

> PROYECTO PNIA 025\_PI

# Manual de propagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) var. MD-2 Golden utilizando biorreactores de inmersión temporal



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO

**Manual de propagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), var. MD-2 Golden  
utilizando biorreactores de inmersión temporal**

Segunda edición. Octubre 2019.

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA  
Estación Experimental Agraria El Porvenir - San Martín  
Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología  
Subdirección de Biotecnología  
Laboratorio de Biotecnología Vegetal  
[www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe)

Equipo técnico:  
Henri Delgado Haya  
Mar Asunción Gárate Navarro  
Alexander Altamirano Salazar  
Juliana Rodríguez García  
Marco Antonio León Martínez

Todos los derechos reservados.

Prohibida la reproducción de esta publicación por cualquier medio, total o parcialmente, sin permiso expreso.

## Agradecimientos

- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA y su unidad ejecutora, el Programa Nacional de Innovación Agraria - PNIA.
- Al equipo técnico del proyecto “Optimización de sistemas de inmersión temporal para la producción masiva de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en la región San Martín”.
- Al Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales - INIBICO, por su apoyo técnico y logístico en la ejecución del proyecto.



# Contenido

<b>1. Presentación</b>	<b>7</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>8</b>
<b>3. Equipamiento</b>	<b>9</b>
<b>4. Cultivo <i>in vitro</i> de piña</b>	<b>10</b>
4.1 Material vegetal	10
4.2 Tratamiento sanitario del material vegetal	11
4.3 Preparación del material vegetal	12
4.4 Primera desinfección	13
4.5 Extracción de yemas	14
4.6 Segunda desinfección e introducción <i>in vitro</i>	15
4.7 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	16
4.8 Condiciones de incubación <i>in vitro</i>	17
4.9 Establecimiento y multiplicación de plántulas en sistema convencional <i>in vitro</i>	18
4.10 Multiplicación en sistema de inmersión temporal utilizando BITs	19
4.11 Preaclimatación de plántulas	20
4.12 Aclimatación de plántulas	21
4.13 Sustrato	22
4.14 Riego	23
4.15 Fertilización	24
4.16 Control fitosanitario	25
4.17 Condiciones ambientales de aclimatación	26
<b>5. Flujogramas de propagación <i>in vitro</i> de piña</b>	<b>27</b>
5.1 Establecimiento <i>in vitro</i>	27
5.2 Multiplicación convencional	28
5.3 Multiplicación de plántulas de piña en biorreactores de inmersión temporal	29
5.4 Aclimatación de plántulas de piña	30
<b>6. Composición de las soluciones stock</b>	<b>31</b>
6.1 Composición de soluciones stock	31
6.2 Composición de los medios de cultivo	33
<b>7. Glosario</b>	<b>34</b>



**Los protocolos presentados han sido validados para la variedad MD-2 Golden, sin embargo, esto no excluye su uso para multiplicar otras variedades de este cultivo.**

# 1

## Presentación

El Instituto Nacional de Innovación Agraria presenta el "Manual de propagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), Var. MD-2 Golden utilizando biorreactores de inmersión temporal", como producto de investigaciones realizadas durante 6 años en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria El Porvenir - San Martín; una tecnología de producción *in vitro* de plántulas de piña, que utiliza la técnica de Biorreactores de Inmersión Temporal (BITS) para maximizar la multiplicación de plántulas.

Los protocolos presentados han sido validados para la variedad MD-2 Golden, sin embargo, esto no excluye su uso para multiplicar otras variedades de este cultivo (para programas de introducción y recambio varietal). Las aplicaciones de los protocolos generados podrían ser utilizados también para otras especies vegetales.

Por último, mencionar que el presente manual ha sido posible gracias al trabajo de los miembros del equipo técnico del proyecto 025\_PI "Optimización de sistemas de inmersión temporal para la producción masiva de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), en la región San Martín", la colaboración del Instituto de Investigación Biológica de la Cordilleras Orientales (INIBICO) y a la valiosa colaboración del Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), unidad ejecutora del INIA, que financió las investigaciones realizadas.

## 2 Introducción

El presente documento tiene como propósito generar una guía clara y específica que garantice la óptima ejecución de los diferentes procedimientos del cultivo *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad MD-2 Golden, y su multiplicación utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs). Comprende en forma ordenada, secuencial y detallada, los pasos a seguir para cada actividad, abarcando colecta de material vegetal, tratamiento del material vegetal, procedimientos de desinfección, enjuague, formulación de soluciones stock, composición y preparación de medios de cultivo para las diferentes fases de cultivo, extracción y siembra de yemas laterales, transferencias *in vitro*, instalación y multiplicación en Biorreactores de Inmersión Temporal y condiciones de aclimatación. Contiene flujogramas de toda la secuencia del cultivo *in vitro*, acompañado de fotografías para mejor comprensión de los procedimientos utilizados.

Es importante señalar, que este documento está sujeto a actualización en la medida que se vayan optimizando los procedimientos de propagación *in vitro* de la piña. La adaptación de los protocolos se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria El Porvenir - San Martín del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA, ubicado en el distrito de Juan Guerra, San Martín, Perú, entre los meses de marzo de 2016 a febrero de 2019, en el marco del proyecto 025\_PI "Optimización de sistemas de inmersión temporal para la producción masiva de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), en la región San Martín".



# 3

## Equipamiento



### EQUIPOS

- Autoclave eléctrica a 121 °C.
- Cabina de flujo laminar horizontal.
- Potenciómetro.
- Ozonizador.
- Balanza analítica.

### INSTALACIONES

- Área de preparación de medios de cultivo, lavado y esterilización.
- Área de siembras y transferencias.
- Área de incubación equipado con sistema de iluminación y aire acondicionado para el control de la temperatura.

### MATERIALES Y REACTIVOS

- Materiales de vidrio, metal y polipropileno.
- Sales minerales y vitaminas M&S Murashige & Skoog, 1962.

# 4

## Cultivo *in vitro* de piña

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

La actividad se inicia con la colecta de brotes axilares de piña de la variedad MD-2 Golden (imagen 1), de aproximadamente 5 meses de edad, 60 cm de longitud y 18 brácteas; los cuales se extraen de plantas maduras identificadas en parcelas de agricultores.



