



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**TRABAJO DE DIPLOMA**

**MICROPROPAGACIÓN EN PIÑA (*Ananas*  
*comosus* (L.) Merr.) CULTIVAR MD-2**

**AUTORES:**

**Br: ANDREA MARÍA ZAMORA JARQUÍN**

**Br: DONALD ALONSO JUÁREZ GÁMEZ**

**ASESOR:**

**ING. AGR. MARBELL AGUILAR MARADIAGA**

**MANAGUA, NICARAGUA**

**MAYO 2008**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	i
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE ANEXO</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>AGRADECIMIENTO</b>	vii
<b>DEDICATORIA</b>	viii
<b>I- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	1
1.1    Objetivo general	3
1.2    Objetivo específico	3
<b>II- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	4
2.1    Localización del experimento	4
2.2    Selección del material vegetativo	4
2.3    Esterilización de materiales y equipos	4
2.4    Medios de cultivo	5
2.5    Propagación in vitro	5
2.5.1    Preparación y desinfección del material vegetativo	5
2.5.2    Fase de establecimiento	6
2.5.2.1    Siembra del material vegetativo	6
2.5.3    Fase de multiplicación	7
2.5.3.1    Efecto de los medios de cultivo, diferentes tipos de corte de explantes y estado físico del medio sobre la producción de brotes axilares	7
2.5.3.2    Efecto del volumen del frasco, el número de explantes por frasco y el estado físico de los medios de cultivo en el crecimiento de los explantes en la fase de multiplicación	8
2.5.4    Fase de enraizamiento	8
2.5.5    Aclimatización de las vitroplantas	9
2.6    Diseño experimental y análisis estadístico	9
2.6.1    Fase de establecimiento	9
2.6.2    Fase de multiplicación	10
2.6.3    Fase de enraizamiento	10
2.6.4    Aclimatización de las vitroplantas	10

<b>III-</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	11
	3.1 Fase de establecimiento	11
	3.2 Fase de multiplicación	13
	3.2.1 Efecto de los medios de cultivo y dos consistencia de medio de cultivo sobre la producción de brotes axilares	13
	3.2.2 Efecto del volumen del frasco, consistencia del medio de cultivo y el número de explantes por frasco	18
	3.3 Fase de enraizamiento	21
	3.4 Fase de aclimatización	23
<b>IV-</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	27
<b>V-</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	29
<b>VI-</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	30
<b>VII-</b>	<b>ANEXOS</b>	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1	Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices axilares de piña (Ananas comosus (L.) Merr) cv MD-2.	6
2	Variantes de medios de cultivo MS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de piña cv MD-2.	7
3	Volúmenes de frascos, estado físico del medio y número de explantes por frasco.	8
4	Variantes de medios utilizados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de piña cv MD-2.	9
5	Comportamiento de primordios de hojas separadas y color verde a las 4 semanas de establecidos los ápices en niveles combinados de ANA, BAP y AIA.	12
6	Efecto del volumen del frasco, número de explantes por frasco y dos consistencias de medio de cultivo sobre las variables longitud de planta, número de hojas, raíces y brotes.	20
7	Comportamiento del AIA y sacarosa sobre las variables longitud de planta y número de hojas.	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1	Hijos axilares de piña cv MD-2 seleccionados en áreas de producción.	4
2	a) hijos de corona b) corte transversal de las hojas. c) reducción antes y después de la desinfección.	6
3	Tipo de corte del tejido.	7
4	Crecimiento de los primordios de hojas en los ápices axilares de piña en los diferentes medios de cultivo.	12
5	Efecto de cuatro variantes de medio de cultivo y dos consistencias de medio sobre el número de brotes/pta en la fase de multiplicación.	15
6	Efecto de cuatro variantes de medio de cultivo y dos consistencias de medio sobre el número de raíces/pta en la fase de multiplicación.	16
7	Efecto de cuatro variantes de medio de cultivo y dos consistencias del medio sobre el número de hojas/pta en la fase de multiplicación.	16
8	Efecto de cuatro variantes de medios de cultivo y dos tipos de corte en la variable número de raíces por planta en la fase de multiplicación.	16
9	Efecto de dos tipos de corte del explante y dos consistencias de medio de cultivo en la variable número de brotes/pta en la fase de multiplicación.	17
10	Izquierda: frascos de 220 ml con 5, 6, 7 y 8 explantes en medio semisólido. Derecha: frascos de 430 ml con 5, 6, 7 y 8 explantes en medio semisólido.	19
11	Izquierda: formación de brotes en medio semisólido. Derecha: frascos con 5, 6, 7 y 8 explantes.	20
12	Influencia de las diferentes combinaciones de AIA y sacarosa sobre el número de raíces.	22
13	Fase de enraizamiento en nueve variantes de medios de cultivo. Arriba: plantas enteras. Abajo: plantas partidas longitudinalmente.	23
14	Influencia de las diferentes combinaciones de AIA y sacarosa en plantas enteras y partidas sobre el porcentaje de sobrevivencia en la fase de aclimatización.	25
15	Izquierda: aclimatización de plantas enteras. Derecha: aclimatización de plantas partidas longitudinalmente.	26
16	Influencia de las diferentes combinaciones de AIA y sacarosa en plantas enteras y partidas sobre la variable porcentaje de plantas con espinas en la fase de aclimatización.	26

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexos</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1	Materiales, equipos y reactivos.	35
2	Composición del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962).	36
3	ANDEVA en la fase de multiplicación.	37
4	ANDEVA en la fase de enraizamiento.	37
5	ANDEVA en la fase de aclimatización.	37
6	Proceso de propagación <i>in vitro</i> de piña.	38
7	Presupuesto para producir 5000 plantas <i>in vitro</i> de piña.	39

## RESUMEN

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria de abril del 2007 a marzo del 2008, con el objetivo de mejorar la eficiencia de producción de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en diferentes fases de la micropropagación. En establecimiento, enraizamiento y aclimatización se evaluaron medios de cultivos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. En la multiplicación se estudió el tipo de consistencia del medio, frasco y número de explantes por frasco. En la fase de establecimiento los medios de cultivo que contenían las sales de Murashige y Skoog, (1962) con 1 mg/l BAP y 0.1 mg/l AIA ó ANA favorecieron la separación de los primordios de hojas; el color verde se presentó en los medios con ANA y BAP. En la fase de multiplicación los mejores medios de cultivo contenían 2 y 3 mg/l BAP de consistencia líquida, con brotes de 0.96 y 1.20. Los medios de cultivo que contenían las sales MS de consistencia semisólida fueron superiores en número de hojas y raíces. La formación de brotes fue superior al usar frascos de 220 ml con 8 explantes en medio semisólido con un promedio de 3.43. La longitud de planta y el número de hojas presentaron promedios superiores en medio semisólido con 5 explantes y en frascos de 220 ml y 430 ml, respectivamente. La inducción de raíces fue favorecida en los medios de cultivo que contenían 1 mg/l de BAP con 40 g/l de sacarosa. Para la variable número de brotes, hojas y longitud de planta no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. Las vitroplantas provenientes de plantas enteras presentaron 100 % de sobrevivencia. El promedio de espinas fue más acentuado en los tratamientos de plantas partidas longitudinalmente. El número de hoja resultó similar estadísticamente en los medios con diferentes niveles de sacarosa en combinación con 0.1 y 1 mg/l de AIA. La longitud de planta obtuvo el mejor promedio en el medio que contenía 0.5 mg/l de AIA con 30 g/l de sacarosa.

Palabras claves: MS, cultivar, propagación *in vitro*, AIA, ANA, BAP.

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestras familias por que en conjunto son las constructoras de nuestro aprendizaje desde sus inicios.

A Víctor Viñuales y María de Jesús Luna Serreta amigos de casi toda la vida a los que considero mis segundos padres por apoyarme incondicionalmente en todo el trayecto de mi formación profesional.

Al Ing. Marbell Aguilar Maradiaga por brindarnos su incondicional apoyo, confianza, amistad y construir juntos conocimientos de mucha utilidad en nuestro inicio como investigadores del agro.

A los docentes universitarios que fueron parte en nuestra formación profesional, haciendo mención especial al Ing. Álvaro Benavides por apoyarnos en el análisis estadístico de los datos de investigación y al Dr. Guillermo Reyes por brindarnos consejos e ideas que ayudaron a mejorar este trabajo.

A nuestro grupo de estudio, en el que aprendimos a establecer relaciones sociales que nos fortalecieron como seres sociales que somos y a aprender a trabajar en equipo socializando diferentes puntos de vista en complejas ideas.

A Erick Ramiro Juárez Gámez y Jeison Uriel Alfaro Gámez, compañeros universitarios que nos brindaron apoyo laboral e intelectual.

A la Universidad Nacional Agraria (UNA), al Consejo Nacional de Universidades (CNU) ya la cooperación de Sueca de los organismos ASDI y SAREC por el apoyo financiero sin el cual no hubiera sido posible realizar nuestro trabajo.

*Andrea María Zamora  
Donald Juárez Gámez*

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de diploma:

A Dios por haberme dado la sabiduría y el conocimiento necesario en esta etapa de mi vida y por haberme acompañado en este duro trabajo de alcanzar mis metas.

A mis padres **Genaro Javier Zamora Peralta** y **Luz Marina Jarquín Martínez**, por darme la confianza y el cariño en este gran caminar de obtener mi segundo triunfo.

A mis abuelos por estar al lado mio desde que di mis primeros pasos y por estar siempre animándome para seguir adelante.

A una persona que admiro y aprecio mucho **Eugenia Zamora Peralta** mi segunda madre; por sus consejos, ayuda y apoyo incondicional cuando mas lo necesitaba. TQM.

A mi mejor amigo y hermano que nunca se separó de mí ni en los momentos más difíciles **Donald Alonso Juárez Gámez** quien en estos cinco años me supo querer y valorar como persona, teniendo siempre una palabra de amor y cariño para mí.

A todos ellos les digo:

*“Cultivaré la alegría y el deseo de ofrecer lo más bello y mejor que hay en mi corazón, romperé las cadenas que me atan para llegar mas allá de mis metas y así levantarme en cada deslíz que tenga en mi vida, porque el camino que viene es largo y las dificultades que están por venir se vuelven más fáciles si se lucha por lo que se quiere alcanzar.”*

*Andrea Zamora Jarquín*

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Jehova Dios por ser la mayor fuente de inspiración de toda la humanidad y por haberme dotado con habilidades intelectuales, fortaleza y sentido común que supe aprovechar y que me permitieron culminar mis estudios y mi trabajo de diploma.

A mi abuelita Romelia Rivera Arosteguí por haber contribuido en mi formación integral y por brindarme el amor y apoyo de madre en los momentos que más lo necesito.

A mis padres Mayra del Socorro Gámez Arosteguí y Donald Alejandro Juárez Dolmus por que ambos han trabajado muy duro toda su vida para darme lo necesario que una persona y hombre de bien debe tener como amor, valores morales íntegros, educación, amor al trabajo, dedicación al estudio y el saber valorar cada cosa que poseo como si fuera la única ; esfuerzo que me motiva a ser cada día mejor en mi formación como un buen profesional y como persona aprovechando el tiempo que Dios me está concediendo vivir.

