



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
PIÑA *Ananas comosus* (L.) HÍBRIDO MD-2 Y SU
ESTABLECIMIENTO *in vitro***

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

JOSÉ ALFREDO GARCIDUEÑAS PAZ

CHAPINGO, MÉXICO, DICIEMBRE DE 2013



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



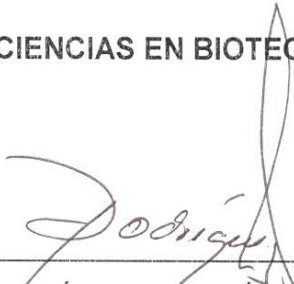
Instituto de Horticultura

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
PIÑA *Ananas comosus* (L.) HÍBRIDO MD-2 Y SU
ESTABLECIMIENTO *in vitro***

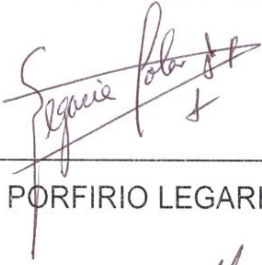
Tesis realizada por el Biól. José Alfredo Garcidueñas Paz, bajo la dirección del comité asesor indicado; aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____


DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

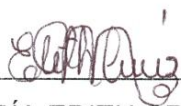
ASESOR: _____


DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

ASESOR: _____


DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PLIEGO

ASESOR: _____


M. C. MARÍA EDITH CRUZ MAYA

Chapingo, Estado de México, Noviembre de 2013

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor del presente trabajo nació en Tuxtepec, Oaxaca; el 16 de abril de 1987. Realizó sus estudios de licenciatura en el Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan, recibiendo el título de Licenciado en Biología en el periodo 2005-2010, su tema de tesis “Caracterización de especies del género *Trichoderma* en dos poblaciones de la región del Papaloapan” se realizó en la Universidad del Papaloapan y durante ese año trabajó en el Laboratorio de Biología como analista en el área de microbiología. En el 2011 ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola en el Departamento de Fitotecnia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

A la Universidad Autónoma Chapingo con mucho afecto por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica y así cumplir una meta más en mi vida profesional.

Al Departamento de Fitotecnia por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en cada uno de sus laboratorios.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por dirigir el trabajo de tesis, por todo su apoyo y por los conocimientos aportados.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por las asesorías y observaciones, por el tiempo dedicado y sus aportaciones para la elaboración de la presente tesis.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Pliego por las asesorías, el apoyo y recursos proporcionados.

A la M. C. Edith Cruz Maya por haberme ayudado en la extracción del ADN de mis muestras y asesorías brindadas.

A los Coordinadores del Posgrado: el Dr. Agustín López Herrera y el Dr. Juan Martínez Solís por estar al pendiente de mi formación académica.

Al Ing. Daniel Uriza Ávila por brindarme las asesorías en la producción de piña.

A Ángeles secretaria del posgrado por el apoyo y amistad.

Al futuro Ing. Agrónomo Iván Herbé Díaz Cázares por ayudarme en la colecta del material vegetal y brindarme su amistad.

A cada uno de los productores por facilitarme el material vegetativo para la presente investigación.

DEDICATORIA

A DIOS por haberme dado el don de la vida, por permitirme llegar a culminar esta etapa profesional y estar presente en cada momento difícil, triste y feliz.... Gracias

A mis padres José Alfredo e Imelda a quienes los quiero mucho, que me han dado gran parte de su vida y esfuerzo, por su preocupación, enseñanzas y valores, son el pilar fundamental de mi persona; no me alcanzaría la vida entera para pagarles todo lo que han hecho por mí.

A mi hermana Margarita Luisa que es parte de mi vida, con la que he compartido muchos momentos inolvidables desde niño.

A mis sobrinos Raúl y Esmeralda que son la luz y alegría de mi familia, por llenarme de momentos alegres y maravillosos.

A mi abuela Margarita que ha sido ejemplo y enseñanza, en afrontar la dificultad y adversidad de la vida.

A mis compañeros de la maestría generación 2011-2012 Julio, Juan, Marcos y Mayte; gracias por el apoyo, ayuda, consejos, tolerancia y amistad que me brindaron.

A mis compañeros de agroindustrias Julieta, Heydi, Deysi y Francisco por su apoyo y amistad brindada.

A mis nuevos amigos que conocí Clau Pao, Lupita, Iván, Pedro, Arturo, Martita y Estela gracias por estar conmigo en cada uno de los momentos de mi vida, me llevo su amistad de todo corazón.

A todas las personas que he conocido a lo largo de mi vida y que me han ayudado a crecer como ser humano, gracias.

Con todo mi afecto
José Alfredo Garcidueñas Paz

CONTENIDO

DATOS BIOGRÁFICOS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO	viii
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMEN GENERAL	xix
GENERAL ABSTRACT	xx
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general.....	6
1.2. Hipótesis general	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Taxonomía.....	7
2.2. Origen y distribución	8
2.3. Descripción botánica.....	11
2.3.1. Morfología	11
2.3.2. Tallo	12
2.3.3. Hojas	13
2.3.4 Raíces	15
2.3.5. Inflorescencia y fruto	15

2.4. Nombres comunes.....	19
2.5. Variedades.....	19
2.5.1. “Cayena Lisa”	20
2.5.2. “Singapore Español”	20
2.5.3. “Queen”	21
2.5.4. “Española roja”	21
2.5.5. “Perola”	22
2.6.6. “Manzana”	22
2.5.7. “Híbrido MD-2”	22
2.6. Citogenética.....	23
2.6.1. Nivel de ploidía.....	23
2.6.2. Mutaciones	24
2.6.2.1. Problemática comercial	24
2.7. Producción mundial del cultivo de piña.....	26
2.8. Producción nacional del cultivo de piña.....	31
2.10. Uso actual y uso potencial	34
2.11. Propagación vegetativa	35
2.11.1. Propágulos vegetativos	35
2.12. Cultivo <i>in vitro</i>	36
2.12.1. Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	37
2.12.2. Investigación en el cultivo <i>in vitro</i> de la piña	39
2.13. Marcadores moleculares.....	41
2.13.1. Reacción en cadena polimerasa PCR.....	46
2.13.2. RAPD	46
2.13.3. ISSR.....	49

2.13.4. Investigación en caracterización molecular en piña	50
CAPITULO III	51
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DOS POBLACIONES DE	51
PIÑA <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr HÍBRIDO MD-2	51
RESUMEN	52
ABSTRACT	53
3.1. INTRODUCCIÓN	54
3.1.1. Objetivos	57
3.1.2. Hipótesis	57
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.2.1. Localización del sitio experimental	58
3.2.2. Material experimental	58
3.2.3. Caracterización morfológica.....	58
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
3.3.1. Análisis de individuos normales y mutantes	65
3.3.2. Análisis de individuos normales	68
3.3.2.1. Análisis de componentes principales	72
3.3.3. Análisis de individuos mutantes	80
3.3.3.1. Análisis de componentes principales	87
3.4. CONCLUSIONES	97
3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	99
CAPITULO IV	101
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE PIÑA	101
<i>Ananas comosus</i> (L.) HÍBRIDO MD-2 MEDIANTE ISSR Y RAPD.....	101
RESUMEN	102

ABSTRACT	102
4.1. INTRODUCCIÓN	103
4.1.1. Objetivos	106
4.2.2. Hipótesis	106
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
4.2.1. Material vegetal	107
4.2.2. Extracción y amplificación de ADN.....	108
4.2.3. Análisis estadístico de la información.....	112
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	113
3.1.2. Análisis RAPD	122
4.4. CONCLUSIÓN.....	130
4.5. BIBLIOGRAFÍA.....	131
CAPITULO V	137
ESTABLECIMIENTO <i>in vitro</i> DE PIÑA <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr HÍBRIDO MD-2	137
RESUMEN	138
ABSTRACT	138
5.1. INTRODUCCIÓN	139
5.1.1. Objetivos	142
5.1.2. Hipótesis	142
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	143
5.2.1. Desinfección de los explantes.....	143
5.2.2 Fase de establecimiento	144
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	146
5.4. CONCLUSIONES.....	153
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	158

7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	160
8. ANEXOS	175

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Superficie cultivada mundial (Has/Año).	26
Cuadro 2.2. Producción mundial (Ton/Año).	27
Cuadro 2.3. Rendimiento en principales países (Kgs/Ha).	28
Cuadro 2.4. Principales países exportadores (Ton/Año).	28
Cuadro 2.5. Principales países importadores (Ton/Año).	30
Cuadro 2.6. Producción nacional de piña (Ton/año).	32
Cuadro 2.7. Datos del cultivo a nivel nacional en el año 2010.	32
Cuadro 2.8. Municipios productores de piña en Veracruz en el año 2010.	33
Cuadro 2.9. Trabajos realizados en cultivo <i>in vitro</i> en piña.	40
Cuadro 2.10. Principales marcadores bioquímicos y moleculares utilizados para la identificación de especies vegetales en la última década.	45
Cuadro 2.11. Caracterización molecular de piña usando diferentes marcadores moleculares.	50
Cuadro 3.1. Cuarenta y ocho caracteres morfológicos seleccionados de la guía de descriptores de IBPGR, 1990, evaluados en las colectas de piña.	60
Cuadro 3.2. Vectores propios y proporción explicada de 29 componentes principales, obtenidos a partir de 48 variables morfológicas de piña.	72
Cuadro 3.3. Contribución de las variables evaluadas a los cuatro primeros componentes.	73
Cuadro 3.4. Matriz de correlación para las variables cuantitativas de la población de individuos normales de piña.	75

Cuadro 3.5. Valores estadísticos para cada una de las variables morfológicas evaluadas en individuos normales.	76
Cuadro 3.6. Vectores propios y proporción explicada de 29 componentes principales, obtenidos a partir de 48 variables morfológicas de piña.	87
Cuadro 3.8. Matriz de correlación para las variables cuantitativas de la población de individuos mutantes de piña.	90
Cuadro 3.9. Valores estadísticos para cada una de las variables morfológicas evaluadas en individuos mutantes.	91
Cuadro 4.1. Individuos utilizados en el análisis, en las colectas realizadas en el estado de Veracruz, lugar y procedencia.	107
Cuadro 4.2. Iniciadores utilizados para generar los marcadores ISSR para la caracterización de individuos de piña.	109
Cuadro 4.3. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD para la caracterización de individuos de piña.	110
Cuadro 4.4. Nivel de polimorfismo obtenido con 5 iniciadores de ISSR en 28 individuos normales y mutantes de piña	116
Cuadro 4.5. Matriz de distancias genéticas para individuos normales y mutantes de piña a través de ISSR.	119
Cuadro 4.6. Nivel de polimorfismo obtenido con 5 iniciadores de ISSR en 28 individuos normales y mutantes de piña	123
Cuadro 4.7. Matriz de distancias genéticas para individuos normales y mutantes de piña a través de RAPD.	126
Cuadro 5.1. Tratamientos de los medios de cultivo.	145
Cuadro 5.2. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre la contaminación, la sobrevivencia, la oxidación y la brotación para 2 diferentes explantes de piña híbrido MD-2.	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Mapa de distribución mundial del cultivar “Cayena Lisa” .	10
Figura 2.2. Principales estructuras morfológicas de la planta de piña.	11
Figura 2.3. Hojas de la planta madre de piña.	14
Figura 2.4. Diagrama de la estructura morfológica del sincarpo que forma el fruto de la piña en su madurez.	16
Figura 2.5. Inflorescencia de la planta de piña.	17
Figura 2.6. Frutos maduros de la planta de piña	18
Figura 2.7. Mutaciones: a) fruto grande con corona múltiple, b) fruto pequeño con corona en forma de roseta, c) fruto grande con corona grande.	25
Figura 2.8. Mutaciones: d) fruto con presencia de cuello, e) fruto con corona en forma de roseta, c) fruto con corona grande	25
Figura 2.9. Producción Mundial de Piña (Toneladas Anuales).	27
Figura 2.10. Principales países exportadores de piña.	29
Figura 2.11. Principales países importadores de piña.	30
Figura 2.12. Participación de Veracruz en la producción de piña de 2010.	31
Figura 3.1. Variabilidad fenotípica de estructuras de piña: a) corona normal, b) coronas múltiples, c) coronas en forma de roseta, d) fruto normal, e) frutos grandes, f) frutos pequeños y deformes.	64
Figura 3.2. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos y cuantitativos mediante el	67

Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales y 40 individuos mutantes de piña.....	67
Figura 3.3. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos mediante el	69
Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales.	69
Figura 3.4. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos mediante el	70
Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales.	70
Figura 3.5. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos y cuantitativos mediante el.....	71
Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales.	71
Figura 3.6. Representación gráfica en 2D de los grupos formados con individuos normales de piña utilizando variables cuantitativas.....	77
Figura 3.7. Representación gráfica en 2D de los grupos formados con individuos normales de piña utilizando variables cualitativas.	78
Figura 3.8. Representación gráfica en 2D de los grupos formados con individuos normales de piña utilizando variables cuantitativas y cualitativas.	79
Figura 3.9. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos mediante el	84
Coeficiente de Concordancia Simple (SM) 40 individuos mutantes de piña.	84
Figura 3.10. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos mediante el	85
Coeficiente de Concordancia Simple (SM) 40 individuos mutantes de piña.	85
Figura 3.11. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos y cualitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) 40 individuos mutantes de piña.	86
Figura 3.12. Representación gráfica en 2D de los grupos formados por individuos mutantes de piña utilizando variables cuantitativas.....	92
Figura 3.13. Representación gráfica en 2D de los grupos formados por individuos mutantes de piña utilizando variables cualitativas.	93

Figura 3.14. Representación gráfica en 2D de los grupos formados por individuos mutantes de piña utilizando variables cualitativas y cuantitativas.	94
Figura 4.1. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne TC-512.	111
Figura 4.2. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los RAPD en el termociclador Techne TC-512.	111
Figura 4.3. Extracción de ADN genómico de piña y elaboración de geles de agarosa.	113
Figura 4.4. Gel de estandarización de 24 iniciadores ISSR con individuos normales y mutantes de piña.	115
Figura 4.5. Gel de estandarización de 24 iniciadores RAPD con individuos normales y mutantes de piña.	115
Figura 4.6. Patrones de bandeo de los genotipos de <i>Ananas comosus</i> híbrido.....	117
MD-2 evaluados con ISSR obtenidos con el iniciador U815.	117
Figura 4.7. Patrones de bandeo de los genotipos de <i>Ananas comosus</i> híbrido.....	117
MD-2 evaluados con ISSR obtenidos con el iniciador U834.	117
Figura 4.8. Dendrograma de agrupamiento de 28 individuos de piña, obtenido a partir de los datos moleculares.....	121
de 5 iniciadores ISSR.	121
Figura 4.9. Patrones de bandeo de los genotipos de <i>Ananas comosus</i> híbrido.....	124
MD-2 evaluados con RAPD obtenidos con el iniciador OPC08.....	124
Figura 4.10. Dendrograma de agrupamiento de 28 individuos de piña, obtenido a partir de los datos moleculares.....	127
de 14 iniciadores RAPD.	127
Figura 4.11. a) Individuos normales de piña. b) Individuos mutantes de piña.....	128
Figura 5.1. Efecto de los procesos de desinfección sobre la contaminación.	146
Figura 5.2. Efecto de los antioxidantes sobre los explantes de piña.	147

Figura 5.3. Diferentes niveles de L-cisteína para evitar la oxidación.....	148
Figura 5.4. Establecimiento <i>in vitro</i> de piña. a) lavado de cormos, b) proceso de desinfección, c) desinfección de cormos, d) localización de yemas axilares, e) cortes de yemas, f) yemas axilares, g) siembra de yemas axilares, h) explantes en medio sólido, i) primer brote a los ocho días, j) brotación de yemas axilares latentes a 30 días.	149

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) HÍBRIDO MD-2 Y SU ESTABLECIMIENTO *in vitro*

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) HYBRID MD-2 AND *in vitro* ESTABLISHMENT

Garcidueñas-Paz, J. A.¹ y Rodríguez-de la O, J. L.²

RESUMEN GENERAL

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr, es la especie más importante de la familia Bromeliaceae. México ocupa el noveno lugar con una participación del 3.6 % en producción. La alta variabilidad genética que se presenta en los cultivares y la carencia de plantas de calidad libres de enfermedades y patógenos son los principales factores de los bajos rendimientos que se tienen en nuestro país. El presente trabajo de estudio tuvo como objetivo caracterizar morfológica y molecularmente a dos poblaciones de piña y su establecimiento *in vitro*. La caracterización morfológica de dos poblaciones de piña se realizó con 48 descriptores de la guía del IBPGR. Los descriptores se dividieron en tres escalas de medición: cuantitativos, categóricos y ordinales en las estructuras de la planta madre, la fruta y corona. Las dos poblaciones se caracterizaron separando caracteres cuantitativos, cualitativos y en combinación. La caracterización morfológica estableció a los 40 individuos mutantes en las siguientes siete categorías: I) Frutos grandes con la corona múltiple, II) Frutos grandes con la corona grande, III) Frutos pequeños con la corona en forma cónica, IV) Frutos pequeños con la corona en forma cónica y presencia de fisura, V) Frutos con la corona en forma de roseta, VI) Frutos espinosos con la corona en forma cilíndrica, VII) Frutos con la corona en forma cilíndrica. La caracterización

molecular de las dos poblaciones de piña se realizó con ISSR y RAPD. Se probaron 25 iniciadores ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas) y 25 iniciadores RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) en 28 materiales. Sólo 5 iniciadores ISSR y 14 iniciadores RAPD detectaron polimorfismo, y los RAPD fueron superiores que los ISSR en porcentaje de polimorfismo (91.56 y 78.66, respectivamente). En la población de individuos normales y mutantes a partir de los ISSR se diferenciaron siete grupos a un Coeficiente de Jaccard de 0.74, y los RAPD diferenciaron en catorce grupos a un Coeficiente de Jaccard de 0.68. Los agrupamientos generados tanto por ISSR como por RAPD fueron similares. El establecimiento *in vitro* de los explantes resultó la etapa más crítica para la micropropagación de la piña, debido a la alta contaminación que se presentó. El mejor proceso de desinfección se obtuvo utilizando Timsen al 100% de 1-3 min, H₂O₂ DE 3-5 min, NaOCl 20 % durante 18 min y bactericida por 10 min disminuyó un 90 % de contaminación. Utilizando la L-cisteína como antioxidante a 140 mg.L⁻¹ disminuyó a un 100 % la oxidación de los explantes. Se utilizaron 31 tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y 2 testigos, únicamente 3 tratamientos promovieron la brotación en porcentajes menores al 20 %, las yemas axilares como fuente de explante tuvieron la mejor respuesta a brotación.

GENERAL ABSTRACT

Pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr, is the most important species of the Bromeliaceae family. Mexico ranks ninth with a share of 3.6 % in production. The high genetic variability that occurs in cultivars and lack of quality plants free of diseases and pathogens are the main factors of low yields that are working in our country. The present study was to characterize morphologically and molecularly two populations of pineapple and *in vitro* establishment. Morphological characterization of two populations of pineapple was performed with 48 descriptors guide IBPGR. The descriptors were divided into three measurement: quantitative, categorical and ordinal in the structures of the mother plant, fruit and crown. The two populations were characterized by separating quantitative, qualitative and in combination. Morphological characterization of 40 individuals established mutants in the following seven categories: I) large fruit with multiple crown, II) large fruits with large crown, III) small fruits with conical crown, IV) small fruits with conical crown and the presence of cleft, V) fruits with rosette shaped crown, VI) spiny fruits with cylindrical crown, VII) fruit with cylindrical crown. The molecular characterization of two populations of pineapple was

performed with ISSR and RAPD. 25 primers ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) primers and 25 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) in 28 materials were tested. Only 5 ISSR primers and 14 RAPD primers detected polymorphism, and RAPS were higher than the percentage of ISSR polymorphism (91.56 and 78.66, respectively). In the population of normal and mutant individuals the ISSR seven groups to a Jaccard coefficient of 0.74 differed, and differed in fourteen RAPD groups to a Jaccard coefficient of 0.68. Clusters generated by both RAPD and ISSR were like. The *in vitro* establishment of explants was the most critical stage for micropropagation of pineapple, due to the high pollution was presented. The disinfection process is best obtained using 100% Timsen 1-3 min 3-5 min H₂O₂, 20 % NaOCl for 18 min and 10 min decreased bactericidal by 90 % contamination. Using the L-cysteine as antioxidant to 140 mg.L⁻¹ decreased to 100% oxidation of the explants. 31 treatments with different concentrations of growth regulators and 2 witnesses were used, only 3 treatments promoted sprouting in percentages below 20 %, the axillary buds as explant source had the best response to sprouting.

¹Estudiante de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

²Profesor-Investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México–Texcoco. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. México.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr; es la especie más importante de la familia Bromeliaceae (Chao *et al.*, 2007; Collins, 1951; Leal y Coppens d'Eeckenbrugge, 1996; Luther, 2004; Páez, 1998; Ruas, 1995; Uriza Ávila, 2005). Es la segunda fruta tropical más importante en el mundo después del mango, la demanda internacional de la piña sigue en crecimiento principalmente debido a los diferentes hábitos alimenticios de los consumidores americanos y europeos que consideran a esta fruta tropical como una de las más finas del mundo, destacando en ella su agradable sabor, aroma y su contenido de vitamina C (FAO, 2010).

La producción mundial está dominada por el Sureste Asiático, en donde sobresalen Filipinas, Tailandia e Indonesia, en América los principales productores son Brasil y Costa Rica. Estos cinco países en su conjunto aportaron en 2010 el 49.3 % de los 19.4 millones de Ton producidas. En este ámbito México ocupó el noveno lugar con una participación del 3.6 % (FAO, 2010).

En México, el cultivo de la piña ocupa aproximadamente una superficie de 31 mil hectáreas. Las zonas productoras de piña en nuestro país, se caracterizan porque se encuentran en algunas regiones específicas de algunos estados. Los principales estados en donde se concentra el 97 % de la producción son: Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Nayarit (SIAP, 2012). El estado de Veracruz figura como el principal productor de piña contribuye con el 73.4 % de la producción nacional, alta superficie cosechada (Has) y mayor valor de la producción, la principal región productora se ubica en zona del Bajo Papaloapan o Cuenca del Papaloapan y abarca los municipios de Villa Isla, Juan Rodríguez Clara y Villa Azueta (SIAP, 2012).

En el país la piña alcanza rendimientos de alrededor de 42 Ton/Ha siendo menor que en otros países como Panamá, que supera los 80 Ton/Ha e Indonesia con 69 Ton/Ha (Dussel, 2002; FAO, 2010).