Imagen 1: Brotes axilares de piña.

## 4.2 TRATAMIENTO SANITARIO DEL MATERIAL VEGETAL

Los brotes se sumergen en solución fungicida - insecticida (1g/L de Benomyl + 1 ml/L de alphacypermetrina) por 15 minutos (imagen 2) y se exponen bajo sombra para su secado por un lapso de 5 días (imagen 3). Luego de este tratamiento los brotes son llevados a laboratorio para un posterior tratamiento.



Imagen 2: Tratamiento sanitario.



Imagen 3: Secado bajo sombra.

### 4.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Estos brotes son cortados en dos partes (apical y basal) (imagen 4) a fin de quedarse con la región intermedia donde se concentra el cormo con yemas no diferenciadas. Este material se lava en constante agitación con agua y detergente por un intermedio de 10 minutos. Enseguida, se trata con 2 ml/L de Kasumin (kasugamicina) por 20 minutos, se enjuaga con agua destilada y se retiran las brácteas para exponer el cormo.

El cormo resultante (imagen 5) es lavado y nuevamente tratado con 2ml/L de Kasumin por un intervalo de 10 minutos con menor frecuencia de agitación a fin de evitar daño físico en las yemas axilares expuestas. Luego de este tratamiento el cormo se lava por dos veces y se lleva a la cámara de flujo laminar para su desinfección.

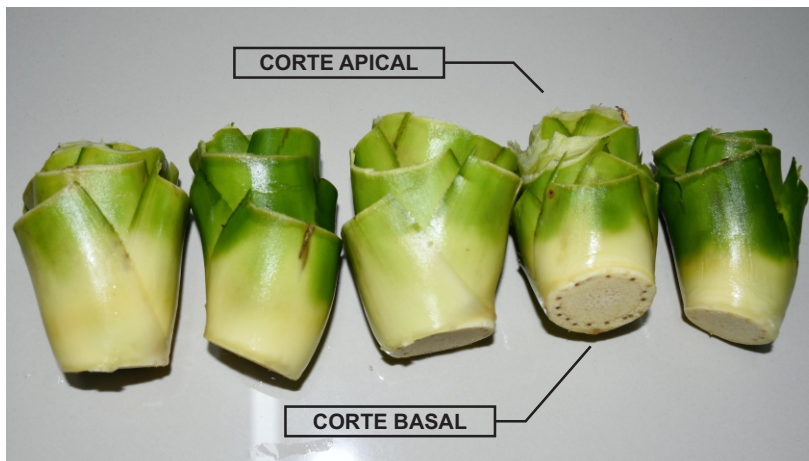


Imagen 4: Región intermedia del brote.



Imagen 5: Cormo.

## 4.4 PRIMERA DESINFECCIÓN

La desinfección se realiza en dos etapas, la primera consiste en colocar el cormo en una solución de 1 % de hipoclorito de sodio por un intervalo de 20 minutos en constante agitación y luego se enjuagan tres veces por 1 minuto cada uno, con agua destilada estéril. Esta actividad se realiza en la cámara de flujo laminar, como se puede observar en la imagen 6.

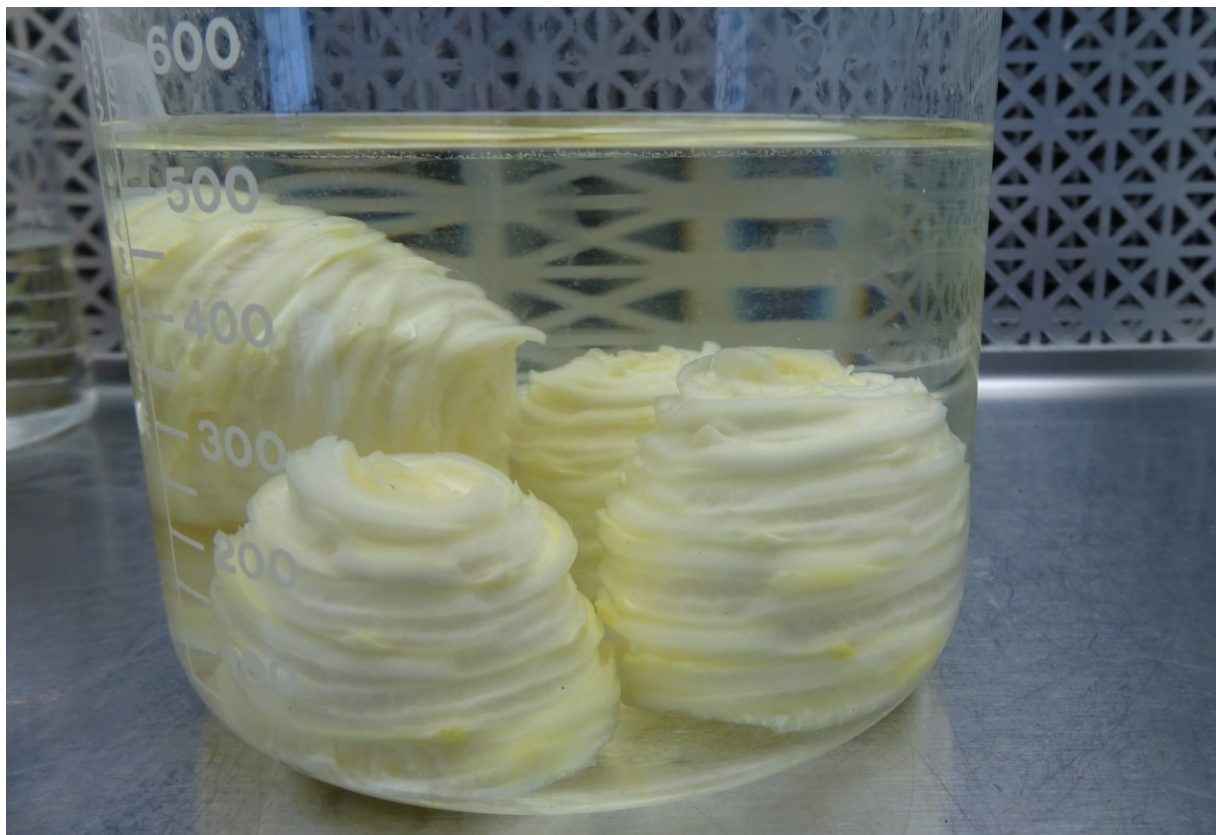


Imagen 6: Desinfección de cormos.