A mi novia Andrea María Zamora Jarquín por ser una persona que juega un doble papel en mi vida, como novia porque ella me da su cariño, amor y tolerancia; y como amiga porque mi brinda sus constructivos consejos y criticas, me contagia con su deseo de superación, me insita al estudio, a cumplir con las tareas de investigación y me muestra siempre que la superación de una persona está en imponerse retos y en no declinar ante una actividad sin haber intentado alcanzarla con éxito y obtener casi la perfección en ella.

*Donald Alonso Juárez Gámez*

## **I - INTRODUCCIÓN**

La piña pertenece a la división de las monocotiledóneas, familia de las Bromeliáceas, al género Ananas, y su nombre científico es (*Ananas comosus* (L.) Merr.) originaria de América Tropical específicamente de América del sur (Martínez, 1981). La fruta es reconocida como una de las más finas de las regiones tropicales y se le considera la reina de todas las frutas (López, 1996). La piña es muy apreciada por su valor nutritivo, es rica en carbohidratos, libre de grasas saturadas y colesterol, baja en sodio y muy alta en vitamina C y minerales, además es un alimento altamente digestivo debido a la enzima bromelia (Castañeda, 2003).

López (1996) señala que en los últimos cien años, la piña 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.

Hoy la piña es el segundo cultivo tropical en volumen de producción, solo superado por la banana (*Musa acuminata*) y conforma más del 20 % de la producción comercial, de la cual el 70 % se consume fresca y el resto se destina al enlatado en almíbar. Los principales productores son Brasil, China, Filipinas, India y Tailandia; que concentran el 50 % de la producción. Otros productores de relieve son Costa Rica, Indonesia, Kenia, México y Nigeria. En 1999 Tailandia produjo 2.331 millones de toneladas y Filipinas 1.495 millones de toneladas. La producción mundial ascendió en ese mismo año a 13.147 millones de toneladas (Medina y García, 2006).

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 sin implementar ningún tipo de tecnología. En los años 80 el cultivo toma auge considerándose como altamente rentable debido a sus características que hacen posible planificar la producción durante todo el año productivo (CENADE, 2000). El mayor volumen de su producción comercial se concentra en dos zonas: Ticuantepe, donde se cultiva el cultivar Monte Lirio. La otra zona conocida como la Meseta de los Pueblos, donde se está cultivando el cultivar Cayena Lisa. En 1997 el INTA estimó la producción nacional en un promedio de 25,531 frutos/ha/año en un área de 970 ha.

El cultivar Monte Lirio es muy apreciada en el mercado interno, pero de menor aceptación en el mercado internacional y Cayena Lisa que en la actualidad es uno de los cultivares más importante por la calidad de su fruto, sin embargo presentan algunos

inconvenientes en cuanto a fragilidad en el transporte y marcada susceptibilidad a ciertas enfermedades (López, 1996).

La piña es un cultivo con buen futuro para los pequeños agricultores y para el país como generador de mayores ingresos y de divisas, por la demanda internacional con posibilidad de exportación a Estados Unidos y Europa para el consumo fresco, así como también para ser industrializada (IICA, 2004).

Recientemente se está introduciendo al país el cultivar MD-2 conocido también por los nombres Golden Ripe, Extra Sweet o Maya Gold, porque su fruta es preferida en los mercados internacionales gracias a los atractivos en cuanto a sabor, olor, propiedades alimenticias, versatilidad culinaria, entre otras características. El cultivar MD-2 es un híbrido desarrollado en Hawai a partir de Cayena Lisa cuyo peso promedio es de 1.3 a 2.5 kg, de color naranja- amarillo intenso con un alto contenido de azúcar de 15 -17 grados brix; es un fruto dulce, compacto y fibroso. Las diferencias que presenta con respecto a la variedad Cayena Lisa son: mayor resistencia al oscurecimiento interno, menor contenido de ácido ascórbico total, menor susceptibilidad a la pudrición y al ataque de *Phytophthora* (Medina y García, 2006).

Las exportaciones de piña de Nicaragua son mínimas, sin embargo, este cultivo tiene una creciente demanda en el mercado nacional, el precio por unidad está en dependencia de la calidad, que comprende: tamaño, olor, sabor y, sobre todo, que esté libre de daños superficiales (Munguía, 2006).

Entre los principales problemas que impiden el aumento en la calidad de la producción en nuestro país se destacan la falta de financiamiento, falta de capacitaciones dirigidas a los productores tanto en el manejo agronómico, manejo de poscosecha. La técnica de cultivo de tejidos vegetales ofrece alternativas en la producción de plantas en grandes volúmenes en corto tiempo como en la obtención de plantas libres de patógenos causantes de enfermedades y garantizando la estabilidad genética del cultivar a propagar.

El empleo de la técnica de micropropagación en el cv MD-2, produciría las siguientes ventajas en comparación a los métodos convencionales de propagación: se evitaría la

diseminación de plagas y enfermedades, reducción del volumen del traslado de semilla, se reduce la aplicación de pesticidas, planificación de la cosecha, se obtiene un material sano y uniforme, no se producen afectaciones en la salud de las personas que manipulan el material vegetativo, se conserva la identidad genética del cultivar, material genético altamente productivo, propagación más rápida y en mayores volúmenes (Sandoval, 2001).

## **OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo general:**

Mejorar la eficiencia de producción en las diferentes fases de la micropropagación del cultivo de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) cultivar MD-2.

### **1.2 Objetivos específicos:**

1. Definir las mejores concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA, AIA y BAP) en la fase de establecimiento de ápices.
2. Identificar las mejores concentraciones de BAP, consistencias de medio de cultivo, tipos de tejidos, efecto del número de explantes y volumen del frasco en la fase de multiplicación.
3. Definir las mejores concentraciones de AIA y sacarosa para la producción de raíces.
4. Evaluar la respuesta de las plantas en base al crecimiento y la sobrevivencia en la fase de aclimatización.

## **II- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Localización del experimento**

La producción *in vitro* de plantas de piña cv MD-2 se realizó en el laboratorio de cultivo de tejido vegetal del programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Facultad de Agronomía de la UNA, ubicado en el km. 12 ½ carretera norte, geográficamente se localiza entre las coordenadas 12°08` latitud Norte y 86°10` longitud Oeste con una altitud de 56 msnm en el departamento de Managua. El estudio se realizó en el periodo abril 2007- marzo 2008.

### **2.2 Selección del material vegetativo**

El material vegetativo se obtuvo de áreas de siembra de productores del municipio de Ticuantepe, departamento de Managua, se seleccionaron renuevos conocidos como hijos axilares que presentaron un buen estado morfológico y fisiológico.



**Figura 1.** Hijos axilares de piña cv MD-2 seleccionados en áreas de producción.

### **2.3 Esterilización de materiales y equipos**

Los materiales, equipos y reactivos utilizados se detallan en anexo 1. En la limpieza de la cristalería (frascos de vidrio) se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) conocido como cloro comercial, a una concentración del 1 % durante 24 horas, posteriormente se procedió a realizar un enjuague con agua y detergente, una vez finalizado el enjuague los frascos se colocaron de forma invertida durante 2 horas para el escurrimiento del agua; los platos petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180 °C durante 1 hora. El área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfectó con

alcohol al 90 % y luego se expuso a la luz ultravioleta durante 30 minutos, antes de proceder a la siembra de los diferentes experimentos.

## **2.4 Medios de cultivo**

Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon en todos los experimentos las sales propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962) como medio basal y se definieron las concentraciones hormonales de auxinas y de citoquininas de acuerdo a la fase en estudio (Anexo 2). Una vez preparados los medios de cultivos, el pH se ajustó a 5.8 con KOH 1 molar (M) ó HCl 1 M. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 1 atmósfera de presión.

## **2.5 Propagación *in vitro***

Para el presente estudio se procedió a desarrollar los cuatro pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie propuestos por Murashige (1974): 1) establecimiento aséptico del cultivo, 2) multiplicación, 3) enraizamiento y 4) aclimatización de las vitroplantas para su posterior trasplante al suelo (Anexo 6).

### **2.5.1 Preparación y desinfección del material vegetativo**

En la fase de establecimiento se empleó el método descrito por (Bancroft y McDonald, 1995) para la desinfección de los explantes. A cada hijo axilar se le eliminaron las hojas que envolvían el ápice, reduciéndolos a un volumen de 4-5 cm de longitud por 2-3 cm de ancho aproximadamente; posteriormente los explantes fueron lavados con agua y detergente para garantizar el desprendimiento de polvo y otras impurezas. Una vez eliminados los residuos de detergente se realizó la primera desinfección sumergiendo los explantes en una solución de NaClO al 1 % durante 5 minutos. En la cámara de flujo laminar se practicó una segunda desinfección con NaClO al 2 % durante 5 minutos, posteriormente se eliminaron los residuos de NaClO mediante tres enjuagues sucesivos con agua estéril. Finalmente se procedió al disectado de los ápices hasta reducirlos a un volumen de aproximadamente 0.5 cm y se sembraron individualmente en tubos de ensayo (Figura 2).



**Figura 2.** a) hijos de corona b) corte transversal de las hojas. c) reducción antes y después de la desinfección.

## 2.5.2 Fase de establecimiento

Para definir los mejores medios de cultivo en la fase de establecimiento se hicieron modificaciones al medio de cultivo propuesto por Mathews y Rangan (1979).

### 2.5.2.1 Siembra del material vegetativo

Se estudiaron nueve variantes de medios de cultivo con adiciones de diferentes concentraciones de ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP) (Tabla 1). Se sembró un ápice por cada tubo de ensayo conteniendo 10 ml de medio de cultivo en estado semisólido y después fueron trasladados al cuarto de crecimiento en condiciones de luz natural con período de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad temperatura de 27- 28 °C.

**Tabla 1.** Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices axilares de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cv MD-2.

Variantes del medio (MS, 1962)	AIA mg/l	BAP mg/l	ANA mg/l
1	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.5	0.1
3	0.0	1.0	0.1
4	0.1	0.5	0.0
5	0.1	1.0	0.0
6	0.0	0.0	0.1
7	0.5	0.0	0.0
8	0.0	0.5	0.0
9	0.0	1.0	0.0

### 2.5.3 Fase de multiplicación

El objetivo de esta fase es la producción y aumento del índice de multiplicación a partir de los ápices establecidos. Para ello se induce a la proliferación de brotes axilares que son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medios frescos (Jiménez, 1995). En la fase de multiplicación se efectuaron 2 experimentos empleando los medios de cultivo propuesto por Páiz (2006) en organogénesis directa en quequisque (*Xanthosoma* spp. L. Schott). Para el estudio se emplearon plantas *in vitro* procedentes de la fase de establecimiento.

#### 2.5.3.1 Efecto de los medios de cultivo, diferentes tipos de cortes de explantes y estado físico del medio sobre la producción de brotes axilares

Con el objetivo de evaluar el coeficiente de multiplicación se estudió el efecto de la interacción de cuatro concentraciones de BAP (Tabla 2), consistencias líquida y semisólida de los medios de cultivo y el manejo de dos tipos de tejidos: plantas enteras y plantas partidas longitudinalmente (Figura 3). Para este estudio se utilizaron frascos con capacidad de 220 ml a los que se les distribuyeron 10 ml de medio de cultivo en el caso de la consistencia líquida y 20 ml en el medio de consistencia semisólida.