Estos bajos rendimientos se deben principalmente a la carencia y la calidad de las plantas ya que la tasa de multiplicación es muy baja en forma natural (Gallardo, 1995; Griffith, 1998; Mogollón *et al.*, 2004; Montilla, 1992), el tiempo requerido para la fructificación, a partir de la siembra de propágulos, es cercano a un año (Roostika y Mariska, 2003). La propagación por el método convencional (vegetativo) de las plantas de piña produce un número muy limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para la plantación a gran escala. Además de la limitación del método convencional las plantaciones se encuentran infestadas de una gran variedad de patógenos, aunado a la falta de material vegetativo con calidad seleccionada, lo cual resulta en un decremento gradual en su vigor, calidad y rendimiento (Blanco *et al.*, 2011; Guzmán, 1988).

De tal manera que uno de los problemas fitosanitarios más importantes en el cultivo de la piña, lo constituyen las enfermedades causadas por insectos, hongos y bacterias que producen marchitamiento, la pudrición de la base del tallo, enfermedades propiciadas por *Fusarium sp.* que perjudican el cultivo afectando negativamente la producción comercial del fruto (Blanco, 2011; Coppens *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002; Santos y Matos, 1995).

Problemas que se ven favorecidos por la forma tradicional de propagación (coronas, brotes, bulbillos, hijuelos y otros), y por la falta de cuidado en el manejo fitosanitario de material madre, lo cual permite que las enfermedades se transmitan en cada generación (Guzmán, 1988).

Por lo anterior, es de primordial importancia contar con un método de propagación rápido para reproducir suficientes plantas de mejor calidad a fin de incrementar los rendimientos en el cultivo de la piña en nuestro país.

El cultivo *in vitro* es una alternativa biotecnológica que permite la propagación masiva de plantas de piña libres de enfermedades y en tiempos relativamente cortos (Blanco, 2011; Gallardo, 1995; Smith, 2000). El método de micropropagación ha sido utilizado por diferentes autores, obteniéndose diversos protocolos para el establecimiento de cultivo *in vitro* de la piña (Casale y De García, 1987; De García *et al.*, 2008; Mogollón *et al.*, 2004; Saucedo *et al.*, 2008; Sripaoraya *et al.*, 2003).

Sin embargo, la práctica del cultivo *in vitro*, puede presentar el inconveniente de ocasionar variación somaclonal en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas de los mismos. La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Anu *et al.*, 2004; Brar y Brar, 1998; Kaeppler *et al.*, 2000; Larkin y Scowcroft, 1981; Mujib, 2004; Navarro y Perea 1996; Pierik, 1998; Sahijram *et al.*, 2003). Cuando la variación somaclonal es heredable se le asocia con rearrreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez *et al.*, 2003; Noro *et al.*, 2007). Por otro lado, cuando la variación somaclonal es epigenética, puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable (Pierik, 1998; Kaeppler *et al.*, 2000; Jain, 2001; Smulders, 2005), que puede estar asociado a alteraciones en los patrones de metilación del ADN (Kubis *et al.*, 2003).

La variación somaclonal es indeseable en casos donde se desea mantener la uniformidad y características con valor agronómico, puede detectarse por cambios fenotípicos visibles (Ahloowalia, 1998; Brar y Brar 1998; Sahijram *et al.*, 2003).

El cultivar de piña más utilizado actualmente en México es el híbrido MD-2, debido a su calidad y altos rendimientos (Rebolledo *et al.*, 2006; Uriza Ávila, 2005). Fue a finales de la década de los 90 cuando se introdujo este cultivar en nuestro país, sin embargo, la falta de material vegetal para la propagación y gran demanda por parte de los productores fueron los principales factores para recurrir a la técnica de cultivo *in vitro* para el abastecimiento de plantas; estos materiales fueron incorporados al campo junto a los propagados vegetativamente, pero nunca se estableció un programa de manejo agronómico para su evaluación y monitoreo, esto provocó la pérdida de la ubicación y mezcla de ambos materiales. No obstante el híbrido MD-2 ha comenzado a sufrir altas tasas de mutación, dentro de las mutaciones sobresalen los frutos grandes, frutos pequeños, la corona múltiple, pequeña, grande, con presencia de espinas o en forma de roseta; esto ha perjudicado en gran medida a los productores para la comercialización y exportación de la fruta fresca, ya que las piñas son rechazadas por no cumplir las normas de estandarización y calidad, provocando graves pérdidas económicas.

La caracterización morfológica es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación. Las características morfológicas se han venido utilizando para estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas y conservar los recursos genéticos. A la fecha, los marcadores morfológicos establecen las bases para identificar y diferenciar variedades, pero presentan las siguientes limitantes: su obtención es tardada, son métodos complejos, limitados, subjetivos, el fenotipo está influenciado por el ambiente donde se desarrolla, son costosos e involucran estados de desarrollo específicos del cultivo (Adugna *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2005; Valadez *et al.*, 2001; Yasmin *et al.*, 2006).

Por otro lado, los avances en la biología molecular han permitido el desarrollo de métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros,

presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Rallo *et al.*, 2002;).

Los marcadores moleculares, que han revolucionado la forma de conducir los estudios sobre diversidad genética, incluyen aquellos basados en la PCR tales como el polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias (RAPD), así como las intersecuencias simples repetidas (ISSR). Por lo que las técnicas moleculares han resultado altamente informativas en la caracterización de materiales altamente emparentados. Los marcadores tipo RAPD e ISSR son simples, económicos y rápidos (Orona *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2010; Yasmin *et al.*, 2006).

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivos establecer un método para la obtención y propagación de plantas de piña, así como realizar la caracterización morfológica y molecular de dos poblaciones.

1.1. Objetivo general

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan el establecimiento de plantas de piña *Ananas comosus* (L.) Merr., conocer la variabilidad morfológica y molecular existente de dos poblaciones de piña del estado de Veracruz, dada la importancia que ocupa el cultivo en la producción nacional y estatal, así como determinar las relaciones de parentesco entre las accesiones, mediante el empleo de marcadores morfológicos y moleculares tipo ISSR y RAPD.

1.2. Hipótesis general

Con la evaluación de diferentes variables podrán optimizarse los requisitos *in vitro* que permitan el establecimiento de piña *Ananas comosus* (L.) Merr., el análisis morfológico y molecular generado con base en sus diferencias y similitudes genómicas permitirá inferir las relaciones existentes entre los 40 individuos normales y mutantes de cada una de las poblaciones de piña.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Taxonomía

Reino: *Planta*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Subclase: *Commelinidae*

Orden: *Bromeliales*

Familia: *Bromeliaceae*

Subfamilia: *Bromelioideae*

Género: *Ananas*

Especie: *comosus*

Nombre científico: *Ananas comosus* (L.) Merr.

2.2. Origen y distribución

Las bromelias (Bromeliaceae) son originarias principalmente de América subtropical y tropical, comprenden aproximadamente 56 géneros y 3000 especies (Luther, 2004). La piña *Ananas comosus* (L.) Merr es la especie más importante de la familia Bromeliaceae, originaria de un lugar no especificado de Sudamérica (Chao *et al.*, 2007; Collins, 1951; Leal y Coppens d'Eeckenbrugge, 1996; Luther, 2004; Páez, 1998; Ruas, 1995; Uriza Ávila, 2005). Los estudios de diversidad sugieren que se originó entre Brasil, norte de Argentina y Paraguay en los bordes meridionales del Amazonas (es decir, la zona de nacimiento de la Cuenca del Plata), desde donde se difundió al curso superior del Amazonas, la zona de Venezuela y las Guayanas (Páez, 1998).

Antes del descubrimiento de la piña por Cristóbal Colón el 4 de noviembre de 1493 (Morrison, 1963), el fruto ya era un componente estable del complejo vegetativo de los cultivos y en la dieta de los nativos americanos en las tierras bajas tropicales (Laufer, 1929). Los exploradores europeos quedaron impresionados por esta fruta abundante y deliciosa, con frecuencia se menciona y describe en sus crónicas. En algunos casos, los propios europeos podrían haber contribuido a la dispersión de la piña en el continente. De hecho, diversas plantas introducidas por Colón desde las Islas Canarias desde su segundo viaje fueron distribuidas por los indígenas en toda América tropical en menos de dos décadas. Por otro lado, si los indígenas dispersaron estos nuevos cultivos con tanta rapidez, muy probablemente habían hecho lo mismo con la piña mucho antes de Colón.

Otros indicios apuntan a la antigüedad del cultivo de piña. Por lo tanto, los nombres “nanas” y “ananas” fueron ampliamente utilizados en toda América del Sur y el Caribe. Los primeros exploradores europeos observaron un alto grado de domesticación y selección expuesta en las piñas que encontraron. Los amerindios distinguían fácilmente las variedades domesticadas de los tipos silvestres y habían

desarrollado un profundo conocimiento de la agronomía de los cultivos, incluyendo su ciclo de producción. Específicamente en variedades adaptadas (por ejemplo, “Andina” “Petrolera” y “Manzana”) encontraron variación en la producción de fruta y calidad. Cinco siglos de trabajo adicionales por horticultores talentosos y fitomejoradores modernos no han contribuido significativamente a la variedad de tipos domesticados (Leal and d'Eeckenbrugge, 1996; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997).

Desde principios de 1500, la piña fascinó a los europeos, que la cultivaron en invernaderos. El primer cultivo exitoso en invernadero fue por Le Cour, al final del siglo XVII, cerca de Leyden. Él publicó un tratado sobre la horticultura de piña, incluyendo forzar a las plantas en flor. Plantas de piña eran distribuida desde los Países Bajos a los jardineros ingleses en 1719 y en Francia en 1730 (Gibault, 1912). El cultivo de piña se expandió en invernaderos europeos durante los siglos XVIII y XIX, se importaron muchas variedades, principalmente de las Antillas.

La ahora famosa variedad Cayena Lisa ('Smooth Cayenne ') se introdujo desde la Guayana Francesa por Perrotet en 1819 (Perrotet, 1825). “Cayena Lisa” y “Queen” fueron distribuidas desde Europa a todas las regiones tropicales y subtropicales. (Collins, 1951). Los españoles y los portugueses dispersaron otras variedades, como “Singapore español”, a África y Asia durante los grandes viajes de los siglos XVI y XVII. Sin embargo, la diversidad de estas variedades es todavía insignificante en comparación con la variación que se encuentra en América (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997). A mediados del siglo XIX se desarrollaron rutas comerciales cortas en lugar de un entorno de producción de piña óptima. La producción en Florida, las Bahamas, Cuba y Puerto Rico suministran el mercado de América del Norte y de las Azores en el mercado europeo (Py *et al.*, 1987). El procesamiento comercial de la piña se inició en Hawái al final del siglo XIX.

La invención y perfeccionamiento de la máquina de pelado y extracción de muestras automática por Henry Ginaca permitieron el desarrollo de una industria conservera económicamente viable a gran escala. Otras operaciones de enlatado importantes comenzaron en la misma época en el sudeste asiático (Malasia en 1888, Taiwán en 1902, Filipinas en 1920) Australia, África del Sur, el Caribe (Martinica, Cuba y Puerto Rico) y Kenia. La Segunda Guerra Mundial arruinó la industria de Asia Sur-Oriental y destruyó el comercio internacional. Hawái ganó una sólida posición de liderazgo que se prolongó hasta el desarrollo de nuevos competidores entre 1950 y principios de 1960 (Py *et al.*, 1987). En el siglo XX se introduce el cultivar “Cayena Lisa” a países tropicales como son Taiwán, Filipinas, Fiji, México, Cuba y Haití. La Figura 2.1 muestra dos grandes centros de distribución de la variedad Cayena Lisa a otras áreas (Collins, 1951).

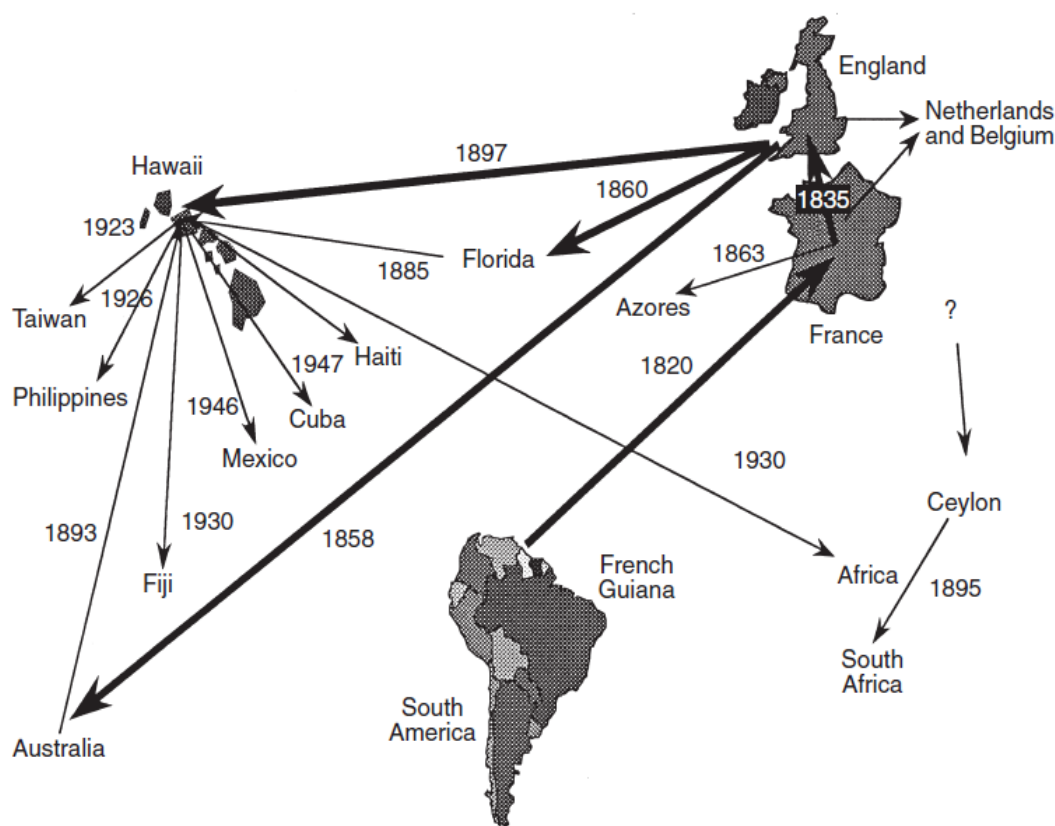


Figura 2.1. Mapa de distribución mundial del cultivar “Cayena Lisa”.

2.3. Descripción botánica

2.3.1. Morfología

La piña es una herbácea perenne, cuya inflorescencia terminal da origen a una fruta múltiple. Después de la maduración de los primeros frutos, la planta desarrolla nuevos brotes a partir de yemas axilares, para producir nuevos ejes de crecimiento capaces de producir otro fruto (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Samson, 1991). La planta adulta es de 1 - 2 m de altura y 1 - 2 m de ancho, y está inscrita en la forma general de un trompo (Bartholomew *et al.*, 2002; Krauss, 1948; Okimoto, 1948; Samson, 1991).

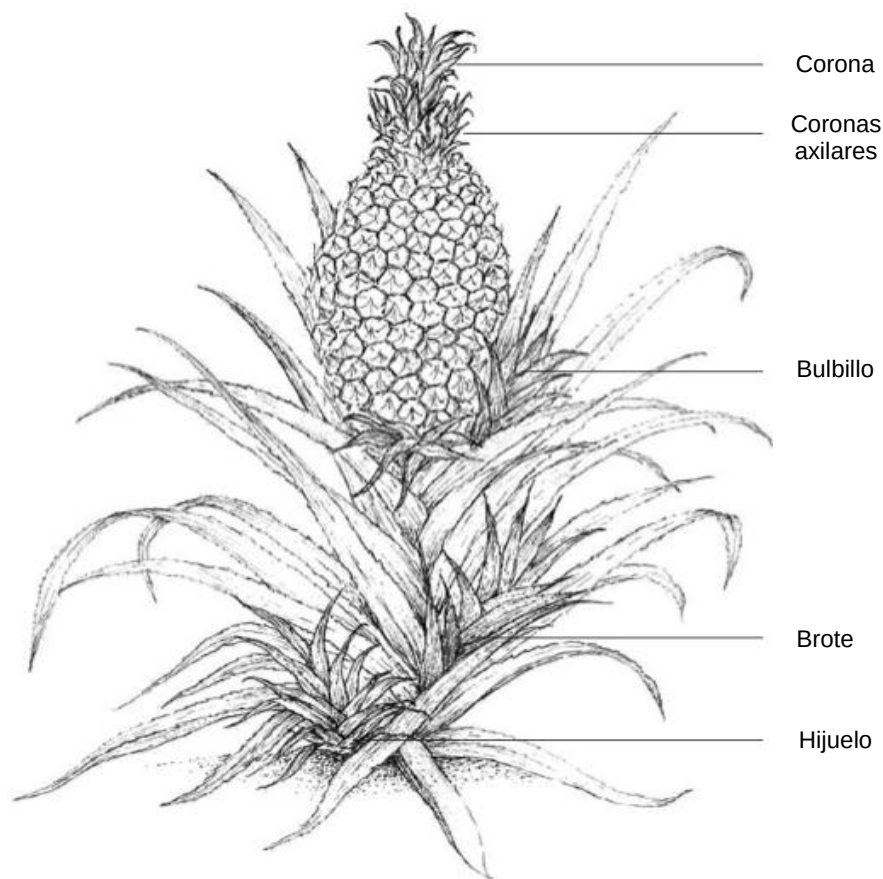


Figura 2.2. Principales estructuras morfológicas de la planta de piña.

2.3.2. Tallo

El tallo es en forma de bastón, con una longitud de 25 a 50 cm y una anchura de 2-5 cm en la base y 5-8 cm en la parte superior. Su parte aérea es recta y erecta. Se curva marcadamente cuando viene de un hijuelo, como los tallos de estos propágulos son en forma de coma, es menos curvado cuando viene de un retoño y erecto al venir de una corona (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Jiménez, 2000; Samson, 1991).

Los nudos pueden ser visualizados por las cicatrices de las hojas después de quitar las hojas del tallo. Los entrenudos son cortos (1-10 mm en función de su posición). Una característica notable del tallo de piña es la presencia de raíces adventicias a través de la epidermis, creciendo aplanadas y distorsionadas, enrolladas alrededor del tallo, entre las hojas. Estas raíces aéreas raramente producen laterales. Son alargadas desde unos pocos milímetros en la región subapical a 10 cm o más cerca de la base del tallo. Por lo tanto, la parte subterránea del tallo está cubierta con un mechón de raíces adventicias fibrosas (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Samson, 1991).

El tallo constituye un cilindro central, y una corteza, separadas por una capa delgada de haces vasculares producidos por el meristemo apical en forma de cúpula. La densa red de tejido vascular que separa la corteza y la estela consiste principalmente de xilema, con muy poco floema. Este cilindro vascular es más grueso en la base del tallo. Las haces vasculares son muy numerosas en todo el tallo, pero no tanto en la corteza. La corteza se compone de un tejido parenquimatoso, atravesada por los haces vasculares aislados que van a las hojas, de las raíces adventicias. El parénquima interno de esta corteza es rico en almidón y contiene rafidios. La epidermis cubre al tallo externamente con tricomas en las regiones nodales (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007).

2.3.3. Hojas

Las hojas sésiles encierran el tallo en dos terceras partes de su circunferencia, el número de hojas es variable, en promedio va de 40 - 80. Las hojas inferiores, originarias del material del cultivo son más pequeñas 5 - 20 cm en comparación con las más jóvenes, que pueden alcanzar más de 1.6 m de largo y 7 cm de ancho, dependiendo de la variedad y condiciones ecológicas. Las hojas apicales son cortas, erectas, ensiformes y excepto para las más pequeñas apicales, más amplias en su base, que forman una vaina no clorofílica alrededor del tallo. El estrés temporal durante el crecimiento puede causar variaciones en la anchura o espinosidad (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Kerns *et al.*, 1936; Samson, 1991).

Las hojas son semirrígidas, gracias a su sección de forma de media luna, esto permite a la planta a recoger el agua en la roseta, donde puede ser absorbida por las raíces adventicias del tallo. La cara adaxial cóncava es de color verde oscuro, con algunas antocianinas, a rojo oscuro o púrpura, de acuerdo a la variedad y condiciones (Figura 2.3). El lado abaxial es convexo, con una superficie corrugada por ranuras longitudinales. Ambas partes están cubiertas por tricomas peltados, particularmente el abaxial, que es densamente furfuráceo y plateado. Los márgenes de las hojas son generalmente espinosos, sin embargo en algunas variedades son lisos (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Samson, 1991).

Las hebras de fibra confieren una alta resistencia a la rotura de las hojas. La densidad estomática es muy baja, alrededor del 80 estomas mm². Los tricomas, son planos y en forma de escudo, paralelos a la superficie de la hoja. Se componen de un disco central de células vivas, un anillo exterior de las células muertas y un tallo pluricelular derivado de la epidermis y de la subepidermis (Bartholomew *et al.*, 2002).

Las células muertas pueden absorber agua y nutrientes, el tallo los puede llevar a los tejidos interiores de la hoja. La presencia de un gran número de mitocondrias en las células del tallo dan evidencia de un papel importante en la absorción de nutrientes disueltos (Sakai and Sanford, 1980).

Otra función importante es la de proteger a la planta de la transpiración excesiva y la luz solar intensa. Más en general, la cutícula gruesa, el tejido de almacenamiento de agua, la disposición de los estomas, los tricomas y el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), lo cual contribuye a la reserva del agua notable de la piña (Bartholomew *et al.*, 2002).



Figura 2.3. Hojas de la planta madre de piña.

2.3.4 Raíces

Las raíces primarias sólo se encuentran en las plántulas muy jóvenes. Ellas mueren poco después de la germinación y son reemplazadas por las raíces adventicias. Estas forman un sistema corto y compactado en la base del tallo, con numerosas raíces fuertes y limitada ramificación. En condiciones ideales, el sistema radicular del suelo puede extenderse hasta 1-2 m lateralmente y 0,85 m de profundidad. El número de raíces producidas después de la siembra se correlaciona positivamente con el peso de los retoños y coronas, produciendo más raíces que originan brotes (Bartholomew *et al.*, 2002; Jiménez, 2000). La anatomía interna de la raíz es con dirección, hacia el centro: la epidermis, abarca las células de la raíz; la corteza que comprende la exodermis, la corteza exterior, con el esclerénquima y canales de aireación, y la corteza interior, con una parénquima lagunar, la endodermis, periciclo, vasos y médula. Su rasgo más característico es la estructura medular dada por los canales de aireación, formados por la unión de punta a punta de las células rafidios en la corteza exterior, y por los canales de aireación formados por la desaparición de los grupos de células de paredes delgadas. Las raíces ramificadas son originadas en la región pericíclica de las raíces principales (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Jiménez, 2000).

