

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA RECURSOS GENETICOS NICARAGUENSES**

## **TRABAJO DE DIPLOMA**

**ESTUDIO DE LA CONSERVACION *IN VITRO* A TASAS MINIMAS DE  
CRECIMIENTO EN PIÑA (*Ananas comosus* L.) MEDIANTE EL EFECTO DE  
OSMOREGULADORES Y LA DILUCION DE LAS SALES MURASHIGE & SKOOG  
(1962) A TEMPERATURAS DE 24 °C Y 16 °C**

**AUTOR**

**Br. MARIA ALEXANDRA LOPEZ CASTILLO**

**ASESOR**

**Ing. Agr. MARBELL AGUILAR MARADIAGA**

**SEPTIEMBRE DE 1998**  
**MANAGUA, NICARAGUA**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Leonor Castillo y Santiago López por haberme brindado la oportunidad de estudiar.

A mis hermanos y a mis primos

A mi hijo Camilo

Al colectivo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del REGEN de la  
UNA

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesor Ing. Agr. Marbell Aguilar M. por haberme dirigido y apoyado en la realización de este trabajo.

Al Ing. Agr. Msc. Guillermo Reyes Castro, y al Ing. Agr. Alvaro Benavides G. por su gran colaboración y amistad. A la Sra. Esmelda Bobadilla, Técnica de Laboratorio.

Al Programa Recursos Genéticos

A Paolo Bona por haberme estimulado y ayudado en la culminación de este trabajo

# INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	1
1.1 La Piña ( <i>Ananas Comosus</i> L.)	1
1.2 El cultivo de la piña en Nicaragua	2
II. MATERIALES Y METODOS	5
2.1 Localización del experimento	5
2.2 Extracción y establecimiento de los explantes	5
2.3 Multiplicación de los explantes	6
2.4 Medios de cultivo	7
2.5 Evaluaciones cuantitativas en la fase de conservación	9
2.6 Evaluaciones cualitativas de las hojas	9
2.7 Evaluación de sobrevivencia de los tejidos	10
2.8 Análisis estadístico	10
III. RESULTADOS Y DISCUSION	13
3.1 Efecto del manitol sobre altura de plántula, número y color de las hojas a temperatura de 24 °C y 16 °C	13
3.1.1 Evaluación a las cuatro semanas de conservación	13
3.1.2 Evaluación a las ocho semanas de conservación	16
3.1.3 Evaluación a las doce semanas de conservación	20
3.1.4 Evaluación a las dieciséis semanas de conservación	25

3.2	Efecto del sorbitol sobre altura de plántula, número y color de las hojas a temperatura de 24 °C y 16 °C	29
3.2.1	Evaluación a las cuatro semanas de conservación	29
3.2.2	Evaluación a las ocho semanas de conservación	32
3.2.3	Evaluación a las doce semanas de conservación	35
3.2.4	Evaluación a las dieciséis semanas de conservación	39
3.3	Efecto de la dilución de las sales Murashige & Skoog en el crecimiento <i>in vitro</i> de piña, variedad Cayena lisa a temperatura de 24 °C y 16 °C	42
3.3.1	Evaluación a las cuatro semanas de conservación	43
3.3.2	Evaluación a las ocho semanas de conservación	46
3.3.3	Evaluación a las doce semanas de conservación	49
3.3.4	Evaluación a las dieciséis semanas de conservación	52
IV.	CONCLUSIONES	56
V.	RECOMENDACIONES	57
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
1	Composición del Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). suplementado con 2 mg/litro de 6-bencil aminopurina.	7
2	Variantes utilizadas al medio MS.	8
3	Efecto del manitol sobre la formacion de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las cuatro semanas de- conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	16
4	Efecto del manitol sobre la formacion de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las ocho semanas de- conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	19
5	Efecto del manitol sobre la formacion de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las doce semanas de- conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	25
6	Efecto del manitol sobre la formacion de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las dieciséis semanas de- conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	27

7	Efecto del sorbitol sobre la formación de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	31
8	Efecto del sorbitol sobre la formación de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	35
9	Efecto del sorbitol sobre la formación de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	38
10	Efecto del sorbitol sobre la formación de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	41
11	Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	45
12	Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.	48

- 13 Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación-  
de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobre-  
vivencia a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C. 52
- 14 Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación-  
de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobre-  
vivencia a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C. 55



## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
1	Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	14
2	Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	18
3	Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	22
4	Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	26

5	Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	30
6	Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	33
7	Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	37
8	Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	40
9	Efecto de las diferentes diluciones de las sales Murashige y Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.	44

- 10 Efecto de las diferentes diluciones de las sales Murashige y Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa. 47
- 11 Efecto de las diferentes diluciones de las sales Murashige y Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa. 50
- 12 Efecto de las diferentes diluciones de las sales Murashige y Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa. 53

## RESUMEN

En el presente estudio se necesitó establecer explantes de piña (*Ananas comosus* L.) del cultivar Cayena lisa, de los cuales se utilizaron yemas apicales y axilares seleccionadas por su buen estado fisiológico y morfológico. Estas se establecieron en condiciones *in vitro* utilizando el medio de cultivo básico Murashige & Skoog MS (1962), suplementado con 2 mg/l de 6-Bencil aminopurina (6-BAP) y 0.02 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa e intensidad lumínica. Una vez que se logró micropropagar la cantidad de explantes necesarios para la conservación, se procedió a la aplicación de los inhibidores del crecimiento (manitol y sorbitol) en concentraciones de 10, 20 y 30 g/l y de la dilución de las sales MS al 25, 50 y 75%, interactuando con temperaturas de 24 °C y 16 °C. A los 120 días de haber permanecido las yemas axilares en las diferentes variantes de medios de cultivo sujetas a estudio, se observó mayor deterioro fisiológico y morfológico de las plántulas en los tratamientos con 10, 20 y 30 g/l de manitol y sorbitol. En las variables altura, número de hojas y color de las hojas se experimentaron menores incrementos mensuales, sin embargo se registraron mayores daños, especialmente en las hojas, las cuales presentaron un mayor porcentaje con color verde clorótico a temperaturas de 24 °C de 16 °C. La sobrevivencia fue mayor a temperatura de 16 °C, por el contrario en las diluciones de las sales MS el deterioro fisiológico y morfológico de las plántulas fue menor, observándose mayor sobrevivencia, presentando mayores porcentajes de coloración verde oscuro y un pequeño porcentaje de plántulas atípicas a temperaturas de 24 °C y 16 °C. También fue notoria la presencia de plántulas atípicas en el manitol y sorbitol a temperatura de 24 °C. Únicamente en el tratamiento a 30 g/l de sorbitol se observó el fenómeno de vitrificación a temperatura de 24 °C en un 15%. Las diluciones de las sales indujeron mejores resultados en altura, número de hojas y color de las hojas en ambas temperaturas, sus características fenotípicas y genotípicas se mantuvieron iguales a pesar de la reducción del crecimiento.

**PALABRAS CLAVES:** *Ananas comosus* L., Murashige & Skoog, 6-bencil aminopurina, ácido naftalen acético, manitol, sorbitol, vitrificación, atípicas.

# I. INTRODUCCION

## 1.1 La piña (*Ananas comosus* L.)

La piña (*Ananas comosus* L.) es considerada originaria de América del Sur, y más precisamente de Brasil (Mederos, 1988).

A la llegada de los españoles la piña estaba ampliamente distribuida en la América tropical, donde contribuía notablemente a la alimentación de las poblaciones indias autóctonas y era conocida como "ananas", que en el lenguaje guaraní significaba "fruta exquisita". Cuando Colón llegó a las Américas los indígenas ofrecieron piñas como gesto de bienvenida y hospitalidad; esa rara fruta recordó a los españoles la bellota de los pinos europeos (*Pinus spp.*) y, como venían con el ánimo de bautizar todo lo que encontraban, la llamaron piña. (Olaya, 1992).

La distribución de la piña en el mundo siguió a la apertura de grandes vías marítimas por los portugueses y los españoles en el transcurso del siglo XVI (Mederos, 1988)

A finales del siglo XIX se inició el enlatado comercial de la piña, adquiriendo pronto en el mercado mundial mayor volumen de venta que de fruta fresca. En alguna época Hawaii produjo prácticamente toda la piña para el enlatado, representando su producción más de la mitad de la producción total del mundo;

Sin embargo, a principios de la década de 1960, su producción había caído a menos de una cuarta parte (Samson, 1991).

El cultivar Cayena lisa es en la actualidad una de las variedades más importantes por la calidad de su fruto, sin embargo presenta algunos inconvenientes en cuanto a fragilidad en el transporte y marcada sensibilidad a ciertas enfermedades.

## **1.2 El cultivo de la piña en Nicaragua**

En Nicaragua el cultivo de la piña es uno de los rubros en los cuales se puede obtener divisas mediante la exportación de fruta fresca, lo mismo para el consumo de la población en la cual goza de aceptación.

En el año 1996 según el Anuario de Producción de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 1997) la producción de piña en Nicaragua se estimó en 4, 600 toneladas métricas. El cultivo de la piña se encuentra localizado mayormente en el municipio de Ticuantepe departamento de Managua, y en pequeñas áreas distribuidas en diferentes municipios de los departamentos de Masaya y Granada.

La piña es una planta autoestéril, por lo cual su producción de semillas es muy limitada, lo que conlleva a la forma asexual para su propagación, esta planta produce varios tipos de vástagos o hijos, que son las distintas formas, por las cuales se puede propagar ( Mederos, 1988).

La piña representa un potencial de exportación para América Latina, pero este cultivo enfrenta problemas de erosión genética en sus recursos nativos, claves para la industrialización, debido al abandono del cultivo de variedades nativas, además de la sustitución del azúcar de la piña por azúcar comercial.

La necesidad de preservar los recursos genéticos ha permitido la implementación de diferentes métodos de conservación de estos recursos vitales para la existencia de la humanidad.

La conservación de germoplasma *in situ* expone los materiales a pérdidas debido a problemas bióticos y abióticos además del costo elevado de su mantenimiento en caso de grandes colecciones en el campo (Roca *et al.*, 1992).

En los últimos años la conservación de los recursos naturales no ha recibido atención especial, por lo que la diversidad genética en especies vegetales están siendo destruidas por la presión demográfica, la deforestación y por la ampliación de fronteras agrícolas. Para salvar estos recursos hay que conservarlos ya sea en semillas, en cuartos fríos, para evitar la pérdida su viabilidad o en colecciones de plantas en el lugar que ocupan naturalmente *in situ*. Estos problemas pueden ser reducidos o eliminados por medio de algunas técnicas biotecnológicas. Los métodos de cultivo de tejidos ofrecen vías para la conservación de germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente, permitiendo mantener las colecciones en pequeños espacios libres de plagas y enfermedades, además de facilitar el intercambio de germoplasma (Espinoza *et al.*, 1992).

Las técnicas para la conservación de germoplasma están basadas en la disminución de la actividad metabólica de las células, tejidos u órganos vegetales, de tal manera que se reduce el crecimiento y se mantiene la posibilidad regenerativa de las mismas, utilizando el método del mínimo crecimiento (tasas mínimas de crecimiento) modificando la tasa de crecimiento del cultivo para alargar los períodos entre transferencias y, por ende, disminuir los riesgos de variación genética o somaclonal.

Considerando que los recursos fitogenéticos constituyen un patrimonio de la humanidad, cuya conservación es un hecho de vital importancia, en el presente estudio se pretende alcanzar el siguiente objetivo:

1. Estudiar el comportamiento de la tasa de crecimiento *in vitro* de plántulas de piña, cultivar Cayena lisa, mediante la adición de diferentes concentraciones de manitol, sorbitol y diferentes diluciones de las sales de Murashige & Skoog (1962) y la interacción de estas variantes a temperatura de 24 °C y 16 °C.



## **II. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 Localización del experimento**

El experimento se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12½ carretera norte, en el Departamento de Managua.

El período comprendido fue de septiembre de 1994 a enero de 1995 para el experimento a temperatura de 24 °C, y de mayo a septiembre de 1996 para el experimento a 16 °C.