## 4.5 EXTRACCIÓN DE YEMAS

Las yemas axilares (*y*) son extraídas del cormo (*C*) con una proporción de tejido basal (*tb*) (imagen 7). Las yemas son extraídas haciendo dos cortes longitudinales y 2 cortes transversales, obteniendo una yema más un cubo de tejido basal, de aproximadamente 7 mm<sup>2</sup>. Finalmente se eliminan las partes afectadas en el tejido basal de las yemas (por efecto del desinfectante).

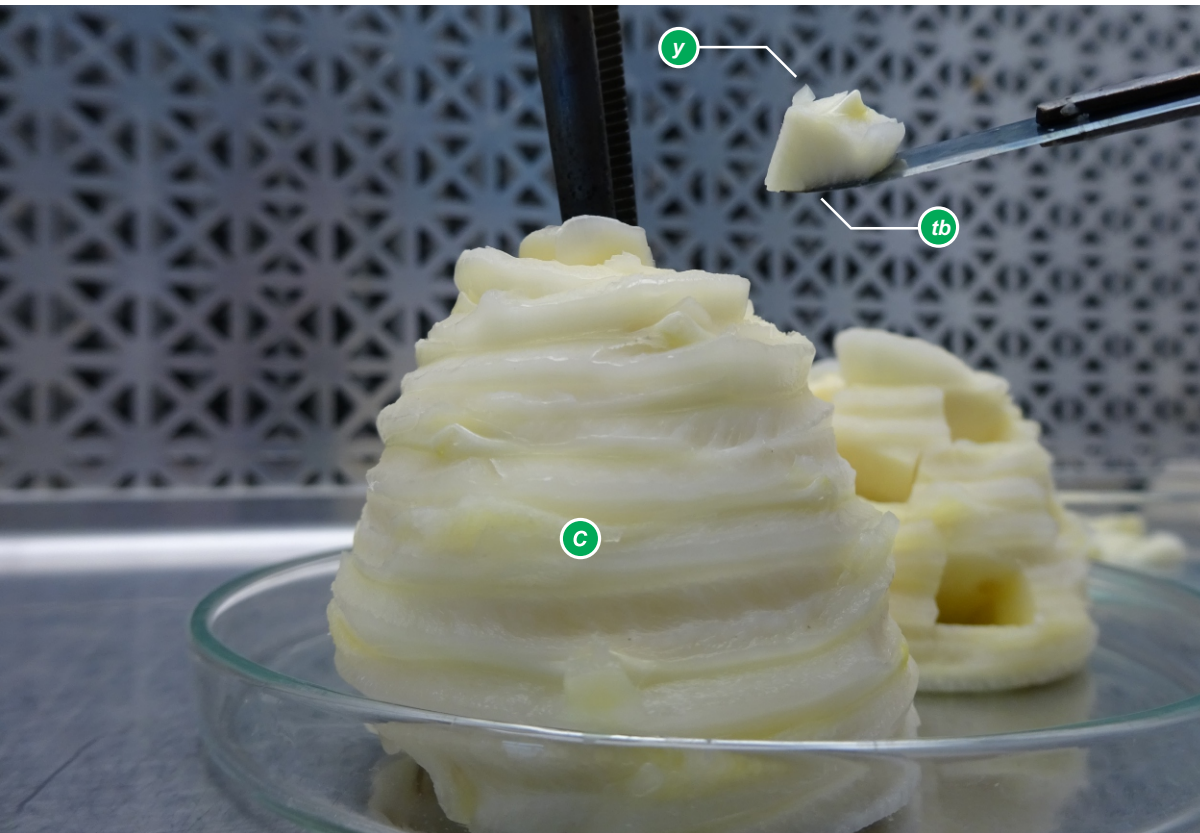


Imagen 7: Extracción de yemas axilares.

## 4.6 SEGUNDA DESINFECCIÓN E INTRODUCCIÓN *IN VITRO*

Las yemas axilares son tratadas con 0,5 % de hipoclorito de sodio por 5 minutos y posteriormente enjuagados tres veces con agua destilada estéril y son inoculadas en un medio de cultivo líquido (imagen 9) en agitación (65 rpm) para su diferenciación.