2.3.5. Inflorescencia y fruto

El pedúnculo e inflorescencia se desarrollan a partir del meristemo apical. La etapa de la emergencia de la inflorescencia se llama "corazón rojo" (Kerns *et al.*, 1936). Las brácteas del pedúnculo son cortas y estrechas. El pedúnculo se alarga después de la floración. Su longitud varía mucho con las variedades (Jiménez, 2000). La inflorescencia tiene menos de 50 a más de 200 flores individuales, está coronada por una corona, compuesta por numerosas hojas cortas (hasta 150) en un tallo corto. Las flores o frutas individuales están dispuestas alrededor del eje central (Figura 2.4). Entre la flor superior y la corona hay una zona de transición con brácteas pero no de flores (Bartholomew *et al.*, 2002).

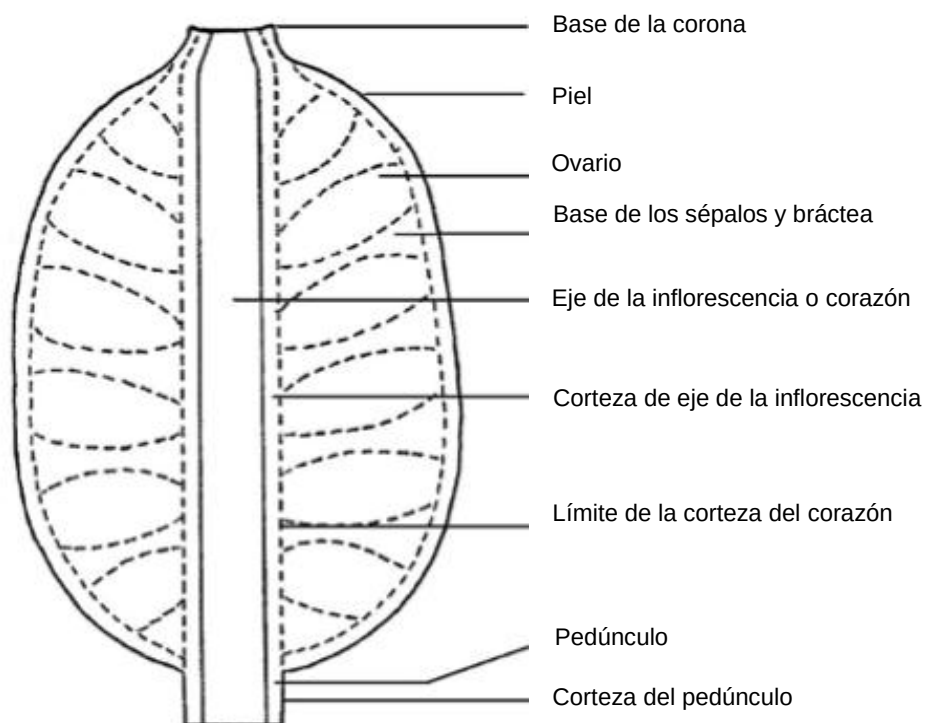


Figura 2.4. Diagrama de la estructura morfológica del sincarpo que forma el fruto de la piña en su madurez.

La parte comestible de la fruta consiste principalmente en los ovarios, las bases de los sépalos, brácteas y la corteza del eje. La cáscara de fruta se compone principalmente de los tejidos de sépalos; las brácteas y los ápices de los ovarios (Okimoto, 1948). La antesis ocurre normalmente en un día. La Floración dura 10-15 días y se produce en una sucesión más o menos acropétalo a lo largo del eje de la inflorescencia (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Jiménez, 2000). Las flores son hermafroditas, trímeras, con tres sépalos, tres pétalos, seis estambres en dos verticilos de tres y un pistilo tricarpetal. Las anteras son bilobuladas, introrsas y dorsifijas. El estigma es trilobulado y trifido es casi tan largo como los pétalos e igual o más largo que los estambres. Los pétalos son ligulados y libres, de color blanco en su base y de azul violeta en la punta (Figura 2.5). Están tan cerca en su extremo exterior que sólo pequeños insectos pueden entrar en la flor. La flor tubular estrecha y la producción de néctar abundante son especialmente adaptadas para que realice la polinización un colibrí (Bartholomew *et al.*, 2002).



Figura 2.5. Inflorescencia de la planta de piña.

Los sépalos son deltoides. Cada flor está rodeada y subtendida en su base por una bráctea pulposa y gruesa, cubierta por tricomas, que se convierte en punta. Las partes de las otras tres brácteas completan el recinto de la flor (Bartholomew *et al.*, 2002). La espinosidad de las brácteas se correlaciona con la espinosidad de la hoja. En la inflorescencia sincárpica resulta de la fusión de la parte basal de las flores y su eje, los ovarios de las flores adyacentes están separados por el tejido parenquimatoso de las bases del cáliz y bráctea (Bartholomew *et al.*, 2002). El ovario es inferior, tricarpelar y trilocular, con los tres septos formando una Y invertida cuando se ve en sección tangencial de la inflorescencia. La placenta y los óvulos se encuentran en la parte superior de tres cavidades profundas, llamados lóculos, que están separados por las glándulas nectarinas. Los óvulos son caudados y dispuestos en dos filas simples o dobles. El número de óvulos por flor varía de 16 a 71. La presencia de dos tipos de óvulos (anátropos ortótropos y bitegumentado unitegmicos) dentro del mismo ovario es común (Bartholomew *et al.*, 2002; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1993; Okimoto, 1948; Rao and Wee, 1979).

Los granos de polen son alargados y esferoidales, biconvexos, isopolares y bilateralmente simétricos y diaperturados. No hay abscisión floral, y, a excepción de la extinción del estilo, los estambres y los pétalos de toda la flor se desarrollan en un fruto partenocárpico, el tipo de fructificación es una baya (Bartholomew *et al.*, 2002). El crecimiento de inflorescencias de frutas maduras va en un aumento de 20 veces. La ampliación del cáliz de crecimiento prolongado por la división celular, va de forma progresiva hasta la floración, y la ampliación de la celda, en las posteriores etapas. Durante este aumento del tamaño, las paredes celulares se adelgazan. Los tejidos, brácteas, sépalos y ovario son estructuras importantes en el fruto maduro. En la fruta madura, los canales estilares quedan completamente cerradas, primero por un tapón mucilaginoso, poco después de la floración, y una semana o dos después de la oclusión celular (Bartholomew *et al.*, 2002; Jiménez, 2000; Samson, 1991).



Figura 2.6. Frutos maduros de la planta de piña

2.4. Nombres comunes

El término "piña" se adoptó por su semejanza con el cono de una conífera; la palabra ananá es de origen guaraní, del vocablo naná naná, que significa «perfume de los perfumes».

Los nombres que se le dan son: piña tropical, piña americana, piña de américa, piña de azúcar, piña de indias, (español); pineapple (inglés); ananas (francés) y abacaxí (portugués). En otras culturas también se llama ananás, ananáz, ananá, nanas, abacachí, abacacaxí, aberas, achupalla (Bartholomew *et al.*, 2002; Collins, 1951; Py, 1987).

2.5. Variedades

La excesiva dependencia de la industria de la piña en un solo cultivo con una estrecha base genética ha provocado que sea extremadamente vulnerable a las amenazas de plagas y enfermedades. El desarrollo de nuevas variedades resistentes parecía la estrategia adecuada para corregir esta situación. Mientras que "Cayena Lisa" es muy buena para el procesamiento, los mercados frescos de piña en el mundo son más diversificados y, donde se ofrece una opción, no siempre se prefiere esta variedad. Estas son las justificaciones principales para el comienzo de programas de mejoramiento de piña a nivel mundial. En 1914, la Asociación de Productores de Piña de Hawái comenzó uno de los esfuerzos anticipados y concertados en el mejoramiento de piña. La estación experimental de esta asociación se convirtió más tarde en el Instituto de Investigación de Piña de Hawái (PRI). Uno de los principales objetivos de los programas del PRI fue el desarrollo de resistencia a plagas y enfermedades en una variedad de tipo "Cayena Lisa". Las variedades que fueron desarrolladas tenían una mejor resistencia a fitóptora, nematodos y enfermedades. El PRI se cerró en 1975 y la evaluación de la progenie se finalizó en el Maui Pineapple Company en 1985. Un pequeño número de las

variedades del PRI y la colección genética fueron puestos a disposición del Departamento de Agricultura de repositorio de germoplasma (USDA) de EE.UU. en 1986. Muchos otros países han comenzado programas de mejoramiento para desarrollar variedades de alto rendimiento con adaptación específica a sus propios entornos. Programas de mejoramiento más actuales se centran en el desarrollo de cultivares para el mercado en fresco. Es importante tener en cuenta que los programas de hibridación que intentan reemplazar “Cayena Lisa” de procesamiento han sido escasos desde el cierre del programa PRI en Hawái. La mayoría de los programas de hibridación giran en torno a “Cayena Lisa”, debido a sus buenas cualidades (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.5.1. “Cayena Lisa”

La fruta es de tamaño mediano ovoide 1.5 a 2.5 kg. La pulpa es de color amarillo pálido, suave y jugosa, con una variación considerable en azúcar de entre 13-19 °Brix, acidez y bajo contenido de ácido ascórbico. A pesar del alto contenido de azúcar su acidez es a menudo considerada excesiva entre los consumidores tropicales, lo que ha contribuido en gran parte a la imagen de la piña como una fruta ácida. La planta es de tamaño mediano 80 a 100 cm, con 60 a 80 hojas verde oscuro que llevan pequeñas espinas en su base y en la punta. Es sensible a muchas plagas conocidas como gorgojo de la fruta, ácaros, sinfílicos, nemátodos; enfermedades como marchitez por cochinilla, fusariosis, putrefacción del núcleo de la fruta y pardeamiento interno. Sin embargo, es considerada para ser tolerante a *Phytophthora sp.* (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.5.2. “Singapore Español”

Es la segunda en importancia para la industria conservera, el color de la pulpa es amarillo dorado. La fruta es pequeña y pesa alrededor de 1 kg, cilíndrica y de color púrpura oscuro, volviéndose cobre a naranja al madurar. El azúcar y la acidez es

baja de 10-12 °Brix, el sabor es pobre. La planta es de tamaño mediano 80 a 100 cm, con 35 a 70 hojas de color verde oscuro, de unos 150 cm de largo y 5 cm de ancho. La espinosidad de las hojas es muy variable, las brácteas del pedúnculo y la inflorescencia son de color rojo brillante. La planta es vigorosa y produce muchos resbalones y brotes; puede presentar corona múltiple. Está adaptada para un alto pH del suelo, lo que probablemente está relacionado con su tolerancia a *Phytophthora sp.* muestra clorosis severa cuando se expone a la alta concentración de manganeso en el suelo (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.5.3. “Queen”

La planta es pequeña de 60-80 cm, con hojas plateadas cortas y muy espinosa, da un fruto pequeño 0.5 - 1 kg, con una cáscara amarilla abundante de pequeños ojos prominentes. La pulpa es de color amarillo dorado crujiente y dulce con 14-18 °Brix, con un sabor excelente y vida útil larga. Es una variedad más tolerante a estrés y a las plagas y enfermedades que “Cayena Lisa”. Por otra parte, es susceptible a *Phytophthora sp.* y al colapso de las frutas y altamente susceptible a la refrigeración (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.5.4. “Española roja”

El fruto es de tamaño mediano entre 1.2 - 2 kg, de color naranja y forma de barril. La pulpa es firme, pálida y dulce, con un contenido de azúcar moderado de alrededor de 12 °Brix, pero baja acidez. La planta es de tamaño mediano, con hojas de color verde oscuro espinosas. Las brácteas florales son de intenso rojo brillante. Es vigorosa y tolerante a la alta temperatura, la sequía, pardeamiento interno y *Phytophthora sp.* pero no a nemátodos (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.5.5. “Perola”

El fruto es pequeño a mediano (0.9 - 1.6 kg), ovoide cuando es pequeña y cónica al madurar, es verde con un color amarillo iluminado en el centro de los ojos maduros. La pulpa es blanca, suave y jugosa con un exquisito aroma. Su azúcar de 13-16 ° Brix y el contenido de ácido ascórbico es alto. La planta es de tamaño mediano y vigorosa, con hojas verde oscuro, erguidas y espinosas. Es una variedad muy resistente, mostrando resistencia a *Phytophthora sp.* y nemátodos (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.6.6. “Manzana”

Difiere en los globulares regulares a la forma cilíndrica y ojos grandes planos de su fruto, que son de un atractivo color rojo brillante cuando se produce en tierras tropicales altas. Es susceptible al nematodo *Pratylenchus neglectus*, pero tolerante a *Meloidogyne incognita* (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.5.7. “Híbrido MD-2”

También llamado “Oro”, “Golden Sweet” ó “Extra Sweet”, fue desarrollado por Del Monte Fresh Produce Inc. Hawái de un cruzamiento efectuado entre los híbridos del PRI 58-1184 y 59-443 para el mercado de fruta fresca. MD-2 da un fruto grande (1.3 a 2.5 kg), con grandes ojos planos y un intenso color amarillo anaranjado. La pulpa es amarillo claro, dulce, compacta y fibrosa. Tiene un alto contenido en azúcar (15-17 °Brix) y ácido ascórbico, pero más bajo en acidez total que Cayena Lisa. El núcleo es blando, comestible y más delgado. Las hojas son de color verde amarillo con una punta de color rojizo y son en su mayoría sin espinas. Es susceptible a la pudrición del núcleo y más sensible a *Phytophthora sp.* (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.6. Citogenética

J. L. Collins y K. R. Kerns determinaron en 1931 el número de cromosomas de la piña *Ananas comosus* y de las especies vecinas: es de 50 ($2N = 50$) para la mayoría de los cultivares (con la única excepción de “Cabezona”, que es triploide). Los cromosomas son pequeños y esféricos en todas las especies (Bartholomew *et al.*, 2002; Py, 1969).

2.6.1. Nivel de ploidía

Heilborn y más tarde J. L. Collins, descubrieron algunos triploides en Sudamérica, pero fue particularmente en las poblaciones híbridas de aquellas zonas donde J. L. Collins aisló muchos de ellos. Los triploides se obtienen por la unión de un gameto diploide (que procede, o bien de una omisión de la reducción cromosomática en la profase meiótica, o de un desdoblamiento del número de cromosomas después de aquella) con un gameto haploide normal (Bartholomew *et al.*, 2002; Py, 1969).

Al comparar los híbridos diploides y triploides y plantas diploides y autotetraploides de “Cayena Lisa”. Los poliploides eran más altos, con hojas anchas, colocado a una mayor longitud internodal, por lo que el área foliar total no difiere mucho. La sección transversal de las hojas tetraploides es más cerrada. Sus fibras más grandes aumentan la rigidez de la hoja. El tamaño de las células, los tricomas y estomas también aumenta con el nivel de ploidía, mientras que se reduce la densidad de estomas. El contenido de agua es mayor en poliploides. Los híbridos triploides y tetraploides de “Cayena Lisa” tienen periodos de crecimiento vegetativo más largo, maduración más lenta y un contenido de azúcar inferior. Los frutos tetraploides son más pequeños, con menos pero más grandes frutiolos (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.6.2. Mutaciones

Las mutaciones pueden ser inducidas con una gama de técnicas, incluyendo el cultivo de tejidos (NPWG, 2007; Pierik, 1998; Williams y Fleisch, 1993), la exposición de hoja en cultivo *in vitro* a los rayos gamma de cobalto (Cisneros *et al.*, 1998), el tratamiento de las semillas y plantas con químicos mutágenos (Singh y Iyer, 1997). A pesar del gran número de mutaciones identificadas en cultivares de piña, que generalmente no se consideran por ser genotipos inestables. La incidencia de mutaciones es probablemente una función de la gran cantidad de plantas propagadas y observadas. El tipo de material de plantación utilizado también puede determinar la frecuencia de algunas plantas fuera de tipo (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.6.2.1. Problemática comercial

El efecto de las mutaciones en nuestro país repercute considerablemente en la comercialización del producto fresco. Los productores de piña son los más afectados con graves pérdidas económicas al ser rechazados sus productos (piñas) por no cumplir las normas de calidad y estandarización. Las normas del mercado internacional para la exportación de piña en el híbrido MD-2 exigen que los frutos sean pequeños de 1.0-1.2 kg, presentando una coloración homogénea al madurar y conservando una relación proporcional entre el fruto y la corona (1:1). Para los productores esto representa una problemática en la venta y compra, ya que no cuentan con un mercado en donde colocar los frutos que son rechazados. Las investigaciones sobre el origen y efecto de las mutaciones son estudiadas actualmente para conocer si el efecto se debe al manejo agronómico, es genético o es una interacción genotipo x ambiente. Las principales mutaciones que se pueden desarrollar en corona son: 1) Corona múltiple, 2) Corona anormal, 3) Ápice solo espinoso, 4) Hojas espinosas, 5) Formación de cuello; mientras que en el fruto son: 6) Tamaño, 7) Peso, 8) Espinosidad y 9) Presencia de fisura



Figura 2.7. Mutaciones: a) fruto grande con corona múltiple, b) fruto pequeño con corona en forma de roseta, c) fruto grande con corona grande.

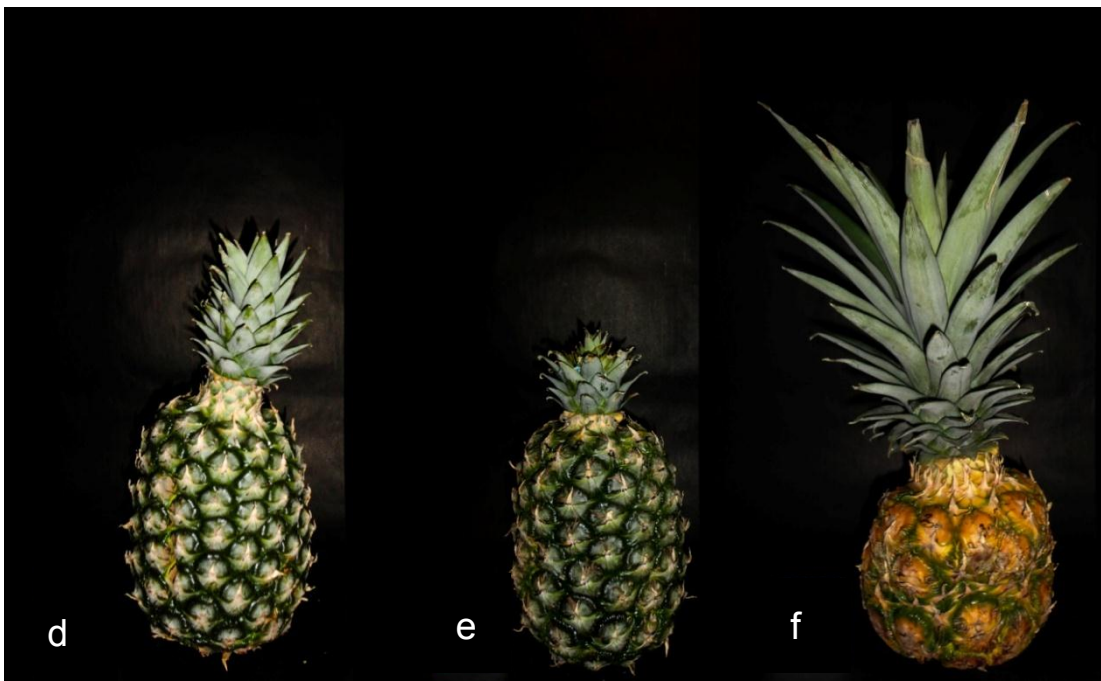


Figura 2.8. Mutaciones: d) fruto con presencia de cuello, e) fruto con corona en forma de roseta, c) fruto con corona grande

2.7. Producción mundial del cultivo de piña

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr es la segunda fruta tropical más importante en el mundo después del mango (FAO, 2010). La demanda internacional de la piña sigue en crecimiento principalmente gracias a los hábitos alimenticios de los consumidores americanos y europeos que consideran a esta fruta tropical, como una de las más finas del mundo, destacando en ella su agradable sabor, aroma y su contenido de vitamina C. En 2010 según datos de la FAO, se cultivaron 906 mil hectáreas de piña a nivel mundial, observando un crecimiento del 7.1 % de la superficie en 2010, con respecto al año 2006. Cinco países concentran el 49.6 % de la superficie cultivada (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Superficie cultivada mundial (Has/Año).

País	2006	2007	2008	2009	2010
Nigeria	117,000	117,500	114,525	157,802	159,200
Tailandia	101,125	94,449	93,116	90,656	93,312
India	82,400	87,000	80,000	84,000	85,700
China	64,146	66,372	64,013	63,951	57,300
Brasil	66,845	71,886	65,982	60,176	54,069
11. México	14,781	15,918	16,372	17,009	16,604
Resto del mundo	399,822	402,663	411,392	424,727	440,356
Total	846,119	855,788	845,405	898,391	906,541
% Variación Anual	4.9%	4.89%	4.89%	4.89%	4.89%
% 5 Países con Mayor Superficie	51.0%	51.1%	49.4%	50.8%	49.6%

Fuente: FAOstat, <http://www.fao.org>

La producción en el 2010 ascendió a 19.4 millones de toneladas, observándose un crecimiento de un 1.7 % con respecto a la producción del año anterior, pero una disminución del 0.6 % con respecto al año 2006; 2007 fue el año con mayor producción de piña, en él se produjeron 19.8 a millones de toneladas (Figura 2.9).