**Tabla 2.** Variantes de medios de cultivo MS en la fase de multiplicación *in vitro* de piña cv MD-2.

Tratamientos Medio de cultivo MS (1962)	BAP (mg/l)	Consistencia	Manejo de tejido
T <sub>1</sub>	0.0	Semisólida y líquida	Enteras y partidas longitudinalmente
T <sub>2</sub>	1.0		
T <sub>3</sub>	2.0		
T <sub>4</sub>	3.0		



**Figura 3.** Tipo de corte del tejido

### 2.5.3.2 Efecto del volumen del frasco, el número de explantes por frasco y el estado físico de los medios de cultivo en el crecimiento de los explantes en la fase de multiplicación

Se estudió el efecto del uso de frascos de dos volúmenes (220 y 430 ml) sobre la consistencia del medio líquido y semisólido y número de explantes por frasco (5, 6, 7 y 8) (Tabla 3). Para este experimento se utilizó el mejor medio de cultivo obtenido en el experimento I de multiplicación suplementado con las sales MS con 3 mg/l BAP.

**Tabla 3.** Volúmenes de frascos, estado físico del medio y número de explantes por frasco.

<i>Variantes volumen (ml)</i>	<i>Estado físico del medio</i>	<b>Densidad de explantes por frasco</b>
220	Semisólida y líquida	5, 6, 7 y 8
430		

### 2.5.4 Fase de enraizamiento

El propósito de la fase de enraizamiento es lograr plantas que desarrollen un sistema radicular que le permita una alta adaptabilidad a condiciones ambientales. El estudio consistió en determinar el efecto de nueve variantes de medios de cultivo suplidos con combinaciones de AIA y sacarosa sobre el crecimiento de dos tipos de cortes de los explantes (enteras y partidas longitudinalmente). Las variantes de medios de cultivo se prepararon en base a las propuestas por Caldera y López (2002) en el cultivo de plátano (*Musa* AAB cv. Enano) (Tabla 4). El experimento se inició con la selección de plantas obtenidas en la fase de multiplicación, con 2-3 hojas y 3 cm de longitud; posteriormente fueron sembradas en frascos de vidrio con capacidad de 220 ml.

**Tabla 4.** Variantes de medios utilizados en la fase de enraizamiento *in vitro* de piña cv MD-2.

Tratamientos Medio de cultivo (MS, 1962)	Reguladores de crecimiento		Tipo de corte del tejido
	*AIA (mg /l)	Sacarosa ( g/l)	
T <sub>1</sub> (testigo)	0.0	30	Enteras y partidas longitudinalmente
T <sub>2</sub>	0.0	40	
T <sub>3</sub>	0.0	50	
T <sub>4</sub>	0.5	30	
T <sub>5</sub>	0.5	40	
T <sub>6</sub>	0.5	50	
T <sub>7</sub>	1.0	30	
T <sub>8</sub>	1.0	40	
T <sub>9</sub>	1.0	50	

### 2.5.5 Aclimatización de las vitroplantas

El experimento se realizó con el objetivo de evaluar el comportamiento de las plantas *in vitro* en base a su crecimiento y sobrevivencia en la fase de aclimatización. En el estudio se evaluaron las plantas provenientes de cada medio de cultivo de la fase de enraizamiento. Las plantas enraizadas se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua para eliminar los restos de agar y sacarosa. Posteriormente se establecieron en bolsas de color negro de polietileno con dimensiones de 4×4 pulgadas que contenían sustrato de compost. Las plantas crecieron bajo condiciones de sombra con cubierta de sarán (70 %). Se aplicó un riego diario y fertilización foliar con 20-20-20 más elementos menores en dosis de 2 g/l una vez a la semana. Las plantas permanecieron en estas condiciones durante seis semanas.

## 2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

### 2.6.1 Fase de establecimiento

En el establecimiento de las plantas se inoculó un ápice por tubo de ensayo y un número de 15 ápices por tratamiento. Para el análisis de los datos no paramétricos se realizó la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) empleando el programa estadístico MINITAB versión 15, para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

A las 4 semanas se evaluaron el número de hojas separadas, número de hojas sin separar y color de las hojas.

### **2.6.2 Fase de multiplicación**

Los ensayos se organizaron en un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo trifactorial. En el primer experimento se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento (frascos) y un número de cinco explantes por frasco, constituyéndose unidades experimentales de 20 plantas por variante de medio de cultivo. En el segundo experimento se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento de cada factor en estudio (volumen del frasco, consistencia del medio y número de explantes por frasco). Para el análisis estadístico primero se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller  $\alpha = 0.05$ . Los datos fueron procesados y analizados en el programa estadístico SAS versión 15.

Se evaluó la longitud de la planta (cm), número de hojas, número de brotes por planta y número de raíces.

### **2.6.3 Fase de enraizamiento**

Se utilizaron cinco réplicas por cada tratamiento, con un número de cinco plantas por frasco. El experimento se estructuró en un diseño BCA con arreglo bifactorial. Se realizó un ANDEVA y para definir el mejor tratamiento la prueba de medias de Duncan y Waller  $\alpha=0.05$ . Se evaluó el número de raíces, longitud de las plantas (cm), número de hojas y número de brotes.

### **2.6.4 Aclimatización de vitroplantas**

Para el procesamiento de los datos no paramétricos de las variables sobrevivencia y plantas con espinas se elaboraron tablas de porcentajes. En el caso de las variables número de hojas y longitud de planta se utilizó un diseño BCA con arreglo unifactorial, evaluándose 25 plantas por tratamiento. A los datos de las variables longitud de planta y número de hojas se les efectuó el correspondiente análisis de ANDEVA y la prueba de medias de Duncan y Waller  $\alpha=0.05$ . Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de plantas con espinas, número de hojas y longitud de la planta (cm).

### **III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Fase de establecimiento**

La iniciación del crecimiento de piña implica el rompimiento de la latencia de las yemas axilares o laterales, hecho que se ve favorecido con la presencia de sustancias inductoras como las auxinas y las citoquininas (Rodríguez *et al.*, 1999). Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de las especies y del tipo de explante (Dottin, 2000).

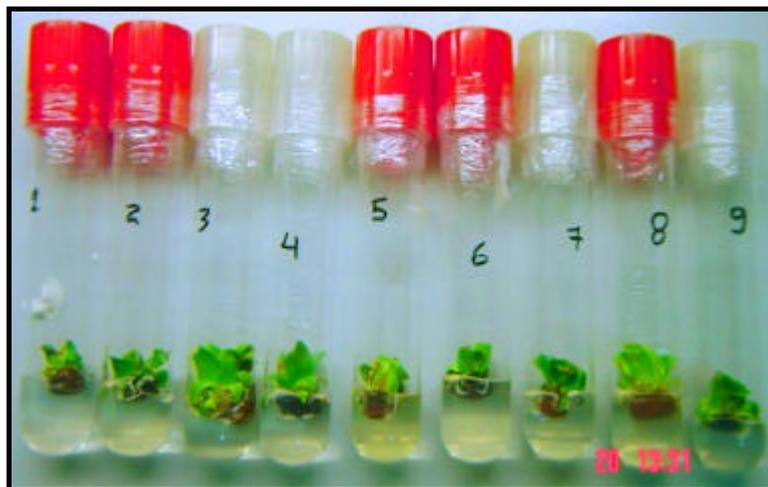
El mejor desarrollo de los primordios que presentaban hojas separadas en un número de 11 plantas, se obtuvo en concentraciones de 0.0 y 0.1 mg/l de ANA y AIA respectivamente en combinación con 1 mg/l de BAP. Este resultado refleja la necesidad de suministrar reguladores de crecimiento para mejorar la regeneración y crecimiento de los ápices, ya que la separación de primordios de hojas indica la activación de yemas axilares localizadas en la base de las hojas. Además, se encontró que en el medio de cultivo que se le adicionó 0.1 mg/l AIA y en el tratamiento sin adición de hormonas (testigo) resultaron ser inferiores, con una frecuencia observada de primordios separados de 2 y 5. Aún cuando el tratamiento testigo no contenía fitohormonas se observó crecimiento y separación de los primordios de hojas, refleja la presencia de reguladores de crecimiento en estos explantes, pero de acuerdo a los mejores resultados se demostró que la adición exógena de fitohormonas estimula la regeneración de los mismos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Comportamiento de primordios de hojas separadas y color verde a las 4 semanas de establecidos los ápices en niveles combinados de ANA, BAP y AIA.

Reguladores de Crecimiento (mg/l)			Variables					
			Primordios con hojas separadas			Color verde		
ANA	BAP	AIA	Si	No	? <sup>2</sup>	Si	No	? <sup>2</sup>
0.0	0.0	0.0	5	10	bc	9	6	ab
0.1	0.5	0.0	7	8	ab	12	3	ab
0.1	1.0	0.0	11	4	a	12	3	ab
0.0	0.5	0.1	7	8	ab	12	3	ab
0.0	1.0	0.1	11	4	a	8	7	b
0.1	0.0	0.0	9	6	ab	13	2	a
0.0	0.0	0.1	2	13	c	7	8	b
0.0	0.5	0.0	9	6	ab	11	4	ab
0.0	1.0	0.0	10	5	ab	12	3	ab

Promedios con letras similares no difieren entre si, para ?<sup>2</sup> a = 0.05. La comparación entre dos frecuencias se realizo verticalmente.

El BAP demostró ser el regulador de crecimiento que tuvo el mayor efecto en la separación de los primordios de hojas, resultando esencial para el metabolismo celular de los explantes. Se observó que la adición de BAP en combinación con ANA ó AIA tuvo su efecto en la regeneración de los ápices y separación de primordios de hojas, lo que refleja que el volumen y edad fisiológica de los ápices empleados en este trabajo, no tenían suficiente concentración endógena de auxinas, por tanto con la adición exógena de estos reguladores se alcanza el balance adecuado de auxinas-citoquininas para estimular el crecimiento y regeneración de los mismos.



**Figura 4.** Crecimiento de los primordios de hojas en los ápices axilares de piña en los diferentes medios de cultivos.

De acuerdo con Barceló *et al.* (1995) usualmente en los ápices, la citoquinina endógena es muy baja, debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de la misma a los medios de cultivo de establecimiento es esencial para los procesos de división celular y para la citocinesis (división del citoplasma para formar dos células hijas). En estudios sobre la influencia de las hormonas en la síntesis de ADN y división celular realizado por Thorpe (1995) se observó que aún cuando las auxinas eran necesarias para que hubiera mitosis y síntesis de ADN, éstas solo se producían cuando habían niveles adecuados de citoquininas para poder tener influencia sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y de proteínas.

Aunque en los medios de cultivo que contenían 0.1 mg/l de AIA y la combinación de 0.1 mg/l de AIA con 1.0 mg/l de BAP se presentaron las menores frecuencias de explantes color verde, esta expresión únicamente parece ser determinante en la actividad fisiológica de los tejidos solo cuando el AIA se adiciona al medio de cultivo, debido al bajo efecto que también produjo en la separación de los primordios de hojas. De acuerdo a los resultados el BAP influye directamente en la expresión del color verde de las hojas (Tabla 5). Las citoquininas promueven la conversión de etioplastos en cloroplastos vía estimulación de la síntesis de clorofila. Investigación reciente de García (2004) plantea la hipótesis de que las citoquininas previenen la pérdida de fragmentos de ADN, permitiendo así que continúen la síntesis de enzimas y la producción de otros compuestos tales como la clorofila. Además Tórrez y Vásquez (1995) afirman que a este hecho se le adiciona a que las citoquininas son más activas en el efecto retardante de la senescencia foliar.