### **2.2 Extracción y establecimiento de los explantes**

Se utilizaron yemas apicales y axilares del cultivar Cayena lisa seleccionadas por su buen estado fisiológico y morfológico con longitud aproximada entre 3 y 5 cm. Posteriormente se introdujeron en un beaker de 600 ml que contenía 350 ml de agua destilada a la que se adicionaron 10 gotas de jabón líquido, luego se expusieron durante una hora bajo el grifo de agua, para eliminar residuos de polvo e impurezas. Una vez transcurrido este período se procedió a la desinfección de los tejidos para prevenir ataques de bacterias y hongos; se realizó esta operación en la campana de flujo laminar en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 minutos. Para eliminar luego los residuos del hipoclorito de sodio se procedió a efectuar 3 pases sucesivos con agua

destilada estéril. Las yemas se secaron con papel filtro previamente esterilizado. Posterior a la desinfección se inició la inoculación de los explantes realizando la manipulación sobre cajas petri con ayuda de pinzas y escalpelos. Se sembraron 70 yemas apicales de forma individual en tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) (MS) suplementado con 2 mg/l de 6-Bencil aminapurina y 0.02 mg/l de ácido naftalen acético (ANA). Los tejidos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento por 50 días a temperatura de 24 °C, humedad relativa del 72 % e intensidad lumínica de 2, 000 lux con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y permanecieron en el medio de cultivo hasta que las plántulas obtuvieran una altura aproximada entre 3 y 5 cm.

### **2.3 Multiplicación de los explantes**

Para aumentar la cantidad de explantes necesarios para iniciar el estudio de conservación se procedió a micropropagar cada plántula desarrollada en la fase de establecimiento para lo cual se procedió a recortar las hojas y raíces, separando de forma individual las diferentes yemas axilares y apicales para sembrarlas en un medio de cultivo igual al empleado en la fase de establecimiento, hasta obtener plántulas de 3 a 5 cm de altura después de 4 semanas.

El medio de multiplicación de los explantes que se utilizó fue el Murashige & Skoog (1962) (MS) suplementado con 2 mg/litro de 6-bencil aminapurina (ver Tabla 1).

Tabla 1 - Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).

Solución final	Constituyente	Concentración mg/l
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
2	KNO <sub>3</sub>	1900
3	MgSO <sub>3</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
6	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	22.3
7	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
8	NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
9	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
10	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
11	Ki	0.83
12	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
13	Na EDTA	37.3
14	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
15	Tiamina-HCl	20.48
16	Mioinositol	100

## 2.4 Medios de cultivo

Como medio de cultivo básico se seleccionó el propuesto por Murashige & Skoog (1962). Las variantes realizadas al medio MS se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 - Variantes realizadas al medio Murashige & Skoog (MS)

Número de variantes	Concentración sales MS (%)	Inhibidor de manitol (g/l)	crecimiento sorbitol (g/l)
1	100	10	
2	100	20	
3	100	30	
4	100		10
5	100		20
6	100		30
7	25		
8	50		
9	75		
10	100 (*)		

(\*) - Testigo

Las variantes de medios de cultivos se prepararon en frascos aforados diluyendo todos los constituyentes en agua destilada y desionizada, posteriormente las soluciones se homogenizaron en el agitador magnético; el pH se ajustó a 5.7 con adición de 0.5 ml de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de potasio (KOH); como producto gelificante se empleó agar a razón de 7 g/l de medio de cultivo, después de aforar y disolver al agar mediante calentamiento se distribuyeron 5 ml de variante de medio por tubo de ensayo.

Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121 °C a una atmósfera de presión durante 20 minutos. En la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia se procedió a la extracción de plántulas originadas en el proceso de multiplicación.

Los tubos de ensayo se colocaron en gradillas y se procedió a dividirlos en dos grupos de acuerdo a la estructuración de los experimentos previamente establecidos, luego un grupo se trasladó a un cuarto de crecimiento con temperatura de 24 °C y el otro a una cámara de crecimiento con temperatura de 16 °C. Los factores de intensidad lumínica, fotoperíodo y humedad relativa fueron similares a los utilizados en las fases de establecimiento y de multiplicación anteriormente descritas. Los explantes permanecieron en cuarto de crecimiento durante 120 días, período durante el cual se registraron todos los parámetros de crecimiento.

## **2.5 Evaluaciones cuantitativas en la fase de conservación**

### Variables evaluadas

- *Altura de plántula* (cm): con una regla milimétrica se midió la altura de cada plántula, desde la base al último primordio apical.
- *Número de hojas*: se contaron todas aquellas hojas que se observaron morfológicamente normales.

## **2.6 Evaluaciones cualitativas de las hojas**

*Color de las hojas*: Se asignaron categorías de color para cada una de las variables evaluadas.

- (A) *Color verde oscuro*: hojas que presentaron una coloración verde limón sin clorosis.
- (B) *Color verde claro*: hojas que presentaron coloración verde más clara con respecto a la categoría anterior.
- (C) *Color verde clorótico*: hojas que presentaron coloraciones verdes acompañadas de puntos blanquesinos y de bandas café rojizas.

## **2.7 Evaluación de la sobrevivencia de los tejidos**

En cada tratamiento se observó el número de plántulas vivas; se consideraron tejidos vivos todos aquellos que se desarrollaron en buen estado fisiológico y morfológico que renuían las características de una plántula completa, también se evaluaron las plantas atípicas caracterizadas por manifestar una coloración verde clara en las hojas y la brotación de yemas adventicias.

## **2.8 Análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar (DCA). Se utilizaron 7 repeticiones por cada tratamiento, las medias obtenidas en el análisis de varianza sirvieron para determinar los incrementos mensuales para las variables altura, número de hojas mediante la fórmula reportada por Mora

(1987). Esta fórmula se aplicó a partir de los datos obtenidos en la primera evaluación. Las coloraciones de las hojas, formación de callos y sobrevivencia de los tejidos se presentan en porcentajes.

a) Fórmula para la variable altura de plántula

$$I_m = (P_i - P_o) / P$$

donde:

$I_m$  = incremento mensual

$P_i$  = altura inicial

$P_o$  = altura final

$P$  = mes de evaluación ( 2, 3 y 4)

b) Fórmula para las variables número de hojas

$$I_m = P_o / P$$

donde:

$I_m$  = incremento mensual

$P_o$  = número de hojas

$P$  = mes de evaluación ( 2, 3 y 4)

### **III. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **3.1 Efecto del manitol sobre altura de plántulas, número y color de las hojas a temperaturas de 24 °C y 16 °C.**

##### **3.1.1 Evaluación a las cuatro semanas de conservación**

A las cuatro semanas de inoculadas las yemas apicales a una temperatura de 24 °C, el tratamiento testigo presentó mayor promedio en la variable altura de la plántula (1.6 cm), superando a los tratamientos a los cuales se les adicionó manitol en 10, 20 y 30 g/l, que resultaron con valores de 1.54, 1.08 y 1.17 cm respectivamente. A temperatura de 16 °C, las plántulas registraron en el tratamiento testigo mayor promedio, con 1.1 cm, superior a los tratamientos a los cuales se les adicionó manitol, los que presentaron valores de 0.85, 1.03 y 0.99 cm, en 10, 20 y 30 g/l de manitol respectivamente.

El número de hojas producidas a temperatura de 24 °C en los tratamientos testigo y con 10 y 30 g/l de manitol, que presentaron respectivamente valores de 1.98, 2.43 y 2.15 hojas, superaron a las producidas con 20 g/l de manitol que resultaron en 1.33.

El número de hojas producidas a temperatura 16 °C en los tratamientos testigo, 20 y 30 g/l de manitol, superaron a las producidas con 10 g/l de manitol. Los valores reportados fueron de 2.34, 1.03, 2.40 y 1.22 hojas en los tratamientos



testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol respectivamente. Los resultados de los experimentos arriba descritos se resumen gráficamente en la Figura 1.

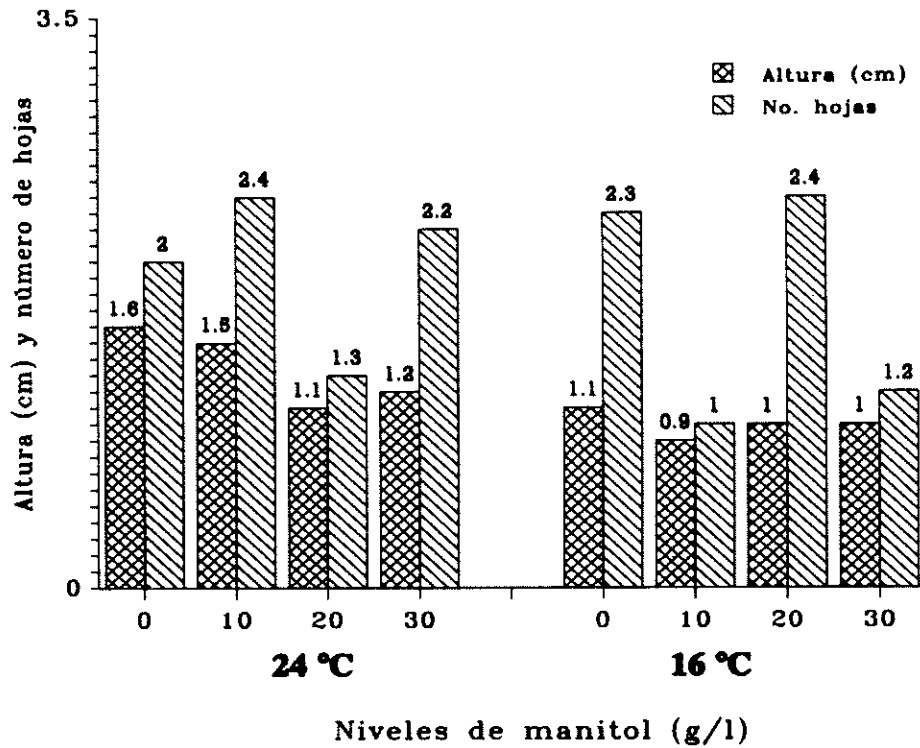


Figura 1 - Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y número de hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

La formación de raíces fue mínima y por tal razón este parámetro no se sometió a análisis estadístico.

Las plántulas atípicas, que se caracterizaron por manifestar una coloración verde clara en las hojas y la brotación de yemas adventicias, no han sido consideradas

en la evaluación de las variables altura de las plántulas y número de hojas. No se observó formación de callos y no se evidenció la formación de plántulas atípicas a temperatura de 24 °C, pero sí a temperatura de 16 °C, el crecimiento de plántulas atípicas fue del 15% en el tratamiento testigo ( ver Tabla 3).

La formación de plántulas atípicas puede derivar de diferentes causas; Allan (1979), observó la formación de yemas adventicias cuando subcultivó plántulas de camote (*Ipomoea batata* L.); Granada & Villalobos (1980), atribuyen la formación de brotes adventicios en ñame (*Dioscorea spp.*) a su origen en tejidos meristemáticos y a la posterior diferenciación de ápices, o directamente a partir de callos originados del explante; Pérez (1991) reporta que las yemas adventicias se forman en muchos cultivos a partir de una célula, que puede ser del Cambium basal o de cicatrización de callos que se forman cuando se cortan los tejidos *in vitro* para la respectiva multiplicación; también se forman yemas adventicias a partir de las multiyemas.

El efecto fisiológico del manitol se manifestó en la coloración de las hojas presentando, a temperatura de 24 °C, un color verde oscuro en el 100% de los casos en todos los tratamientos (10, 20 y 30 g/l de manitol y testigo). A temperatura de 16 °C, se presentaron porcentajes diferentes de color verde oscuro a medida de que se incrementó la concentración de manitol, registrándose valores de 28 y 57% en los tratamientos con 10 y 30 g/l de manitol, mientras que no se presentó esta coloración en los tratamientos testigo y 20 g/l de manitol. El color verde claro se observó en porcentajes de 43, 28 y 43% en los tratamientos testigo, 10 y 20 g/l de manitol respectivamente, y en el tratamiento con 30 g/l de

manitol no se registró esta coloración. El color verde clorótico en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol se registró en porcentajes de 57, 44, 57 y 43% respectivamente.

Aún cuando se evidenciaron diferencias en el aspecto morfológico y fisiológico por efecto del manitol, la sobrevivencia de los tejidos a temperatura de 24 °C fue del 100% en todos los tratamientos, mientras que a temperatura de 16 °C, se observó una disminución en los tratamientos con 10 y 30 g/l de manitol, registrándose porcentajes de 28 y 86% respectivamente.