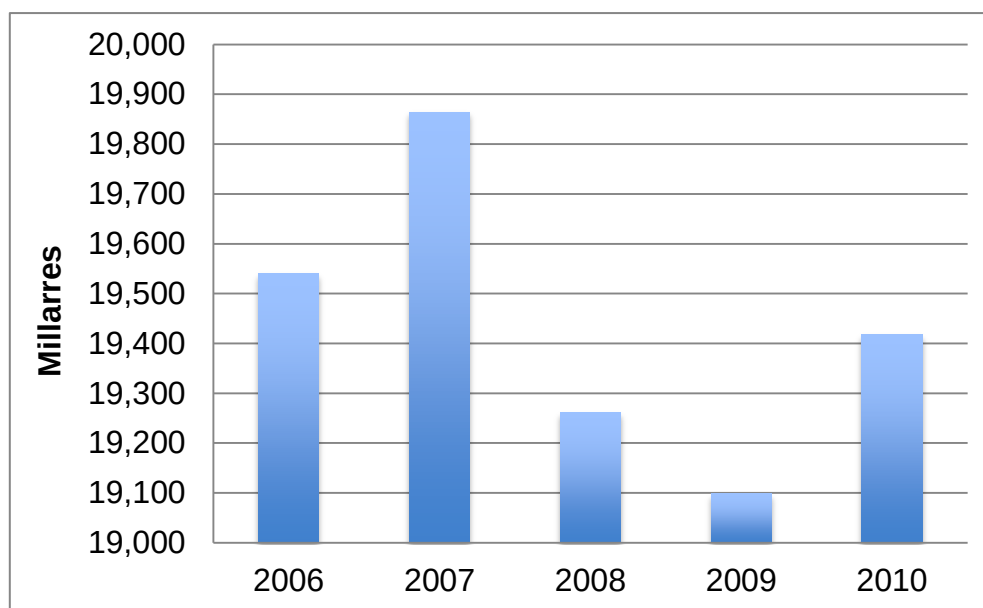


Figura 2.9. Producción Mundial de Piña (Toneladas Anuales).

Los cinco países principales concentran el 49% de la producción mundial, por su parte México es uno de los países importantes en la producción de piña, ocupando el 9no lugar con una producción de 701 mil toneladas en el año 2010, un 10.7% de crecimiento con respecto al año 2006 (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Producción mundial (Ton/Año).

País	2006	2007	2008	2009	2010
Brasil	2,560,630	2,676,420	2,568,550	2,206,490	2,120,030
Filipinas	1,833,910	2,016,460	2,209,340	2,198,500	2,169,230
Tailandia	2,705,180	2,815,280	2,278,160	1,894,860	1,924,660
Costa Rica	1,805,000	1,547,140	1,667,530	1,682,040	1,976,760
Indonesia	1,427,000	1,395,570	1,433,130	1,558,200	1,390,380
9. México	633,747	671,131	685,805	749,396	701,746
Resto del mundo	8,754,608	8,742,645	8,419,875	8,809,531	9,135,500
Total	19,540,855	19,864,646	19,262,390	19,099,017	19,418,306
% Variación Anual	9.5%	1.7%	-3.0%	-0.8%	1.7%
% 5 Países con Mayor Superficie	52.9%	52.6%	52.7%	50.0%	49.3%

Fuente: FAOstat, <http://www.fao.org>

Entre los países con mayor productividad, destacan Panamá e Indonesia, con 82 y 69 toneladas de rendimiento por hectárea en el ejercicio 2010. Por su parte, nuestro país registra rendimientos de 41 a 44 toneladas por hectárea (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Rendimiento en principales países (Kgs/Ha).

País	2006	2007	2008	2009	2010
Panamá	71.1500	71.7192	71.6104	82.5649	83.3636
Indonesia	66.8186	73.6177	68.8939	69.2533	69.5190
Benín	59.6535	54.5976	43.7775	52.3124	51.3488
Martinica	34.2625	33.2000	42.8571	47.0588	41.2500
México	42.8758	42.1618	41.8761	44.0588	42.2637

Fuente: FAOstat, <http://www.fao.org>

A nivel mundial en el año 2009 se exportaron 2.8 millones de toneladas, que representan el 14.9 % de la producción total mundial (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4. Principales países exportadores (Ton/Año).

País	2005	2006	2007	2008	2009
Costa Rica	905,090	1,194,180	1,353,030	1,458,980	1,511,460
Bélgica	256,761	246,704	263,811	234,123	273,014
Países Bajos	87,500	183,773	189,000	216,131	197,038
EUA	80,611	15,577	89,269	90,512	88,108
Filipinas	210,761	262,216	276,931	291,825	209,532
9. México	33,075	25,588	32,256	42,792	49,359
Resto del mundo	615,137	591,959	608,664	550,867	522,629
Total	2,188,935	2,519,997	2,812,961	2,885,230	2,851,140
% Variación Anual	-	15.1%	11.6%	2.6%	-1.2%
% 5 Países con Mayor Superficie	70.4%	75.5%	77.2%	79.4%	79.9%

Fuente: FAOstat, <http://www.fao.org>

Cinco países concentran el 80 % de las exportaciones mundiales de piña, el principal país exportador fue Costa Rica con 1.5 millones de toneladas, cantidad que representa el 53 % de las exportaciones totales, en segundo lugar se ubicó Bélgica con 273 mil toneladas. Cabe señalar que las exportaciones de piña, se vienen incrementando y que del año 2005 al 2009 presentan un crecimiento de más de un 30 %, destacando el caso de Costa Rica con un crecimiento del 60 % durante ese mismo período con una tasa anual de crecimiento del 13 %. México ocupa el 9no lugar entre los países exportadores con 49,359 toneladas en el año 2010, no obstante, apenas representa el 6.6 % de la producción nacional (Figura 2.10).

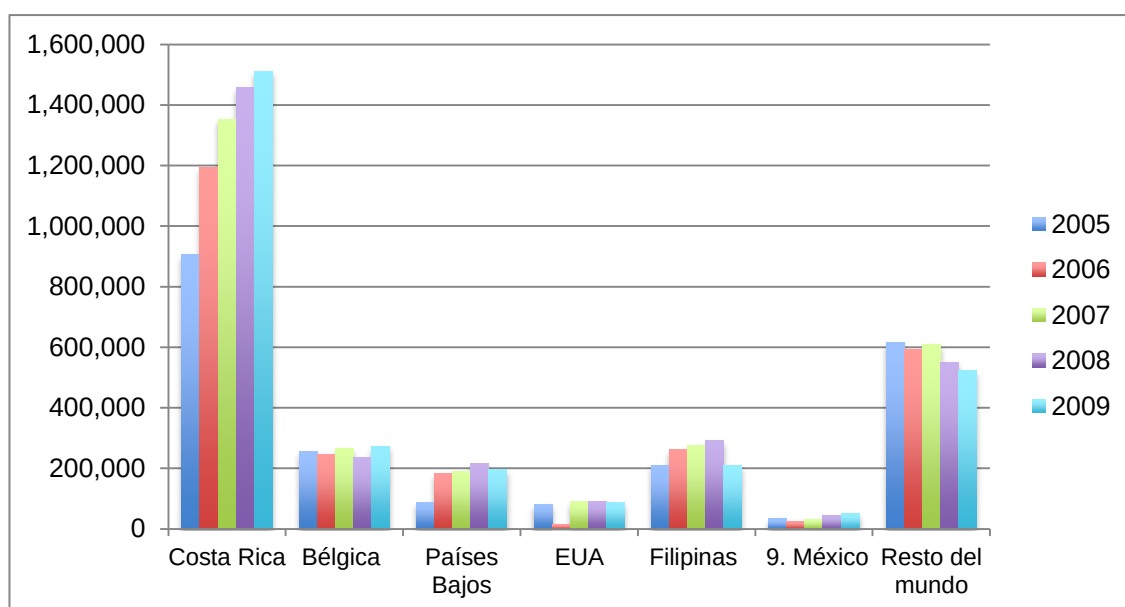


Figura 2.10. Principales países exportadores de piña.

Conforme a datos de la FAO, las importaciones de piña en el mercado mundial, alcanzaron 2.5 millones de toneladas en el año 2009, siendo Estados Unidos el principal país importador, con más de 712 mil toneladas, que representan el 28 % del total. Le siguen en importancia, Bélgica, Alemania, Países Bajos, Gran Bretaña, que junto con los Estados Unidos, concentran más del 60 % de las importaciones mundiales de piña (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5. Principales países importadores (Ton/Año).

País	2005	2006	2007	2008	2009
EUA	577,605	634,239	696,820	713,584	712,945
Bélgica	268,559	250,805	292,499	309,156	290,252
Alemania	122,424	146,446	167,499	173,060	202,557
Países Bajos	93,004	226,771	200,026	228,079	198,087
Reino Unido	78,047	104,673	116,730	125,932	144,518
82. México	375	203	192	172	167
Resto del mundo	822,732	925,675	1,041,489	1,076,492	1,001,862
Total	1,962,746	2,288,812	2,512,172	2,626,475	2,550,388
% Variación Anual	-	16.6%	9.9%	4.4%	-2.9%
% 5 Países con Mayor Superficie	58.1%	59.5%	58.6%	59.0%	60.7%

Fuente: FAOstat, <http://www.fao.org>

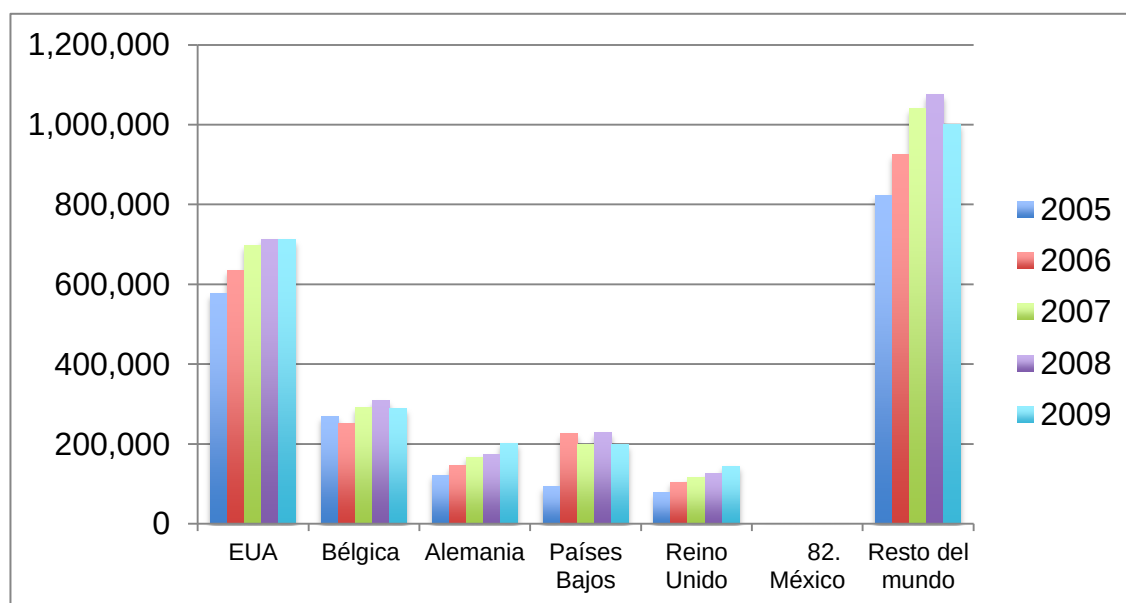


Figura 2.11. Principales países importadores de piña.

Con respecto al mercado mundial el comercio de la piña como fruta fresca se ha transformado en los últimos quince años como no ha sucedido con otras frutas, esto debido al cambio en los hábitos de consumo; así como, la aparición de una nueva variedad de piña conocida inicialmente como el híbrido MD-2.

2.8. Producción nacional del cultivo de piña

Las zonas productoras de piña en nuestro país, se caracterizan porque se encuentran en algunas regiones específicas de algunos estados. Los principales estados en donde concentra el 97 % de la producción son: Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Nayarit (SIAP, 2010) (Figura 2.12).

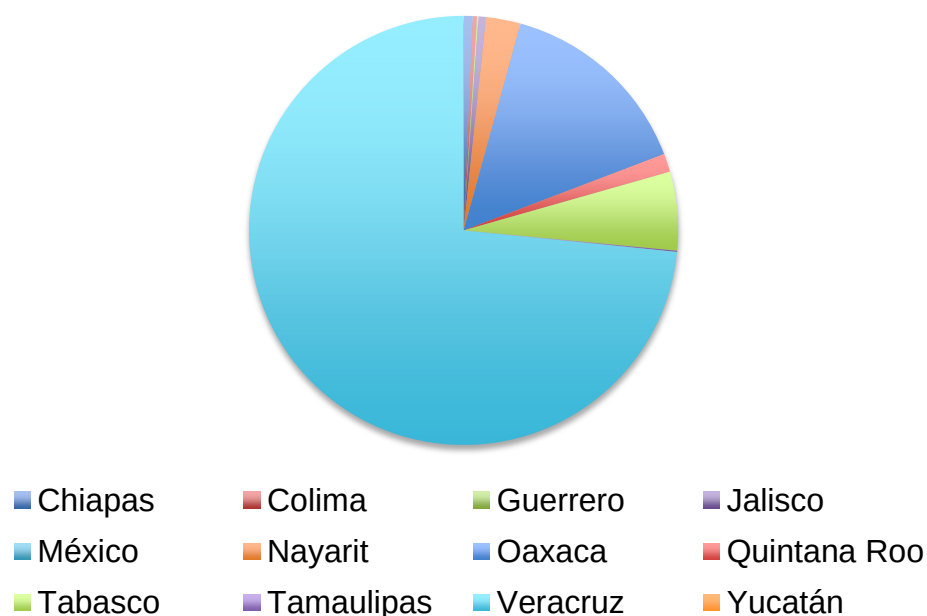


Figura 2.12. Participación de Veracruz en la producción de piña de 2010.

Sin embargo sólo en Veracruz y Oaxaca, se encuentra la zona productora de piña por excelencia. A esta región se le conoce como la zona del Bajo Papaloapan o Cuenca del Papaloapan, y abarca los municipios de Medellín, Alvarado, Tlalixcoyan, Villa Isla, Juan Rodríguez Clara, Villa Azueta y Chacaltianguis, los cuales pertenecen al estado de Veracruz; y los municipios de Loma Bonita y Tuxtepec, del estado de Oaxaca. De acuerdo a con las cifras reportadas por el Centro de Estadísticas Agrícola de la SAGARPA en el año 2010, estos dos estados aportaron alrededor del 90 % de la producción nacional de piña (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6. Producción nacional de piña (Ton/año).

Ubicación	2006	2007	2008	2009	2010
Veracruz	468.2	495.7	504.5	517.6	515.0
Otros estados	165.5	175.4	213.8	231.8	186.7
Total	633.7	671.1	718.3	749.4	701.7
% Participación	73.9%	73.9%	70.2%	69.1%	73.4%

Fuente: SAGARPA, SIAP, <http://www.siap.gob.mx>

El estado de Veracruz es el más importante en la producción a nivel nacional por la alta superficie cosechada (Has), alta producción de piña (Toneladas/año) y mayor valor de la producción (SIAP, 2012) (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7. Datos del cultivo a nivel nacional en el año 2010.

Ubicación	Sup. Semb. (Ha)	Sup. Cosech. (Ha)	Prod. (Ton)	Rend. (Ton/Ha)	PMR. (\$/Ton)	Valor Prod. (1,000,\$)
Chiapas	341	341	4,842.00	14.20	4,931.85	23,880.00
Colima	48.5	48.5	2175	44.85	3,596.55	7,822.50
Guerrero	97	97	801.4	8.26	6,883.39	5,516.35
Jalisco	202	127	3,884.00	30.58	3,070.55	11,926.00
México	4	4	18	4.50	5,500.00	99
Nayarit	1,162.75	934.75	18,350.15	19.63	3,137.04	57,565.18
Oaxaca	2,014.00	1,951.45	104,685.43	53.64	3,248.65	340,086.28
Quintana Roo	256.00	252.00	9,705.00		6,848.28	66,462.55
Tabasco	1,269.00	1,269.00	41,575.00	32.76	2,300.00	95,622.50
Tamaulipas	16	16	640	40.00	5,500.00	3,520.00
Veracruz	26,456.00	11,559.25	515,007.50	44.55	2,642.73	1,361,023.75
Yucatán	5	5	57	11.40	2,500.00	142.5
Total	31,871.25	16,604.95	701,740.48	42.26	2,812.53	1,973,666.61

Fuente: SAGARPA, SIAP, <http://www.siap.gob.mx>

Son 11 los municipios productores del estado de Veracruz, de los cuales 3 de ellos concentran el 91 % de la superficie sembrada y 79 % de la producción, siendo éstos: Juan Rodríguez Clara, Isla, y Azueta (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8. Municipios productores de piña en Veracruz en el año 2010.

Municipio	Sup. Semb. (Ha)	Sup. Cosech. (Ha)	Prod. (Ton)	Rend. (Ton/Ha)	PMR. (\$/Ton)	Valor Prod. (1,000,\$)
Alvarado	114.00	114.00	4,332.00	38.00	2,500.00	10,830.00
Chacaltianguis	800.00	800.00	36,800.00	46.00	2,500.00	92,000.00
Isla	7,750.00	2,779.00	127,834.00	46.00	2,500.00	319,585.00
Jamapa	22.00	22.00	836.00	38.00	2,500.00	2,090.00
José Azueta	7,680.00	2,955.00	132,975.00	45.00	2,500.00	332,437.50
Juan Rodríguez Clara	8,610.00	3,409.25	156,825.50	46.00	2,500.00	392,063.75
Martínez de la torre	60.00	60.00	1,920.00	32.00	4,000.00	7,680.00
Medellín	930.00	930.00	34,875.00	37.50	4,500.00	156,937.50
Tampico Alto	70.00	70.00	1,750.00	25.00	3,000.00	5,250.00
Tlaxiaco	270.00	270.00	10,260.00	38.00	2,500.00	25,650.00
Tres Valles	150.00	150.00	6,600.00	44.00	2,500.00	16,500.00
Total	26,546.00	11,559.25	515,007.50	44.45	2,642.73	1,361,023.75

Fuente: SAGARPA, SIAP, <http://www.siap.gob.mx>

La producción de la piña es una de las actividades que ha demostrado un mayor dinamismo en términos absolutos y relativos de crecimiento, producción y generación de empleo en la selva peruana en los últimos años, ésta ha dinamizado la producción agropecuaria. Este dinamismo en la actividad ha sido alentado por factores de índole interno, congruentes con las nuevas reglas del juego en el modelo económico y el agotamiento de ciertas actividades orientadas al mercado local, agobiadas por las crisis económicas, bajos precios, la falta de crédito y así como el colapso de la citricultura.

2.10. Uso actual y uso potencial

La mayor parte de la producción mundial de piña es enlatada. Las rebanadas son el producto más valioso, seguidas del jugo, trozos y cubos; otros productos son ensaladas de fruta, jarabe de azúcar, alcohol y ácido cítrico. Recientemente la exportación de piñas en fresco hacía mercados de países templados se ha incrementado enormemente. En general, se seleccionan para este propósito frutos más pequeños, en un estado más temprano a la madurez. El sesenta por ciento de una piña fresca es comestible. El fruto contiene de 80 a 85 por ciento de agua, 12 a 15 por ciento de azúcares (del cual dos terceras partes se encuentran en forma de sacarosa, el resto en glucosa y fructosa), 0.6 por ciento de ácido (del cual 87 por ciento es cítrico, el resto ácido málico), 0.4 por ciento de proteínas, 0.5 por ciento de cenizas (principalmente K), 0.1 por ciento de grasas, algo de fibra y diversas vitaminas (principalmente A y C). El contenido de vitamina C varía de 8 a 30 mg/100 g. Las hojas de la piña producen una fibra blanca fuerte, a partir de la cual se elabora la ropa de seda de piña en Filipinas y Taiwán. Se utilizan cultivares especiales para este fin, los cuales se cultivan en altas densidades a la sombra. Los frutos tienen que eliminarse, por lo que no es posible combinar la producción de la fruta con la de la fibra (Samson, 1991).

En México se han realizado investigaciones para la producción de etanol a partir de desechos lignocelulósicos (Barrita y Pacheco, 2010) y de jugo de desecho de piña (Rico, 2009), elaboración de papel artesanal (Hernández, 2008), extracción de fibra textil a partir de la hoja (Goytia *et al.*, 2005) y obtención de bromelina (Gómez, 2007).

2.11. Propagación vegetativa

La piña tiene una propagación de tipo asexual y para establecer plantaciones nuevas se utilizan los brotes vegetativos que la planta madre emite en forma natural. Dado que la piña es una especie herbácea perenne, basta con proporcionar una sola vez el material vegetativo a un productor, para que él obtenga hijuelos para la siembra de manera indefinida, durante muchos ciclos.

2.11.1. Propágulos vegetativos

Se clasifican de acuerdo a su posición en la planta. Los hijuelos aparecen en la parte de tierra del tallo. Los brotes aparecen en la parte aérea, son más frecuentes. Los bulbillos aparecen en el pedúnculo. A menudo se agrupan cerca de la base de la fruta; como son numerosos en la mayoría de los cultivares, son útiles para la propagación rápida. La corona también se puede utilizar para la siembra cuando se procesa la fruta de la piña. Algunas plantas pueden carecer de una corona o, por el contrario, producir múltiples coronas. También, las coronas axilares pueden crecer en la base de la corona principal (Bartholomew *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007; Jiménez, 2000).

La misma planta puede dar una secuencia de varios ciclos de producción. En la mayoría de las plantaciones comerciales, a las plantas no se les permiten producir más de dos o tres cultivos, debido a una reducción en el tamaño del fruto y la uniformidad. Una nueva plantación se debe establecer con regularidad, esto se puede hacer con los mismos brotes laterales de la cosecha anterior, o con otros propágulos vegetativos, tales como la corona de la fruta (Bartholomew *et al.*, 2002).

2.12. Cultivo *in vitro*

Es una propagación artificial de tipo asexual de plantas utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, consiste en regenerar una planta a partir del cultivo de material vegetal, el cual, a su vez procede de tejido especializado. Esto se debe a la *totipotencialidad* de las células vegetales, es decir, la capacidad de desdiferenciarse y bajo condiciones controladas *in vitro*, regenerar una planta completa a partir de una célula aislada o un tejido vegetal. Todos los cultivos se inician a partir de un explante que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta ya sea tallo, hoja, raíz, yemas, primordios florales, anteras u otros (Castillo, 2001; George *et al.*, 2008; Loyola y Vázquez, 2006; Pérez, 2009; Rojas *et al.*, 2004).

El cultivo de tejidos no es una técnica nueva, se originó a partir de los primeros intentos de cultivo *in vitro* hechos por el científico alemán Haberlandt a principios del siglo XX, quien colocó algunas células vegetales aisladas en un cultivo con diferentes azúcares, sales inorgánicas y aminoácidos (Castillo, 2001; Núñez *et al.*, 2006 y Pierik, 1998) y a partir de entonces se han podido desarrollar técnicas y procedimientos para la regeneración de plantas en el laboratorio. El cultivo *in vitro* se realiza de manera aséptica y bajo estrictas condiciones de los factores que intervienen en el desarrollo de la planta como disponibilidad de nutrientes, hormonas, fuentes de carbono y factores abióticos como temperatura, luz, entre otros (Castillo, 2001 y Estopá, 2005).