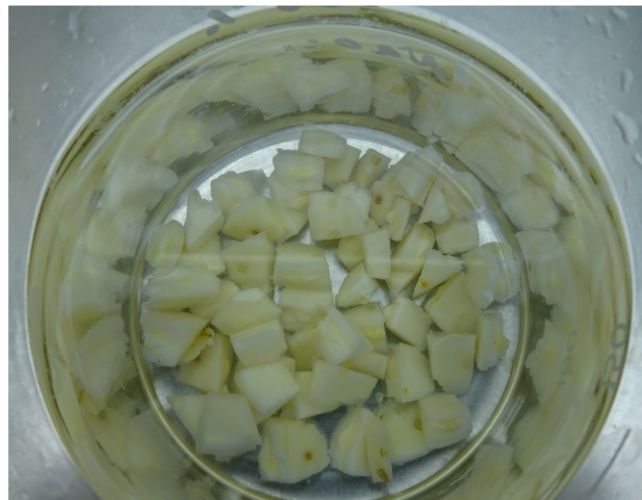


Imagen 8: Desinfección de yemas

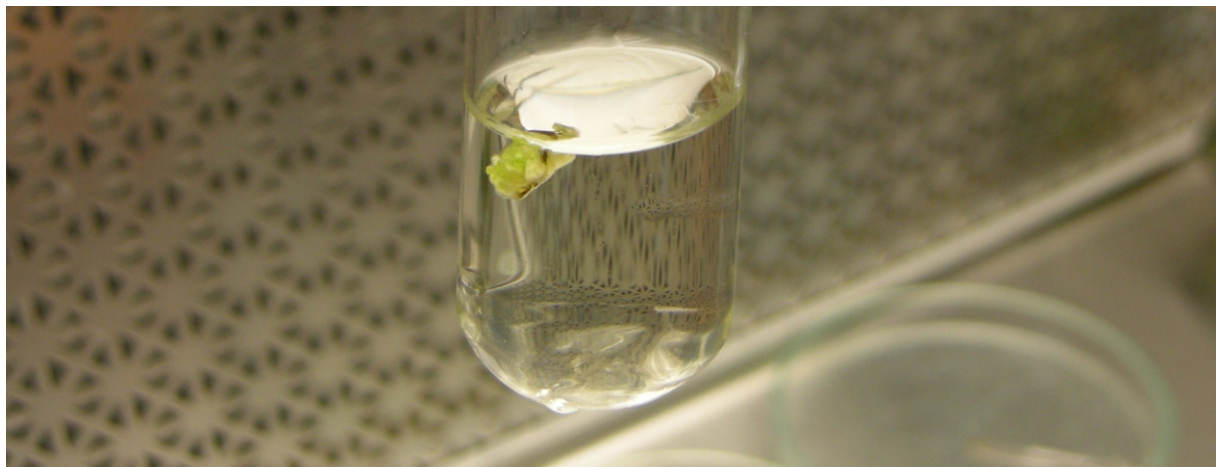


Imagen 9: Yema en medio de cultivo.

## 4.7 CONDICIONES DE CULTIVO *IN VITRO*

Para la diferenciación de yemas (imagen 10) y multiplicación de brotes (imagen 11) se empleó medios de cultivo líquido compuesto por sales minerales (Murashige & Skoog, 1962), a media concentración (diferenciación) y concentración completa (multiplicación) enriquecidos con vitaminas y reguladores de crecimiento para cada etapa.

### **Diferenciación:**

Thiamine-HCl 0,4 mg/L + ácido nicotínico 0,5 mg/l + 6-bencil amino purina (BAP) 3 mg/L + 10% (v/v) de endospermo líquido de coco + sacarosa 30 g/L.

### **Multiplicación:**

Thiamine-HCl 0,4 mg/L + ácido nicotínico 0,5 mg/l + 6-bencil amino purina (BAP) 2 mg/L + ácido naftalen acético (ANA) 0,3mg/L + sacarosa 30 g/L. Ambos medios de cultivo con un pH=5,8.

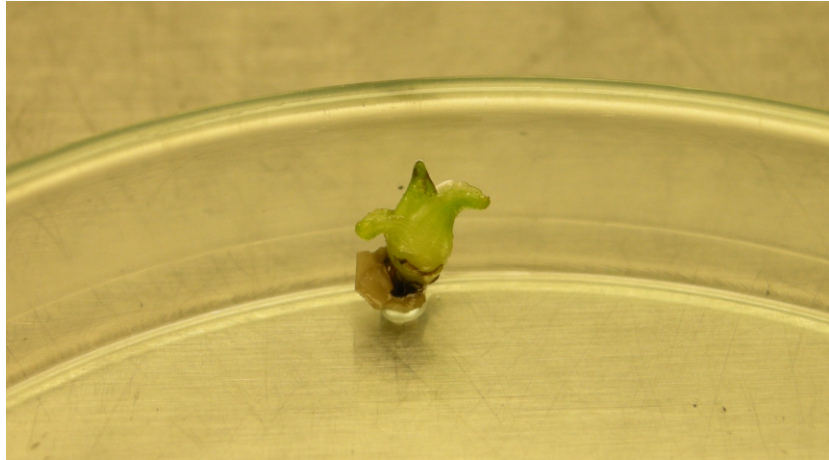


Imagen 10: Yema diferenciada.

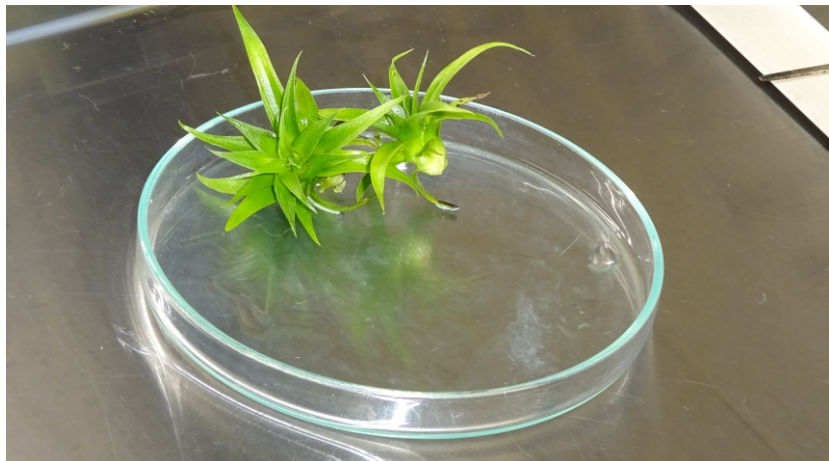


Imagen 11: Multiplicación de brotes de piña.



## 4.8 CONDICIONES DE INCUBACIÓN *IN VITRO*

Las condiciones de crecimiento en el área de incubación del laboratorio (imagen 12), para las dos etapas (diferenciación y multiplicación) es a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de 800 lux. A diferencia de la etapa de multiplicación, yemas que inician el proceso de diferenciación son expuestas inicialmente a condiciones de oscuridad total por 48 horas.



Imagen 12: Plántulas de piña en área de incubación.

## 4.9 ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE PLÁNTULAS EN SISTEMA CONVENCIONAL IN VITRO

La diferenciación y multiplicación de yemas (como se observa en la imagen 13), (durante cuatro subcultivos por 8 meses) permite obtener plántulas y clusters óptimos (imagen 14) para ser multiplicadas en un bioreactor de sistema de inmersión temporal.



Imagen 13: Yema diferenciada en medio de cultivo.



Imagen 14: Multiplicación de brotes de piña.