Tabla 3 - Efecto del manitol sobre la formación de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Manitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	0	15	0	0	100	100	100	0	0	0	43	57
10	0	0	0	0	100	28	100	0	0	28	28	44
20	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	43	57
30	0	0	0	0	100	86	100	0	0	57	0	43

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

### 3.1.2 Evaluación a las ocho semanas de conservación

A las ocho semanas de establecidos los explantes, a temperatura de 24 °C el incremento mensual en altura de las plántulas fue superior en los tratamientos

testigo y 20 g/l de manitol, con valores respectivos de 0.49 y 0.32 cm que en los tratamientos con 10 y 30 g/l los cuales presentaron valores de 0.14 y 0.05 cm. A temperatura de 16 °C el incremento mensual en la altura de las plántulas fue superior en los tratamientos con 20 y 30 g/l de manitol, los cuales dieron valores de 0.04 y 0.065 cm, mientras que con 10 g/l y en el testigo se registraron valores de 0.005 y 0.045 cm respectivamente.

Los tratamientos con manitol que a las cuatro semanas presentaron formaciones morfológicas atípicas, a las ocho semanas desarrollaron agrupaciones de yemas adventicias con pequeños esbozos foliares de coloración verde clorótica, pero no aumentaron los porcentajes de plántulas atípicas con respecto a la evaluación anterior. Jarret & Gawel (1991), empleando cantidades de 18.2 g/l de manitol y sorbitol observaron la formación de hojas pequeñas, peciolo largo, desarrollo de callos en la base y pigmentación variada en comparación con niveles más bajos de manitol y sorbitol después de 90 días de inoculadas yemas axilares de camote; similares efectos reporta Felderman, citado por Pérez *et. al.*, (1984), en caña de azúcar (*Saccharum spp*), atribuyendo dichas expresiones morfológicas al rejuvenecimiento y a la sanidad de las plántulas regeneradas *in vitro*.

El incremento mensual en la variable número de hojas a temperatura de 24 °C fue el siguiente en los tratamientos con 10, 20 y 30 g/l de manitol resultaron respectivamente valores de 2.85, 2.21 y 1.71, mientras que el tratamiento testigo resultó con el valor mayor, de 3.15. A temperatura de 16 °C se obtuvieron valores de 0.43, 3.00 y 0.57, en los tratamientos con 10, 20 y 30 g/l de manitol

respectivamente, los cuales fueron superados ligeramente por el testigo que resultó con 3.07.

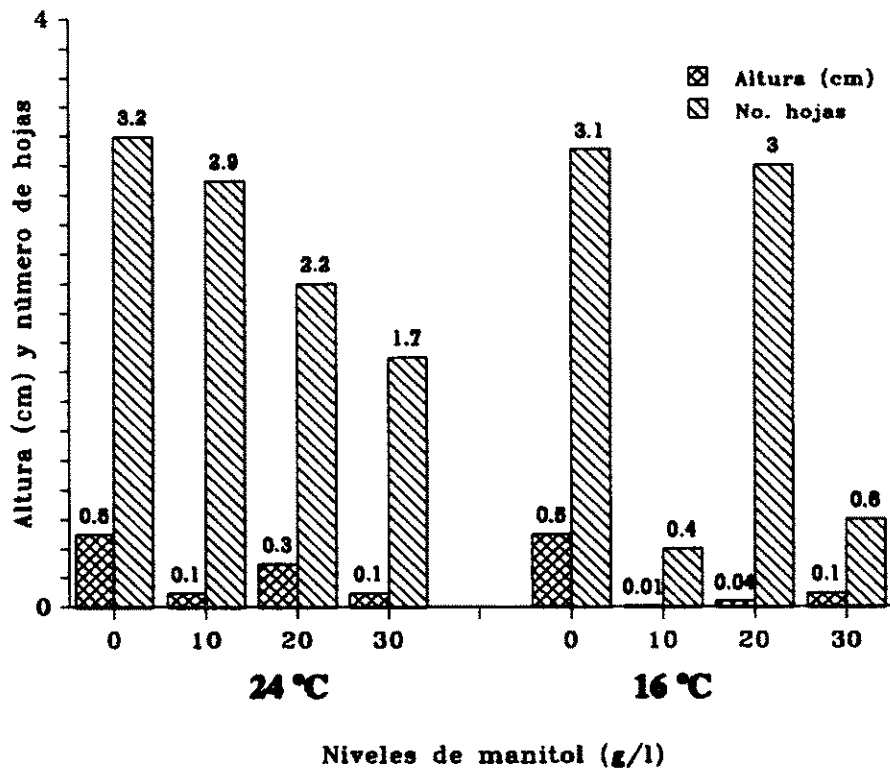


Figura 2 - Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y número de hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

La coloración verde oscuro de las hojas a temperatura de 24 °C disminuyó con respecto a la evaluación anterior; en el tratamiento con 10 g/l y en el testigo presentó valores de 85 y 90% respectivamente, mientras que en los tratamientos con 20 g/l y 30 g/l esta coloración no se presentó. La coloración verde claro presentó porcentajes de 10, 10, 28 y 57% respectivamente, en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol. La coloración verde clorótica aumentó en el

tratamiento con 20 g/l de manitol alcanzando un 72%, mientras que en los tratamientos testigo y 30 g/l de manitol se presentaron en porcentajes inferiores de 5 y 43%; en el tratamiento con 10 g/l de manitol no se presentó esta coloración.

A temperatura de 16 °C la coloración verde oscura en los tratamientos testigo y 10 g/l de manitol se dio en el 28 y 15% de los casos respectivamente; no se apreció esta coloración en los tratamientos con 20 y 30 g/l de manitol. La coloración verde claro alcanzó porcentajes de 43, 28, 43 y 57% correspondientes a los tratamientos testigo 10, 20 y 30 g/l de manitol. La coloración verde clorótica presentó valores superiores con respecto a la evaluación anterior presentando porcentajes de 29, 57, 57 y 43% en el testigo 10, 20 y 30 g/l de manitol respectivamente ( ver Tabla 4).

Tabla 4 - Efecto del manitol en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Manitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	0	0	0	100	100	85	10	5	28	43	29
10	0	0	0	0	100	28	90	10	0	15	28	57
20	28	0	0	0	57	86	0	28	72	0	43	57
30	0	0	0	0	100	86	0	57	43	0	57	43

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

El porcentaje de sobrevivencia a los 24 °C, con respecto a la evaluación anterior, en la cual se observó el 100% en todos los tratamientos, disminuyó solamente en el tratamiento con 20 g/l de manitol, en el cual se registró un valor de 57%. En los experimentos a 16 °C este parámetro resultó con valores iguales a la evaluación anterior, con excepción del tratamiento con 20 g/l de manitol el cual bajó del 100 hasta 86%.

En la evaluación a las ocho semanas de conservación como también en la anterior (cuatro semanas) no se observaron procesos de vitrificación.

### 3.1.3 Evaluación a las doce semanas de conservación

A las doce semanas de establecidas las plántulas a temperatura de 24 °C se observó en la variable altura un mayor incremento por efecto del tratamiento con 20 g/l de manitol en 0.83 cm, disminuyendo en los tratamientos testigo, 10 y 30 g/l de manitol en 0.23, 0.14 y 0.02 cm, respectivamente. A temperatura de 16 °C se observó mayor incremento en el tratamiento con 30 g/l de manitol con 0.043 cm, en los tratamientos testigo y con 20 g/l de manitol presentaron valores respectivos muy aproximados de 0.023 y 0.026 cm, y en el tratamiento con 10 g/l de manitol no se registró incremento.

Comparando estos incrementos con los que se obtuvieron a las ocho semanas se demuestra que resultaron inferiores, lo que confirma lo antes señalado, que sin la adición de sustancias reductoras de crecimiento las plántulas disminuyen el ritmo

de crecimiento aunque sus principales órganos (hojas y raíces) estén debidamente desarrolladas.

El número de hojas a temperatura de 24 °C, en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol, presentó un incremento mensual de 3.05, 2.14, 1.86 y 1.86 respectivamente. A temperatura de 16 °C el incremento mensual disminuyó en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol hasta los valores de 1.77, 0.28, 1.90 y 0.71. Los resultados se observan en la Figura 3.

La reducción de la tasa de incremento puede estar influenciada por el efecto osmoregulador del medio de cultivo debido a la retención de moléculas de sacarosa, manitol y a la deshidratación del medio de cultivo. Roca *et al.*, (1992), afirman que la respuesta de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos.



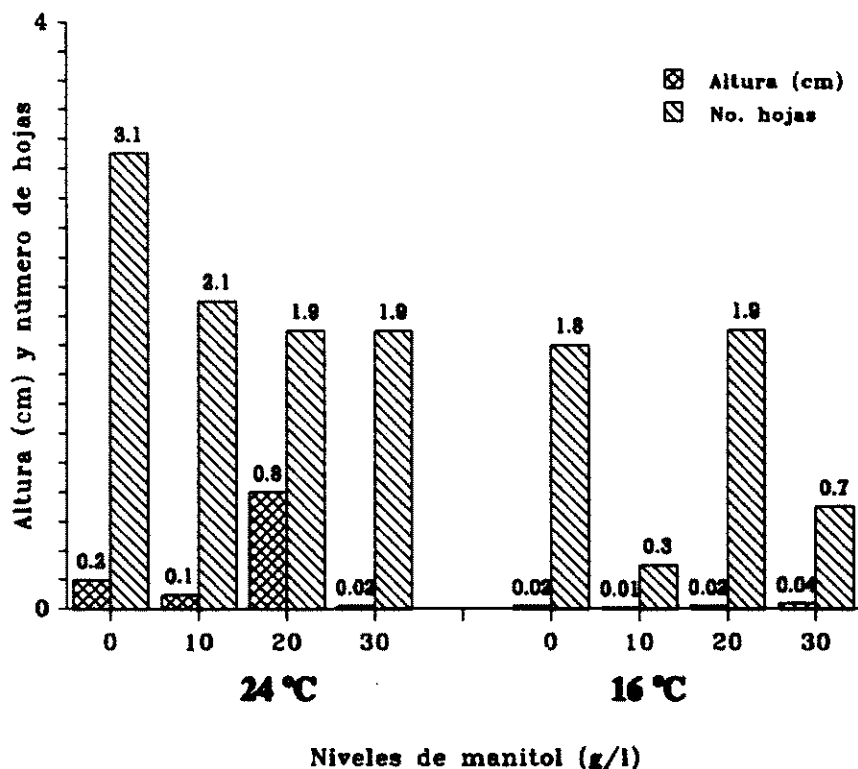


Figura 3 - Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y número de hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

En las hojas a temperatura 24 °C se redujo el color verde oscuro en el tratamiento testigo en 57%, mientras que con 10, 20 y 30 g/l de manitol no registró esta coloración. El color verde claro en 10 g/l de manitol se disminuyó a 5% y en los tratamientos testigo y en 20 g/l de manitol no hubo variación permaneciendo con igual porcentaje que en la evaluación anterior de 10 y 28%, mientras que en 30 g/l de manitol no se registró esta coloración. El color verde clorótico se manifestó con mayor porcentaje en los tratamientos 10, 20 y 30 g/l de manitol

con 95, 72 y 100%, respectivamente el tratamiento testigo se observó el 33% de las plántulas evaluadas.

Roca *et al.*, (1992) señalan que el tipo de coloración que presenta la plántula es un indicador de cambios fisiológicos que se producen por efecto principalmente del manitol.

Aunque los porcentajes de sobrevivencia de las plantas disminuyó en el tratamiento con 30 g/l de manitol hasta el 86%, se conservó el mismo porcentaje en las demás variantes pero fue notorio la presencia de puntos blanquecinos tanto en el haz como en el envés de las hojas en porcentajes de 10 y 15% en los tratamientos testigo y 30 g/l de manitol respectivamente.

Según Phan & Letouze (1983), observaron en 15 especies un desorden en el desarrollo con aspecto translúcido, acuoso y quebradizo a estas manifestaciones le asignaron el nombre de vitrificación. Estudios microscópicos han demostrado que tales plantas exhiben un proceso de desarrollo anormal particularmente una deficiencia en la síntesis de lignina Waymouth (1973).

