comercio. (2015). Piña: Mejoramiento genético y propagación. ISSUU. https://issuu.com/quioscosic/docs/pina_final
- Takayama, S. & M. Akita. (1996). Biorreactor advances for the large-scale production of propagules. Workshop on Somatic Embriogenesis, Artificial seed and biorreactors. Sanremo.
- Teisson, C., Alvard, D., Berthouly, B., Cote, F., Escalant, J., Etienne, H & Lartaud, M. (1996). Simple apparatus to perform Plant Tissue Culture by temporary immersion. Acta Horticulturae, 440: 521-526.
- Torres, A. C., Caldas, L. A., y Buso, J. A. (1998). Cultura de Tejidos e Transformación Genética de Plantas. Embrapa, 1.
- Vargas, V. (2009). Manejo Técnico del Cultivo de Piña. Eds: Ministerio de Agricultura e Instituto Nacional de Innovación Agraria.
- Zamora Jarquín, A. M., y Juárez Gámez, D. A. (2008). Micropropagación en piña (*Ananas comosus* L. Merr) cultivar MD-2 [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Archivo digital. <https://repositorio.una.edu.ni/2052/1/tnf01z25.pdf>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica del producto NATURAM 5.



Teléfono: (506) 2536-6560
E-mail: ferbaint@ferbainternacional.com

FICHA TÉCNICA

Producto: NATURAM 5

Consta de 4 páginas
Edición: Agosto 2021

Identificación de la sustancia o preparación:

Nombre comercial del producto: NATURAM 5
Código Comercial: COCU05C
Aspecto: Líquido color verde

Usos:

Fertilizante orgánico bioestimulante para aplicación foliar o al suelo, fungicida bactericida de acción de contacto y sistémica.

Fabricante:

SICIT GROUP S.p.A., Via Arzignano n.80, 36072, Chiampo (VI), Italia
Teléfono: +39 0444 450 946

Representante para Centro América y Caribe:

Nombre de la empresa: Ferba Internacional S.A.
Ubicación: Costa Rica <mailto:ferbaint@ferbainternacional.com>
Email: ferbaint@ferbainternacional.com
Teléfono: +506 2536-6560
Teléfono de Emergencia: +506 8309-0547

Composición:

Mezcla de un complejo de aminoácidos y péptidos de cadena corta más cobre en forma de peptidato (peptato) de cobre.

Composición	(% p/v)
Aminoácidos y péptidos*	23.10 %
Cobre (Cu) metal procedente de sulfato de cobre pentahidratado	6.15 %
Ingredientes inertes	70,75 %
Totales	100.00 %

* Contiene 3.69% de nitrógeno orgánico (N) como parte de la molécula de aminoácidos y péptidos.

Anexo 2. Ficha técnica del producto PROMET.® Cu



Ficha Técnica

Última revisión: 03.2020

PROMET® Cu

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Nombre del producto:	Promet® Cu
Grupo:	Fertilizante foliar - Proteinato
Composición (p/v):	Sulfato de cobre pentahidratado... 32 % Equivalente de cobre (Cu)..... 8.0 ± 0.5 % Aminoácidos totales 18.5 ± 1.0 % Nitrógeno (N) orgánico 3.3 ± 0.5 %
Formulación:	Líquido soluble
Distribuidor:	Serfi S.A.
Presentaciones del producto:	0.25 L, 1 L y 5 L

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

Aspecto:	Líquido
Color:	Verde/marrón
Olor:	Característico de hidrolizado proteico
Densidad:	1.26 – 1.28 g/mL

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

- **Promet® Cu** es un fertilizante indicado para prevenir y corregir la deficiencia de cobre en cualquier cultivo
- **Promet® Cu** pertenece a una nueva generación de fertilizantes denominados "proteínatos" donde el cobre se encuentra quelatado con aminoácidos libres que facilitan la asimilación de este nutriente en forma ascendente y descendente convirtiéndolo en el único cobre sistémico del mercado.
- El Proteinato de Cobre contenido en el **Promet® Cu** induce la mayor formación de fenolasas de las que normalmente se producen dentro de la planta. Las fenolasas ejercen una acción de protección contra el ataque de hongos y bacterias, ya que estos compuestos permiten una mayor estabilidad de las membranas y paredes celulares, evitando o reduciendo el avance de la enfermedad, debido a que forma grupos reductores que contrarrestan el efecto de degradación enzimática producida por los hongos patógenos y bacterias.