## 4.10 MULTIPLICACIÓN EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL UTILIZANDO BITS

Los explantes (plántulas) son acondicionados en contenedores para multiplicación y reciben una programación de inmersión de cuatro minutos por frecuencias repetidas cada cuatro horas. El sistema está constituido por dos recipientes de plástico de 4 litros cada uno (un contenedor de medio de cultivo y otro contenedor de plántulas), los dos recipientes están conectados por una manguera de plástico flexible, los cuales constituyen una unidad experimental. El flujo de aire es generado por un compresor, microfiltrado por filtros de venteo de  $0,2 \mu\text{m}$  y conducido al interior del contenedor del medio de cultivo que mediante presión interna (0,2 bar), hace posible la transferencia del medio de cultivo hacia el segundo recipiente de explantes, terminada la inmersión, el flujo de aire es invertido y por consiguiente una transferencia del medio hacia su contenedor original. El tiempo y frecuencia de inmersión es controlado por un temporizador digital.



## 4.11 PREACLIAMACIÓN DE PLÁNTULAS

Las plántulas de piña contenidas en los biorreactores (imagen 15) se trasladan a vivero de aclimatación, en el cual permanecen por espacio de 3-4 días, entre ese tiempo el frasco se abre poco a poco para que entren en contacto con las condiciones ambientales naturales (imagen 16).



Imagen 15: Plántulas de piña en biorreactores de inmersión temporal.



Imagen 16: Preaclimatación de plántulas de piña.

## 4.12 ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS

Luego de la preaclimatación de plántulas de piña, éstas son retiradas de los frascos contenedores (imagen 17) y son lavadas en agua destilada para eliminación de restos de medio de cultivo, así mismo se individualizan las plántulas de los clústers, con la finalidad de homogenizar el tamaño en las bandejas de aclimatación. Se realiza una inmersión en solución fungicida benomyl (1g/L), se deja secar por espacio de 20 minutos, finalmente se coloca 1 plántula en un tubete conteniendo el sustrato específico para aclimatación, como se aprecia en la imagen 18.



Imagen 17: Plántulas de piña listas para aclimatar.



Imagen 18: Plántulas de piña en tubetes.

### 4.13 SUSTRATO

Se recomienda 2 tipos de sustratos (imagen 19) para la aclimatación de plántulas de piña: fibra de coco y premix #3, ambos con buena capacidad de retención de humedad y aireación. Los sustratos son esterilizados en bolsas de polipropileno en autoclave a 121 °C y 15 lbs de presión por 30 minutos. Se deja enfriar por 1 día y se llenan los tubetes de las bandejas aclimatadoras. Cabe mencionar que si la producción es mayor y no se cuenta con equipo autoclave existen otros métodos de esterilización que funcionan exitosamente. Con estos tipos de sustratos las plantas se presentan más vigorosas como observamos en la imagen 20.

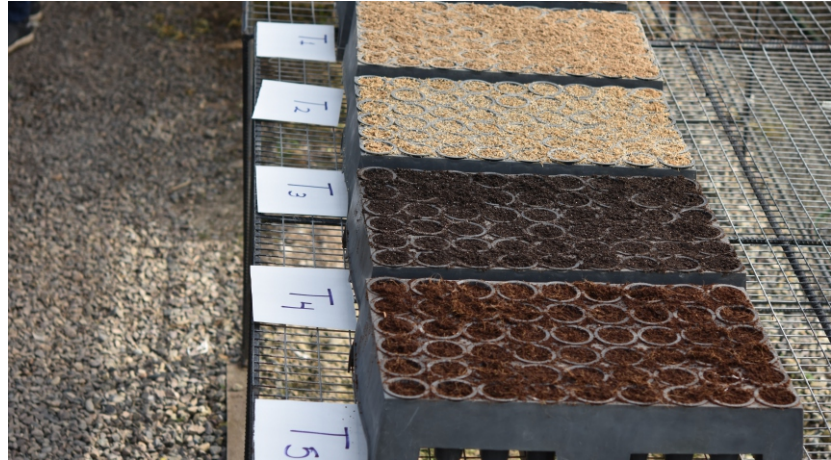


Imagen 19: Sustratos para aclimatación de piña.



Imagen 20: Plántulas de piña aclimatadas en sustrato premix #3.

#### 4.14 RIEGO

Con el tipo de sustrato mencionado, el riego puede realizarse 3 veces por semana (imagen 21 y 22), considerando un riego profundo en la cuarta vez para eliminar restos de sales que se acumulen, provenientes de la fertilización.



Imagen 21: Riego por sistema de microaspersión.



Imagen 22: Plántulas de piña con riego.

## 4.15 FERTILIZACIÓN

La fertilización debe ser aplicada en forma conjunta en el momento del riego, por medio de soluciones nutritivas NPK + Microelementos, considerándose una conductividad eléctrica (CE) de 1000  $\mu$ S. La aplicación se realiza 3 veces por semana en el agua de riego. Es necesario utilizar equipos de protección personal al momento de preparación y aplicación de fertilizantes, como lo apreciado en las imágenes 23 y 24.



Imagen 23: Preparación de soluciones nutritivas.



Imagen 24: Aplicación de fertilizantes.



## 4.16 CONTROL FITOSANITARIO

Se debe aplicar soluciones fungicidas e insecticidas solo si se tiene riesgo de ataque de plagas y enfermedades en vivero, para que las plantas estén sanas y vigorosas (imagen 25). Es necesario utilizar equipos de protección personal al momento de preparar y aplicar pesticidas.