Vieth & Phan (1982), reportan en la mayoría de los casos de vitrificación presentan en el medio MS por su alta concentración de nitrato de amonio.

En las variables fue evidente el efecto diferente que producen los tratamientos testigo y los que contienen manitol, las yemas inician el proceso de diferenciación una vez que se inoculan en el medio de cultivo y mantienen un

ritmo de crecimiento continuo hasta que disminuyó paulatinamente después de cuatro semanas, mientras que en los tratamientos que se les adicionó manitol, el proceso de diferenciación es lento debido a efecto osmótico que produce el manitol causando alteraciones fisiológicas en los tejidos como es la formación de callo, lo que impide en gran medida la iniciación de raíces, limitándose de esta manera la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo necesarias para mantener un crecimiento continuo. Jarret & Gawel (1991), reportan que el manitol y el sorbitol reducen la altura de las plántulas, se produce una apertura de las hojas y desarrollo del peciolo, acortamiento apical de lo cual resultan numerosos tallos y producen un sobre efecto de plántulas más compactas.

En las plántulas conservadas a temperatura de 16 °C se incrementó únicamente el color verde oscuro de las hojas en el tratamiento testigo en un 45% y en 20 g/l de manitol en 57%, disminuyendo en el tratamiento a 10 g/l de manitol en 10%, no se registró esta coloración en el tratamiento a 30 g/l. El color verde claro aumentó en 62% en el tratamiento a 10 g/l de manitol y disminuyó en 15 y 1% en los tratamientos testigo y 20 g/l de manitol respectivamente; en el tratamiento a 30 g/l de manitol se registró igual que en la evaluación anterior. El color verde clorótico se manifestó con mayor porcentaje en el tratamiento testigo con 40% disminuyendo en los tratamientos con 10 y 20 g/l de manitol hasta 28 y 42%; en el tratamiento 30 g/l de manitol se conservó el 43% registrado a las ocho semanas. El porcentaje de sobrevivencia no varió respecto a la evaluación efectuada a las ocho semanas.

Tabla 5 - Efecto del manitol en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencias a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Manitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	0	0	10	100	100	57	10	33	45	15	40
10	0	0	0	0	100	28	0	5	95	10	62	28
20	42	0	0	0	57	86	0	28	72	57	1	42
30	0	0	0	15	86	86	0	0	100	0	57	43

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

### 3.1.4 Evaluación a las dieciséis semanas de conservación

Las diferencias en el incremento mensual de la altura de la plántula fue mínima a temperatura de 24 °C en los tratamientos testigo, 10 y 20 g/l de manitol con valores de 0.22, 0.05 y 0.08 cm respectivamente, mientras que en el tratamiento con 30 g/l de manitol el efecto reductor del incremento fue menor registrándose 0.03 cm.

En cambio a temperatura de 16 °C el incremento mensual en altura de las plántulas fue mínima entre los tratamientos testigo, 10 y 20 g/l de manitol con valores de 0.08, 0.02 y 0.01 cm respectivamente y en 30 g/l de manitol no se registró incremento.

A 24 °C el número de hojas presentó incrementos de 2, 2.25, 1.61 y 1.39 correspondiente a los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol. A temperatura a 16 °C el incremento fue de 0.93, 0.21, 1.36 y 0.33 en los tratamientos testigo 10, 20 y 30 g/l de manitol, respectivamente.

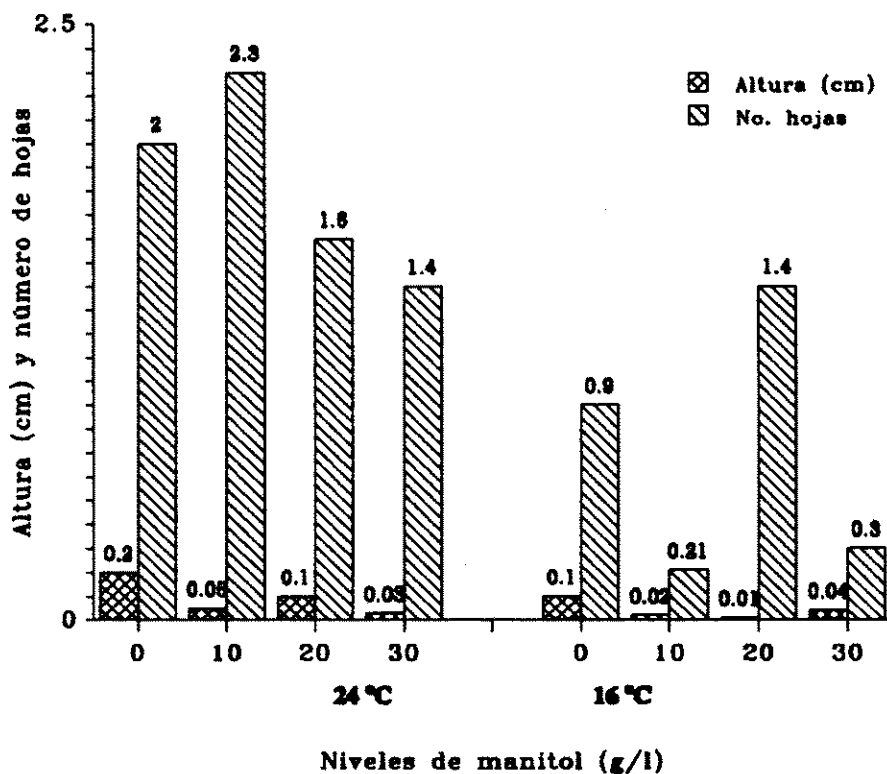


Figura 4 - Efecto de diferentes concentraciones de manitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

El color verde oscuro de las hojas a temperatura 24 °C disminuyó en el tratamiento testigo a 28%, en los tratamientos a 10, 20 y 30 g/l de manitol no se observó. la coloración verde claro no se registró en los tratamientos con 10 y 20 g/l en relación a la evaluación a las doce semanas , mientras que el tratamiento

testigo registró igual porcentaje que a las doce semanas a 10%. El color verde clorótico expresión típica del deterioro fisiológico que sufren los tejidos fue más evidente en los tratamientos con mayor concentración de manitol, con porcentajes de 62, 100, 100 y 100%, en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol.

A temperatura de 16 °C el color verde oscuro de las hojas en relación a la evaluación a las doce semanas no se presentó en los tratamientos a 10, 20 y 30 g/l de manitol. El tratamiento testigo registró el 43%. El color verde claro no se observó en los tratamientos con 10, 20 y 30 g/l de manitol y el tratamiento testigo registró el 15%. En el color verde clorótico se evidenció más en los tratamientos con mayor concentración de manitol, con porcentajes de 42, 100, 100 y 100% en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de manitol respectivamente.

Tabla 6 - Efecto del manitol en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Manitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	0	0	0	71	86	28	10	62	43	15	42
10	0	0	0	0	100	28	0	0	100	0	0	100
20	53	0	0	0	57	86	0	0	100	0	0	100
30	15	0	0	0	57	86	0	0	100	0	0	100

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

A las 16 semanas de haber permanecido las yemas axilares en las diferentes variantes de medios de cultivos sujetas a estudio, fue evidente el mayor deterioro morfológico y fisiológico de las plántulas en los tratamientos con manitol en las variables altura y número de hojas que experimentaron los menores incrementos mensuales, también se observó que a mayor concentración 20 g/l de manitol aumentó el amarillento en tallos y hojas. La sobrevivencia a 24 °C disminuyó en los tratamientos testigo y a 30 g/l hasta el 71 y 57%. A temperatura de 16 °C el tratamiento testigo disminuyó a 86% en relación a la evaluación anterior

Hubo incremento en la formación de plántulas atípicas únicamente a temperatura 24 °C en los tratamientos testigo, 20 y 30 g/l de manitol hasta 15, 53 y 15%, respectivamente. Henshaw (1982), reporta que una concentración 0.2 mol de manitol causaron limitaciones en el crecimiento de *solanum spp.* sin formación de plántulas anormales. Starinsky *et al.* (1985), observaron que la combinación de 4% de manitol con 0.5 y 3% de sacarosa y temperatura de 25 °C se provocó estrés osmótico en *solanum spp.* y se redujo el crecimiento de las plántulas. Para Roca *et al.* (1979), la disminución del crecimiento de las plántulas es debido a que al aumentar el potencial osmótico se reduce la absorción de agua y nutrientes por parte del explante, efectos similares son reportados por Jarret & Gawel (1991), con el empleo de sorbitol y manitol a concentraciones de 18.2 g/l después de 90 días en camote. Roca (1984), con adiciones de manitol entre 5 y 25 g/l encontró que es efectivo para limitar el crecimiento en yuca, pero disminuye la viabilidad de los tejidos a bajas temperaturas entre 10 °C y 18 °C. Westcott (1981), determinó que niveles mayores de 40 g/l de manitol causan efectos tóxicos en los explantes de papa suprimiendo el crecimiento de los tejidos.

## **3.2 Efecto del sorbitol sobre altura de plántulas, número y color de las hojas a temperaturas de 24 °C y 16 °C**

### **3.2.1 Evaluación a las cuatro semanas de conservación**

A las cuatro semanas de inoculadas las yemas axilares a temperatura de 24 °C el tratamiento testigo presentó mayor promedio en la variable altura de la plántula, con 1.6 cm, superando los tratamientos a los cuales se les adicionó sorbitol, registrándose valores de 1.34, 0.98 y 1.4 cm para 10, 20 y 30 g/l de sorbitol respectivamente. Análogamente, a temperatura de 16 °C presentó mayor promedio el tratamiento testigo con 1.1 cm, superando a los tratamientos a los que se les adicionó con sorbitol, que registraron valores de 1.03, 1.07 y 0.93 cm correspondientes a 10, 20 y 30 g/l de sorbitol.

El número de hojas a temperatura de 24 °C resultó como sigue: 2.15, 1.91, 1.44 y 2.08 respectivamente para los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol. A temperatura de 16 °C el número de hojas producidas en los tratamientos con 20 g/l de sorbitol y el testigo fue de 2.34 y 1.87 superando a las producidas en 10 y 30 g/l de sorbitol, que presentaron valores de 1.58 y 1.57 respectivamente.



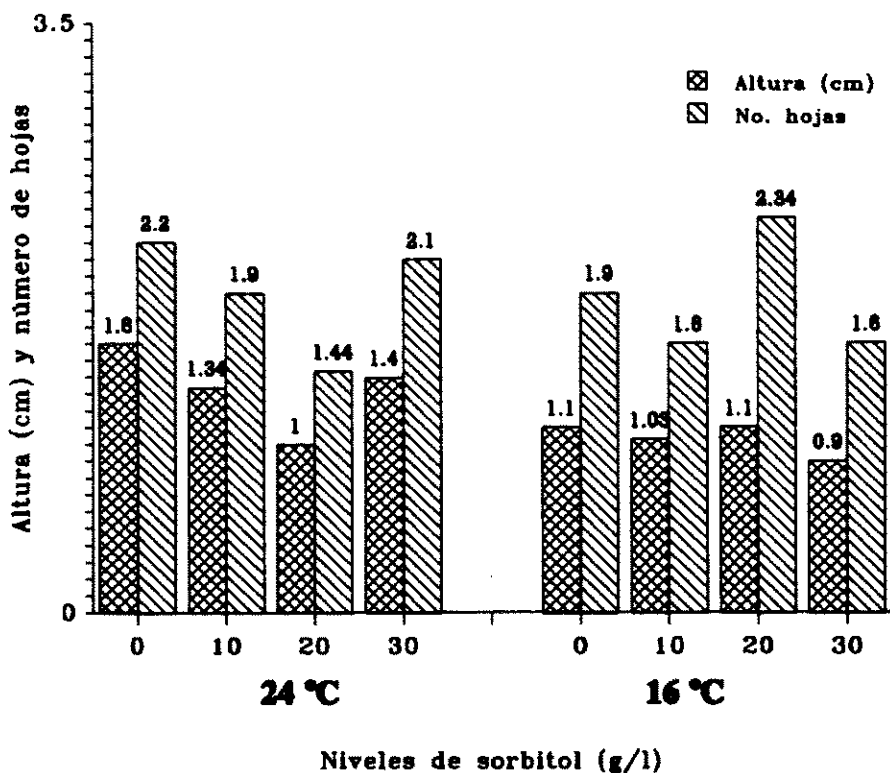


Figura 5 - Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

A temperatura de 24 °C la coloración verde oscuro se observó en porcentajes de 100, 100, 28 y 57% correspondiente a los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol. Con respecto al color verde claro los porcentajes fueron de 28 y 43% en los tratamientos a 20 y 30 g/l de sorbitol, mientras que no se registró esta coloración en los tratamientos testigo y con 10 g/l de sorbitol. El color verde clorótico únicamente se observó en un 44%, en el tratamiento a 20 g/l de sorbitol. La sobrevivencia fue de un 86% en el tratamiento suplementado con 10 g/l de sorbitol, y el 100% en todos los demás tratamientos.