## **3.2 Fase de multiplicación**

### **3.2.1 Efecto de los medios de cultivo y dos consistencias sobre la producción de brotes axilares**

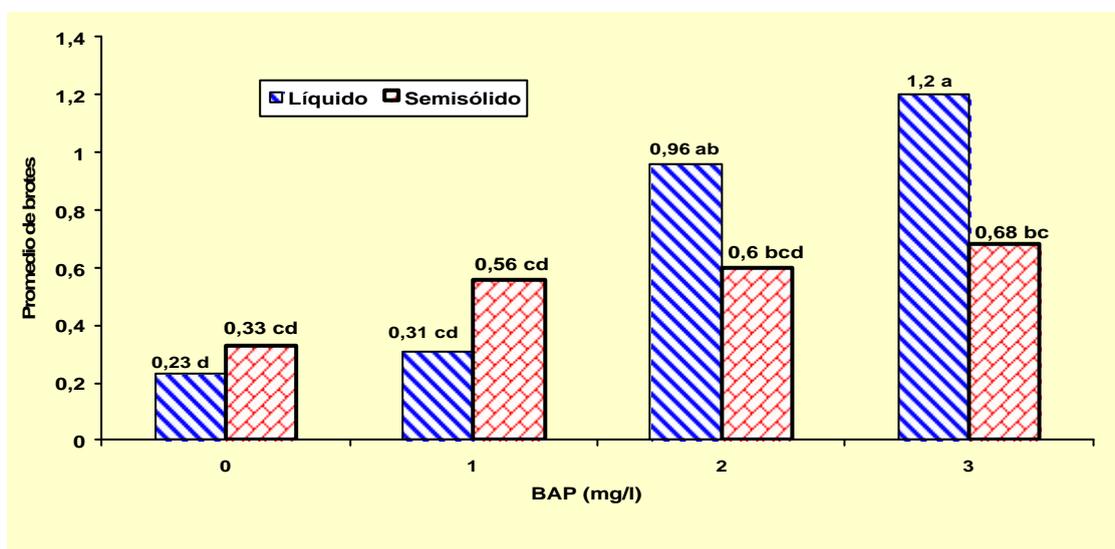
La proliferación de los brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en la base de las hojas. El uso de citoquininas es generalizado en los medios de propagación, variando su concentración en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes (Hu y Wang, 1983).

No hubo interacción en los factores medio de cultivo\*estado físico del medio\*tipo de corte del explante; este comportamiento estadístico similar entre plantas partidas y enteras sugiere que en la fase de multiplicación, las plantas se deben cortar en dos partes longitudinalmente porque esta práctica garantiza que se obtengan dos plantas morfológicamente similares en su crecimiento, pero además representa una ventaja económica al incrementarse la cantidad de plantas obtenidas. Sin embargo, se encontró interacción entre los factores medio de cultivo\* estado físico del medio únicamente para la variable número de brotes. También, hubo interacción entre medio\*tipo de corte en el promedio de raíces y entre los factores estado físico del medio\*tipo de corte en la variable número de brotes (Anexo 3). Los resultados presentados en la Figura (5) muestran que la interacción en la variable número de brotes por planta fue significativa, se obtuvo los mayores promedios de brotación en los medios de cultivo con concentraciones de 2 y 3 mg/l de BAP de consistencia líquida, con valores promedios de 1.20 y 0.96 respectivamente. El menor promedio se presentó en las variantes que no contenían BAP y con 1 mg/l de BAP tanto para consistencia líquida y semisólida. En cambio en la interacción estado físico del medio y tipo de corte del explante en esta misma variable los mejores promedios se obtuvieron al emplear ambas consistencias de medio de cultivo (líquida y semisólida) con explantes enteros para el primero y partidos para el segundo con promedios de 0.72 y 0.70 brotes/pta respectivamente, presentando similitud estadística con el tratamiento de consistencia líquida usando explantes partidos (Figura 9).

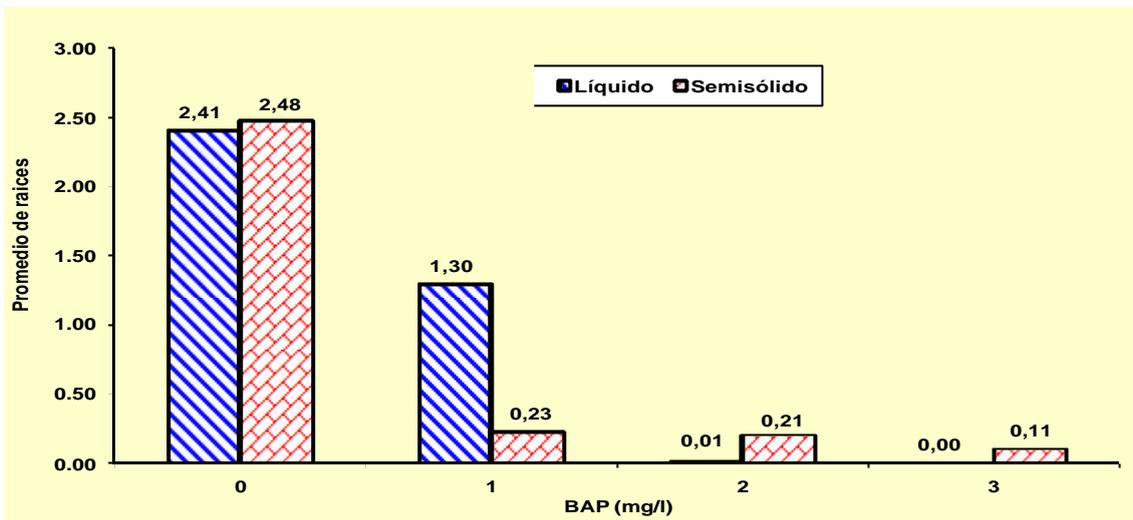
A pesar de que no hubo significancia entre los factores medio de cultivo\*estado físico del medio en las variables número de raíces y hojas, se observó que el mayor promedio de raíces por planta se presentó en los medios de cultivo de consistencia líquida y semisólida que no se les agregó BAP con promedios de 2.48 y 2.41 respectivamente (Figura 6). El número de hojas por planta producidas presentaron la misma tendencia. En el medio de cultivo semisólido se obtuvo un promedio de 6.28 hojas por planta similar al tratamiento que contenía 1 mg/l de BAP en medio de consistencia líquida (5.85 hojas/pta), (Figura 7). En la interacción medio\*tipo de corte el mayor promedio de raíces se presentó en el tratamiento sin adición de BAP con plantas enteras con promedio de 3.35 (Figura 8).

Mayores promedios de raíces y hojas no inciden a una mayor brotación en las plantas; pero sí la emisión de brotes parece estar más relacionada al efecto de las concentraciones de BAP que se agregan al medio de cultivo y al estado físico de éste. En el cultivo de piña estas yemas no se inhiben recíprocamente durante su desarrollo, debido a que se anula la dominancia apical, hecho que puede extrapolarse a las plantas intactas donde las citoquininas aplicadas exógenamente en general activan el crecimiento de las yemas laterales. El hecho de que el mayor promedio de raíces se presentara en los medios líquidos y semisólidos y sin adición de BAP o en bajas concentraciones, se debe a que las citoquininas inhiben la formación de raíces.

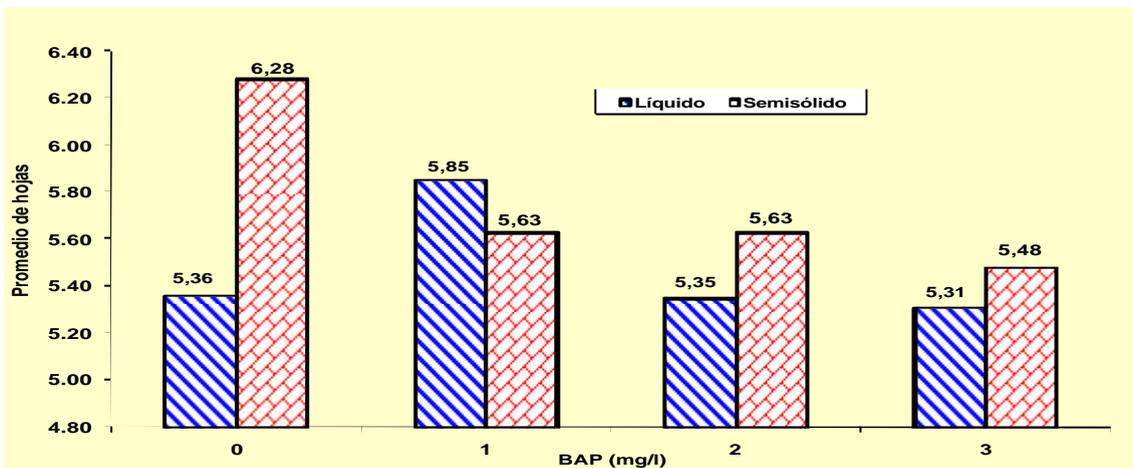
La inducción de órganos *in vitro* por efecto de las citoquininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son activadas en base a una proporción alta de citoquinina con respecto a las auxinas. El efecto de las citoquininas en el crecimiento de las raíces es extremadamente limitado, por lo que el tratamiento a secciones de raíz en cultivo con una citoquinina da como resultado una estimulación de la división celular, sin embargo, no conduce a un incremento en la elongación de la raíz, pero sí a una estimulación de la división de las células que están destinadas a diferenciarse en tejidos vasculares (Hurtado y Merino, 1994).



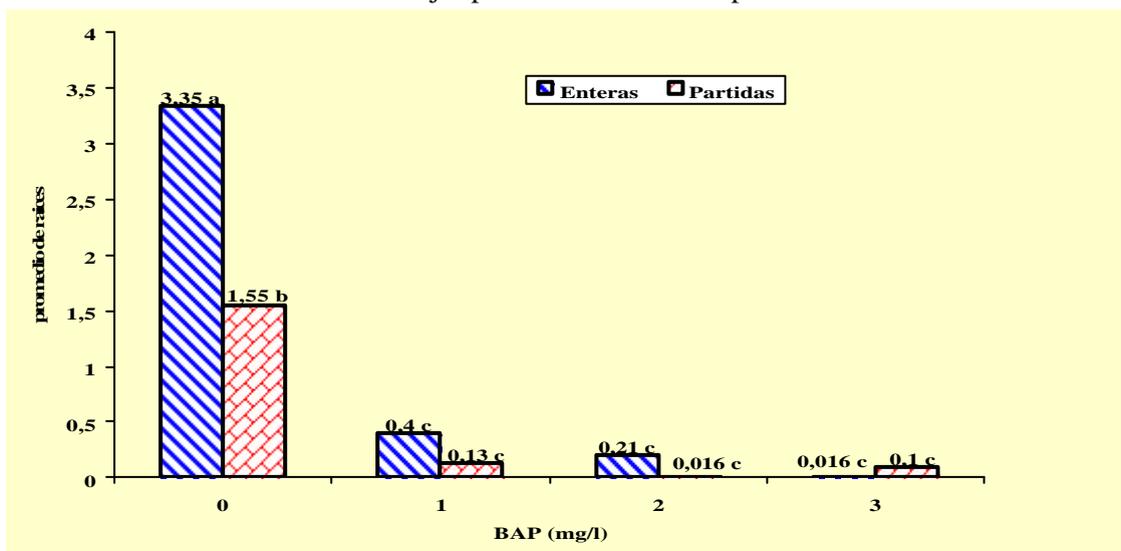
**Figura 5.** Efecto de cuatro variantes de medios de cultivo y dos consistencias de medios en la variable número de brotes/pta en la fase de multiplicación