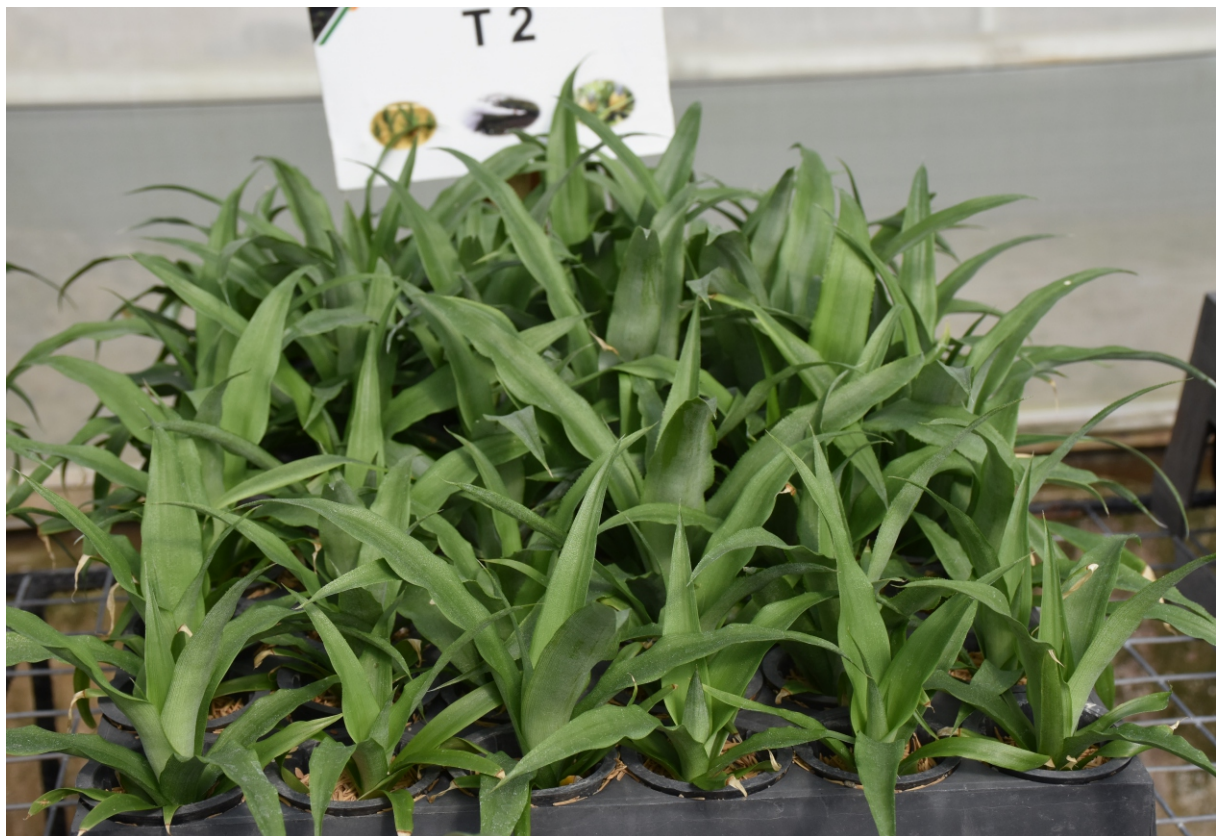


Imagen 25: Plantas sanas de piña Golden.

## 4.17 CONDICIONES AMBIENTALES DE ACLIMATACIÓN

Las plántulas deben estar bajo cobertura (imagen 26) que no permita la entrada de lluvia para poder controlar el riego y evitar pudriciones. Debe estar lo más iluminado posible, tener acceso de agua y en todo caso sistema de riego por microaspersión (imagen 27).



Imagen 26: Vivero de aclimatación.

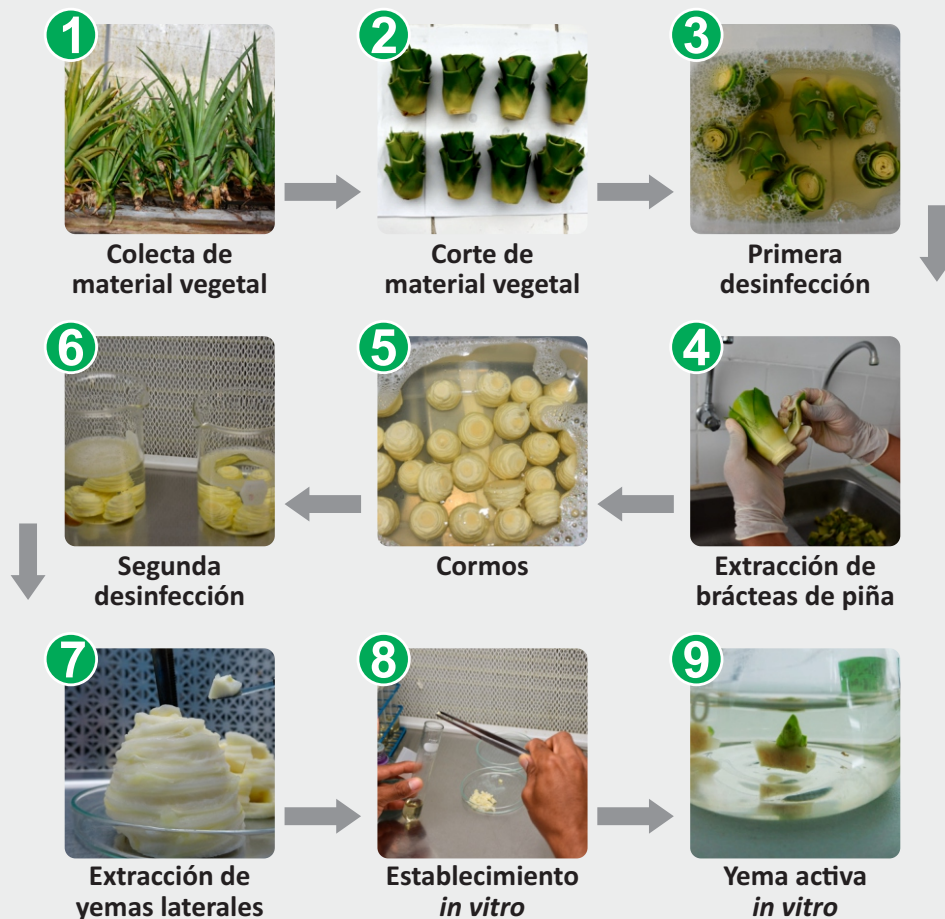


Imagen 27: Sistema de riego por microaspersión.  
(*m*=microaspersores)