A temperatura de 16 °C la coloración verde oscuro registró porcentajes de 85, 100 y 42%, en los tratamientos a 10, 20 y 30 g/l de sorbitol mientras que el tratamiento testigo no presentó esta coloración. El color verde claro se presentó en porcentajes de 42, 15 y 28% en los tratamientos testigo, 10 y 30 g/l de sorbitol respectivamente, mientras que en el tratamiento a 20 g/l no se observó esta coloración. El color verde clorótico únicamente se presentó en los tratamientos testigo y a 30 g/l de sorbitol con 58 y 30% respectivamente. La sobrevivencia de los tejidos fue del 100% en todos los tratamientos.

Se observó el crecimiento de plantas atípicas a temperatura de 24 °C únicamente en el tratamiento con 10 g/l de sorbitol en un 15%; a temperatura de 16 °C se observó en un 15% para el tratamiento testigo.

Tabla 7 - Efecto del sorbitol en la formación de plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sorbitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	0	15	0	0	100	100	100	0	0	0	42	58
10	15	0	0	0	86	100	100	0	0	85	15	0
20	0	0	0	0	100	100	28	28	44	100	0	0
30	0	0	0	0	100	100	57	43	0	42	28	30

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

### 3.2.2 Evaluación a las ocho semanas de conservación.

A las ocho semanas de establecidos las plántulas, con temperatura de 24 °C, el incremento mensual en la altura de las plántulas fue de 0.49, 0.1, 0.21 y 0.53 cm respectivamente en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol. A temperatura de 16 °C el incremento mensual en la altura de las plántulas fue de 0.045, 0.30, 0.22 y 0.03 cm correspondiente a los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol.

Con respecto a la variable número de hojas, el incremento mensual a temperatura de 24 °C fue superior en los tratamientos testigo, 20 y 30 g/l de sorbitol, con valores de 3.15, 2.15 y 3.5 respectivamente, que en el tratamiento a 10 g/l en el cual se registró un incremento de 1.57. A temperatura de 16 °C el incremento mensual fue inferior en los tratamientos con sorbitol, que presentaron valores de 1.5, 1.71 y 1.3 para 10, 20 y 30 g/l de sorbitol respectivamente, mientras que el tratamiento testigo presentó un aumento considerable con un valor de 3.07.

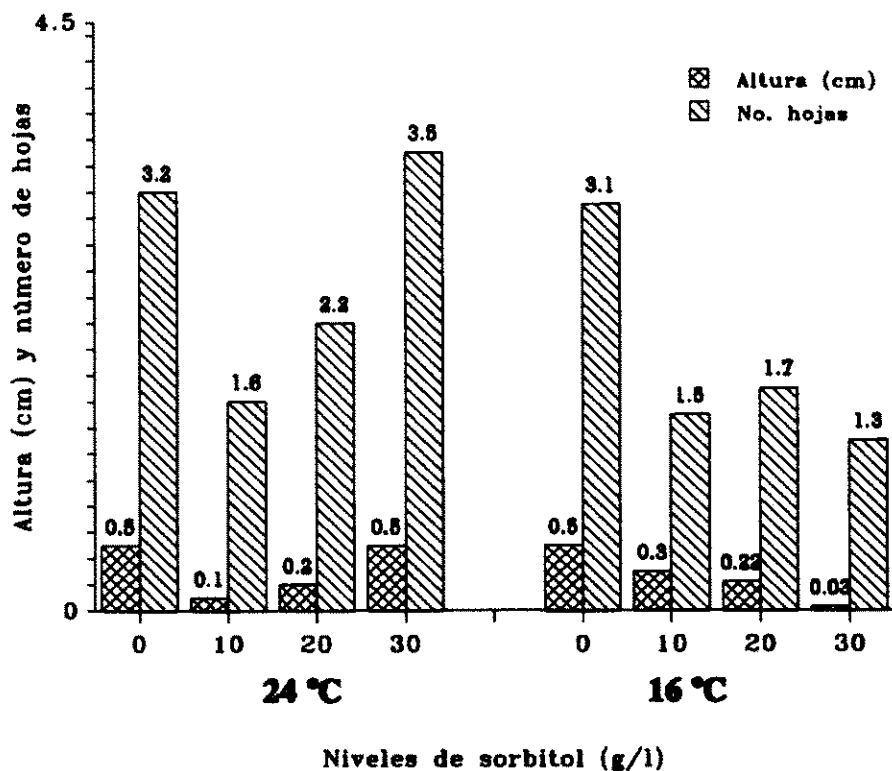


Figura 6 - Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

A temperatura de 24 °C la coloración verde oscura disminuyó con respecto a la evaluación anterior en los tratamientos testigo y 10 g/l bajando hasta 85 y 15% respectivamente. En los tratamientos con 20 y 30 g/l de sorbitol presentaron por lo contrario valores análogos a la evaluación anterior. La coloración verde clara aumentó hasta 10% en el tratamiento testigo y hasta 43%, en 10 g/l de sorbitol y disminuyó en los tratamientos a 20 y 30 g/l de sorbitol en 15 y 28%, respectivamente. La coloración verde clorótica presentó un incremento de 5, 42, 57 y 15% correspondiente a los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol.

La sobrevivencia fue de 57 % para el tratamiento a 10 g/l y del 100% en los tratamientos testigo, 20 y 30 g/l de sorbitol.

A temperatura de 16 °C la coloración verde oscura, únicamente se incrementó hasta 57 y 28% en 30 g/l de sorbitol y el testigo. La coloración verde claro aumentó hasta 57 y 43% en los tratamientos con 10 y 30 g/l de sorbitol respectivamente, conservándose iguales los demás tratamientos. La coloración verde clorótica se registró en el 30% del tratamiento testigo, y 15% del tratamiento a 10 g/l de sorbitol; en los tratamientos a 20 y 30 g/l no se registró esta coloración. Aunque el porcentaje de sobrevivencia fue el 100% en todas las variantes de medio de cultivo, se observó la formación de puntos blanquecinos (vitrificación) con aspecto algodonoso en el envés, pecíolo y tallos de las plántulas en porcentaje de 15% en el tratamiento a 20 g/l de sorbitol. Vieth *et al.*,(1982) atribuyen que en la mayoría de los casos de vitrificación se debe al alto contenido de nitrato de amonio que posee el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).

A temperatura 24 °C el porcentaje de plántulas atípicas aumentó con respecto a la evaluación anterior en el tratamiento testigo (hasta15%) y no varió en el tratamiento con 10 g/l de sorbitol. En los demás tratamientos no se observaron plántulas atípicas. A temperatura de 16 °C se observó formación del 15% de plántulas atípicas únicamente en el tratamiento testigo.

Tabla 8 - Efecto del sorbitol en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificaciones y sobrevivencias a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sorbitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	15	0	0	100	100	85	10	5	28	42	30
10	15	0	0	0	57	100	15	43	42	28	57	15
20	0	0	0	15	100	100	28	15	57	100	0	0
30	0	0	0	0	100	100	57	28	15	57	43	0

A: Color verde oscuro B: Color verde claro C: Color verde clorótico

### 3.2.3 Evaluación a las doce semanas de conservación.

A las doce semanas a temperatura de 24 °C del establecimiento se observó que en la variable altura de la plántula se presentaron valores aproximados entre sí, el mayor incremento de la altura fue por efecto de los tratamientos con 20 y 30 g/l de sorbitol con valores respectivos de 0.54 y 0.40 cm, resultados inferiores a éstos, se presentaron en el tratamiento testigo y en 10 g/l de sorbitol con incrementos respectivos de 0.23 y 0.13 cm. A temperatura de 16 °C se observó que la variable altura de la plántula presentó un incremento inferior en los tratamientos testigo 10 y 20 g/l de sorbitol con valores de 0.023, 0.173 y 0.113 cm respectivamente, únicamente en el tratamiento con 30 g/l se presentó un incremento superior de 0.09 cm en relación a la evaluación anterior. Agentes osmóticos no metabolizables como el manitol y sorbitol posiblemente sean más

efectivos que la sacarosa en las limitaciones de crecimiento de los cultivos (Roca *et al.*, 1992). Mora (1987), señala que altas tasas metabólicas no se pueden mantener indefinidamente y eventualmente los procesos disminuyen, lo cual conduce a una detención del crecimiento.

El número de hojas a temperatura de 24 °C el incremento mensual fue superior en el tratamiento testigo con 3.5 hojas , mientras que en los tratamientos a los que se les adicionaron 10 y 20 g/l de sorbitol fueron de 1.62 y 2.48 respectivamente; el tratamiento con 30 g/l fue inferior el incremento con 2.81 comparado con la evaluación a las ocho semanas.

A temperatura de 16 °C el incremento en el número de hojas fue mayor en el tratamiento testigo con 1.77 observándose en los demás tratamientos un ligero incremento con valores de 1.66, 1.71 y 1.66 cuando se adicionaron 10, 20 y 30 g/l de sorbitol respectivamente.

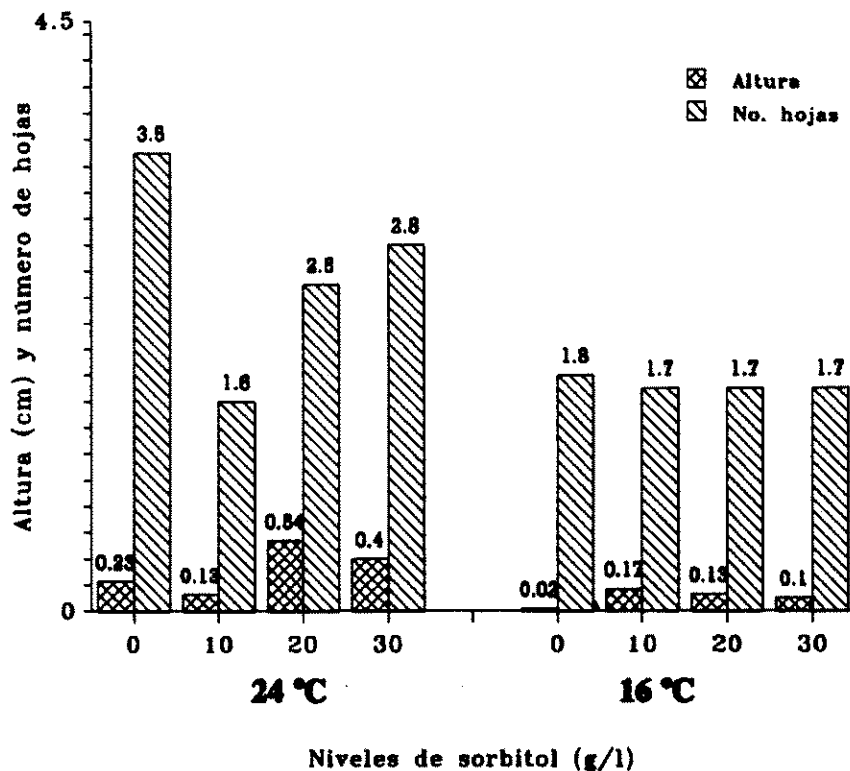


Figura 7 - Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

A temperatura de 24 °C el color verde oscuro de las hojas presentó un decremento en el tratamiento testigo con 57% en relación a las ocho semanas de evaluación, mientras que se conservó igual coloración los tratamientos con 10, 20 y 30 g/l de sorbitol. El color verde claro decreció en los tratamientos 10 y 30 g/l con 28 y 15% respectivamente. No se observó alteración en los tratamientos testigo y 20 g/l de sorbitol. El color verde clorótico se incrementó en porcentajes de 33, 57, 57 y 28% correspondiente a los tratamientos testigo 10, 20 y 30 g/l de sorbitol.