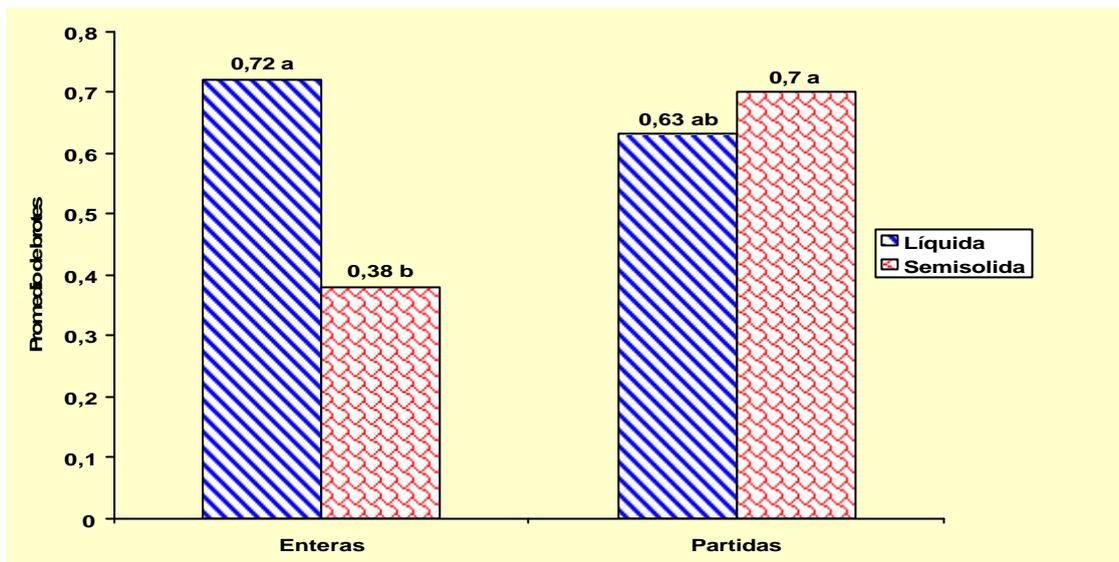
**Figura 6.** Efecto de cuatro variantes de medios de cultivo y dos consistencias de medios en la variable número de raíces/pta en la fase de multiplicación



**Figura 7.** Efecto de cuatro variantes de medios de cultivo y dos consistencias de medios en la variable número de hojas/pta en la fase de multiplicación



**Figura 8.** Efecto de cuatro variantes de medios de cultivo y dos tipos de corte en la variable número de raíces/pta en la fase de multiplicación.



**Figura 9:** Efecto de dos tipos de corte del explante y dos consistencias de medio de cultivo en la variable número de brotes/pta en la fase de multiplicación.

Otra causa que explica el hecho de que en los medios de cultivo sin adiciones de BAP se obtuvieran los mejores promedios de raíces y hojas es que posiblemente la concentración de auxinas endógenas de los tejidos fue mayor a las concentraciones de citoquininas exógenas cuyo efecto fue anulado por las auxinas. De acuerdo con Hurtado y Merino (1994) en ausencia de citoquininas, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados, pero en presencia de ésta se obtiene una división celular mediada citoquinínicamente. Cuando la proporción auxina-citoquinina es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales.

La respuesta de los explantes a las características físicas del medio de cultivo se atribuye al potencial hídrico (osmótico y matricial) que incide sobre la disponibilidad de agua para las plantas *in vitro* (Debergh *et al.*, 1991; George, 1996; Majada *et al.*, 1998). El descenso del potencial hídrico del medio tiene efectos perjudiciales en las tasas de distintos procesos morfogénicos. En medios semisólidos se modifican drásticamente la absorción de citoquininas y de iones, además se reduce la brotación debido a una mayor retención de agua, contrario a lo que ocurre con los tejidos que crecen en medios en estado líquido.

La alta producción de brotes en medios líquidos fue favorecida posiblemente por una mejor absorción de nutrientes, como lo reporta Gupta *et al.*, (1981) quienes encontraron que los medios líquidos facilitan la absorción de nutrientes por la planta debido a la distribución homogénea de los diferentes constituyentes de los medios de cultivo. Resultados similares fueron obtenidos por Guerra *et. al.*, (1999) con altas tasas de regeneración en medio líquido en los cultivares de piña Perola y Primavera.

Diversos autores concuerdan que en recipientes de cultivos tradicionales el efecto del medio líquido puede presentar beneficios en algunas especies (Bhojwani *et al.*, 1996; Escalona, 1999). Sin embargo, aunque el medio líquido con altas concentraciones de BAP (2-3 mg/l) puede aumentar el promedio de brotes y el crecimiento de hojas y raíces, generalmente produce una respuesta hiperhídrica que afecta posteriormente la aclimatización e incluso provocar la muerte de las plantas obtenidas debido a esta condición *in vitro*.

### **3.2.2 Efecto del volumen de frasco, consistencia del medio de cultivo y el número de explantes por frasco**

De estos resultados se destacan en el promedio de brotes los frascos de 220 ml con 8 explantes y medio de cultivo de consistencia semisólida (3.43 brotes/pta) en frascos de 220 ml con 5 explantes y consistencia líquida (3.03 brotes/pta) que fueron estadísticamente similares (Figura 10). Aunque únicamente el primer tratamiento descrito resultó estadísticamente superior a los promedios alcanzados por los demás tratamientos. Los menores promedios de brotación se presentaron en medio semisólido con 5 y 7 explantes en frascos de 430 ml (Tabla 6) (Figura 11).

Estas diferencias estadísticas entre los promedios de la interacción volumen de los frascos\* estado físico de los medios de cultivo\* número de explantes por frasco, no marcan una tendencia claramente definida que permita seleccionar el mejor tratamiento en las cuatro variables evaluadas.

Los resultados del número de brotes/pta, tiene su explicación en que durante el proceso de corte y siembra de los tejidos no se seleccionaron por tamaño, es decir que estos tejidos se obtuvieron de brotes axilares como de plantas madres con un crecimiento bien

definido, este procedimiento se vuelve una rutina frecuente en los procesos de producción masiva de plantas. Otro factor que pudo influir en la expresión de las variables evaluadas fue el tiempo de evaluación que debió extenderse a las 6 semanas de inoculados los explantes.



**Figura 10.** Izquierda: frascos de 220 ml con número de 5, 6, 7 y 8 explantes en medio semisólido. Derecha: frascos de 430 ml con 5, 6, 7 y 8 explantes en medio semisólido

Las mayores longitudes se alcanzaron cuando se sembraron 5 y 6 explantes en frascos de 220 ml establecidos sobre medios de consistencia semisólida, con valores respectivos de 6.58 y 5.71 cm. No se observó una tendencia al aumentar la longitud de plantas por efecto del volumen de los frascos o por el número de explantes. Generalmente cuando la longitud de planta fue mayor se redujo el número de brotes en ambos tipos de frascos, consistencia del medio de cultivo y número de explantes por frasco. (Tabla 6).

El mayor promedio de hojas/pta se presentó en el medio semisólido con 5 explantes y frascos de 430 ml (8.16), aunque no se reportaron diferencias significativas con los demás tratamientos. Los menores promedios se presentaron en medios de cultivo de consistencia líquida, en los dos tipos de frascos y con un número de 5 y 8 explantes (Tabla 6).

El número de raíces resultó superior estadísticamente al usar 6 explantes en medio semisólido en los dos tipos de frascos de 220 y 430 ml con un promedio de 1.46 en los dos recipientes. En la combinación frascos de 220 ml con 8 explantes y medio de cultivo de consistencia semisólida se presentó el menor promedio de raíces (Tabla 6). Estos resultados indican que al ser mayor la cantidad de medio de cultivo agregado a los frascos de 430 ml resulta tener influencia en la respuesta de los explantes de acuerdo a la cantidad de plantas, porque disponen de una mayor cantidad de oxígeno, nutrientes y

de reguladores de crecimiento para lograr un buen crecimiento en los órganos más importantes del crecimiento vegetativo de las vitroplantas.

**Tabla 6.** Efecto del volumen del frasco, número de explantes por frasco y dos consistencias de medios de cultivo sobre la longitud de planta, número de hojas, raíces y de brotes.

Frasco (ml)	Número de explantes	Consistencia del medio	Variables			
			Promedio de brotes	Longitud de la planta (cm)	Promedio de hojas	Promedio de raíces
220	5	Líquida	3.03 ab	4.71 bc	6.16 cd	0.43 cd
		Semisólida	1.93 b	6.58 a	6.53 bc	0.76 abcd
	6	Líquida	0.76 cd	3.53 d	6.26 bc	0.16 cd
		Semisólida	1.48 cd	5.71 ab	6.36 bc	1.46 a
	7	Líquida	1.00 cd	4.93 b	5.98 cd	0.20 cd
		Semisólida	0.91 cd	4.43 c	6.45 bc	0.38 cd
	8	Líquida	0.65 cd	3.25 d	5.56 d	0.75 abcd
		Semisólida	3.43 a	4.71 bc	6.81 b	0.00 d
430	5	Líquida	0.43 cd	3.63 cd	5.33 d	0.96 ab
		Semisólida	0.10 d	3.85 cd	8.16 a	1.16 ab
	6	Líquida	0.95 cd	3.78 cd	5.86 cd	1.11 ab
		Semisólida	0.33 cd	3.96 cd	7.06 b	1.46 a
	7	Líquida	1.73 bc	4.45 c	6.00 cd	0.81 abc
		Semisólida	0.10 d	3.65 cd	6.55 bc	0.81 abc
	8	Líquida	0.25 d	3.05 d	5.76 cd	0.58 bc
		semisólida	0.21 d	3.30 d	6.45 bc	1.25 ab

Promedios con letras similares no difieren entre si, para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller  $\alpha = 0.05$ .