El cultivo *in vitro* genera algunas ventajas, una de ellas es el hecho que ésta técnica no sólo sirve para micropropagar un cultivo, sino que también proporciona saneamiento y mantenimiento de plantas libre de patógenos; gracias a ello, comercialmente, las plantas producidas mediante esta técnica incrementan su valor. Además, esta técnica es considerada como una técnica de clonación, es decir, se pueden propagar plantas élite con características específicas, las cuales al ser propagadas tradicionalmente por otro método de multiplicación vegetativa o cruza

clásicas, no permanecerían en la planta hija (Estopá, 2005). Los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el desarrollo de la planta *in vitro*, ya que controlan procesos bioquímicos y fisiológicos de la planta. El uso de un regulador, su concentración y la combinación con otro tipo de regulador, o bien, la combinación con las hormonas endógenas de la planta dan como resultado una respuesta en la morfología de la planta (Karam *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2004).

El uso de reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales, se remonta al año de 1939, cuando Gaurtheret, Nobecourt y White demostraron que la auxina ácido indolácetico estimula la producción de callos indiferenciados en un cultivo y en la década de los 50's Miller y otros científicos descubrieron que el ingrediente activo en la leche de coco y en el extracto de levadura que promovía el crecimiento en el cultivo era una clase de hormona, a la cual denominaron citocinina. Con esta información se determinó la importancia del balance hormonal. Por lo tanto, Skoog y Miller, reportaron en 1957 que el balance auxina-citocinina era muy importante para el crecimiento de las células en el cultivo (Rojas *et al.*, 2004).

Con niveles relativamente altos de auxinas y niveles relativamente bajos de citocininas, ocurría el crecimiento indiferencial de callo. Por el contrario, niveles relativamente altos de citosinas respecto a auxinas inducían la aparición de ramas diferenciadas. En 1962, Murashige y Skoog publicaron los detalles de un medio distinto con altos niveles de NH_4 , medio que hasta la fecha ha sido utilizado con excelente resultados en el cultivo de tejidos vegetales (Castillo, 2001; Núñez *et al.*, 2006; Magallanes-Cedeño, 2004; Pierik, 1998; Rojas *et al.*, 2004).

2.12.1. Etapas del cultivo *in vitro*

La regeneración de plantas *in vitro* de cualquier especie vegetal presenta cinco etapas principales (Olmos *et al.*, 2010; Pérez, 2009; Raya *et. al.*, 2009).

Etapla 0: selección de la planta madre. Es una etapa preparativa, en la que se seleccionan y acondicionan las plantas madre de las cuales saldrán los explantes para el cultivo *in vitro*. Esta etapa se suele llevar a cabo en un invernadero y las plantas madres se tratan con fungicidas de 1 a 4 meses, todo esto para minimizar las posibilidades de contaminación microbianas. Otros tipos de pretratamientos sirven para cambiar el estado fisiológico de la planta y así favorecer el establecimiento del cultivo *in vitro* como por ejemplo cambios en la temperatura, fotoperiodo, fertilización, aplicación de reguladores de crecimiento o podas severas para estimular el surgimiento de tejido fotosintético (Pérez, 2009).

Etapla 1: establecimiento del cultivo. En esta etapa se realiza la elección del explante y los procesos de asepsia en los tejidos vegetales que se van a cultivar. Para la elección del explante, en general, los órganos jóvenes tienen mejor respuesta *in vitro*. En cuanto a los procesos de asepsia del material vegetal se realizan principalmente con el empleo de etanol al 70 %, diferentes concentraciones de cloro comercial o bien detergentes (Olmos *et al.*, 2010 y Pérez, 2009).

Etapla 2: multiplicación. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel importante sobre la multiplicación de los explantes (Olmos *et al.*, 2010 y Pérez, 2009).

Etapla 3: enraizamiento. Formación y regulación del sistema radical para su posterior manipulación y hace más viable su adaptación al ambiente externo. El enraizamiento se puede lograr separando los brotes y transfiriéndolos a un medio de cultivo con mayor concentración de auxinas o carbón activado. Para evitar la oxidación de los cultivos también se puede probar la transferencia de los brotes generados directamente al sustrato con previa aplicación de enraizador comercial y manteniendo el ambiente con alta humedad relativa (Paz-Silva *et al.*, 2009; Pérez, 2009).

Etapas 4: aclimatación. Consiste en transferir la plántula obtenida *in vitro*, a un nuevo ambiente, generalmente a un invernadero con condiciones adecuadas para superar las dificultades que las plántulas enfrentan al ser retiradas de su medio de cultivo en el laboratorio. Este proceso es crítico, ya que la plántula pasa de un ambiente totalmente aséptico a otro sujeto a la presencia de microorganismos saprófitos y patógenos. En esta etapa, la plántula puede presentar diferentes tipos de estrés como hídrico, mecánico, entre otros, además de pasar de un estado heterotrófico a un estado autótrofo, puede presentar respuestas bioquímicas y físicas al cambio de luz, temperatura, humedad y clima lo que implica cambios en la expresión génica. Mantener una alta humedad y temperatura es una pequeña regla general en la fase de aclimatación (De Rezende *et al.*, 2000; Raya *et al.*, 2009).

2.12.2. Investigación en el cultivo *in vitro* de la piña

La importancia económica de la piña ha impulsado la investigación biotecnológica en su aprovechamiento. Se han desarrollado diversas estrategias para el mejoramiento tanto de la producción como en el crecimiento. La aplicación de métodos de mejoramiento varía desde la inoculación bacteriana y el cultivo de protoplastos hasta la inserción de genes específicos. La inoculación con líneas de bacterias nitrificantes, como *Azotobacter*, aisladas demostraron incrementar el crecimiento y la producción de plantas creciendo bajo condiciones *in vitro* para la piña variedad “Cayena Lisa”, en la fase de adaptación (García y Serrano, 2005).

Los cultivos de micropropagación producen plantas libres de patógenos pero también eliminan la formación de endomicorrizas, las cuales contribuyen positivamente en la nutrición mineral de las plantas como un biofertilizante. El hongo *Glomus* sp. ha probado ser uno de los más efectivos. Los hongos endomicorrízicos, además del aporte de nutrimentos, actúan como agentes bioprotectores contra otros patógenos del suelo (Guillemin *et al.*, 2002).

El aislamiento de protoplastos muestra que los híbridos somáticos tienen un potencial para obtener nuevos genotipos resistentes de piña. Una de las estrategias biotecnológicas es obtener protoplastos a partir de explantes de hoja (Pinho - Guedes *et al.*, 2002). Para la obtención de embriones somáticos, se utilizó como fuente del explante las bases de las hojas de las variedades “Cayena Lisa” y “Roja Española” (Daquinta *et al.*, 2002). En la formación de callos *in vitro*, se han obtenido callos de crecimiento lento, y de color cremoso, similares a los callos embriogénicos. Otra fuente de explante son los brotes laterales de piña, los cuales fueron probados también para determinar la probable micropropagación en cultivos de las variedades “Primavera” y “Perola” utilizando los reguladores del crecimiento: citocinina, benzil adenina purina (BAP) (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg.L⁻¹) y auxina, ácido indolacético (AIA) (2.0 mg.L⁻¹) con sacarosa 4 % y medio sólido Murashige y Skoog (1962), a fin de inducir proliferación, el enraizamiento se logró sin la adición de reguladores del crecimiento (De Almada *et al.*, 2002). Zepeda y Sagawa (1981), lograron obtener alrededor de 5 000 plantas a partir de un solo explante con medio líquido Murashige y Skoog (MS) adicionado con agua de coco y transferidos a BAP para formar brotes axilares capaces de enraizar. Para la variedad “Roja Española” se ha realizado irradiación gama, a fin de observar la variación somaclonal y mutagénesis.

Cuadro 2.9. Trabajos realizados en cultivo *in vitro* en piña.

Autor	Investigación
Blanco <i>et al.</i> , 2011	Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales.
Garrita y Gómez; 2000	Micropropagación de la variedad de piña “Champaka F-153”.
Mogollón <i>et al.</i> , 2004	Multiplicación clonal y enraizamiento <i>in vitro</i> de la variedad “Queen Australia”.
Romero y Escobedo, 2003	Micropropagación y formación de callo de dos cultivares de piña “Champaka y MD-2”.
Saucedo <i>et al.</i> , 2008	Propagación clonal <i>in vitro</i> de piña variedades “Champaka” y “Hawaiana”.

2.13. Marcadores moleculares

Claros (1998) menciona que el mejoramiento genético se ha realizado desde la prehistoria, toda vez que se han seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas, basándose principalmente en el fenotipo, esto gracias a la variabilidad genética y a la heredabilidad de caracteres morfológicos, lo cual requiere de observaciones exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo.

En la última década el uso de los marcadores de ADN para el estudio de la diversidad genética de los cultivares ya es rutinario y está evolucionando la Biología, incrementando el desarrollo de técnicas de más precisión, rapidez y bajo costo para evaluar la variación genética (Joshi *et al.*, 2011; Karp *et al.*, 1997).

Los marcadores genéticos se han empleado en diferentes fases de la mejora de las plantas: el pre-mejoramiento (conservación y uso de los recursos genéticos, conocimiento y uso del sistema reproductivo, caracterización y pureza de cultivares para emplearlos como progenitores); el mejoramiento (selección de progenitores y monitoreo en los híbridos, selección asistida para caracteres cualitativos y cuantitativos, introgresión de genes desde especies silvestres) y el post mejoramiento (caracterización y pureza de cultivares en los lotes de semilla, desarrollo e identificación de Organismos Genéticamente Modificados, entre otros). Estos se han usado, también con éxito, en otras líneas de investigación en plantas, tales como la filogenia, el diagnóstico de patógenos, y la agroindustria (Álvarez, 2011; Borém, 2009; Bueren *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2011; Nuez *et al.*, 2000; Weising *et al.*, 2005). Es importante mencionar que ningún marcador es superior a todos para un amplio rango de aplicaciones. El marcador más apropiado dependerá de la aplicación específica, el nivel de polimorfismo, la presencia de suficientes facilidades técnicas y de conocimiento, necesidades de tiempo y limitaciones financieras (Alarcón, 2009 y Spooner *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares proporcionan medios para caracterizar el germoplasma, más que para evaluarlo. No obstante, estos marcadores son valiosos para analizar diferencias en secuencias específicas de ADN ya que permiten determinar polimorfismos genéticos y niveles de diferenciación, para distinguir procedencias, progenies e incluso individuos, y para proporcionar conocimiento sobre la historia evolutiva (Arnold *et al.*, 2002; Bueren *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2011 y Ledig, 2004).

Los organismos vivos poseen diferentes secuencias nucleotídicas en su genoma (polimorfismos) que los hacen diferentes de otros individuos y fungen como huella genética y como marcadores moleculares. Esta variabilidad o polimorfismos genéticos ocurren de manera natural entre y dentro de diferentes poblaciones de organismos (Jonah *et al.*, 2011; Trigiano *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 2005).

Para evaluar estos polimorfismos, se pueden utilizar dos clases de marcadores: los morfológicos y los moleculares. Los primeros marcadores que se empezaron a utilizar fueron los de tipo bioquímico: metabolitos secundarios, proteínas estructurales y principalmente las isoenzimas y aloenzimas (Baker, 2000; Jonah *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2011; Mendoza-Herrera y Simpson, 1996; Weising *et al.*, 2005).

Las isoenzimas son enzimas que convierten el mismo sustrato, pero no son necesariamente productos del mismo gen. Las isoenzimas pueden estar activas en diferentes etapas de la vida del individuo o en diferentes compartimentos celulares. Las aloenzimas por su parte, son isoenzimas que son codificadas por genes ortólogos, pero difieren por uno o más aminoácidos debido a las diferencias alélicas. La principal ventaja de las aloenzimas, es que son de herencia codominante y técnicamente simples y de bajo costo. Las desventajas son que presentan número limitado de aloenzimas disponibles, requieren tejido fresco y son fácilmente influenciadas por el ambiente (Baker 2000; Mendoza y Simpson, 1996; Weising *et al.*, 2005).

El análisis de isoenzimas y aloenzimas es relativamente fácil. Se realiza la electroforesis del extracto de tejido preparado en un gel de almidón o poliacrilamida. Las proteínas de este extracto son separadas por su carga neta y tamaño. Después de la electroforesis, la posición de un enzima particular en el gel es detectada por la adición de un sustrato colorante que tiñe el gel. Dependiendo el número de *loci*, su estado de homo o heterocigosidad y la configuración enzimática, se pueden visualizar de una a varias bandas (Baker, 2000; Weising *et al.*, 2005).

Posteriormente, con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular que permitieron extraer y purificar ADN, se pudieron generar diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos, de esta manera se pudieron visualizar diferencias entre las secuencias homólogas de ADN de los organismos. Estas diferencias son resultado de cambios o rearrreglos entre las bases que forman el ADN como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Estos marcadores, además tienen la ventaja de ser dominantes o codominantes y no son influenciados por el ambiente (Nieto *et al.*, 2005; Valadez y Kahl, 2000; Weising *et al.*, 2005). Los marcadores moleculares pueden agruparse en tres categorías, dependiendo el tipo de técnica que se utiliza para generarlos (Cuadro 2.10).

La primera categoría se basa en la técnica de hibridación (Southern), cuyo propósito principal es explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos de ADN ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular (Valadez y Kahl, 2000). En esta categoría entran los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción RFLP (Agarwal *et al.*, 2008; Bostein *et al.*, 1980; Farooq and Azam, 2002; Weising *et al.*, 2005).

La segunda categoría agrupa aquellos marcadores generados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Weising *et al.*, 2005). Esta técnica utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables. Estas secuencias pueden ser aleatorias, semialeatorias o

específicas (Valadez y Kahl, 2000). En esta categoría entran marcadores como Polimorfismos del ADN Amplificado al Azar (RAPD) (Jonah *et al.*, 2011; William *et al.*, 1990; Weising *et al.*, 2005). “Primers” arbitrarios con Reacción en Cadena de la Polimerasa (AP-PCR) (Jonah *et al.*, 2011; Welsh and McClelland, 1990; Weising *et al.*, 2005), Amplificación de la Huella de ADN (DAF) y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Farooq and Azam, 2002; Vos *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 2005), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Farooq and Azam, 2002; Weber and May, 1989; Weising *et al.*, 2005), estos últimos tienen la desventaja de que se debe conocer previamente la ubicación de una secuencia en el genoma de interés.

La tercera categoría combina las técnicas de la PCR o sus productos con la hibridación Southern. En este tipo de marcadores se requiere la síntesis previa de ADN mediante PCR y posteriormente se hibrida con alguna sonda que detecte microsatélites. De esta manera, con el resultado de la PCR se detecta un patrón de fragmentos llamados de primera generación y al hibridar las huellas con una sonda radioactiva, detecta microsatélites y se revela un patrón llamado de segunda generación, este es el caso de los RAHM o RAMPO (Valadez y Kahl, 2000).

Cuadro 2.10. Principales marcadores bioquímicos y moleculares utilizados para la identificación de especies vegetales en la última década.

Marcadores bioquímicos	• Aloenzimas (Tansley and Orton, 1983; Kephart, 1990; May, 1992).
Marcadores moleculares basados en ADN citoplasmático cloroplastos (cpADN), mitocondrial (mtADN) o ADN nuclear.	• Técnica basada en la no-PCR² • Longitudes Polimórficas de Fragmentos de Restricción (RFLP). (RFLP, Botstein <i>et al.</i>, 1980; Neale and Williams, 1991). • Minisatélites o Repeticiones en Tandem de Numero Variable (VNTR) (VNTR Jeffreys <i>et al.</i>, 1985 a, b)
Marcadores moleculares basados en ADN citoplasmático cloroplastos (cpADN), mitocondrial (mtADN) o ADN nuclear.	• Basado en la técnica de PCR • ADN secuenciado • Multicopias de ADN, regiones de espacios internos de genes transcritos en el ribosoma nuclear (ITS) (Takaiwa <i>et al.</i>, 1985; Dillon <i>et al.</i>, 2001). • Copia simple de ADN, incluyendo intrones y exones (Sanger <i>et al.</i>, 1977; Clegg, 1993a). • Sitios de secuencia etiquetadas (STS) • Microsatélites, Secuencias Repetidas Simples (SSR), Repeticiones Cortas en Tandem (STR), Microsecuencia de Secuencia Etiquetada (STMS) o Polimorfismo de Longitud de Secuencia Simple (SSLP). (Hearne <i>et al.</i>, 1992; Morgante and Olivieri, 1993; Queller <i>et al.</i>, 1993; Jarne and Lagoda, 1996). • Polimorfismo de Longitud de Secuencia Amplificada (ASLP) (Maughan <i>et al.</i>, 1995). • Caracterizado de Secuencias de Regiones Amplificadas (SCAR) (Paran and Michelmore, 1993). • Secuencia Polimórficas Adheridas y Amplificadas (CAPS) (Akoyanz <i>et al.</i>, 1992; Konieczny and Ausubel, 1993). • Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (SSCP) (Hayashhi, 1992). • DGGE (Riedel <i>et al.</i>, 1990). TGGE (Riesner <i>et al.</i>, 1989). • Análisis heteroduplex (HDA) (Pérez <i>et al.</i>, 1999). • DHPLC (Hauser <i>et al.</i> 1998). • Polimorfismo Amplificado de ADN por Primer Arbitrario (MAAP) (Caetano and Anolles, 1996). • ADN Polimórfico Amplificado al Azar, (RAPD) (William <i>et al.</i>, 1990). • Minisatélites Amplificación de ADN (identificación de individuos) DAF, (Caetano – Anolles <i>et al.</i>, 1991). • AP-PCR (Welsh and McClelland, 1990). • Secuencias Repetidas Intersimples (ISSR) (Zietkiewicz <i>et al.</i>, 1994). • Reacción Amplificada de Primer Simple (SPAR) (Staub <i>et al.</i>, 1996). • ADN de Minisatélite de Amplificación Directa (DAMD) (Heath <i>et al.</i>, 1993). • Polimorfismo en la Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP) (Vos <i>et al.</i>, 1995). • Loci Polimórfico de Microsatélite Amplificado Selectivamente (SAMPL), (Witsenboer <i>et al.</i>, 1997).

FUENTE: Spooner *et al.*, 2005.

2.13.1. Reacción en cadena polimerasa PCR

La PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de ADN de una región específica del genoma de la especie se amplifica de manera cíclica en una mezcla de reacción *in vitro*; lo anterior permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de ADN, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aun cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentración muy baja (Saiki *et al.*, 1988).

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con el ADN entre los dos oligonucleótidos y se sigue con un paso de amplificación. Luego, se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo (Claros, 1998). Según la técnica, se usan uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN o diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Valadez - Kahl, 2000).

2.13.2. RAPD

En 1990, Williams *et al.* y Welsh y McClelland, independientemente, describieron la utilización de un iniciador oligonucleótido de secuencia simple y al azar en una PCR de baja severidad (35-45 °C) para la amplificación simultánea de varios fragmentos de ADN. Estos fragmentos los refirieron como amplificación de polimorfismos de ADN al azar (RAPD) y “primers” arbitrarios PCR (AP-PCR), respectivamente (Mohler and Schwarz, 2005; Weising *et al.*, 2005).

Esta metodología consiste en la amplificación de ADN mediante PCR utilizando oligonucleótidos al azar, generalmente de 10 pb de longitud, que varían en el contenido de GC (de 40 a 100 %). Normalmente un solo oligonucleótido es utilizado como iniciador, que trabaja hacia adelante o hacia atrás y las regiones flanqueadas por secuencias repetidas invertidas homólogas al oligonucleótido son amplificadas de acuerdo con las condiciones normales para amplificación de PCR y se logran amplificar fragmentos de 1 a 10 sitios genómicos de manera simultánea (Bolívar, 2007, Mohler and Schwarz, 2005). Los fragmentos amplificados tienen un tamaño que va de los 0.5 a 5 Kb. El iniciador se usa como punto de partida para que la ADN polimerasa termoestable (Taq) sintetice la segunda cadena a partir de un ADN genómico molde y una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), de esta manera la secuencia genómica se extiende a partir del extremo OH-3' de los iniciadores (Williams *et al.*, 1990).

Este proceso se realiza en un termociclador con programa de varios ciclos por un tiempo y temperaturas específicas, divididos en tres etapas básicas que incluyen: 1) desnaturalización térmica del ADN: consiste en la separación de las dos cadenas de ADN a una temperatura de 90 a 95 °C; 2) alineamiento de los iniciadores: los oligonucleótidos se alinean a las cadenas simples de ADN molde, este proceso ocurre a temperaturas de 36 a 60 °C y 3) extensión del iniciador: la ADN polimerasa integra los dNTPs a las nuevas cadenas de ADN a temperaturas de aproximadamente 72 °C. Este ciclo se repite de 25 a 45 veces, en cada ciclo los fragmentos de ADN se amplifican exponencialmente. Los productos amplificados pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida y visualizarse mediante la tinción de estos geles con bromuro de etidio o nitrato de plata (Williams *et al.*, 1990).

Los polimorfismos entre individuos resultan principalmente de diferencias en las secuencias en uno o en ambos sitios iniciadores o de inserciones-delecciones y son visibles en los geles, cada uno de los fragmentos amplificados representaría un *locus*

específico en el genoma y se visualizan como bandas presentes (alelo 'A') o ausentes (alelo 'a'). Por lo tanto, los RAPD son marcadores de tipo dominante, ya que un fragmento se presenta únicamente cuando es homocigoto (AA) o heterocigoto (Aa); sin embargo, los alelos homólogos pueden a veces ser identificados con la ayuda de información detallada del pedigree (Bolívar, 2007 y Mohler and Schwarz, 2005).

La inserción de grandes fragmentos de ADN entre los dos sitios de alineación origina un fragmento muy largo provocando que se pierda, por otra parte la delección o pérdida de un fragmento de ADN que lleve uno de los dos sitios de alineación provoca también su pérdida. También existen polimorfismos debidos a la sustitución de un nucleótido que puede afectar el alineamiento de uno de los dos iniciadores y a la inserción o delección de pequeños fragmentos de ADN lo que origina cambios en el tamaño del fragmento (Bolívar, 2007).