Los porcentajes de sobrevivencia de las plantas se conservaron igual en relación a las ocho semanas de evaluación y no se manifestó vitrificación.

A temperatura de 16 °C en las hojas el color verde oscuro aumentó en el tratamiento testigo hasta el 43%, mientras que en 30 g/l de sorbitol se redujo a 43%, en los tratamientos con 10 y 20 g/l no variaron los porcentajes. El color verde claro disminuyó en 15% en el tratamiento testigo, en cambio el tratamiento con 30 g/l aumentó en un 57%, no se registraron variaciones en los tratamientos con 10 y 20 g/l de sorbitol. El color verde clorótico se manifestó con mayor frecuencia en el tratamiento testigo con el 42%, no hubo variación en los tratamientos a los que se les adicionaron 10, 20 y 30 g/l de sorbitol. Aunque los porcentajes de sobrevivencia de las plantas alcanzó el 100%, fue notorio el incremento de vitrificación tanto en el haz como el envés de las hojas en porcentajes de 10 y 15% correspondientes en los tratamientos testigo y 20 g/l de sorbitol.

Tabla 9 - Efecto del sorbitol en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas vitrificación y sobrevivencia a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sorbitol (g/l)	Plánt. Atípicas		Vitrificación		Sobrevivencia		Color de las Hojas					
	(%)		(%)		(%)		(%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	15	0	10	100	100	57	10	33	43	15	42
10	28	0	0	0	57	100	15	28	57	28	57	15
20	0	0	0	15	100	100	28	15	57	100	0	0
30	0	0	0	0	100	100	57	15	28	43	57	0

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

#### 3.2.4 Evaluación a las dieciséis semanas de conservación.

A temperatura de 24 °C el incremento mensual de la altura de la plántula decreció en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol en 0.22, 0.06, 0.027 y 0.27 cm respectivamente.

A temperatura de 16 °C el incremento mensual de la altura de la plántula fue inferior en los tratamientos a 10 y 30 g/l de sorbitol con valores para ambos de 0.01 y 0.04 cm; en el tratamiento con 20 g/l de sorbitol no hubo incremento, pero el tratamiento testigo experimentó aumento en 0.08 cm.

El número de hojas a temperatura de 24 °C presentó incrementos inferiores en relación a la evaluación a las doce semanas reportándose valores de 2, 1.42, 1.82 y 2.28, correspondientes a los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol.

A temperatura de 16 °C el número de hojas se incrementó en 0.93, 1.35 1.32 y 1.32 en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l de sorbitol respectivamente.

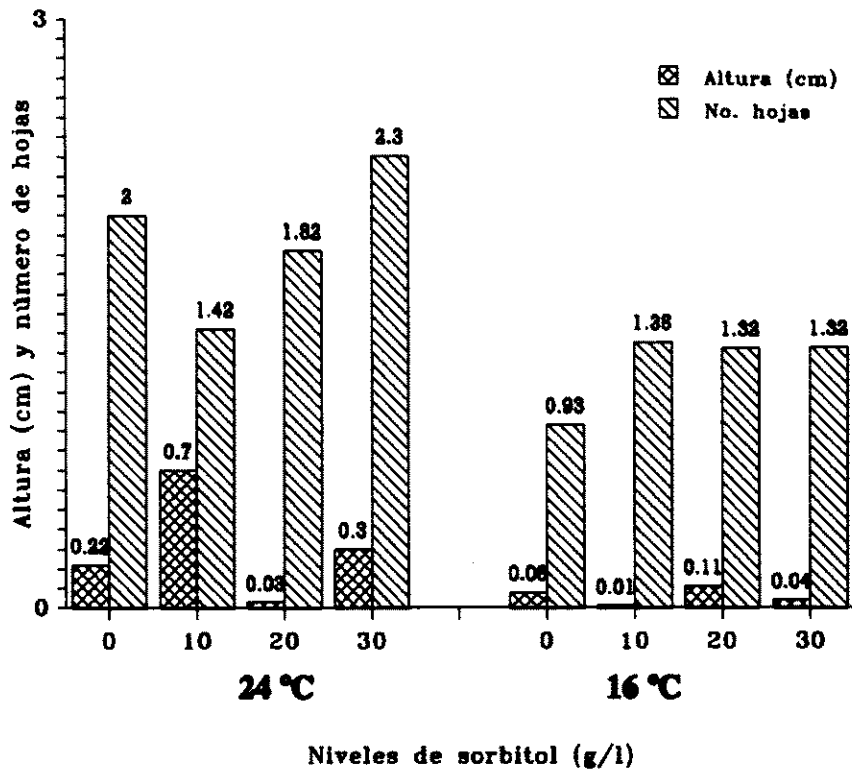


Figura 8 - Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

El color verde oscuro a temperatura de 24 °C disminuyó en el número de plántulas que los manifestaron en los tratamientos testigo, 20 y 30 g/l de sorbitol en 28, 15 y 43%, únicamente en el tratamiento suplementado con 10 g/l no se presentó variación en esta coloración. El color verde claro disminuyó únicamente en el tratamiento con 10 g/l hasta el 15%, permaneciendo igual en los tratamientos testigo, 20 y 30 g/l. El color verde clorótico aumentó hasta el 62, 70, 70 y 42% correspondientes a los tratamientos testigo a 10, 20 y 30 g/l de sorbitol.

A temperatura 16 °C el color verde oscuro de las hojas disminuyó en los tratamientos a 20 y 30 g/l de sorbitol en 72 y 15%; en los tratamientos testigo y con 10 g/l de sorbitol no se presentó variación. El color verde claro se aumentó en los tratamientos suplementados con 20 y 30 g/l en 28 y 85% respectivamente; en el tratamiento testigo y con 10 g/l de sorbitol no hubo alteración en su porcentaje el color verde clorótico no presentó variación en los tratamientos testigo, 10, 20 y 30 g/l conservando su coloración en comparación con la evaluación a las doce semanas.

Tabla 10 - Efecto del sorbitol en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas vitrificación y sobrevivencia a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sorbitol (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	0	0	10	71	86	28	10	62	43	15	42
10	28	0	0	0	43	100	15	15	70	28	57	15
20	0	0	0	28	42	100	15	15	70	72	28	0
30	0	0	15	0	15	100	43	15	42	15	85	0

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

A las 16 semanas de haber permanecido las yemas axilares en las diferentes variantes de medios de cultivo sujetas a estudio fue evidente el mayor deterioro fisiológico y morfológico de las plántulas en los tratamientos con 10, 20 y 30 g/l

de sorbitol, en las variables altura, número de hojas y color de las hojas las que experimentaron menores incrementos mensuales.

La sobrevivencia a temperatura de 24 °C disminuyó notablemente en todos los tratamientos en comparación a las doce semanas; mientras que la vitrificación se incrementó en un 15% en el tratamiento con 30 g/l y a temperatura de 16 °C la sobrevivencia disminuyó hasta el 86% en el tratamiento testigo y la vitrificación se incrementó en un 28% en el tratamiento a 20 g/l en relación a la evaluación a las doce semanas.

A temperaturas de 24 °C y 16 °C no se registraron incrementos en la formación de plántulas atípicas.

### **3.3 Efecto de la dilución de las sales Murashige & Skoog en el crecimiento *in vitro* de piña, variedad Cayena lisa a temperaturas de 24 °C y 16 °C.**

La nutrición del cultivo *in vitro* plantea problemas particulares, su débil actividad clorofílica necesita aporte bajo en carbono, forma orgánica (sacarosa, glucosa, etc.). Privados además en gran parte de los mecanismos reguladores que se presentan en la planta entera, los tejidos aislados cultivados *in vitro* son especialmente sensibles a la acción de los iones minerales (Márgara, 1988). La relación entre las concentraciones de carbohidratos y los componentes del medio nutritivo pueden tener efecto sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos *in vitro* (Staritsky, 1980). El balance de nitrógeno y carbono en el

medio de cultivo tiende a favorecer el crecimiento de tallos y raíces, lo cual depende de que sea alto o bajo respectivamente. Con poca cantidad o la eliminación de ciertos nutrimentos orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo se puede reducir el crecimiento de los cultivos (Roca *et al.*, 1992).

### 3.3.1 Evaluación a las cuatro semanas de conservación

A las cuatro semanas de conservados los tejidos a temperatura de 24 °C se observó que en la dilución al 75% de las sales MS, se produjo mayor efecto en la reducción de la tasa de crecimiento, reportándose un promedio de 1.30 cm; con 25 y 50% de las sales y en el tratamiento testigo, la altura fue notablemente superior con promedios respectivos de 1.75, 1.57 y 1.6 cm.

De igual forma ocurrió en los tejidos a temperatura 16 °C donde se observó que en la dilución al 75% de las sales MS se produjo mayor efecto en la reducción de la tasa de crecimiento con promedio de 0.96 cm y en los tratamientos al 25, 50% de las sales y en el tratamiento testigo la altura fue superior con promedios respectivos de 1.14, 1.13 y 1.1 cm.

El número de hojas a temperatura de 24 °C fue mayor en el tratamiento a 50% de las sales con incremento de 2.28, y en los tratamientos al 25 y 75% de las sales y el testigo se obtuvo un promedio de 2.15 para cada uno de ellos; a temperatura de 16 °C el incremento del número de hojas fue mayor en el tratamiento testigo con un incremento de 2.34, en el tratamiento al 75% de las sales 2.19, al 25% 1.83 y al 50% 1.03.

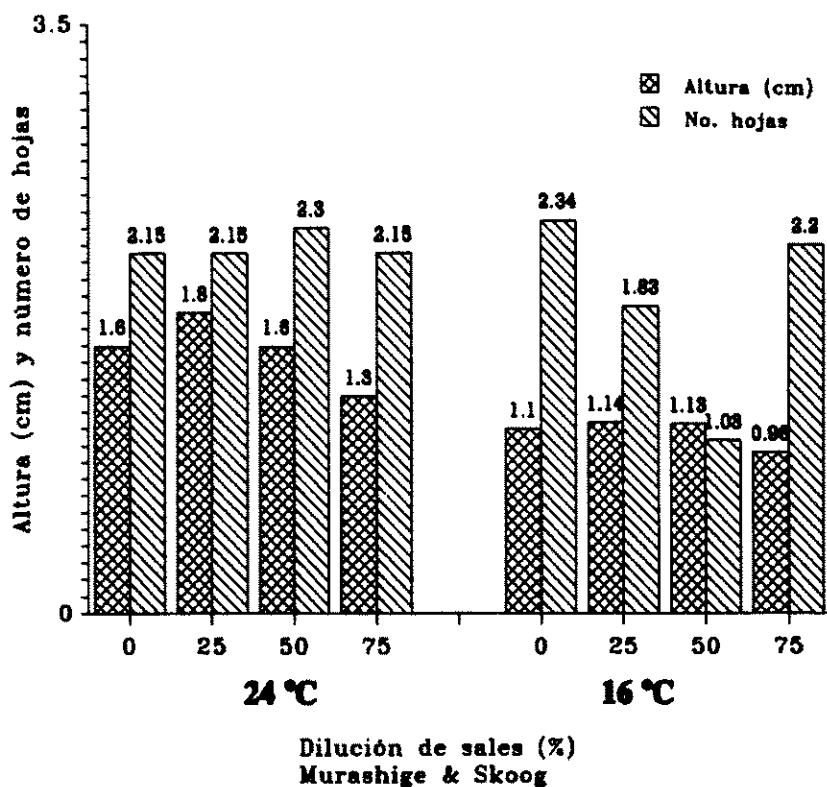


Figura 9 - Efecto de diferentes diluciones de las sales Murashige & Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

La coloración de las hojas a temperatura de 24 °C se observó que el color verde oscuro se manifestó en el 100% en los tratamientos testigo, 50 y 75% de las sales; en el tratamiento al 25% de las sales fue de un 85%. El color verde claro se observó en un 15% para el tratamiento a 25% de las sales en los tratamientos testigo, 50 y 75% no evidenció esta coloración. El color verde clorótico no se registró en ninguno de los tratamientos.