**Figura 11.** Izquierda: formación de brotes en medio semisólido. Derecha: frascos con 5, 6, 7 y 8 explantes.

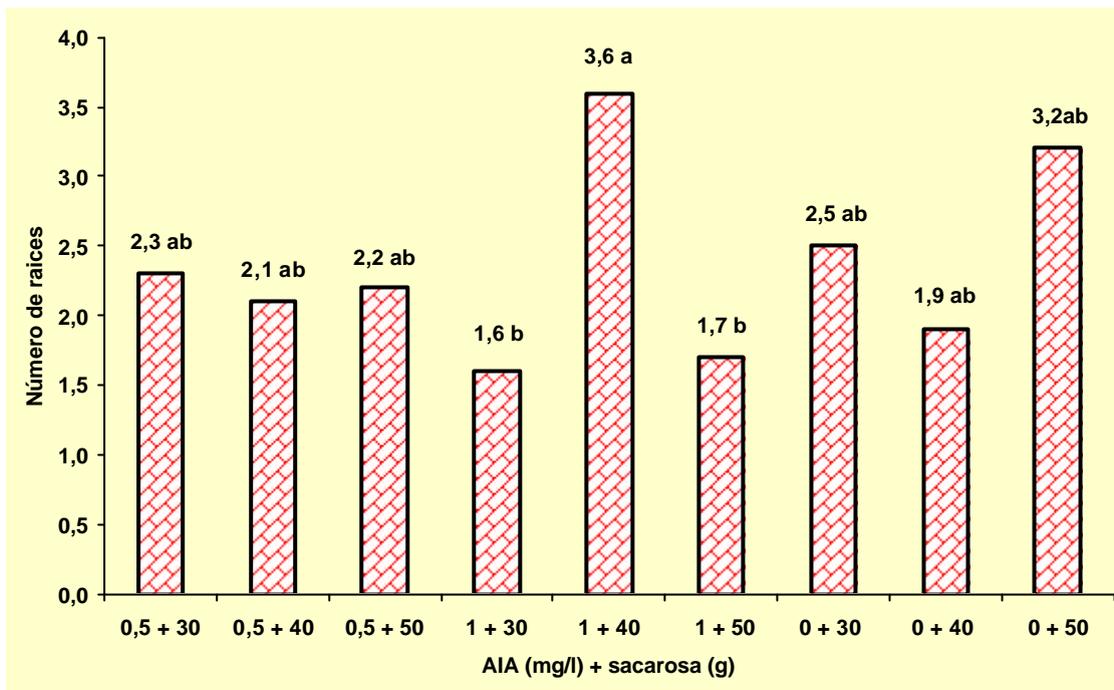
### 3.3 Fase de enraizamiento

Esta es la fase más voluminosa de todo el proceso, cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que además de crecer y desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta aclimatizada lista para llevarse al campo (Pérez, 1998).

No hubo diferencias significativas entre los factores medio de cultivo, tipo de corte del tejido, así como en la interacción de ambos factores en longitud de planta, número de brotes y de hojas (Anexo 4). Este comportamiento resultó similar a lo reportado en la fase de multiplicación porque al partir las plantas permite duplicar la cantidad de plantas obtenidas. Esta respuesta se debió a que en esta fase los medios de cultivo contenían únicamente AIA, cuyo efecto es inducir a los tejidos a emitir una mayor cantidad de raíces, pero afecta la formación de brotes, hojas y el crecimiento de las plantas, características morfogénicas inherentes al uso de citoquininas en el medio.

La acción de las citoquininas en el proceso de la división celular está relacionada con la presencia de AIA en el tejido, comprobándose que además de la cinetina se necesita AIA para obtener el crecimiento, alargamiento y división celular (Tórrez y Vásquez, 1995). La inducción *in vitro* de órganos producidos por las citoquininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción citoquinínica alta con respecto a las auxinas; estimulando la elongación de las hojas al usar concentraciones bajas junto con las auxinas (Hurtado y Merino, 1994).

Únicamente hubo diferencias estadísticas entre el promedio de número de raíces/pta que se obtuvo en el medio de cultivo que se le adicionó 1mg/l de AIA y 40 g/l de sacarosa (3.60) y las variantes de medios de cultivo que contenían 1 mg/l de AIA con 30 y 50 g/l de sacarosa (1.60 y 1.70, respectivamente) (Figura 12).

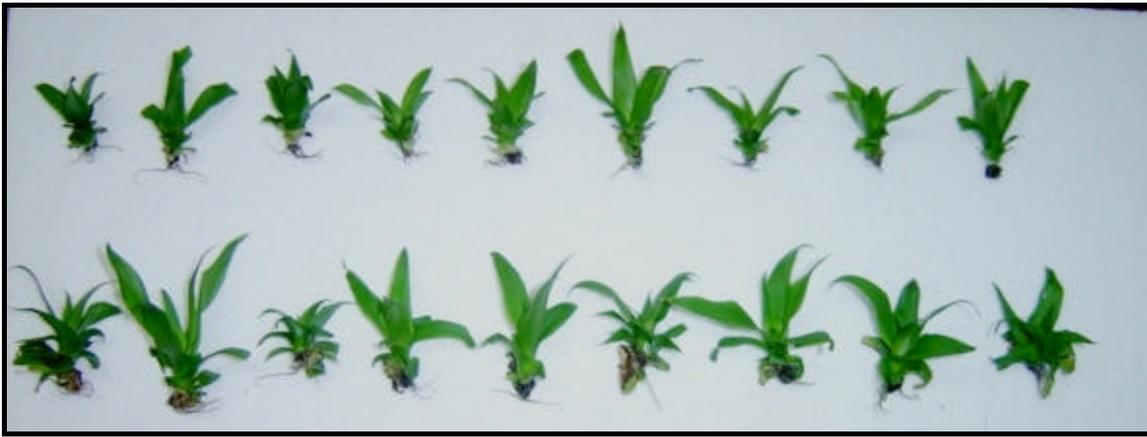


**Figura 12.** Influencia de las diferentes combinaciones de AIA y sacarosa sobre la variable número de raíces.

La respuesta de los tejidos a la combinación de niveles de sacarosa con AIA es causada por el rol de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces y al efecto sinérgico que se produce en los tejidos cuando se combinan estos dos compuestos (Tórrez y Vásquez, 1981).

Para el desarrollo de los procesos de morfogénesis *in vitro* es necesario lograr un balance adecuado de los reguladores de crecimiento y por lo general se consigue con las combinaciones más simples, además de otras diferencias como es el empleo de una alta concentración de sacarosa que constituye un estímulo adicional para la formación de raíces y crecimiento de la planta (Figura 13). De acuerdo con Hurtado y Merino (1994) las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de las mismas, porque pueden incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementa su crecimiento.

El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocida, recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento y es precisamente el AIA una de las auxinas más empleadas en esta fase (Tórrez y Vásquez, 1981; Hu y Wang, 1983).



**Figura 13.** Fase de enraizamiento en nueve variantes de medios de cultivo. Arriba: plantas enteras. Abajo: plantas partidas longitudinalmente

### 3.4 Fase de aclimatización

Tradicionalmente el proceso de transplante sigue un período de aclimatización que puede durar varias semanas. Durante este tiempo las plantas se someten a una adaptación gradual a las condiciones de humedad y temperatura externa, en las cuales los órganos que se desarrollan muestran una transición de sus características anatómo-fisiológicas, hasta conseguir una total aclimatización (Donnelly *et al.*, 1985; Van Huylenbroeck, 1994).

La aclimatización es un proceso necesario a través del cual se reducen al mínimo las pérdidas de las plantas cultivadas *in vitro* después de su transplante a estas condiciones, de forma progresiva, adaptando sus estructuras y su fisiología, convirtiéndose de un organismo heterótrofo en uno mixótrofo (nula o baja capacidad fotosintética) (Pospisilova *et al.*, 1997; González *et al.*, 1999). Sin embargo, durante la fase de adaptación, estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, dióxido de carbono y luz. Este cambio en las plantas así como la morfología de las mismas, determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatización (Pospisilova *et al.*, 1997).

Con las plantas que se desarrollaron en la fase de enraizamiento en las diferentes variantes de medio de cultivo, se estudió su respuesta a las condiciones ambientales. Similar a la fase de enraizamiento, no se encontró ninguna interacción entre medio de cultivo\* tipo de corte del tejido, pero si hubo respuesta estadística diferenciada de

longitud de planta y número de hojas de acuerdo a los constituyentes de los medios de cultivo (Anexo 5).

El número de hojas en las variantes de medios de cultivo no registró diferencias entre si (Tabla 7). Mientras que en longitud de planta se observaron diferencias significativas entre los promedios alcanzados en la variante de medio de cultivo 0.5 mg/l de AIA con 30 g/l de sacarosa; las sales MS con 30 g/l de sacarosa; 0.5 mg/l de AIA con 40 g/l de sacarosa; 0.0 y 1.0 mg/l de AIA en combinación con 50 g/l de sacarosa. (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comportamiento del ácido indolacético y sacarosa sobre las variables longitud de planta y número de hojas.

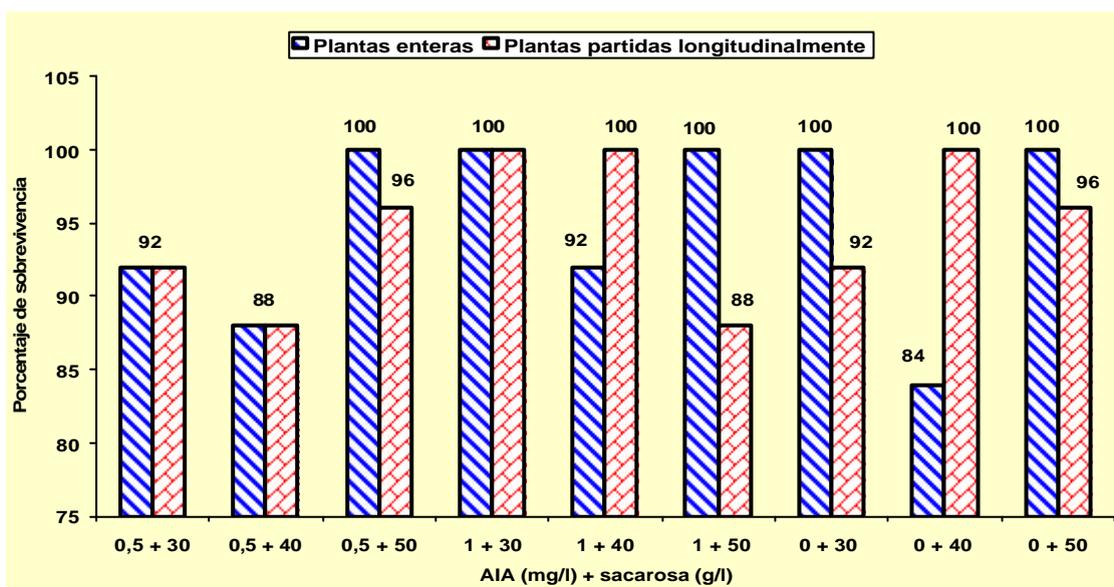
		variables	
AIA (mg /l)	Sacarosa (g/l)	Longitud de planta (cm)	Promedio de hojas
0.5	30	5.81 a	7.54 a
0.5	40	4.01 bc	7.56 a
0.5	50	4.36 abc	8.34 a
1.0	30	5.33 ab	8.40 a
1.0	40	4.23 abc	7.80 a
1.0	50	3.05 c	8.06 a
0.0	30	3.72 bc	7.50 a
0.0	40	4.26 abc	8.02 a
0.0	50	3.31 c	8.22 a

**Promedios con letras similares no difieren entre si, para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller  $\alpha = 0.05$ .**

Estos resultados sugieren la importancia de agregar AIA con 30 g/l de sacarosa para una mayor adaptación de las plantas al ambiente. Devlin (1980) ha comprobado que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular como es incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad del agua, reduciendo la presión de la pared celular o aumentando la síntesis de ARN, proteínas específicas (enzimas) y aún de la misma pared, lo que provoca un aumento en la plasticidad de la pared celular que trae como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento.