# 5

## Flujogramas de la propagación *in vitro* de piña

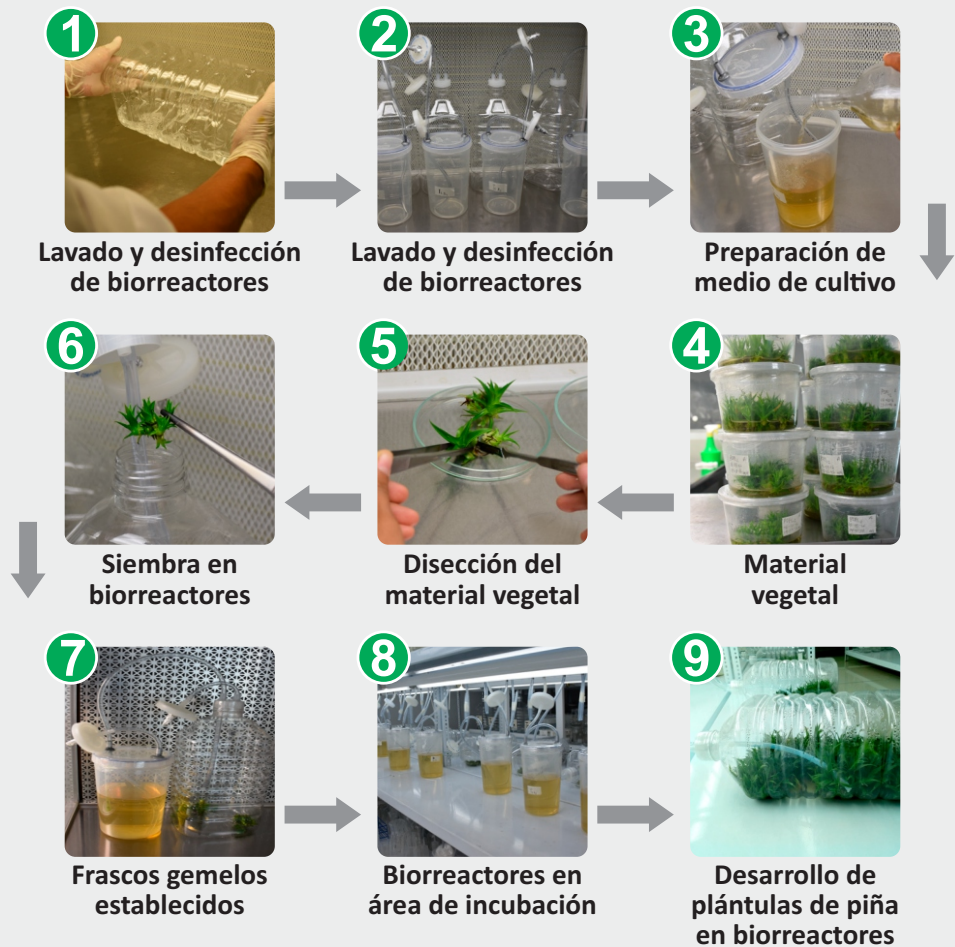
### 5.1 ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*



## 5.2 MULTIPLICACIÓN CONVENCIONAL *IN VITRO*



### 5.3 MULTIPLICACIÓN DE PLÁNTULAS DE PIÑA EN BITs



## 5.4 ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE PIÑA



**1**  
Preaclimatación de plántulas (3-4 días)



**2**  
Preparación de sustrato y llenado de bandejas



**3**  
Selección de plántulas por tamaño



**6**  
Secado



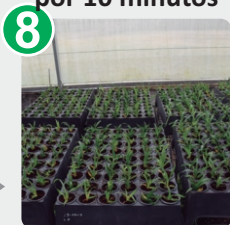
**5**  
Inmersión en solución fungicida (Benomyl 1 g/L) por 10 minutos



**4**  
Lavado de plántulas



**7**  
Siembra en sustrato



**8**  
Plántulas aclimatadas en vivero

# 6

## Composición de las soluciones stock

### 6.1 COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES STOCK

STOCK	REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK (g/l)
Stock A	<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b> Nitrato de amonio	82,5
Stock B	<b>KNO<sub>3</sub></b> Nitrato de potasio	95
Stock C	<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b> Cloruro de calcio dihidratado	88
Stock D	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> Fosfato de potasio monobásico	34
Stock E	<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b> Molibdato de sodio dihidratado	0,05
	<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b> Cloruro de cobalto hexahidratado	0,005
	<b>KI</b> Cloruro de potasio	0,166
	<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> Ácido bórico	1,23
Stock F	<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b> Sulfato de manganeso tetrahidratado	3,38
	<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b> Sulfato de magnesio heptahidratado	74
	<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b> Sulfato de zinc heptahidratado	1,725
	<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b> Sulfato de cobre pentahidratado	0,005
Stock G	<b>Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O</b> Disodium ethylenediaminetetraacetate dihidratado	1,865
	<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b> Sulfato ferroso heptahidratado	1,39

*Macro y micronutrientes. Formulación según Murashige & Skoog (1962), modificado.*

## 6.2 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Observaciones:

- Los medios de cultivo con pH inicial básico son ajustados con ácido clorhídrico (HCl).
- Los medios de cultivo con pH inicial ácido son ajustados con hidróxido de potasio (KOH).
- Los medios de cultivo se preparan 1 o 2 días antes de su uso.

### 6.2.1 Medio de inducción

REACTIVOS	VOLUMEN (1 000 ml)
A, B, G	10 ml
C, D, E, F	2,5 ml
Thiamina (1 000 ppm)	0,4 ml
Ácido nicotínico (1 000 ppm)	0,5 ml
Azúcar	30 g
ELC - Endospermo líquido de coco	100 ml
BAP - Bencilamino purine	3 mg
pH 5,7 (KOH - Hidróxido de potasio - 1M)	
Esterilización de autoclave	15 min.