La técnica de RAPD presenta varias ventajas: no se requiere conocer la secuencia genética, existen iniciadores universales y comerciales, el protocolo es relativamente fácil y rápido, se requieren cantidades pequeñas de ADN y la automatización es posible (Aureoles, 2006). Sin embargo, sus desventajas son: por su naturaleza dominante, no se pueden identificar heterocigotos; además, la reproducibilidad de los resultados no es exacta, estos pueden depender del tipo de Taq ADN polimerasa, la competición de los fragmentos de ADN, el equipo termociclador y el de electroforesis que se utilice (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica ha sido la más utilizada para construir mapas y analizar la semejanza de genotipos. También es utilizada para estudios a nivel individual (identificación genética), estudios de diversidad genética de cultivares, así como estudios de especies relacionadas entre sí y su relación con sus ancestros silvestres (Nieto *et al.*, 2005 y Williams *et al.*, 1990). Debido a los problemas de reproducibilidad de los RAPD, muchos investigadores han tratado de resolver este problema y han

desarrollado otro tipo de marcadores. Paran y Michelmore (1993) convirtieron los fragmentos RAPD a marcadores de PCR simples y robustos llamados Secuencias Caracterizadas de Regiones Amplificadas (SCAR). En estos marcadores, los iniciadores son derivados de los fragmentos RAPD clonados, los cuales son extendidos de su tamaño original con 10 a 15 bases (Mohler y Schwarz, 2005).

2.13.3. ISSR

Las secuencias entre repeticiones simples o ISSR, son las regiones situadas entre microsatélites. La técnica se basa en la amplificación por PCR de las secuencias ubicadas entre los microsatélites. En esta técnica, desarrollada por Zietkiewicz *et al.* (1994), utiliza iniciadores cuya secuencia debe estar formada por di o trinucleótidos con un nucleótido extra en la terminación 3'. El nucleótido extra permite la amplificación únicamente si el iniciador se ancla en la terminación 5' del microsatélite con un "primer" nucleótido disponible en la secuencia flanqueadora (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005). Los nucleótidos extras funcionan como "anclas" y aseguran que la amplificación sea iniciada en la misma posición 5' del microsatélite en cada ciclo, en donde el iniciador localiza dos regiones microsatélite separadas por una secuencia genómica amplificable del ADN molde, la reacción de PCR generará una banda de tamaño particular para ese locus, representando el fragmento de ADN que se encuentra entre los microsatélites (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005). Las huellas genéticas obtenidas con esta tecnología revelan polimorfismos inter e intraespecíficos en una amplia variedad de especies eucariotas; además, permiten detectar alta variación genética entre individuos muy cercanos y son altamente reproducibles, debido a que este método es más exigente y utiliza altas temperaturas de alineación durante la PCR. Otra de las ventajas de esta técnica es que para diseñar los iniciadores no se necesita conocer secuencias del genoma del organismo de interés. Esta clase de marcadores es de tipo dominante, al igual que los RAPD, cada banda corresponde a un locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante, mientras que la ausencia de la misma representa al genotipo recesivo (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005).

2.13.4. Investigación en caracterización molecular en piña

A continuación se presenta una serie de ejemplos generales del uso de marcadores moleculares en piña (Cuadro 2.12). Los usos más frecuentes corresponden a la estimación de la diversidad genética intra e inter poblacional, sea en especies cultivadas o silvestres, en el desarrollo de mapas de ligamiento, para estudio de las relaciones filogenéticas entre especies, también como herramienta para determinar la mejor estrategia de conservación de recursos genéticos por ejemplo en la formación de colecciones nucleares, en la identificación de duplicados, entre otros.

Cuadro 2.11. Caracterización molecular de piña usando diferentes marcadores moleculares.

Autor	Técnicas	Investigación
Carlier <i>et al.</i> (2004)	RAPD, AFLP, ISSR	Mapas genéticos
Duval <i>et al.</i> (2001)	RFLP	Análisis de la diversidad genética.
Feuser <i>et al.</i> (2003)	Isoenzimas, RAPD	Detección de variantes en plantas cultivadas <i>in vitro</i> , ya sea, en un sistema de inmersión temporal o en uno estacionario.
Hidayata <i>et al.</i> (2012)	ITS	Análisis de la diversidad genética.
Kato <i>et al.</i> (2005)	AFLP	Análisis de la diversidad genética.
Lv <i>et al.</i> (2012)	qRT, Gen AcFT	Aislamiento y caracterización del locus T de inflorescencia
Popluechai <i>et al.</i> (2007)	RAPD	Análisis de las relaciones genéticas.
Rodríguez <i>et al.</i> (2013)	SSR	Análisis de las relaciones genéticas.
Ruas <i>et al.</i> (1995)	RAPD	Análisis de la diversidad genética.
Ruas <i>et al.</i> (2001)	RAPD	Análisis de la diversidad genética.
Santos (2008)	RAPD	Análisis de la diversidad genética.
Sripaoraya <i>et al.</i> (2001)	RAPD	Análisis de las relaciones genéticas
Tapia <i>et al.</i> (2005)	RAPD, ISSR	Análisis de la diversidad genética.
Vanijajiva (2012)	ISSR	Análisis de la diversidad genética.
Wohrmann y Weising (2011)	SSR	Análisis de las relaciones genéticas.
Zhang <i>et al.</i> (2012)	ISSR	Análisis de la diversidad genética.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DOS POBLACIONES DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) Merr HÍBRIDO MD-2

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DOS POBLACIONES DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) Merr HÍBRIDO MD-2

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TWO POBLATIONS OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) Merr HYBRID MD-2

Garcidueñas-Paz, J. A.¹ y Rodríguez-de la O, J. L.²

RESUMEN

La caracterización morfológica de dos poblaciones de piña se realizó con 48 descriptores de la guía del IBPGR. Los descriptores se dividieron en tres escalas de medición: cuantitativos, categóricos y ordinales en las estructuras de la planta madre, la fruta y corona. Los datos morfológicos dieron como resultado 29 variables cuantitativas y 19 cualitativas. Las dos poblaciones se caracterizaron separando caracteres cuantitativos, cualitativos y en combinación. Se realizó un análisis de componentes principales para conocer cuáles fueron las variables que permitieron explicar el mayor porcentaje de variabilidad fenotípica. Mediante un análisis de correlación se establecieron las variables que tenían mayor relación entre ellas. Se calcularon las medias aritméticas, coeficientes de variación y desviación estándar para determinar la variabilidad. Finalmente, los dendrogramas obtenidos permitieron establecer los agrupamientos correspondientes de los individuos de cada población a través del coeficiente de similitud. En la población de individuos normales y mutantes a partir de datos cuantitativos y cualitativos se diferenciaron cinco grupos a un coeficiente de distancia de 0.34. En la población de individuos normales los caracteres cuantitativos diferenciaron a los 40 individuos en ocho

grupos a un coeficiente de distancia de 0.16, los caracteres cualitativos diferenciaron en tres grupos a un coeficiente de 0.03, un análisis combinado de caracteres cualitativos y cuantitativos permitió la formación de ocho grupos a un coeficiente de 0.14. En la población de individuos mutantes los caracteres cuantitativos diferenciaron a los 40 individuos mutantes en cinco grupos a un coeficiente de distancia de 0.38, Los caracteres cualitativos discriminaron a los 40 individuos en tres grupos a un coeficiente de 0.09, un análisis combinado de caracteres cualitativos y cuantitativos permitió la formación de ocho grupos a un coeficiente de 0.35. La caracterización morfológica estableció a los 40 individuos mutantes en las siguientes siete categorías: I) Frutos grandes con la corona múltiple, II) Frutos grandes con la corona grande, III) Frutos pequeños con la corona en forma cónica, IV) Frutos pequeños con la corona en forma cónica y presencia de fisura, V) Frutos con la corona en forma de roseta, VII) Frutos con la corona en forma cilíndrica, VI) Frutos espinosos con la corona en forma cilíndrica.

Palabras clave: caracterización, descriptores, variables cuantitativas, cualitativas.

ABSTRACT

Morphological characterization of two populations of pineapple was performed with 48 descriptors IBPGR guide. The descriptors were divided into three measurement: quantitative, categorical and ordinal in the structures of the mother plant, fruit and crown. The morphological data resulted in 29 quantitative and 19 qualitative variables. The two populations were characterized characters separating quantitative, qualitative and in combination. We performed a principal component analysis to know what were the variables that allowed explaining the highest percentage of phenotypic variability. Through correlation analysis variables were established had greater relationship between them. Arithmetic means were calculated, coefficients of variation and standard deviation to determine variability. Finally, the dendrograms obtained allowed to establish appropriate groupings of individuals of each population by similarity coefficient. In the population of normal and mutant individuals from quantitative and qualitative data five groups differed to a distance coefficient of 0.34. In normal individuals the population of quantitative traits differed

at 40 individuals in eight groups to a distance coefficient of 0.16, the qualitative characteristics differentiated into three groups to a coefficient of 0.03, a combined analysis of qualitative and quantitative characters allowed the formation of eight groups at a ratio of 0.14. In the population of individuals mutants quantitative traits differed at 40 mutant individuals in five groups to a distance coefficient of 0.38, qualitative characters discriminated against 40 individuals in three groups at a coefficient of 0.09, a combined analysis of qualitative characters and quantitative allowed the formation of eight groups in a ratio of 0.35. Morphological characterization of 40 individuals established mutants in the following seven categories: I) large fruits with multiple crown, II) large fruits with large crown, III) small fruits with conical crown, IV) small fruits with conical shaped crown and presence of cleft, V) fruits with rosette shaped crown, VII) fruits with cylindrical crown, VI) spiny fruits with cylindrical crown.

Key words: characterization, description, variables quantitative, qualitative.

3.1. INTRODUCCIÓN

La caracterización morfológica es el primer paso que se lleva a cabo en los programas de mejoramiento genético de los cultivos y de conservación. Las características morfológicas se han venido utilizando para estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas y conservar los recursos genéticos. A la fecha, los marcadores morfológicos establecen las bases para identificar y diferenciar variedades, pero presentan las siguientes limitantes: su obtención es tardada, son complejos, limitados, subjetivos, influenciados por el ambiente, costosos e involucran estados de desarrollo específicos del cultivo (Yasmin *et al.*, 2006).

La caracterización del germoplasma representa una actividad importante para los coleccionistas de frutales que los conservan *ex situ* (Anónimo, 2002). Con la caracterización se evalúan una serie de características cuantitativas y cualitativas, que permiten obtener información muy valiosa sobre la variabilidad existente, la cual puede ser utilizada en programas de selección y mejoramiento, en sistemática, identificación, gestión de bancos de germoplasma, definición de variedades comerciales, búsqueda de marcadores útiles en el mejoramiento genético (González, 2001; Sheldeman *et al.*, 2004).

La caracterización se puede realizar en diferentes formas, pero la más común es la morfológica ó fenotípica en la cual se evalúan datos de las características morfológicas de la planta. Para ello se requiere de la definición de variables con mayor estabilidad, los cuales pueden ser propuestas como descriptores, y que deben ser de fácil medición y uniformes dentro del mismo genotipo. Estas generalmente hacen referencia a la presencia de estructuras y fenología de una accesión (González, 2001).

Existen diferentes tipos de descriptores, por ejemplo, de pasaporte, de manejo, de sitio y ambiente, de evaluación, y de caracterización. Los de caracterización permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos y generalmente son caracteres altamente heredables, pueden ser fácilmente detectados a simple vista y se expresan de forma similar en ambientes variados; además pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales que son deseables, según el consenso de los usuarios de un cultivo en particular (Franco e Hidalgo, 2003).

El uso de un descriptor facilita mucho este proceso y al mismo tiempo permite una homogenización de los datos, facilitando en el futuro la comparación con datos tomados en otros sitios (Franco e Hidalgo, 2003). La caracterización morfológica no puede diferenciar entre la expresión genética y la influencia del ambiente. Muchas veces las condiciones ambientales tienen su influencia en las características morfológicas. Para evitar el efecto genotipo x ambiente es aconsejable establecer campos de colecciones y realizar la caracterización *ex situ*. El establecimiento de colecciones *ex situ* permite estudiar el efecto ambiental (Sheldman *et al.*, 2004).

México es el noveno productor de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), después de Nigeria y Tailandia, con 16,604 Ha plantadas de piña en el 2010 y un volumen de producción de 701,746 Ton (FAO, 2010). La producción comercial de México se obtiene principalmente de variedades introducidas cuya variación genética se desconoce. Las bases genéticas con que cuenta el país en este género y variedad son insuficientes. México no se considera centro de origen de esa especie; sin embargo el cultivo de piña se remonta a la segunda década del siglo XX con el incremento de la demanda internacional por la caída de la producción de piña en Hawái y el establecimiento de varias empacadoras en las regiones productoras del país (ASERCA, 2000), sobre todo de origen norteamericano, introduciendo materiales que aún permanecen en las zonas no cultivadas o en plantaciones de productores y que resultan eco tipos adaptados a esas zonas.

En el país son pocos los trabajos publicados donde se ha caracterizado la diversidad morfológica y agronómica de la piña, la cual sería útil para identificar una especie o cultivar. Tapia *et al.* (2005) evaluaron 15 materiales de piña del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Papaloapan, Veracruz; mediante caracteres morfológicos y observaron que éstos, a pesar de la variabilidad encontrada, tendieron a ser similares; las variedades Champaka, MD-2 y Cayena Lisa que son las variedades genéricas más cultivadas en la región del Papaloapan. Por lo que concluyeron que la piña tiene una reducida variabilidad fenotípica. Los mismos autores evaluaron 11 variables morfológicas (cuantitativas y cualitativas) encontrado que los materiales silvestres son los que menor parentesco tienen con el resto de los materiales y que su importancia radica en el uso ornamental y la resistencia a plagas y enfermedades, siendo de interés en los programas de mejoramiento.

Por su parte Isidró *et al.* (2003) realizaron una caracterización de germoplasma de piña colectada en Cuba mediante prospección nacional para conocer su localización, diversidad genética y situación actual de variedades cultivadas de piña y otras especies de la familia Bromeliaceae y del género *Ananas* para su posible utilización en un programa de mejoramiento genético de la especie.

En el presente trabajo de investigación se caracterizaron dos poblaciones de piña (constituida una de individuos normales y la otra de mutantes) mediante el uso de descriptores morfológicos, con el propósito de determinar las relaciones genéticas mediante el grado de similitud entre los materiales, esperando que los datos resultantes de la evaluación puedan utilizarse para futuros trabajos de selección y fitomejoramiento.

3.1.1. Objetivos

Caracterizar dos poblaciones de piña procedentes del estado de Veracruz utilizando caracteres morfológicos, con la finalidad de detectar relaciones genéticas entre las mismas.

Establecer las categorías y grupos de los individuos a través de la caracterización morfológica, con base en los descriptores para piña del IBPGR.

3.1.2. Hipótesis

Debido a que los materiales de piña evaluados se obtuvieron a partir de diferentes métodos de propagación, se espera detectar variabilidad genética entre los mismos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Localización del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), localizada en Texcoco, Estado de México (19° 20' 34.61" LN y 98° 53' 06.93" LO, a 2269 msnm).

3.2.2. Material experimental

La colecta de los materiales se llevó a cabo mediante muestreo simple aleatorio. Se colectaron 80 especímenes de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) de diferentes parcelas ubicadas en los municipios de Juan Rodríguez Clara y Villa Isla en el estado de Veracruz. Los ejemplares correspondieron a 40 individuos normales y 40 individuos mutantes de acuerdo a las categorías establecidas.

3.2.3. Caracterización morfológica

La investigación se estableció en parcelas productoras de piña. La colecta del material vegetal se realizó el 03/Mayo/2012 en el período de cosecha y maduración de la piña. La caracterización morfológica se realizó con 48 descriptores de la guía del IBPGR (1990). Descriptores para Piña (Cuadro 3.1.), relativos de planta, fruto y corona, se dividieron con tres escalas de medición: categóricos, ordinales y cuantitativos. La luminosidad, la saturación y el color se midieron en un espectrofotómetro modelo SP-62 marca X-Rite, Inc. Los datos morfológicos (29 variables cuantitativas y 19 variables cualitativas) se analizaron construyendo primero una matriz básica de datos (MBD). En un primer análisis, la matriz básica de datos cualitativos y cuantitativos con individuos normales y mutantes, fue estandarizada y se generó una matriz de distancias mediante el coeficiente SM se construyó un dendrograma mediante el paquete computacional Sistema de Análisis

Multivariado y Taxonómico Numérico NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000). Este mismo análisis se repitió separando los datos cualitativos y cuantitativos; para la población con individuos normales e individuos mutantes se realizó un análisis de agrupamiento utilizando UPGMA y se construyeron los dendrogramas tomando a cada accesión como una unidad taxonómica operacional (OTU) mediante el paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000).

Se realizó un análisis de componentes principales para datos cuantitativos, la matriz básica de datos fue estandarizada y se obtuvo una matriz de correlación, a partir de esta se determinaron las matrices de eigen vectores y eigen valores y se generaron los diagramas correspondientes mediante el paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000).

Se empleó el paquete computacional Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.0 y se realizó el cálculo de la media aritmética, coeficiente de variación, desviación estándar, máximos y mínimos; para cada descriptor morfológico en la población de individuos normales e individuos mutantes.

Cuadro 3.1. Cuarenta y ocho caracteres morfológicos seleccionados de la guía de descriptores de IBPGR, 1990, evaluados en las colectas de piña.

Número	Carácter	Abrev.	Escala	Valores
Planta				
1	Altura de la planta	A	Cuant	Cm
2	Cobertura de la planta	C	Cuant	Cm
3	Hábito de la planta	H	Cat	1=Alojado 2=45° 3=90°
4	Porte del follaje	PF	Cat	1=Vertical 2=Ligeramente abierta 3=Abierta 4=Difusión 5=Caída
5	Número de hojas	NH	Cuant	Número
6	Longitud de la hoja más larga	LHML	Cuant	Mm
7	Ancho de la parte más ancha de la hoja más larga	APMAHML	Cuant	Cm
8	Espesor medio de la hoja más larga	EMHML	Cuant	Mm
9	Longitud de las espinas	LE	Cuant	Mm
10	Dirección de las espinas	DE	Bin	1=Antrosa 2= Retrosa
11	Presencia de espinas	PE	Cat	1=Espinas en la punta 2=Espinas en la punta e intermedio 3=Espinas en la punta e inferior 4= Espinas en toda la hoja
12	Longitud del pedúnculo	LP	Cuant	Cm
13	Diámetro del pedúnculo	DP	Cuant	Cm
14	Número de hojas del	NHP	Cuant	Número

	pedúnculo			
15	Número de las brácteas del pedúnculo	NBP	Cuant	Número
16	Longitud de la bráctea del pedúnculo	LBP	Cuant	Cm
17	Presencia de tricomas	PT	Bin	0=Ausente 1=Presente
Fruta				
18	Forma de la fruta	FF	Cat	1=Cuadrado 2=Oval 3=Redonda 4=Cónica 5=Largo-cónica 6=Piramidal 7=Cilíndrico, ligeramente de la base 8=Cilíndrico, drásticamente de la base 9=Piriforme 10=Reniforme
19	Peso de la fruta	PF	Cuant	G
20	Altura de la fruta	AF	Cuant	Cm
21	Diámetro de la fruta	DF	Cuant	Cm
22	Tipo de fruta	TF	Bin	1=Agrupados 2=Aislados
23	Número de frutitos	NF	Cuant	Número
24	Luminosidad de la fruta en la madurez	LFM	Cuant	Número
25	Saturación de la fruta en la madurez	SFM	Cuant	Número
26	Tono de la fruta en la madurez	TFM	Cuant	Número
27	Homogeneidad del color de la fruta en la madurez	HCFM	Cat	1=Malo 2=Medio 3=Bueno
28	Presencia de fisura	PF	Bin	0=Ausente 1=Presente
29	Número de ojos	NO	Cuant	Número
30	Perfil de los ojos	PO	Cat	1=Liso

				2=Normal 3=Prominente
31	Forma de los ojos	FO	Cat	1=Redondos 2=Redondos-cuadrados 3=Cuadrados 4=Redondos-pentagonales 5= Pentagonales 6=Redondos-hexagonales 7=Hexagonales 8=Cuadrados-pentagonales 9=Cuadrados-hexagonales 10=Pentagonales-hexagonales
32	Tamaño relativo de las brácteas florales	TRBF	Cat	1=1/4 2=1/3 3=1/2 4=2/3 5=3/4 6=4/4
33	Número de espirales	NE	Cuant	Número
34	Número de ojos en la espiral más larga	NOEML	Cuant	Número
Corona				
35	Número de coronas	NC	Cuant	Número
36	Corona unida a la fruta	CUF	Bin	1=Sin cuello 2=Con cuello
37	Longitud de la corona	LC	Cuant	Cm
38	Peso de la corona	PC	Cuant	G
39	Hojas	H	Bin	1=Rectas 2=Curvadas
40	Número de hojas de la corona	NHC	Cuant	Número
41	Forma de la corona	FC	Cat	1=Cono 2=Bloques oblongos 3=Abanico 4=Cónico-largo

				5=Cilíndrica alargada 6=Cilíndrica alargada con tapa de manojó
42	Actitud del follaje	AF	Cat	1=Erguido 2=Semierecto 3=Horizontal 4=Caída
43	Presencia de espinas en las hojas	PEH	Cat	1=Lisa 2=Espinass en la punta 3=Epinoso-serradas 4=Tuberías
44	Luminosidad de la hoja	LH	Cuant	Número
45	Saturación de la hoja	SH	Cuant	Número
46	Tono de la hoja	TH	Cuant	Número
47	Tamaño de corona en proporción al tamaño de la fruta madura	TCPTFM	Cat	1=Corona inferior de 1/4 de tam. del fruto 2=Corona aprox. de 1/4 de tam del fruto 3=Corona aprox. de 1/3 de tam. del fruto 4=Corona aprox. de 1/2 de tam. del fruto 5=Corona aprox. de 3/4 de tam. del fruto 6=Corona aprox. al mismo tam. del fruto 7=Corona aprox. 1.5 veces tam. del fruto 8=Corona aprox. 2 veces tam. del fruto 9=Corona mayor a 2 veces tam. del fruto
48	Ápice de la corona	AC	Cat	1=Con copa como cavidad 2=Uniformemente plana 3=Puntas sobresalientes