De acuerdo a la evaluación de la sobrevivencia de las plantas, considerada por Pérez (1998) como una de las variables más importantes del proceso de micropropagación, la sobrevivencia estuvo influenciada por dos factores: 1. Crecimiento de las plantas en medios de cultivo. 2. El tipo de corte practicado a los explantes. En las plantas formadas en estas variantes descritas en la fase de enraizamiento se obtuvieron buenos resultados

de sobrevivencia, gracias a que las concentraciones de AIA y sacarosa adicionadas alcanzaron el balance adecuado para estimular el crecimiento y así brindar mayor adaptabilidad a condiciones ambientales. El porcentaje de sobrevivencia fue mayor con el empleo de explantes enteros, debido a que tienen mayores cantidades de tejidos de reserva (Figura 14). Los resultados sugieren que para obtener una alta sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatación para plantas enteras se pueden emplear las combinaciones de 50 g/l de sacarosa con 0, 0.5 y 1 mg/ de AIA y para plantas partidas emplear las combinaciones de 0 mg/l de AIA con 40 g/l de sacarosa y 1 mg/l de AIA con 30 y 40 g/ l de sacarosa. Jiménez (1995) considera que las plantas que crecen en medios de cultivo con mayores concentraciones de sacarosa, presentan mayor sobrevivencia debido a una mayor adaptación para soportar el estrés hídrico, motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unidos a una mejor constitución morfológica de las plantas (Figura 15).

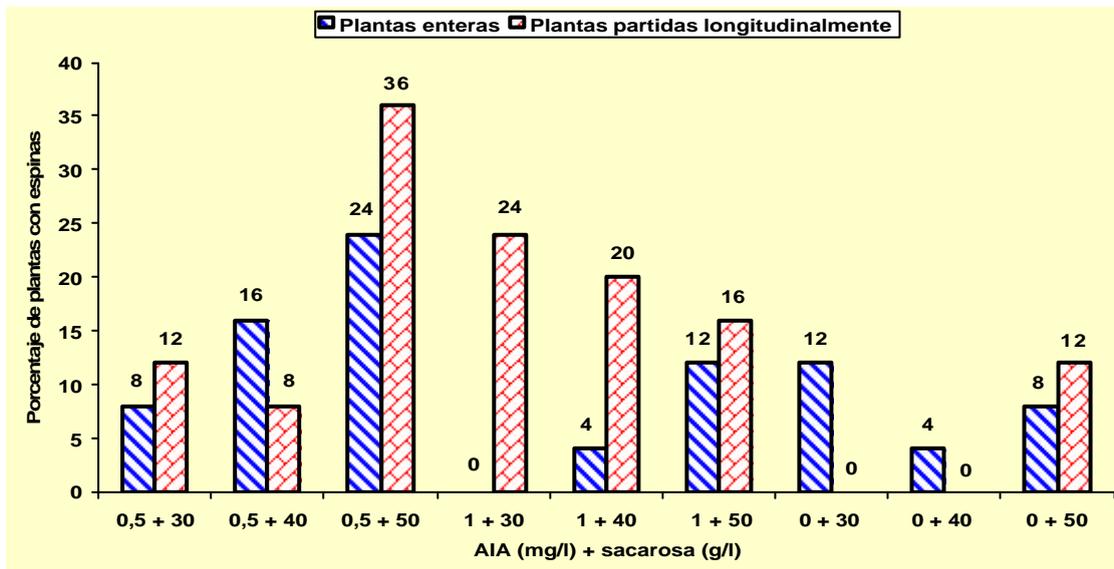


**Figura 14.** Influencia de las diferentes combinaciones de AIA y sacarosa en plantas enteras y partidas sobre la variable porcentaje de sobrevivencia en la fase de aclimatización.



**Figura 15.** Izquierda: aclimatización de plantas enteras. Derecha: aclimatización de plantas partidas longitudinalmente.

Durante la aclimatización de las plantas se observó presencia de espinas en los bordes y a los dos lados de la porción central de algunas hojas. La mayor presencia de espinas se observó en los tratamientos provenientes de plantas partidas, obteniéndose los mayores promedios en los medios suplidos con 0.5 mg/l de AIA más 50 g/l de sacarosa y con 1.0 mg/l de AIA más 30 g/l de sacarosa. En los tratamientos con plantas enteras la mayor presencia de espinas fue observada en el medio de cultivo con adición de 0.5 mg/l de AIA y 50 g/l de sacarosa (Figura 16). La presencia de espinas en plantas del cultivar MD-2 se reporta como una característica varietal, de manera tal que la presencia de espinas en las plantas *in vitro* puede estar más relacionada al aspecto genético del cultivar que al efecto de variación somaclonal producido durante el proceso de producción *in vitro*.



**Figura 16.** Influencia de las diferentes combinaciones de AIA y sacarosa en plantas enteras y partidas sobre la variable porcentaje de plantas con espinas en la fase de aclimatización.

#### IV- CONCLUSIONES

En la fase de establecimiento el tratamiento testigo, la combinación de 1 mg/l BAP con 0.1 mg/l AIA y de ANA y medio de cultivo que solo se le adicionó 0.1 mg/l de AIA, favorecieron a una mayor separación y desarrollo de los primordios de hojas. El color verde de los primordios de hojas de los explantes se observó con mayor frecuencia en los medios de cultivo que se les adicionó BAP y ANA.

En la fase de multiplicación la proliferación de brotes axilares fue mejor en los medios de cultivo que se le adicionaron 2 ó 3 mg/l BAP de consistencia líquida. Los medios de cultivo que contenían únicamente las sales MS y de consistencia semisólida fueron superiores en número de hojas y raíces.

En la formación de brotes por efecto del volumen del frasco, consistencia del medio de cultivo y por el número de explantes, fue superior en frascos de 220 ml con 8 y 5 explantes en medio de consistencia semisólida para el primero y líquida para el segundo. La mayor longitud de planta se presentó al usar frascos de 220 ml empleando 5 y 6 explantes en medio de consistencia semisólida. El número de hojas presentó sus mejores promedios en frascos de 430 ml, con 5 explantes y medio de consistencia semisólida; el número de raíces resultó superior estadísticamente al usar 6 explantes en frascos de 220 y 430 ml y medio de consistencia semisólida.

En la fase de enraizamiento los medios de cultivo que contenían combinaciones de 1 mg/l de BAP con 40 g/l de sacarosa favorecieron el incremento del número de raíces. En las variables número de brotes, hojas y longitud de planta no presentaron diferencia significativa entre los tratamientos.

En la fase de aclimatización la sobrevivencia de las plantas fue superior en los tratamientos de explantes enteros. La mayor presencia de espinas se observó en las plantas partidas, obteniéndose los mayores promedios en los medios que contenían 0.5 mg/l de AIA más 50 g/l de sacarosa y con 1 mg/l de AIA más 30

g/l de sacarosa. No se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos en las variables número de hojas y longitud de planta.

## V- RECOMENDACIONES

En el establecimiento de brotes axilares de piña para obtener un óptimo desarrollo de ápices utilizar el medio de cultivo MS suplido con 1mg/l BAP con 0.1 mg/l AIA y ANA.

Para estimular una mayor brotación axilar en la fase de multiplicación, utilizar el medio de cultivo MS suplido con 2 ó 3 mg l de BAP. En el caso de que se emplee frascos de 220 ml inocular 5 explantes cuando el medio sea de consistencia líquida y 8 explantes en medios de consistencia semisólida.

En la fase de multiplicación y enraizamiento cortar longitudinalmente los explantes, esta práctica permite una reducción del costo de producción y el precio de venta al duplicarse la cantidad de las mismas.

En la fase de enraizamiento adicionar al medio de cultivo 1 mg/ l de AIA y 40 g/ l de sacarosa o únicamente 50 g/l de sacarosa efectuando cortes longitudinales a los explantes.

Realizar estudios de comportamiento de las plantas *in vitro* a condiciones de campo, considerando su manejo agronómico, el comportamiento fisiológico y la estabilidad genética.

## **VI- BIBLIOGRAFÍA**

- BANCROFT, R. D. y F. D. MCDONALD.** 1995. Plant tissue culture Manual. CARDI. Cave Hills Campus, P. O Box 64, Barbados. P 1-6.
- BARCELÓ; NICLOAS, G; SABATAR B. y R. SÁNCHEZ.** 1995. Fisiología Vegetal. Ciencia y Técnica. Ediciones Pirámide S.A. 7<sup>ma</sup> ed. Madrid, ES. P 120-320.
- BHOJWANI, S. S y M. H. RAZDAN.** 1996. Plant tissue culture theory and practice, revised edition (Eds). New York. P 39-63.
- CALDERA, L. A y J. F. LÓPEZ.** 2002. Mejoramiento de la eficiencia de la propagación *in vitro* de plátano (*Musa* AAB cv. Enano). Tesis Ing. Agr. UNA. Managua, Nicaragua. 41p.
- CENADE** (Centro de acción y apoyo al desarrollo rural). 2000. Guía Técnica de piña. Managua, NIC. P 27.
- CASTAÑEDA, P.** 2003. Seminario sobre producción y manejo post cosecha de la piña para la exportación (en línea). Proyecto regional de fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria en cultivos de exportación no tradicional – vifinex. Manual técnico (consultado el 12 de marzo 2008). San Salvador, El Salvador. 63p.
- DEBERGH, P. L y R. H. ZIMMERMAN.** 1991. Micropropagation technology and application. Kluwer Academia Publishers.
- DEVLIN, R. M.** 1980. Fisiología vegetal. Omega. Barcelona, ESP. 55p.
- DONNELLY, D; VIDAVER, J y K. LEE.** 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and alter transfer tos oil, plant cell tissue culture. Scientia Hort. 28:331-337.

- DOTTIN, M. P.** 2000. Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas, Cuba. 119p.
- ESCALONA, M.** 1999. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar por el grado de científico de Doctor de ciencias agrícolas, Universidad de Ciego de Ávila, Centro de bioplasmas de Ciego de Ávila. 94p.
- GARCÍA B, F. J.** 2004. Fitorreguladores (on line). Universidad Politécnica de Valencia. España. Disponible en Internet: [www. Evita. Upv.es/VARIOS/BIOLOGIAT/temas/tema\\_14htm-431K-](http://www.Evita.Upv.es/VARIOS/BIOLOGIAT/temas/tema_14htm-431K-).
- GEORGE, E.** 1996. Plant Propagation by tissue culture: Part II The technology. (Ed) Exegetics limited, Edington, Wills. Inglaterra. P 639-650.
- GONZÁLEZ, J. L; RODRÍGUEZ, R y M. ESCALONA.** 1999. Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización de plántulas de piña y caña de azúcar. En: Biotecnología vegetal, libro de reportes cortos. 5to coloquio Internacional de Biotecnología vegetal (IBP). Santa Clara, CB. P 174-175.
- GUPTA, P.K; MASCARENHAS, A.F y V. JANNATHAN.** 1981. Tissue culture of trees: clonal propagation of mature trees of eucalyptus *Citriodora Hook*, by tissue culture. Planta science letters. Limerick. 20: 195-201.
- GUERRA, M.P; VESCO, L. L; PESCADOR, R; SCUELTER, A. R y R.O. NODARI.** 1999. Establecimiento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 34:9. 1557-1563.
- HU. C. Y y P. J. WANG.** 1983. In: Hand Book I: Plant Tissue and cell culture. Chapter 5. p 178-202.
- HURTADO, D. H y M. E. MERINO.** 1994. Cultivo de tejidos vegetales. (Ed) Trillas, México. 232p.