*Murashige & Skoog, (1962) [1/2]*

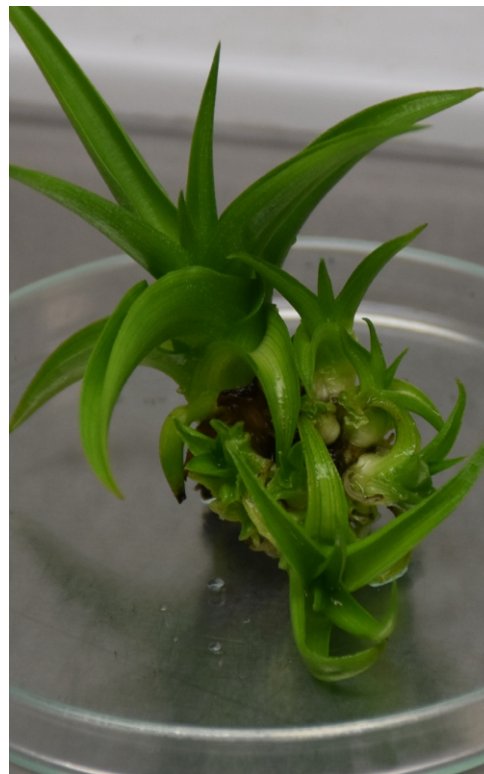




## 6.2.2 Medio de multiplicación *in vitro*

REACTIVOS	VOLUMEN (1 000 ml)
A, B, G	10 ml
C, D, E, F	2,5 ml
Thiamina (1 000 ppm)	0,4 ml
Ácido nicotínico (1 000 ppm)	0,5 ml
Azúcar	30 g
ELC - Endospermo líquido de coco	100 ml
BAP - Bencilamino purine	2,1 mg
ANA - Ácido Naphtalen acético	0,3 mg
pH 5,7 (KOH - Hidróxido de potasio - 1M)	
Esterilización de autoclave	15 min.

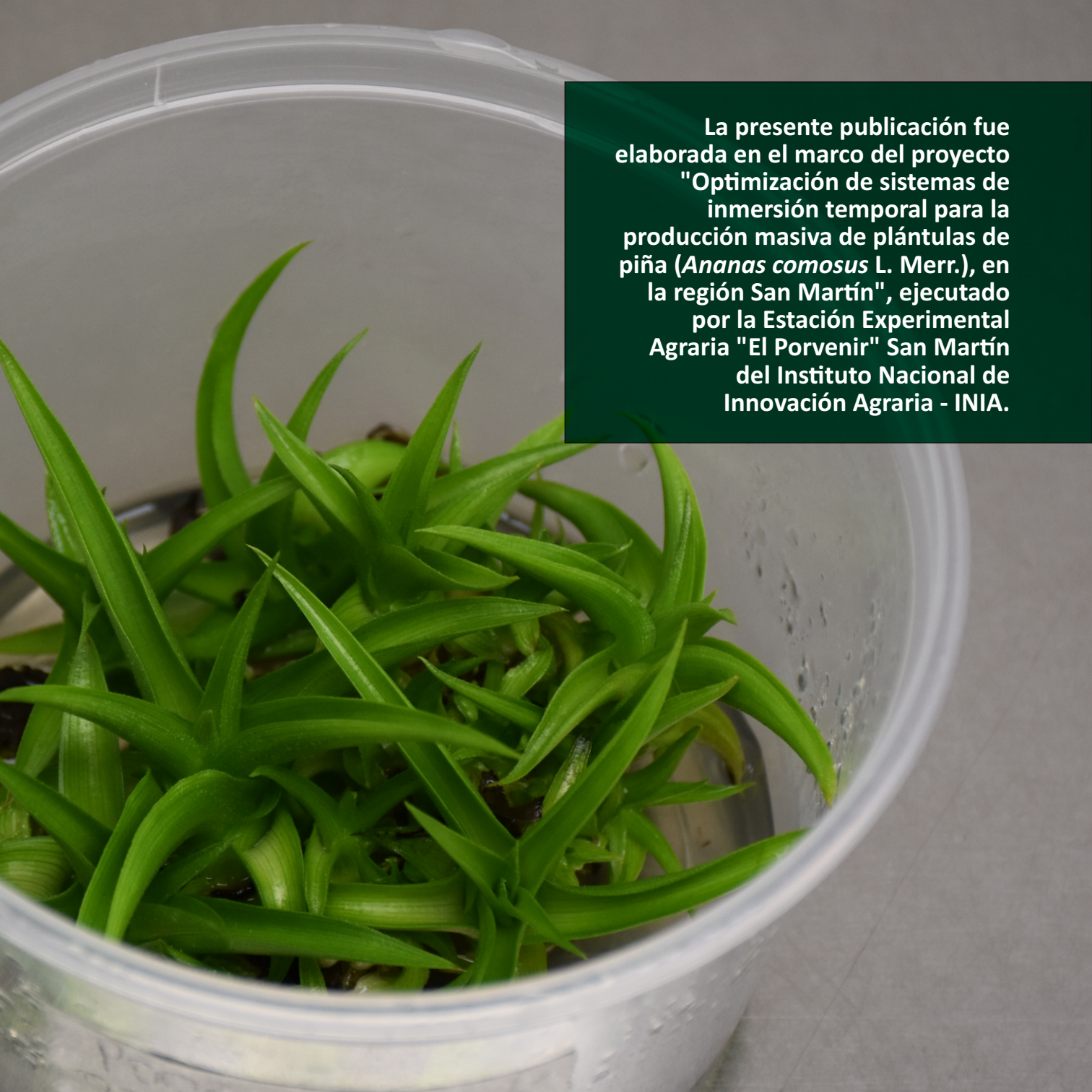
*Murashige & Skoog, (1962) [Total]*



# 7

## Glosario

- **BIORREACTOR**  
Es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico y biológico que involucra células, tejidos, organismos o sustancias bioquímicamente activas para hacerlas crecer.
- **EXPLANTE**  
Es cualquier parte de un organismo vivo, como las células, los tejidos, o los órganos, que son transferidos a un medio artificial para cultivo.
- **IN VITRO**  
Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo u otro frasco, en un ambiente controlado fuera de microorganismos.
- **PROPAGACIÓN**  
Es la multiplicación de plantas por medios vegetativos (asexuales).
- **PROTOCOLO**  
Es conocido como un procedimiento estándar de operaciones, una lista de instrucciones para realizar un experimento.
- **SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**  
Son sistemas semiautomatizados en la propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos.



La presente publicación fue elaborada en el marco del proyecto "Optimización de sistemas de inmersión temporal para la producción masiva de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), en la región San Martín", ejecutado por la Estación Experimental Agraria "El Porvenir" San Martín del Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA.



*Instituto Nacional de Innovación Agraria*

Av. La Molina 1981, La Molina  
Lima - Perú.  
(51 1) 240 2100 / 240 2350  
[www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe)