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

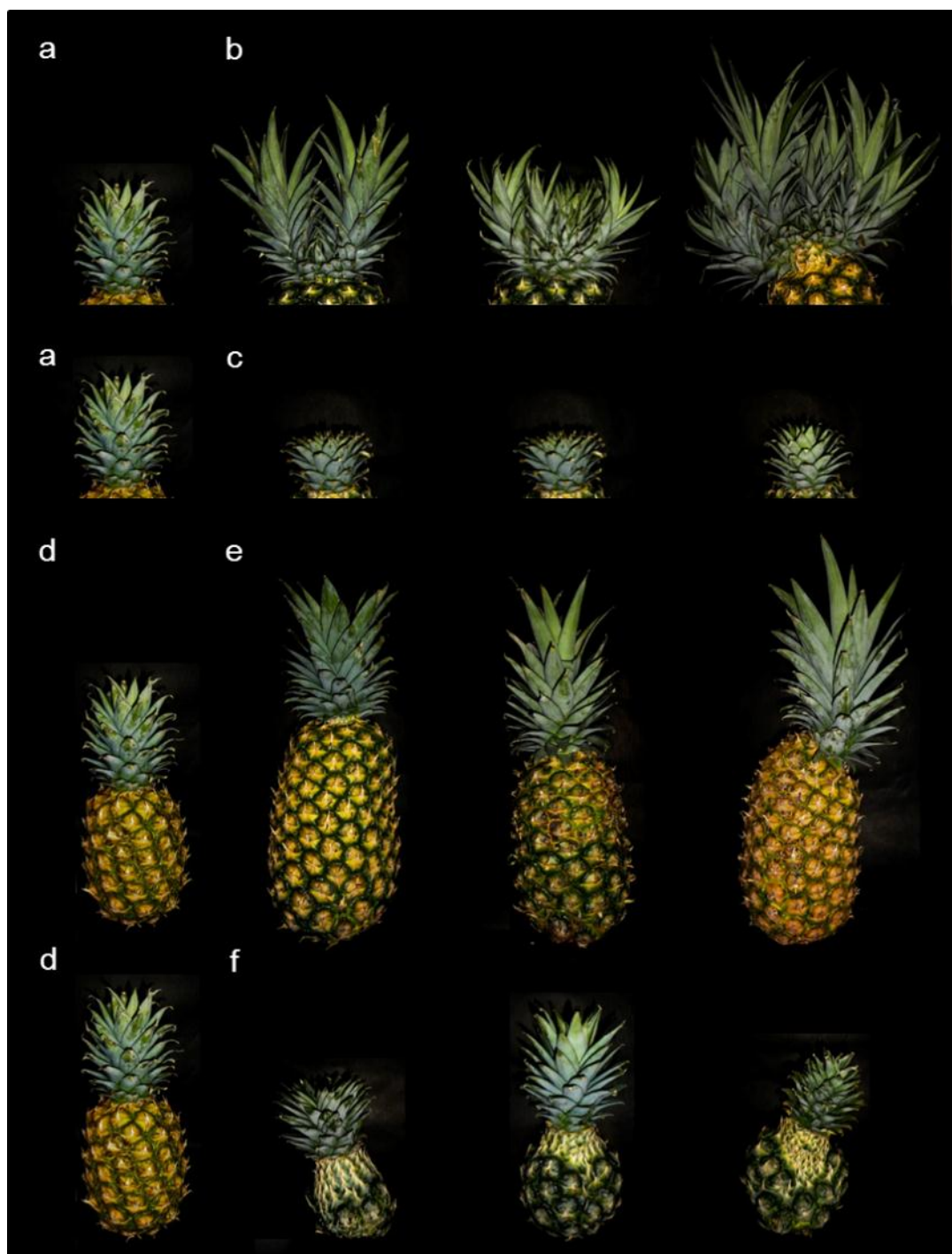


Figura 3.1. Variabilidad fenotípica de estructuras de piña: a) corona normal, b) coronas múltiples, c) coronas en forma de roseta, d) fruto normal, e) frutos grandes, f) frutos pequeños y deformes.

3.3.1. Análisis de individuos normales y mutantes

Según el dendrograma generado a partir de datos cuantitativos y cualitativos se diferenció cinco grupos a un coeficiente de distancia de 0.34 (Figura 3.2.) dentro de un rango de 0.00 a 0.61.

El primer grupo consistió de la población formada de 40 individuos normales y 26 individuos mutantes. Este grupo se subdividió a un coeficiente de distancia de 0.30 en dos subgrupos: 1A, integrado por toda la población de 40 individuos normales y 15 individuos mutantes con las siguientes características: los individuos 32Pi, 33Pi, 34Pi y 36 fueron frutos grandes con corona grande; 8Pi y 18Pi fueron frutos grandes con corona en forma cilíndrica y presencia de cuello; 1Pi correspondió a un fruto grande con corona múltiple; 27Pi fue un fruto grande con la corona en forma cilíndrica; 11Pi presentó la corona en forma cónica; 23Pi presentó la corona en forma de roseta; 30Pi y 29Pi fueron frutos con corona grande y presencia de fisura; 26Pi correspondió a un fruto con corona larga-cónica con presencia de fisura; 25Pi y 40Pi correspondieron a frutos espinosos con corona en forma cilíndrica. Los frutos grandes y coronas grandes se presentaron en 8 y 6 individuos respectivamente, pero solamente 4 individuos los presentaron en conjunto.

El subgrupo 1B integrado con 14 individuos mutantes: 7Pi, 12Pi, 13Pi, 15Pi, 20Pi y 21Pi presentaron la corona en forma de roseta; 28Pi presentó la corona larga-cónica; 39Pi presentó la corona en forma cilíndrica; 14Pi correspondió a frutos pequeños con corona en forma cónica; 17Pi correspondió a fruto pequeño con corona en forma de roseta; 22Pi fue un fruto grande con la corona en forma de roseta y presencia de cuello; 19Pi correspondió a un fruto grande con corona en forma de roseta; 16Pi fue un fruto grande con corona en forma cilíndrica y presencia de cuello y el individuo 24Pi correspondió a un fruto espinoso con corona en forma cilíndrica. La corona en forma de roseta se presentó en 9 individuos.

El grupo 2 lo integraron tres individuos: los individuos 3Pi y 35Pi correspondieron a frutos pequeños con corona en forma cónica y presencia de fisura; el individuo 5Pi fue un fruto pequeño con corona en forma cónica.

El grupo 3 estuvo formado por los individuos: 4Pi fue un fruto pequeño con corona en forma cónica y presencia de fisura; 6Pi correspondió a un fruto pequeño con corona grande y presencia de fisura; 9Pi fue un fruto pequeño con corona larga-cónica y presencia de fisura.

El grupo 4 estuvo formado por los individuos: 2Pi, 10Pi, 31Pi, 38Pi y 41Pi que correspondieron a frutos grandes con corona múltiple.

A partir de este dendrograma se generó la división de ambas poblaciones, la población de individuos mutantes estuvo integrada por 14 individuos del subgrupo 1A, el subgrupo 1B y los grupos 2, 3, 4 y 5. Posteriormente se analizaron por separado.

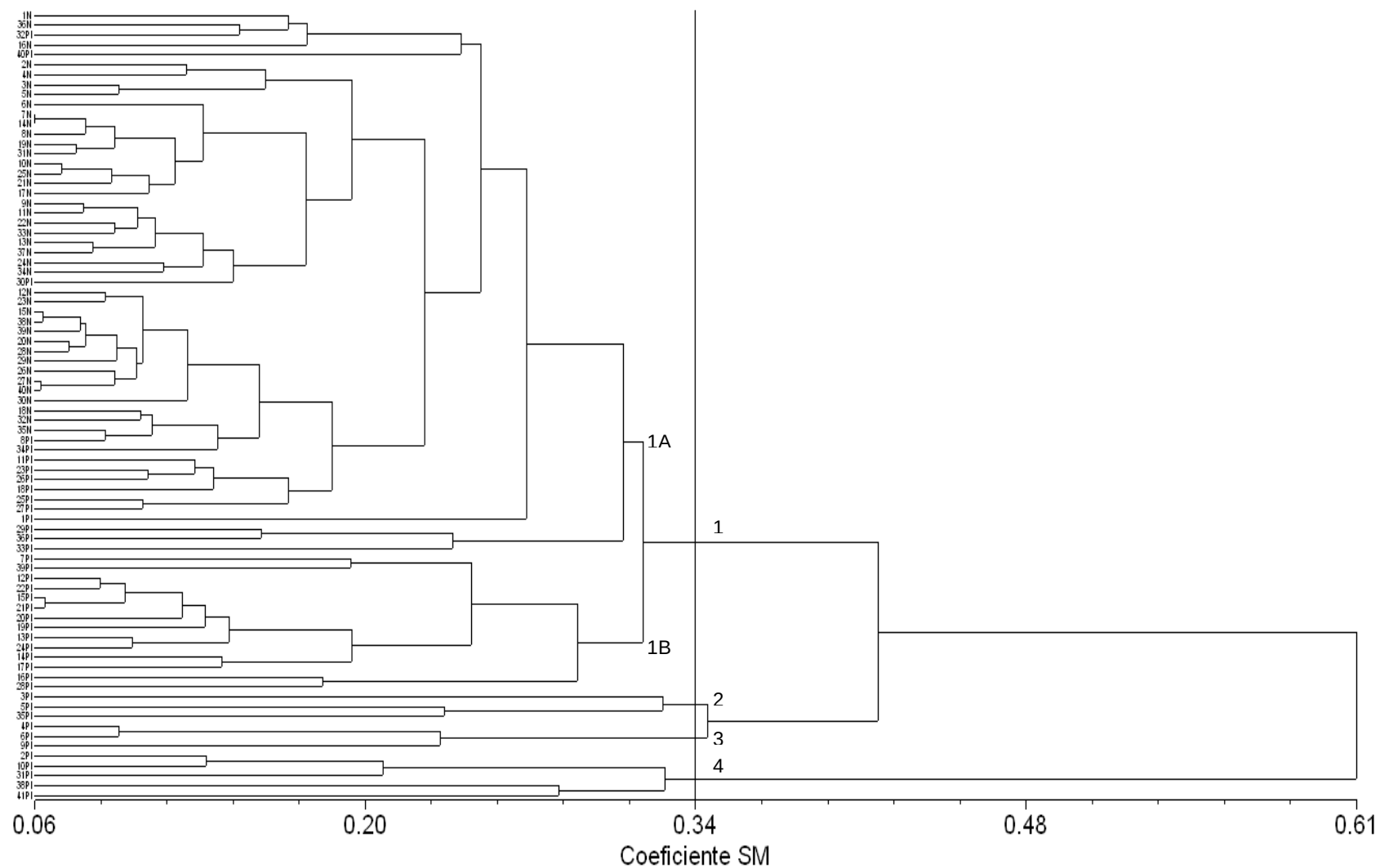


Figura 3.2. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos y cuantitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales y 40 individuos mutantes de piña.

3.3.2. Análisis de individuos normales

Los caracteres cuantitativos diferenciaron a los 40 individuos en ocho grupos a un coeficiente de distancia de 0.16 (Figura 3.3.), dentro de un rango de 0.00 a 0.26. El grupo 1 estuvo representado por el individuo 1N. El grupo 2 lo integraron los individuos 3N y 5N. El grupo 3 estuvo formado por los individuos 2N, 4N y 17N. El grupo 4 lo integraron los individuos 6N, 7N, 8N, 10N, 14N, 19N, 25N y 31N. El grupo 5 estuvo representado por los individuos 9N, 11N, 13N, 21N, 22N, 24N, 33N, 34N y 37N. El grupo 6 consistió de los individuos 12N, 15N, 18N, 20N, 23N, 26N, 27N, 28N, 29N, 30N, 32N, 35N, 38N, 39N y 40N. El grupo 7 fue representado por el individuo 16N. El grupo 8 estuvo integrado por el individuo 36N.

Los caracteres cualitativos discriminaron a los 40 individuos en tres grupos a un coeficiente de 0.03 (Figura 3.4.); los coeficientes de distancia variaron entre 0.00 y 0.06. El grupo 1 estuvo representado por los individuos 1N, 2N, 3N, 5N, 6N, 8N, 9N, 10N, 11, 14N, 13N, 15N, 16N, 17N, 18N, 19N, 20N, 21N, 22N, 23N, 24N, 26N, 27N, 28N, 31N, 33N, 34N, 35N, 39N y 40N. El grupo 2 lo integraron los individuos 4N, 12N, 29N y 36N. El grupo 3 consistió de los individuos 7N, 25N, 30N, 32N, 37N y 38N.

Un análisis combinado de caracteres cualitativos y cuantitativos permitió la formación de ocho grupos a un coeficiente de 0.14 (Figura 3.5.), en un rango de similitud entre 0.00 a 0.22. El grupo 1 estuvo representado por el individuo 1N. El grupo 2 lo integraron los individuos 2N y 4N. El grupo 3 estuvo formado por los individuos 3N y 5N. El grupo 4 lo integraron los individuos 6N, 7N, 8N, 10N, 14N, 17N, 19N, 21N, 25N y 31N. El grupo 5 estuvo representado por los individuos 9N, 11N, 13N, 22N, 24N, 33N, 34N y 37N. El grupo 6 consistió de los individuos 12N, 15N, 18N, 20N, 23N, 26N, 27N, 28N, 29N, 30N, 32N, 35N, 38N, 39N y 40N. El grupo 7 fue representado por el individuo 16N. El grupo 8 estuvo integrado por el individuo 36N.

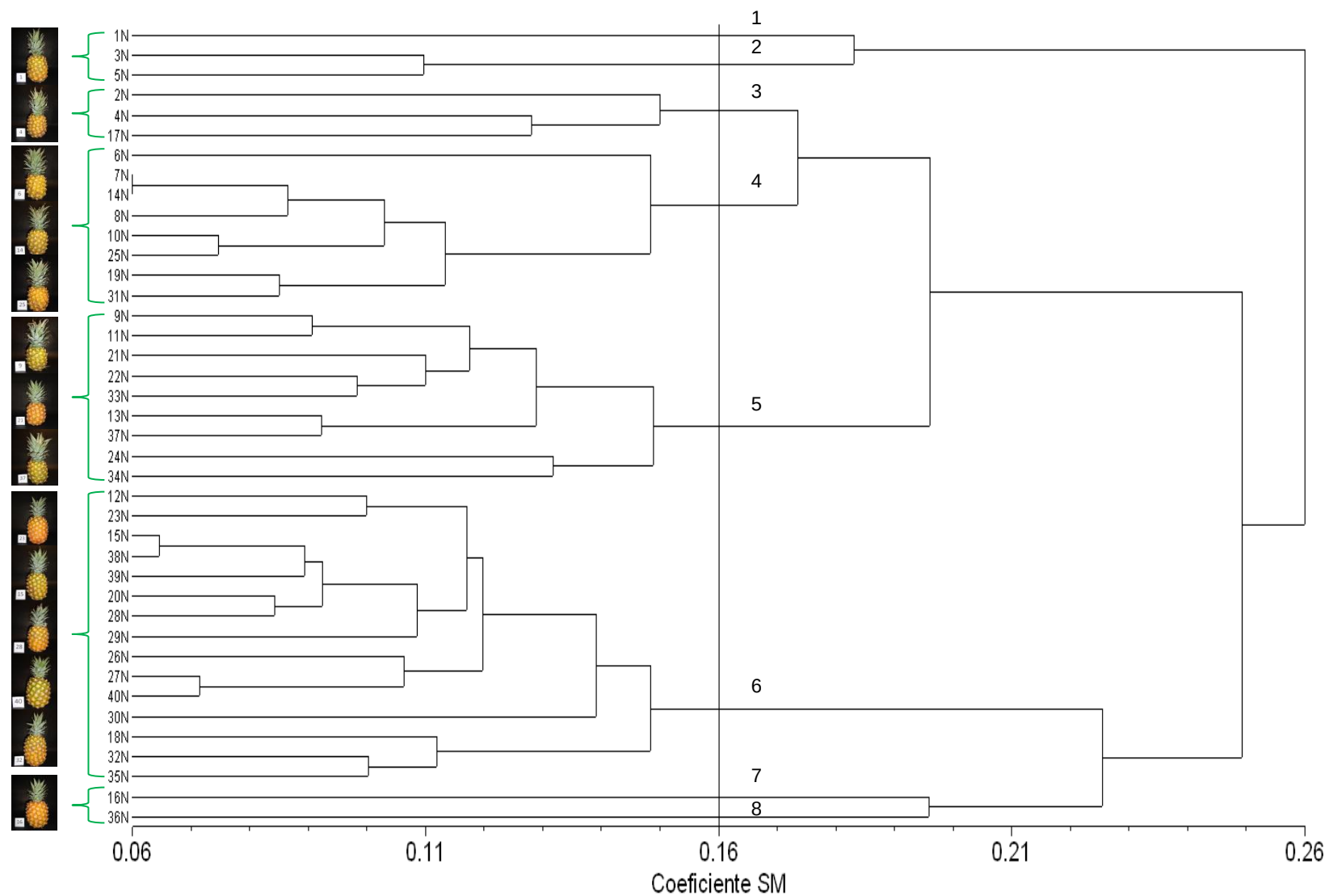


Figura 3.3. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales.

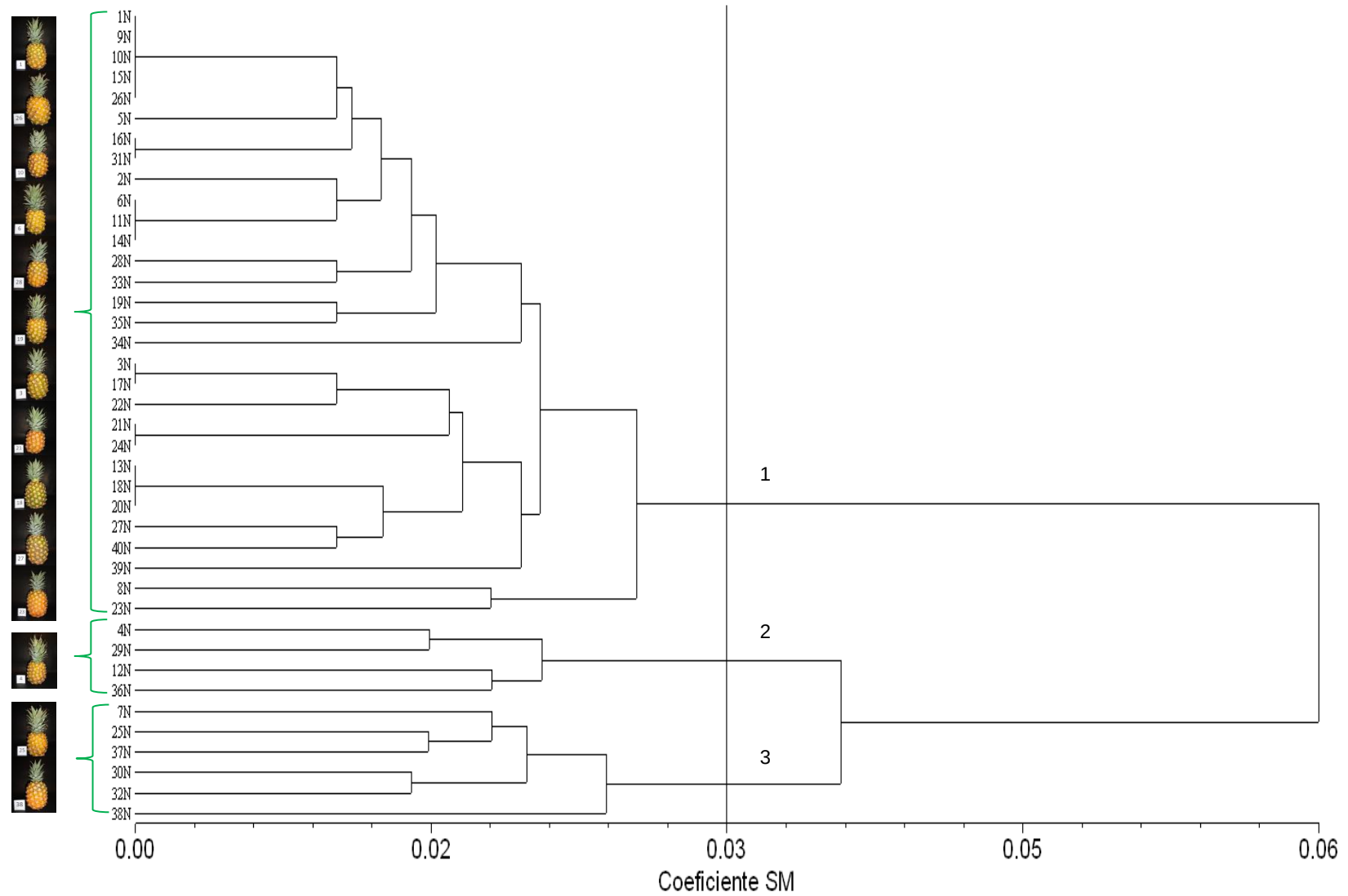


Figura 3.4. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales.