A temperatura de 16 °C la coloración verde oscura se registró en los tratamientos a 25, 50 y 75% de las sales con promedios de 43, 85 y 15% respectivamente, en el tratamiento testigo no se observó esta coloración. El color verde claro se presentó en porcentajes de 42, 28, 15, y 41% correspondientes a los tratamientos testigo, 25, 50, y 75% de las sales. El color verde clorótico en el tratamiento al 50% de las sales no se observó; pero en los tratamientos testigo, 25, y 75% de las sales se registraron en un 58, 29, y 44% de las plántulas respectivamente.

En todos los tratamientos a temperatura de 24 °C y 16 °C la sobrevivencia de los tejidos fue del 100%. También se pudo notar la presencia plántulas atípicas únicamente a temperatura de 24 °C en el tratamiento al 75% de las sales.

Tabla 11 - Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las cuatro semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sales MS (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	42	58
25	0	0	0	0	100	100	85	15	0	43	28	29
50	0	0	0	0	100	100	100	0	0	85	15	0
75	15	0	0	0	100	100	100	0	0	15	41	44

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico



### 3.3.2 Evaluación a las ocho semanas de conservación.

A las ocho semanas a temperatura 24 °C en la variable altura de la plántula se registró promedios de incremento mensual de 0.15, 0.55, 0.64 y 0.49 cm correspondientes a los tratamientos al 25, 50 y 75% de las sales y en el testigo, estos resultados reflejan una reducción en el ritmo de crecimiento respecto a los registrados a las cuatro semanas de conservadas las plántulas.

A las ocho semanas a temperatura de 16 °C comparando la variable altura de plántula con los resultados obtenidos a las cuatro semanas de conservadas; observemos reducción en el ritmo de crecimiento registrándose promedios de incremento mensual de 0.015, 0.095, 0.55 y 0.045 cm en los tratamientos con diluciones de 25, 50, 75% de las sales y el testigo respectivamente.

El incremento mensual en el número de hojas a temperatura 24 °C fue de 2.81, 3.5, 4.14 y 3.15 correspondiente a los tratamientos al 25, 50, 75% de las sales y el testigo. A temperatura de 16 °C el incremento mensual en el número de hojas fue de 1.28, 0.35, 2.64 y 3.07 correspondientes a los tratamientos a 25, 50, 75% de la dilución de las sales y el testigo.

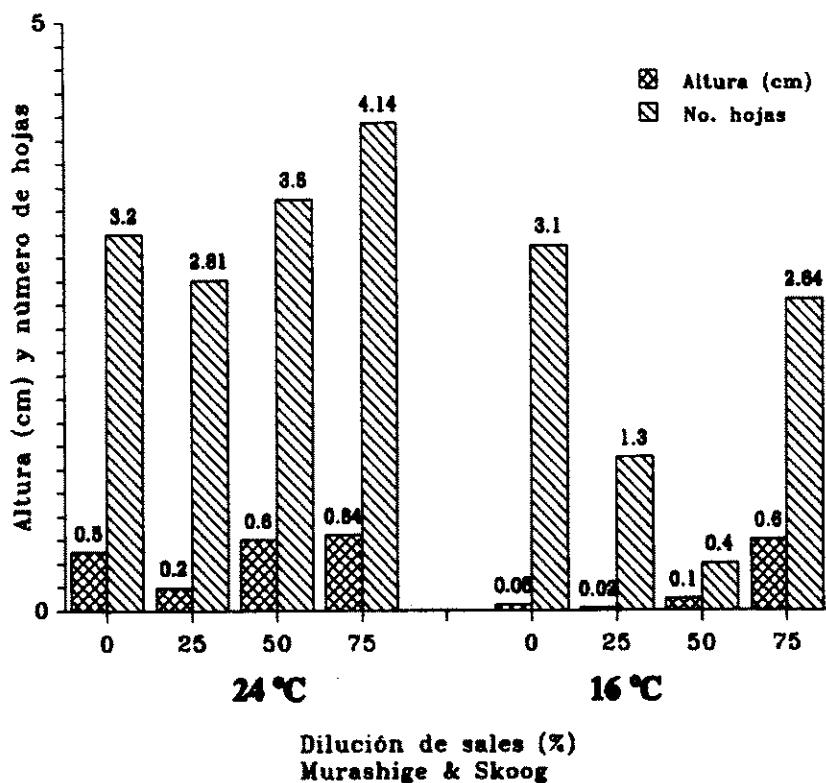


Figura 10 - Efecto de diferentes diluciones de las sales Murashige & Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

El porcentaje de plántulas que presentaron color verde oscuro a temperatura de 24 °C disminuyó ligeramente en los tratamientos al 25, 50% de las sales y el testigo con porcentajes de 85, 90 y 85%. El color verde claro en el tratamiento al 75% de las sales no se observó esta coloración y en los tratamientos al 50% de las sales y el testigo aumentaron el 10% en relación a la evaluación anterior, permaneciendo igual el tratamiento al 25% de las sales con 15%. El color verde clorótico presentó un ligero aumento en el tratamiento testigo con un porcentaje

de un 5%, registrándose igual porcentajes en los tratamientos con 25, 50 y 75% de las sales referente a la evaluación anterior.

A temperatura de 16 °C el color verde oscuro en el tratamiento al 75% de las sales conservó su porcentaje al 15%, y aumentó el 28% en el tratamiento testigo, disminuyendo en los tratamientos al 25 y 50% de las sales en porcentajes de 28 y 75% respectivamente. El color verde claro en el tratamiento al 25% de las sales aumentó a un 42% pero en los tratamientos al 50 y 75% de las sales y el testigo se conservaron los porcentajes de 15, 41 y 43% respectivamente en relación a la evaluación a las cuatro semanas. El color verde clorótico presentó en los tratamientos de 25, 50 y 75% de las sales y el testigo porcentajes respectivos de 30, 10, 44 y 29%.

Tabla 12 - Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las ocho semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sales MS (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	0	0	0	0	100	100	85	10	5	28	43	29
25	0	0	0	15	100	100	85	15	0	28	42	30
50	0	0	0	10	100	100	90	10	0	75	15	10
75	0	0	0	0	100	100	100	0	0	15	41	44

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

### 3.3.3 Evaluación a las doce semanas de conservación

La altura de las plántulas a las doce semanas a temperatura de 24 °C, en el tratamiento al 75% de la dilución de sales presentó un incremento de 0.33 cm y en los tratamientos al 25, 50% de las sales y el testigo el incremento fue inferior con respecto al tratamiento antes mencionado presentándose con valores de 0.17, 0.14 y 0.23 cm.

A temperatura de 16 °C en los tratamientos a 25, 50, 75% de la dilución de las sales y el testigo presentaron incrementos mensuales en altura de 0.056, 0.016, 0.03 y 0.023 cm respectivamente.

El número de hojas a temperatura de 24 °C, el incremento mensual fue inferior en todos los tratamientos en relación a las ocho semanas de evaluación con valores de 2.29, 3.33, 3.62 y 3.05 correspondiente a los tratamientos al 25, 50, 75% de las sales y el testigo respectivamente.

El número de hojas a temperatura de 16 °C el incremento mensual fue superior en los tratamientos al 25 y 50% de las sales con 2.44 y 0.51 respectivamente, disminuyendo el incremento en los tratamientos al 75% de las sales y el testigo de 1.29 y 1.77 respectivamente.

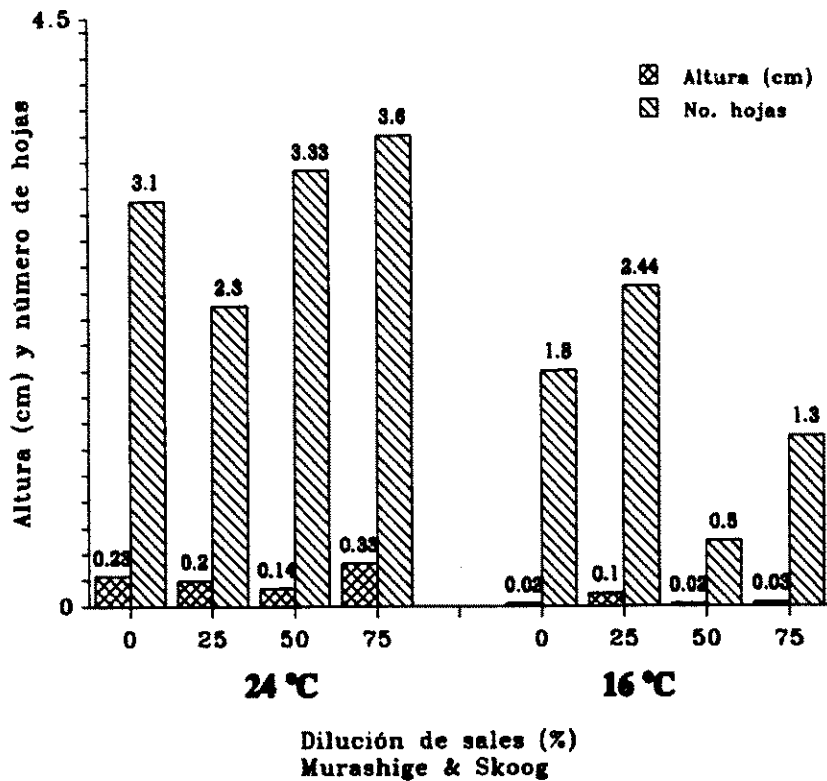


Figura 11 - Efecto de diferentes diluciones de las sales Murashige & Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.

A temperatura de 24 °C el porcentaje de plántulas que presentaron color verde oscuro en los tratamientos al 25 y 50% de las sales no varió en relación a las ocho semanas de evaluación, pero en los tratamientos al 75% de las sales y el testigo disminuyeron los porcentajes hasta el 70 y 57% respectivamente. El color verde claro aumentó en el tratamiento al 75% de las sales en un 15%, en los tratamientos al 25 y 50% de las sales y el testigo conservaron sus porcentajes en relación a la evaluación anterior. El tratamiento al 75% de las sales y el testigo aumentaron los porcentajes de plántulas que presentaron el color verde clorótico

en 15 y 33%; en los tratamientos al 25 y 50% de las sales no se observaron variaciones en los resultados. El comportamiento de las plántulas en los diferentes tratamientos no sufrieron alteración en cuanto a la sobrevivencia respecto a la evaluación a las ocho semanas. La presencia de vitrificación se observó en un 5% en el tratamiento testigo.

El color verde oscuro a temperatura de 16 °C aumentó en los tratamientos a 75% de las sales y el testigo en un 43% y en los tratamientos al 25 y 50% de las sales se presentó una disminución en esta coloración de 15 y 28% respectivamente. El color verde claro de las hojas en los tratamientos a 25% de las sales y el testigo disminuyeron los porcentajes en relación a la evaluación anterior en 28 y 15%; en el tratamiento al 50% de las sales no se registró esta coloración, únicamente en el tratamiento al 75% de la dilución de las sales aumentó el porcentaje de plántulas a 42%. En el tratamiento al 75% de la dilución de las sales disminuyó el porcentaje de plántulas que presentaron el color verde clorótico en un 15%, pero se incrementó en 57, 72 y 42% correspondientes a los tratamientos al 25, 50% de la dilución de las sales y el testigo respectivamente. La sobrevivencia de las plántulas en el tratamiento al 50% de las sales disminuyó en un 86%, en los tratamientos al 25, 75%, y el testigo no sufrieron alteraciones con respecto a la evaluación a las ocho semanas. La vitrificación se presentó en las plántulas en porcentajes de 10 y 15% correspondientes a los tratamientos al 75% de la dilución de las sales y el testigo.

Tabla 13 - Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las doce semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C.