**INTA** (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 1997. El cultivo de la piña. Managua, NIC. P 20.

**IICA (Instituto interamericano de capacitación agrícola)**. Guía de exportación para los mercados estadounidenses de piña. (On line) 2004. (Consultado 5 mayo 2008). Nicaragua. Disponible en: [http://www.iica.int.ni/Estudios\\_PDF/Guia\\_Export\\_Pina.pdf](http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Guia_Export_Pina.pdf)

**JIMÉNEZ, G. E.** 1995. Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villas, CB. P 99.

**LÓPEZ, H.** 1996. Cultivo de la piña. Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria. Guia tecnológica. Managua, NIC. 7:20.

**MAJADA, J; FEITO, P.I; CENTENO, M.L; FERNÁNDEZ, B; SÁNCHEZ, R y R. TAMES.** 1998. Plant Groth Regulation: 25:113-121.

**MARTÍNEZ, Q.** 1981. Fruticultura: La Piña. Habana, CB. P 251.

**MATEWS, V. H y T. S. RANGAN.** 1979. Multiple Plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* cultures of pineapple, Scientia Hortic. 11:319-328.

**MEDINA, J y H. S GARCÍA.** Operaciones postcosecha de la piña. Instituto tecnológico de Veracruz. (on line).2006.(Consultado 3 mayo del 2007). México Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/pi%c3%B1tropicas>.

**MUNGUÍA, C.** 2006.occidente prueba cultivo de piña. <http://www-ni.laprensa.com.ni/archivo/2006/agosto/28/noticias/campoyagro/>

**MURASHIGE, T** 1974. Plant propagation Thought tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiology. 25:135-166.

**MURASHIGE, T y F. SKOOG.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol plant. 15:473-497.

- PÀIZ, E. F.** 2006. Organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo de quequisque (*Xanthosoma* spp. L. Schott), cultivar Masaya. Tesis Ing. Agr. UNA. Managua, Nicaragua. 79 p.
- PÉREZ, J N.** 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. 83 – 295.
- POSPISILOVA; CATSKY, J. J y Z. SESTAK.** 1997. Photosynthesis in plant cultivated *in vitro*. In: Pessaraki M. Eds. Hanbook of photosynthesis. New York. P 525-540.
- COLOQUIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL (5, 1999, CUBA), 1999.** Cultivo *in vitro* de *Ananas comosus* (L.) Merr., (piña), cultivar cabezona, libro de reportes cortos Ed. Por Rodríguez, L. E; Santiago, Y; Rosales, Y; Igarza, Y. y E. Fonet. Santa Clara, CB. 56 p.
- SANDOVAL F, J. A.** 2001. Biotecnología aplicada para la micropropagación de banano y plátano (*Musa* AAA, AAB). Ed. Loria, M. San José, CR. P 3-7.
- TÓRREZ, G. S. y E. VÁSQUEZ.** 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Puebla y Educación. Plaza, Ciudad de la Habana, CB. 19-37:315-373.
- TÓRREZ, G. S. y E. VÁSQUEZ.** 1981. Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo Editorial Puebla y Educación. Plaza, Ciudad de la Habana. P 362-371.
- THORPE, T. A.** 1995. En: *in vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. P 155-189.
- VAN HUYYLENBROECK, J. M.** 1994. Influence of light stress during the acclimatation of *in vitro* plantlets. En: Plant Production on the threshold of a new century, Kluwer. Academic Publisher. P 451-453.

## **VII- ANEXOS**

**Anexo 1.** Materiales, equipos y reactivos.

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos de ensayo de 150 x 25mm con tapones plásticos	Autoclave	Ácido naftalenacético (ANA)
Frascos erlenmeyer	Agitador electromagnético	Ácido clorhídrico (HCl)
Alcohol	Freezer (4 °C)	Ácido indolacético (AIA)
Escalpelos	Balanza analítica	Macro y micronutrientes del medio básico de cultivo Murashige y Skoog (1962)
Hipoclorito de sodio (NaClO)	Horno	Agar
Agua destilada	Cámara de flujo laminar	Bencilaminopurina (BAP)
Marcadores	pHmetro	
Papel aluminio	Mecheros	
Pipetas		
Pinzas		
Placas petri		
Sacarosa		
Tijeras		
Cuchillos		
Detergente		

**Anexo 2** Composición del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/l</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00
KNO <sub>3</sub>	1,900.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
<b>Microelementos</b>	<b>mg/l</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22.30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.02
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.02
<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Tiamina HCl	0.10
Myo- inositol	100.00
<b>Azúcar</b>	<b>g/l</b>
Sacarosa	30.00

**Anexo 3.** ANDEVA en la fase de multiplicación

<b>Fuente</b>	<b>Nº de brotes</b>	<b>Nº de raíces</b>	<b>Nº de hojas</b>
Medio	<.0001	<.0001	0.1715
Consistencia	0.1564	0.4803	0.0655
Corte	0.2142	<.0001	0.0210
Medio*Cons	0.0125	0.8608	0.0800
Medio*Corte	0.1194	<.0001	0.5392
Cons*Corte	0.0282	0.1495	0.3461
Medio*Cons*Corte	0.6374	0.0654	0.2036

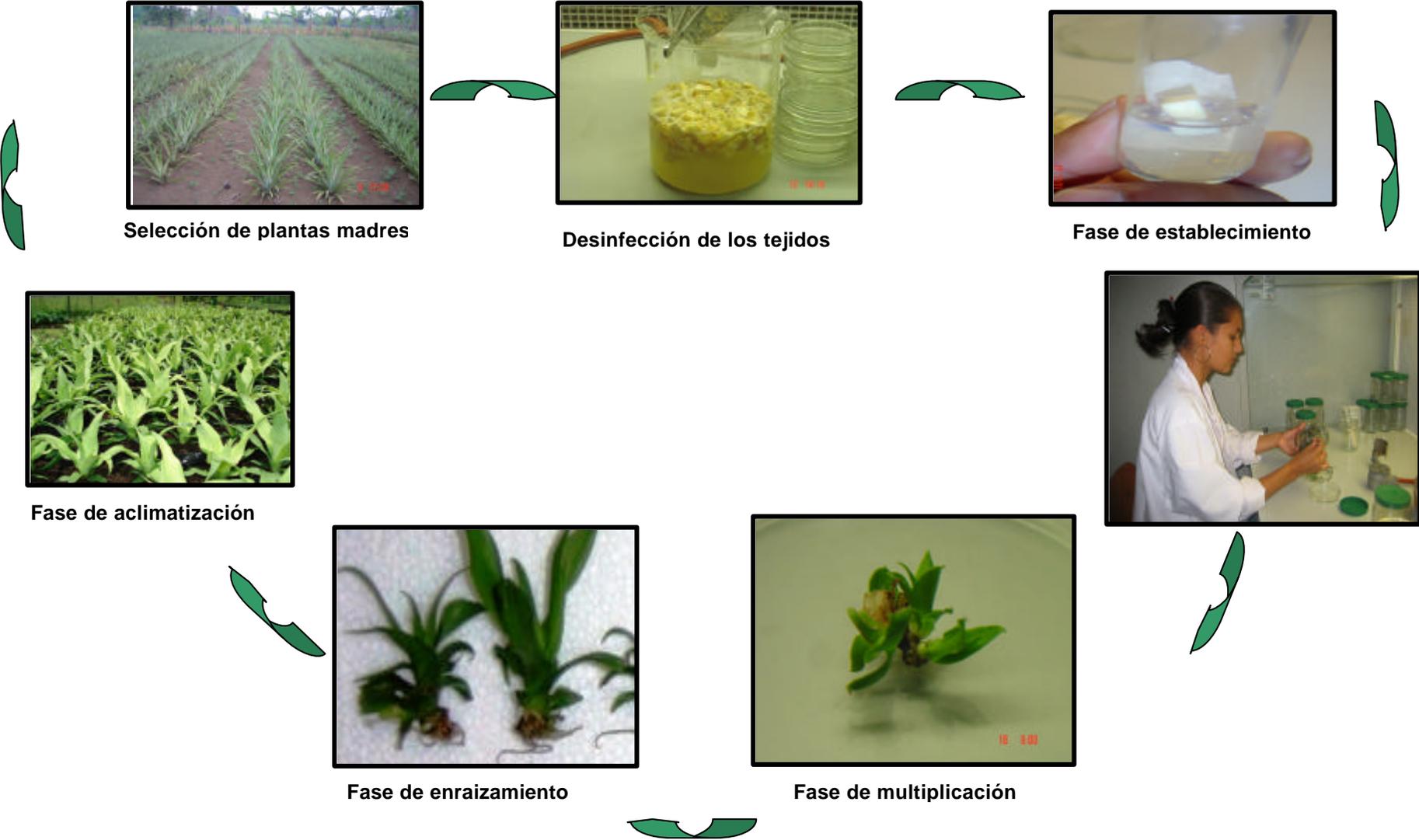
**Anexo 4** ANDEVA en la fase de enraizamiento

<b>Fuente</b>	<b>Longitud de planta</b>	<b>Nº de hojas</b>	<b>Nº de brotes</b>
Medio	0.9428	0.0685	0.6313
Corte	0.2179	0.1527	0.1797
Medio * corte	0.9282	0.3373	0.7631

**Anexo 5** ANDEVA en la fase de aclimatización

<b>Fuente</b>	<b>Longitud de planta</b>	<b>Nº de hojas</b>
Medio	0.0054	0.8259
Corte	<.0001	0.9779
Medio * corte	0.5948	0.1986

Anexo 6. Proceso de propagación *in vitro* de piña.



**Anexo 7.**Presupuesto para producción de 5,000 plantas *in vitro* de piña

<b>Rubros</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Unitario \$ US</b>	<b>Costo Total \$ US</b>
<b>Insumos</b>				
Reactivos	Diversos			800.00
Cristalería	Diversa			600.00
Fertilizante/orgánico	Saco	2	6.00	12.00
Semilla (hijos)	Unidades	100	0.20	20.00
<b>Combustible y lubricantes</b>				
Combustible	G. Diesel	5	3.20	16.00
Lubricantes	L	1	2.50	2.50
<b>Materiales y herramientas</b>				
Papel Bond 40	Resma	1	5.00	5.00
Memoria de cámara fotográfica	Unidad	1	40.00	40.00
Baterías recargables (AA)	Unidad	1	6.00	6.00
Tablas para toma de datos	Unidad	3	1.50	4.50
Tinta Imp. /Color	cartucho	1	40.00	40.00
Tinta Imp. /Negro	cartucho	1	40.00	40.00
<b>Materiales de laboratorio</b>				
Alcohol	Litros	4	2.25	9.00
Cloro	Litros	2	0.75	1.50
Algodón	Libra	2	5.00	10.00
Azúcar	Libras	4	0.28	1.12
Desinfectante	Litro	2	1.50	3.00
Pinzas	Unidad	2	18.50	37.00
Escalpelos	Unidad	2	16.00	32.00
Cuchillas para escalpelos (# 11)	Caja/100 uni.	1	50.00	50.00
Marcadores indelebles	Unidad	5	1.75	8.75
Papel aluminio	Rollo	2	10.50	21.00
Cuchillos	Unidad	2	3.00	6.00
Plástico	Rollo	2	18.00	36.00
<b>Energía</b>				500.00
<b>Agua</b>				60.00
Imprevistos (10 %)				236.03
<b>Total</b>				<b>2596.40</b>