RECOMENDACIONES DE USO

Promet® Cu se absorbe rápidamente a través de las hojas como por las raíces. Es completamente soluble, fácil de aplicar tanto por vía foliar como vía radicular mediante el sistema de riego (goteo, aspersión, etc.) o en drench al suelo.

Es muy importante no exceder las dosis recomendadas para mantener el óptimo crecimiento de las plantas.

Se recomienda alternar las aplicaciones de **Promet® Cu** con **Kalex®**.

DOSIS	PERIODO DE APLICACIÓN
Tratamiento curativo: 400 – 500 mL/cil 200 L	2 – 3 aplicaciones a intervalos de 7 – 10 días a la aparición de los primeros síntomas. Repetir cuando sea necesario.
Tratamiento preventivo: 400 – 500 mL/cil 200 L	2 – 3 aplicaciones distanciadas cada 15 – 21 días.

Las deficiencias de cobre desde el inicio del desarrollo del cultivo originan que la producción de fenolasas sea deficiente, por lo que existe una predisposición de la planta a mostrar susceptibilidad al ataque de enfermedades como se muestra en el cuadro siguiente:

Av. República de Panamá 2577
La Victoria, Lima - Perú

Agro +51.710.4068

EMAIL:
atencionalcliente@serfi.biz

Anexo 3. Ficha técnica del producto Carboxy® Min L



¿QUÉ HACE?

Previene y corrige desórdenes nutricionales ocasionados por deficiencia de micronutrientes.

¿CÓMO LO HACE?

Los ácidos ECCA Carboxy® de tipo alifáticos contenidos en la formulación forman quelatos de estabilidad intermedia con micronutrientes, es decir, los protege de las barreras de la cutícula y epidermis de la hoja o fruto, permitiendo su fácil flujo a través de los tejidos de conducción y eficaz ingreso a las células demandantes.

BENEFICIOS

- Evita pérdidas de rendimiento por deficiencias de micronutrientes.
- Previene y corrige amarillamientos y deformaciones de las hojas por deficiencia de micronutrientes.
- Facilidad de manejo y aplicación.
- Provoca rápida respuesta en los cultivos.

RECOMENDACIONES DE USO

Carboxy® Min L se aplica por aspersión foliar o al suelo (por sistemas de riego presurizado); puede ser aplicado junto con la mayoría de los fertilizantes y agroquímicos líquidos. Para aplicación al suelo, vierta la cantidad medida en el tanque fertilizador y aplíquelo con el agua de riego.

DOSIS

CULTIVO	DOSIS	APLICACIONES/OBSERVACIONES
Solanáceas (Chile, tomate, tomate de cascara, pimiento, berenjena)	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo y repitiendo cada semana hasta completar un total de 3 o 4 aplicaciones.
Cucurbitáceas (Sandía, melón, calabaza, pepino)	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo y repitiendo cada semana hasta completar un total de 3 o 4 aplicaciones.
Crucíferas (Col, brócoli, coliflor)	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo y repitiendo cada semana hasta completar un total de 3 o 4 aplicaciones.
Hortalizas de bulbo	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo y repitiendo cada semana hasta completar un total de 3 o 4 aplicaciones.
Berries (Zarzamora, arándano, frambuesa, fresa)	4 a 6 L/ha	Mensualmente a inicio de brotación.
Pepaya	4 a 6 L/ha	En aspersión foliar al inicio del desarrollo vegetativo cada 3 o 4 semanas.
Banano	4 a 6 L/ha	En aspersión foliar al inicio del desarrollo vegetativo cada 3 o 4 semanas.
Ornamentales	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo y repitiendo cada semana hasta completar un total de 3 o 4 aplicaciones.
Frutales Templados (Manzano, vid, durazno)	4 a 6 L/ha	Mensualmente a inicio de brotación.
Frutales Tropicales (Aguacate, cítricos, piña, mango, cacao)	4 a 6 L/ha	En aspersión foliar al inicio del desarrollo vegetativo cada 3 o 4 semanas.
Papa	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo completo y repetir cada 2 semanas, cuando sea necesario.
Espárrago	2 a 4 L/ha	Desde el inicio del desarrollo vegetativo completo y repetir cada 2 semanas, cuando sea necesario.