Sales MS (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	0	5	10	100	100	57	10	33	43	15	42
25	0	0	0	0	100	100	85	15	0	15	28	57
50	0	0	0	0	100	86	90	10	0	28	0	72
75	15	0	0	15	100	100	70	15	15	43	42	15

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

### 3.3.4 Evaluación a las dieciséis semanas de conservación

A las 16 semanas a temperatura de 24 °C las plántulas experimentaron niveles más bajos de incremento en la variable altura de la plántula en los tratamientos al 25 y 50% de la dilución de las sales, con valores respectivos de 0.11 y 0.08 cm; en el tratamiento testigo el incremento registrado fue casi igual al observado a las doce semanas con 0.22 cm y en el tratamiento al 75% su incremento fue menor con un valor de 0.13 cm. A temperatura 16 °C el incremento de la variable altura de la plántula en los tratamientos al 25, 50% y el testigo fue mayor con respecto a las doce semanas con un incremento respectivo de 0.06, 0.075 y 0.08 cm y en el tratamiento con 75% de dilución de las sales disminuyó con un valor de 0.005 cm.

A temperatura de 24 °C el número de hojas en los tratamientos fue inferior al registrado a las doce semanas, en los tratamientos testigo, 25, 50 y 75% de las sales les correspondieron incrementos de 2, 2.11, 2.53 y 3.03. A temperatura de 16 °C el incremento mensual en el número de hojas de los tratamientos fue inferior al registrado a las doce semanas, con 0.93, 1.03 y 1.03 correspondiente a los tratamientos testigo, 25 y 75% de la dilución de las sales; en el tratamiento al 50% de las sales el incremento fue ligeramente superior en comparación con la evaluación a las doce semanas con un valor de 0.6.

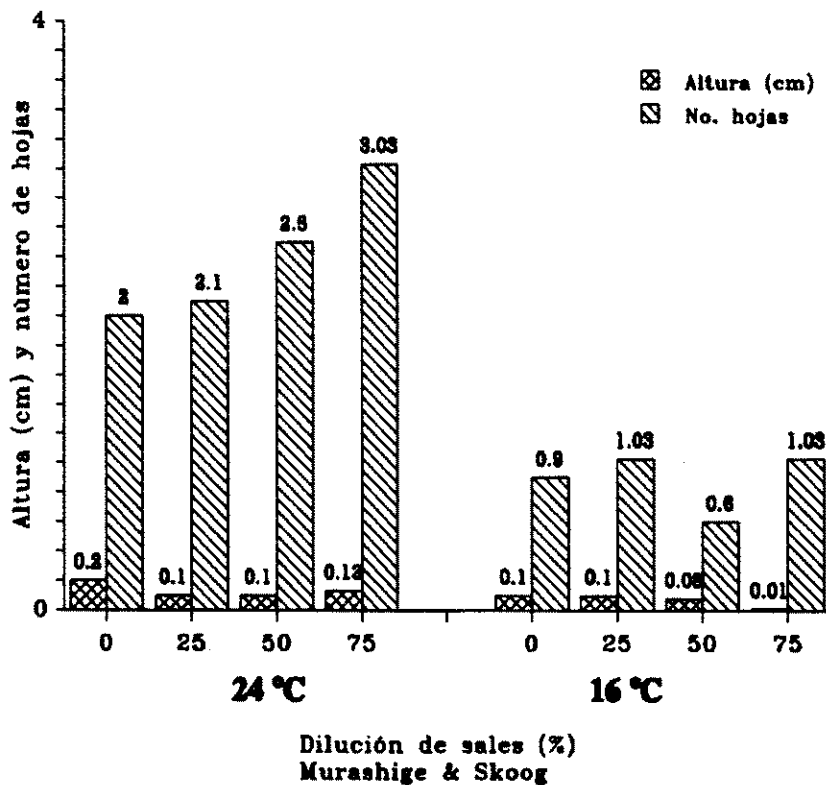


Figura 12 - Efecto de diferentes diluciones de las sales Murashige & Skoog en el incremento mensual de altura (cm) y el número de hojas a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas de 24 °C y 16 °C en la variedad Cayena lisa.



A temperatura de 24 °C el color verde oscuro de las hojas disminuyó hasta el 28 y 71% en los tratamientos testigo y al 50% de las sales respectivamente. Mientras en los tratamientos al 25 y 75% de la dilución de las sales les correspondieron porcentajes de 85 y un 70%. El porcentaje de plántulas que manifestaron el color verde claro, disminuyó hasta el 1% en el tratamiento al 75% de la dilución de las sales, pero se conservó el porcentaje de 10, 15 y 10% en los tratamientos testigo, 25 y 50% de la dilución de las sales respectivamente. El color verde clorótico sufrió un aumento en los tratamientos al 50, 75% de la dilución de las sales y el testigo con porcentajes respectivos de 19, 29 y 62%, en el tratamiento al 25% de la dilución de las sales no se registró coloración.

En el tratamiento testigo la sobrevivencia de las plántulas fue del 71% y en los tratamientos al 25, 50 y 75% de las sales fue del 100%.

A temperatura de 16 °C el color verde oscuro de las hojas se manifestó en los tratamientos testigo y al 50% de la dilución de las sales, igual porcentaje en relación a las doce semanas de evaluación; en el tratamiento al 75% de la dilución de las sales no se registró esta coloración, únicamente el tratamiento al 25% de la dilución de las sales presentó un aumento en 28%. El porcentaje de plántulas que manifestaron el color verde claro fue de 15% para el tratamiento testigo, en los demás tratamientos no se observó este color. El color verde clorótico experimentó un aumento en todos los tratamientos en porcentajes de 72, 72, 100 y 42% correspondientes a los tratamientos al 25, 50, 75% de la dilución de las sales y el testigo; la sobrevivencia de las plántulas se incrementó en todos los tratamientos en comparación a la evaluación a las doce semanas en

porcentajes de 86, 71, 43 y 86% correspondientes a los tratamientos testigo, 25, 50 y 75%. La presencia de vitrificación no se evidenció en los tratamientos.

Tabla 14 - Efecto de las diferentes diluciones de las sales MS en la formación de plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las dieciséis semanas de conservación a temperaturas 24 °C y 16 °C.

Sales MS (g/l)	Plánt. Atípicas (%)		Vitrificación (%)		Sobrevivencia (%)		Color de las Hojas (%)					
	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C	16 °C	24 °C			16 °C		
							A	B	C	A	B	C
0	15	0	0	0	71	86	28	10	62	43	15	42
25	0	0	0	0	100	71	85	15	0	28	0	72
50	0	0	0	0	100	43	71	10	19	28	0	72
75	0	15	0	0	100	86	70	1	29	0	0	100

A: Color verde oscuro    B: Color verde claro    C: Color verde clorótico

A las 16 semanas de haber permanecido sujetas a estudio, las plántulas presentaron menor deterioro morfológico y fisiológico comparado con los medios de cultivo que se les adicionó manitol y sorbitol en ambos medios se observó una mayor sobrevivencia a temperatura de 24 °C, además fue evidente un mayor daño en las hojas presentando color verde clorótico a temperatura de 16 °C. También se observó en el manitol y sorbitol la formación de plántulas atípicas a 24 °C, y en menor incremento en la dilución de las sales a temperatura de 16 °C. La vitrificación se observó únicamente en el sorbitol.

#### IV. CONCLUSIONES

- El método del cultivo de tejidos puede ser utilizado para la reproducción y conservación de plántulas de piña.
- Las plántulas, en condiciones adecuadas de medio de cultivo y de temperatura, conservan sus características genéticas.
- El uso de inhibidores de crecimiento no parece favorecer el proceso de conservación *in vitro* de plántulas de piña.
- Un medio de cultivo constituido esencialmente por sales MS en concentración del 50% y una temperatura de conservación de 24 °C, han proporcionado resultados satisfactorios, que abren la posibilidad de una aplicación práctica del método al sector agro-industrial.

## **V. RECOMENDACIONES**

- Efectuar experimentos con períodos de conservación mayores a las dieciséis semanas, para estudiar el límite temporal de aplicación del método, ya que esto es muy importante a los fines de su aplicación práctica.
- Investigar la estabilidad genética y los posibles problemas en la sucesiva fase de transplante en el campo.
- Repetir el experimento con diferentes variedades de piña.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Allan, J. J. 1979. Tissue culture storage of sweet potato germoplasm. P.h. D. Thesis, Birmingham. P. 4, 15, 231, 233.

Espinoza, N. ; Lizarraga, R. ; Sigueña, C. ; Buitran, F. ; Bryan, J. & Dodd S, J.H. 1992. Cultivo de tejidos: Micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Guía de investigación C. I. P. P. 30.

FAO. 1997. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Anuario de Producción. vol. 50-160.

Granada, C.L. & Villalobos, V.M. 1980. Propagación *in vitro* de *Dioscorea sp* Nueva época (Chapingo) México. 21 : 1-7.

Henshaw, G. G. 1982. Tissue culture methods and germplasm storage. In International congress of Plant Tissue and Cell Culture ( 5; 1982, Tokyo ). Plant Tissue Culture 1982. Proceedings. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture. P. 789-792.

Jarret, R.L. & Gawel, N. 1991. Chemical and enviromental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lim) *In Vitro* . Plant cell. Tissue organ culture 25: 153-159.

- Márgara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* ; los meristemos y la organogénesis. Ed. por Mateo Box, J. M. & Urbano Terron. P. Madrid, Mundiprensa. 178 pp.
- Mederos, E. O. 1988. Piña. En: Fruticultura. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, Cuba. P. 68-75.
- Mora, M. I. 1987. Uso de osmorreguladores e inhibidores químicos para la conservación del germoplasma *in vitro* de *Musa sp.* Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R. Universidad de Costa Rica, CATIE. P. 64-94.
- Murashige, T. ; Skoog and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15 (3). P. 473-497.
- Olaya, C. I. 1992. Piña. En: Frutas de América tropical y subtropical. Ed. Norma,S.A. Santa Fé de Bogotá, Colombia. P. 64-77.
- Pérez, P.J. ; Castillo, M.A. ; González, M.A. & Velazco, O. 1984. Comportamiento de poblaciones obtenidas por cultivo de tejidos en caña de azúcar (*Saccharum spp.*): Primer congreso Nacional de genética, Julio 1984. La Habana, Cuba. (Resúmenes).
- Pérez, P.J. 1991. Cultivo de tejidos en la caña azúcar. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Ed. por W.M. Roca ; L.A.

- Mruginiski. Cali, (Col.), Centro Internacional de Agricultura Tropical. P. 547- 548.
- Phan, C.T. & Letouze, R. 1983. A comparative Study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnate: CoA ligase activity of normal and vitrious plants (*Prunus sativum*, L) obtained *in vitro*. Plant Science Letters ( Holanda ) 31. P. 223-327.
- Roca, W.M.; Escobar, R. & Mafia, G. 1992. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*: Principios y técnicas. CIAT, Cali (Col.) Centro Internacional de Agricultura Tropical. Guía de estudio. P. 5-20.
- Roca, W. ; Brayan, J. ; Roca, M. 1979. T issue culture for the international transfer of potato genetic resources. American potato journal (EE.UU) 56. P. 1-10
- Roca, W.M. 1979. Métodos de cultivo de tejidos para el intercambio internacional y la conservación del germoplasma de yuca. Boletín informativo (colombia) CIAT. 6. P. 3-5.
- Roca, W.M. 1984. Cassava. En : Sharp.
- Samson, J. A. 1991. Piña. En: Fruticultura tropical. Ed. Limusa, Mexico, D.F. P. 229-258.

Staritsky, G. 1980. In vitro storage of aroid germplasm. FAO. Plant genetic resources newsletter, Rome (Italia) IBPGR. 42. P. 25-27

Staritsky, G. A. J. Dekkers, N.P. Louwaars and E.A.Z. and voort. 1985. *In vitro* conservation of aroid germoplasm at reduced temperatures and under osmotic stresses. In: L.A. Withers and P.G. Alderson ( Eds ). Plant tissue culture and its agricultural applications, Butterworths. P. 277-284.

Vieth, J. ; Phan, C.T. & Hegedus, P. 1982. Etude histologique exploratoire de regenerants vitreux de *Pyrus malus* , C V M-26. Annales de L' ACFAS ( Canada ) 49 : 91.

Waymouth, C.H. 1973, Quality control measures; determination and survey of osmolality in culture media. In tissue culture methods and applications. Ed. by P. Kruse ; M. Paterson New York Academic press. P. 703-709.

Wescott, R. J. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm; 1, minimal growth storage potato research ( Holanda ) 24 : 331-342.