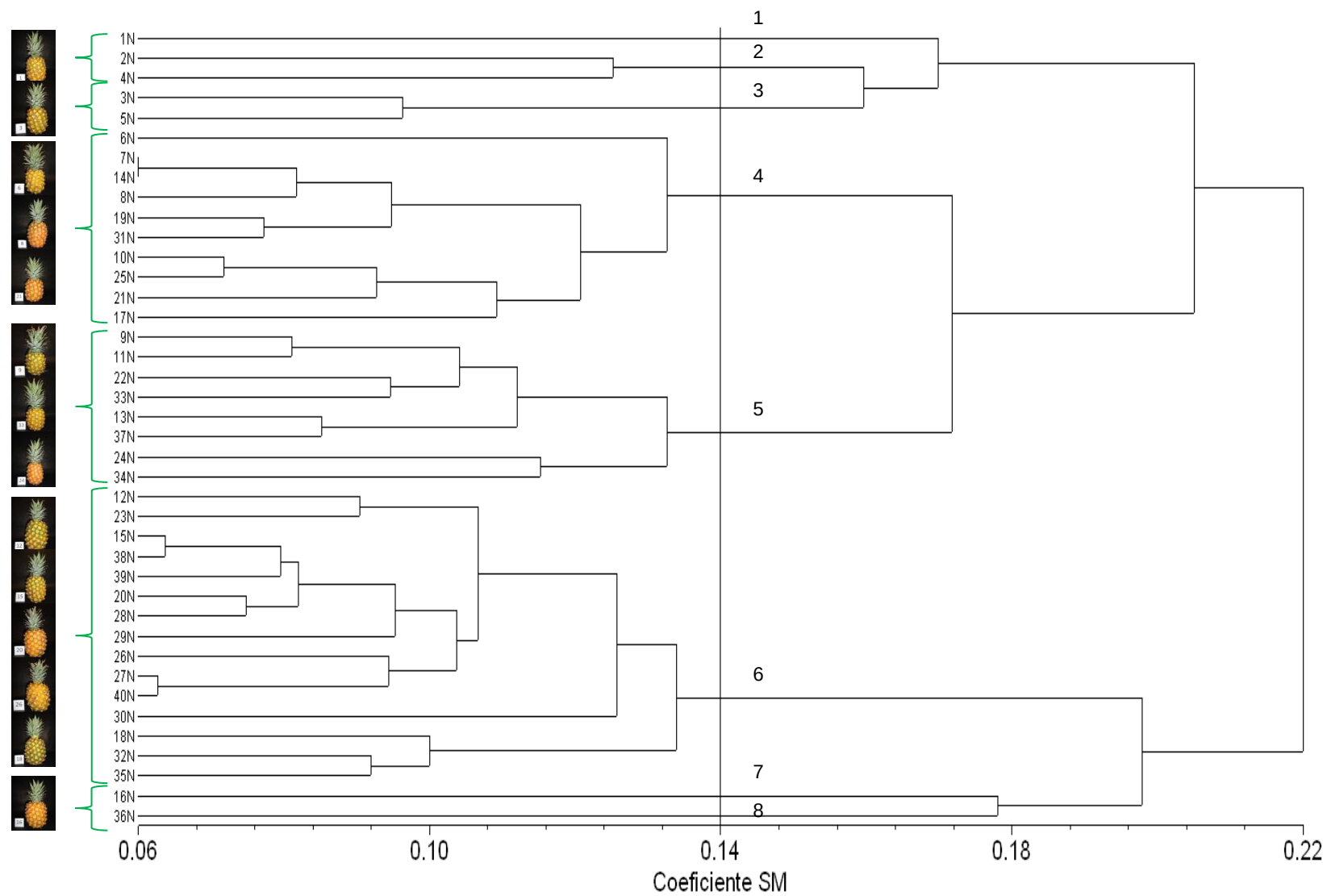


Figura 3.5. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos y cuantitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) con 40 individuos normales.

3.3.2.1. Análisis de componentes principales

Los vectores propios determinaron los cuatro componentes principales (CP) que explican el 63.81 % de la variabilidad observada para las variables morfológicas evaluadas (Cuadro 3.2.).

Cuadro 3.2. Vectores propios y proporción explicada de 29 componentes principales, obtenidos a partir de 48 variables morfológicas de piña.

CP	Vectores propios	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
1	9.83926598	33.9285	33.9285
2	4.23491515	14.6032	48.5317
3	2.40803980	8.3036	56.8352
4	2.02531576	6.9838	63.8191
5	1.80894915	6.2378	70.0568
6	1.50614504	5.1936	75.2505
7	1.02626501	3.5388	78.7893
8	0.97195431	3.3516	82.1409
9	0.79035607	2.7254	84.8662
10	0.71501019	2.4656	87.3318
11	0.64634002	2.2288	89.5605
12	0.52738260	1.8186	91.3791
13	0.46960478	1.6193	92.9984
14	0.42406932	1.4623	94.4607
15	0.35350119	1.2190	95.6797
16	0.30459314	1.0503	96.7300
17	0.23996858	0.8275	97.5575
18	0.21594278	0.7446	98.3021
19	0.13927867	0.4803	98.7824
20	0.11818477	0.4075	99.1899
21	0.07651596	0.2638	99.4538
22	0.07142618	0.2463	99.7001
23	0.04388366	0.1513	99.8514
24	0.02047581	0.0706	99.9220
25	0.01305777	0.0450	99.9670
26	0.00866668	0.0299	99.9969
27	0.00089163	0.0031	> 100%
28	0.00000000	0.0000	> 100%
29	0.00000000	0.0000	> 100%
Suma	29.000000		

De acuerdo al porcentaje acumulativo de los cuatro componentes principales se eligieron las variables con un mayor valor a -0.63 (Cuadro 3.3.). El mayor número de variables estuvo asociado con la fruta, las variables fueron el PF (peso de la fruta), AF (altura de la fruta), DF (diámetro de la fruta), NF (número de frutitos), LFM (luminosidad de la fruta en la madurez), TFM (tono de la fruta en la madurez), NO (número de ojos) y NOEML (número de ojos en la espiral más larga).

Cuadro 3.3. Contribución de las variables evaluadas a los cuatro primeros componentes.

Variable	C1	C2	C3	C4
A	0.5964	0.2105	0.3698	0.3010
C	-0.1608	0.1741	0.2872	0.4842
NH	0.4374	0.2365	0.2385	0.3879
LHML	-0.0028	0.0540	-0.6977	-0.5099
APMAHML	-0.9074	0.0375	-0.1544	-0.0566
EMHML	-0.6420	0.1574	0.1342	0.0515
LE	-0.8113	-0.1188	0.3044	0.0099
LP	0.4558	0.1325	0.3013	0.1902
DP	-0.8847	-0.0056	-0.0957	-0.0961
NHP	-0.2535	-0.0234	0.0284	0.2394
NBP	-0.4391	0.0644	0.1696	0.1245
LBP	-0.8742	0.0665	0.0331	-0.1509
PF	-0.9779	-0.1300	0.0607	-0.0108
AF	-0.3992	-0.7679	-0.0393	0.0982
DF	-0.7651	-0.4647	0.1555	-0.1374
NF	0.3088	-0.8993	0.0216	-0.0299
LFM	0.2576	0.3862	-0.6602	-0.1345
SFM	0.2989	0.0860	-0.4922	0.3837
TFM	0.4757	-0.0370	0.2075	** -0.5493
NO	0.3088	-0.8993	0.0216	-0.0299
NE	-0.3484	0.2815	0.4815	-0.3814
NOEML	-0.2565	-0.6926	-0.3017	0.2042
NC	-0.9776	0.0282	0.0691	-0.0422
LC	-0.7613	0.1866	-0.0872	0.0164
PC	-0.6316	0.5148	-0.0617	-0.0676
NHC	-0.1398	0.7439	-0.1849	0.0890
LH	0.6322	0.1279	0.2732	-0.4825
SH	-0.1319	0.0617	0.4118	-0.3370
TH	0.7274	-0.0577	0.1060	-0.3120

Las variables que más contribuyeron al CP 1 fueron: APMAHML (ancho de la parte más ancha de la hoja más larga), EMHML (espesor medio de la hoja más larga), LE (longitud de las espinas), DP (diámetro del pedúnculo), LBP (longitud de la bráctea del pedúnculo), PF (peso de la fruta), DF (diámetro de la fruta), NC (número de coronas), LC (longitud de la corona), PC (peso de la corona), LH (luminosidad de la hoja), TH (tono de hoja). La relación estableció que en la planta madre al aumentar el ancho de la hoja aumentó el espesor de la hoja y la longitud de las espinas. La fruta presento una relación entre las variables del peso y el diámetro. La corona presento una relación entre la longitud y el peso, así también, entre la luminosidad y el tono.

El CP 2 lo establecen las variables AF (altura de la fruta), NF (número de frutitos), NO (número de ojos), NOEML (número de ojos en la espiral más larga), NHC (número de hojas de la corona). Es decir, entre mayor altura tuvo la fruta mayor número de ojos, frutitos y espirales presentó.

El CP 3 lo determinaron las variables LHML (longitud de la hoja más larga) y LFM (luminosidad de la fruta en la madurez). El CP 4 se formó por la variable TFM (tono de la fruta en la madurez).

En el Cuadro 3.4 se observa la matriz de correlación entre las variables cuantitativas que presentaron alta significancia. Existe correlación alta y positiva ($r = 0.98$) entre las variables NC (número de coronas) y PF (peso de la fruta); entre las variables NC (número de coronas) y LBP (longitud de la bráctea del pedúnculo) hubo una correlación de 0.89; entre NC (número de coronas) y APMAHML (ancho de la parte más ancha de la hoja más larga) la correlación fue de 0.88; entre NC (número de coronas) y DP (diámetro del pedúnculo) se dio una $r = 0.86$; y entre PF (peso de la fruta) y DF (diámetro de la fruta) la correlación fue de 0.82. Esto puede ser indicativo de que existe información redundante entre las variables y por lo tanto con solo la aplicación de una de ellas se puede explicar la parte de la variabilidad morfológica que aportan las variables.

Cuadro 3.4. Matriz de correlación para las variables cuantitativas de la población de individuos normales de piña.

	A	C	NH	LHM L	APM AHM L	EMH ML	LE	LP	DP	NHP	NBP	LBP	PF	AF	DF	NF	LFM	SFM	TFM	NO	NE	NOE ML	NC	LC	PC	NHC	LH	SH	TH
A	1.00																												
C	0.08	1.00																											
NH	0.33	0.13	1.00																										
LHML	-0.36	-0.35	-0.30	1.00																									
APMAHML	-0.62	0.17	-0.41	0.17	1.00																								
EMHML	-0.28	0.34	-0.20	-0.14	0.56	1.00																							
LE	-0.27	0.24	-0.49	-0.20	0.61	0.55	1.00																						
LP	0.34	-0.08	0.22	-0.33	-0.50	-0.32	-0.27	1.00																					
DP	-0.58	-0.03	-0.37	0.17	0.82	0.44	0.69	-0.38	1.00																				
NHP	-0.08	-0.03	0.17	-0.15	0.19	-0.04	0.14	-0.08	0.41	1.00																			
NBP	-0.06	0.15	-0.18	-0.06	0.37	0.18	0.41	-0.18	0.38	-0.01	1.00																		
LBP	-0.60	0.18	-0.44	0.01	0.77	0.60	0.73	-0.38	0.76	0.15	0.25	1.00																	
PF	-0.60	0.19	-0.47	-0.06	0.87	0.66	0.83	-0.45	0.85	0.23	0.43	0.87	1.00																
AF	-0.45	-0.05	-0.23	-0.13	0.37	0.12	0.36	-0.31	0.32	0.25	0.06	0.27	0.50	1.00															
DF	-0.56	0.02	-0.42	-0.14	0.63	0.46	0.71	-0.41	0.63	0.15	0.28	0.67	0.82	0.69	1.00														
NF	-0.02	-0.25	-0.13	-0.07	-0.33	-0.30	-0.14	0.05	-0.30	-0.15	-0.18	-0.31	-0.18	0.52	0.18	1.00													
LFM	-0.13	-0.07	-0.05	0.43	-0.16	-0.10	-0.40	-0.06	-0.24	-0.18	-0.21	-0.16	-0.29	-0.34	-0.35	-0.25	1.00												
SFM	0.12	0.00	-0.06	0.05	-0.24	-0.26	-0.33	0.09	-0.32	-0.13	-0.14	-0.31	-0.34	-0.11	-0.34	0.03	0.37	1.00											
TFM	0.25	-0.23	0.06	0.05	-0.38	-0.25	-0.34	0.07	-0.40	-0.02	-0.30	-0.37	-0.44	-0.15	-0.21	0.10	0.09	-0.32	1.00										
NO	-0.02	-0.25	-0.13	-0.07	-0.33	-0.30	-0.14	0.05	-0.30	-0.15	-0.18	-0.31	-0.18	0.52	0.18	1.00	-0.25	0.03	0.10	1.00									
NE	-0.23	0.19	-0.17	-0.17	0.26	0.37	0.37	-0.08	0.22	-0.01	0.17	0.41	0.36	-0.04	0.30	-0.23	-0.09	-0.30	0.00	-0.23	1.00								
NOEML	-0.26	-0.10	-0.33	0.03	0.22	0.05	0.24	-0.21	0.26	0.09	-0.02	0.17	0.32	0.59	0.41	0.45	-0.23	-0.02	-0.16	0.45	-0.60	1.00							
NC	-0.56	0.24	-0.46	-0.03	0.88	0.70	0.82	-0.44	0.86	0.21	0.44	0.89	0.98	0.34	0.74	-0.32	-0.23	-0.35	-0.43	-0.32	0.40	0.22	1.00						
LC	-0.36	-0.06	-0.27	0.04	0.72	0.39	0.44	-0.37	0.67	0.27	0.27	0.59	0.67	0.16	0.45	-0.40	-0.24	-0.14	-0.38	-0.40	0.25	0.09	0.69	1.00					
PC	-0.28	-0.24	-0.11	0.05	0.56	0.30	0.40	-0.06	0.64	0.27	0.30	0.52	0.51	-0.12	0.27	-0.70	-0.03	-0.12	-0.28	-0.70	0.19	-0.12	0.57	0.73	1.00				
NHC	0.06	0.14	-0.02	-0.02	0.17	0.29	0.02	-0.04	0.04	-0.09	-0.04	0.22	0.05	-0.46	-0.29	-0.65	0.41	0.12	-0.17	-0.65	0.19	-0.32	0.15	0.18	0.37	1.00			
LH	0.40	-0.25	0.17	0.02	-0.56	-0.35	-0.47	0.32	-0.47	-0.21	-0.33	-0.37	-0.59	-0.42	-0.43	0.08	0.07	-0.03	0.57	0.08	0.07	-0.36	-0.54	-0.53	-0.31	-0.10	1.00		
SH	-0.04	-0.15	-0.14	-0.10	0.02	-0.11	0.26	0.06	0.07	-0.22	0.10	0.12	0.10	-0.14	0.16	-0.09	-0.40	-0.17	0.01	-0.09	0.21	-0.08	0.12	0.16	0.28	-0.05	0.15	1.00	
TH	0.34	-0.07	0.23	0.06	-0.63	-0.37	-0.56	0.12	-0.60	-0.23	-0.31	-0.55	-0.68	-0.19	-0.47	0.23	0.17	0.05	0.57	0.23	-0.03	-0.25	-0.65	-0.65	-0.60	-0.18	0.61	-0.14	1.00

En el Cuadro 3.5 se muestran las medias, desviación estándar, coeficiente de variación, máximos y mínimos de las características evaluadas los caracteres que presentaron mayor variación fueron el EMHML (espesor medio de la hoja más larga), LE (longitud de las espinas), NBP (número de brácteas del pedúnculo), NOEML (número de ojos en la espiral más larga), PF (peso de la fruta), con coeficientes de variación de 30.94, 28.73, 20.81, 20.60 y 19.93, respectivamente. Los caracteres con menor variabilidad fueron NC (número de coronas CV = 0 %), TH (tono de la hoja CV = 2.65 %), LH (luminosidad de la hoja CV = 4.75 %), DF (diámetro de la fruta CV = 4.99 %), TFM (tono de la fruta en la madurez CV = 5.97 %).

Cuadro 3.5. Valores estadísticos para cada una de las variables morfológicas evaluadas en individuos normales.

Variable	Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Máximo	Mínimo
A	64.4	5.93	9.22	75	52
C	122.27	15.60	12.76	144	82
NH	47.65	7.40	15.54	69	35
LHML	74	10.54	14.24	105	63
APMAHML	5.65	0.46	8.16	7	4.8
EMHML	2.69	0.83	30.94	3.16	1.18
LE	2.11	0.60	28.73	3.16	1.10
LP	33.77	3.99	11.81	43	27
DP	2.53	0.48	18.97	3.86	1.92
NHP	10.07	1.67	16.57	14	7
NBP	6.42	1.33	20.81	8	4
LBP	3.05	0.41	13.55	3.86	2.31
PF	1.01	0.20	19.93	1.57	0.77
AF	14.04	1.38	9.84	17.40	12.19
DF	10.71	0.53	4.99	12.58	9.80
NF	100.57	12.07	12.00	127	82
LFM	43.70	3.67	8.40	49.69	37.13
SFM	38.98	4.06	10.41	45.65	32.43
TFM	69.23	4.13	5.97	78.67	64.19
NO	100.57	12.07	12.00	127	82
NE	9.1	1.33	14.68	12	8
NOEML	11.47	2.36	20.60	17	7
NC	1	0	0	1	1
LC	13.69	1.99	14.55	18.30	10.60
PC	124.9	23.3	18.6	175.0	90.6
NHC	74.77	8.09	10.82	96	62
LH	43.56	2.07	4.75	47.46	40.14
SH	15.82	2.64	16.68	20.76	11.11
TH	113.53	3.01	2.65	118.30	108.30

En la Figura 3.6 muestra un gráfico en dos dimensiones de los grupos formados por individuos normales utilizando variables cuantitativas. Estos ocho grupos corresponden de la misma forma al dendrograma generado a partir de datos cuantitativos de la Figura 3.3.

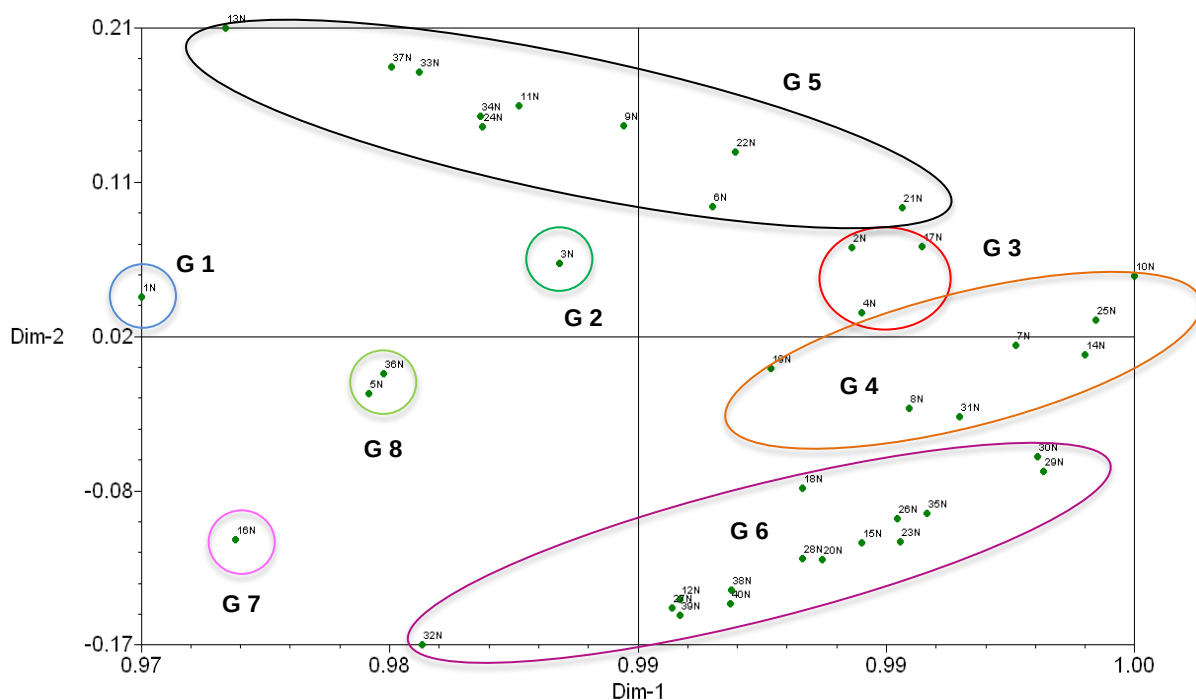


Figura 3.6. Representación gráfica en 2D de los grupos formados con individuos normales de piña utilizando variables cuantitativas.

En la Figura 3.7 muestra un gráfico en dos dimensiones de los grupos formados por individuos normales utilizando variables cualitativas. Estos tres grupos corresponden de la misma forma al dendrograma generado a partir de datos cuantitativos de la Figura 3.4.

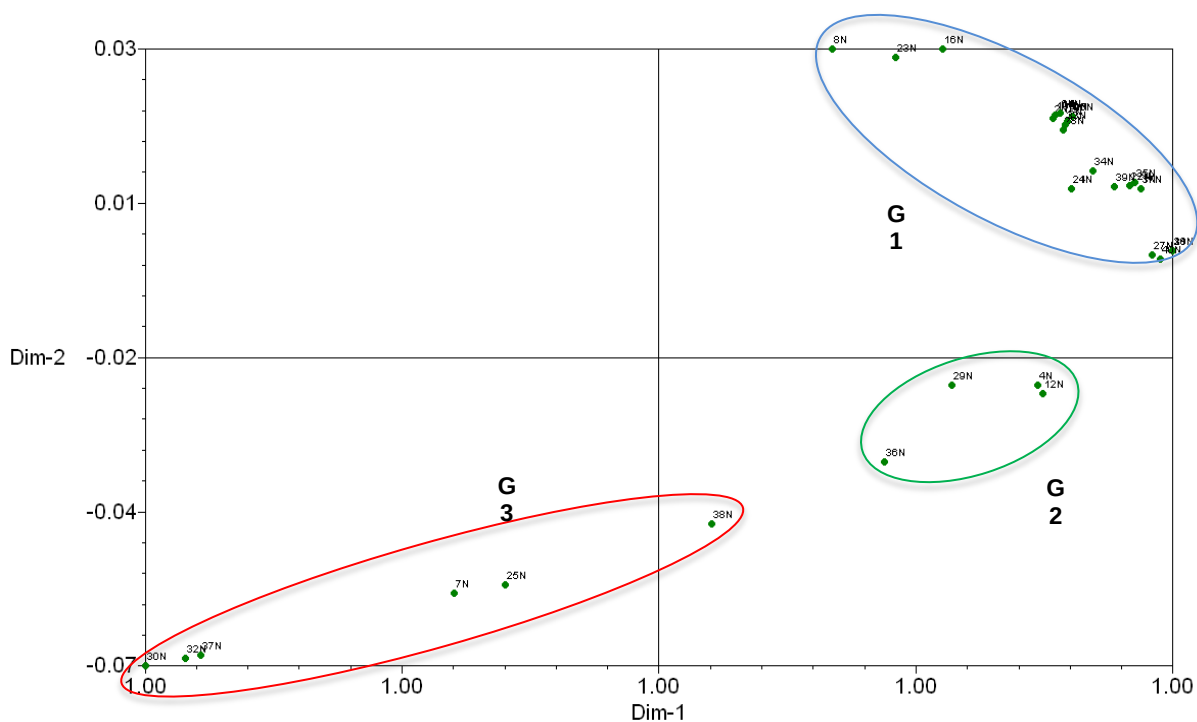


Figura 3.7. Representación gráfica en 2D de los grupos formados con individuos normales de piña utilizando variables cualitativas.

En la Figura 3.8 muestra un gráfico en dos dimensiones de los grupos formados por individuos normales utilizando variables cuantitativas y cualitativas. Estos ocho grupos corresponden de la misma forma al dendrograma generado a partir de datos cuantitativos de la Figura 3.5.

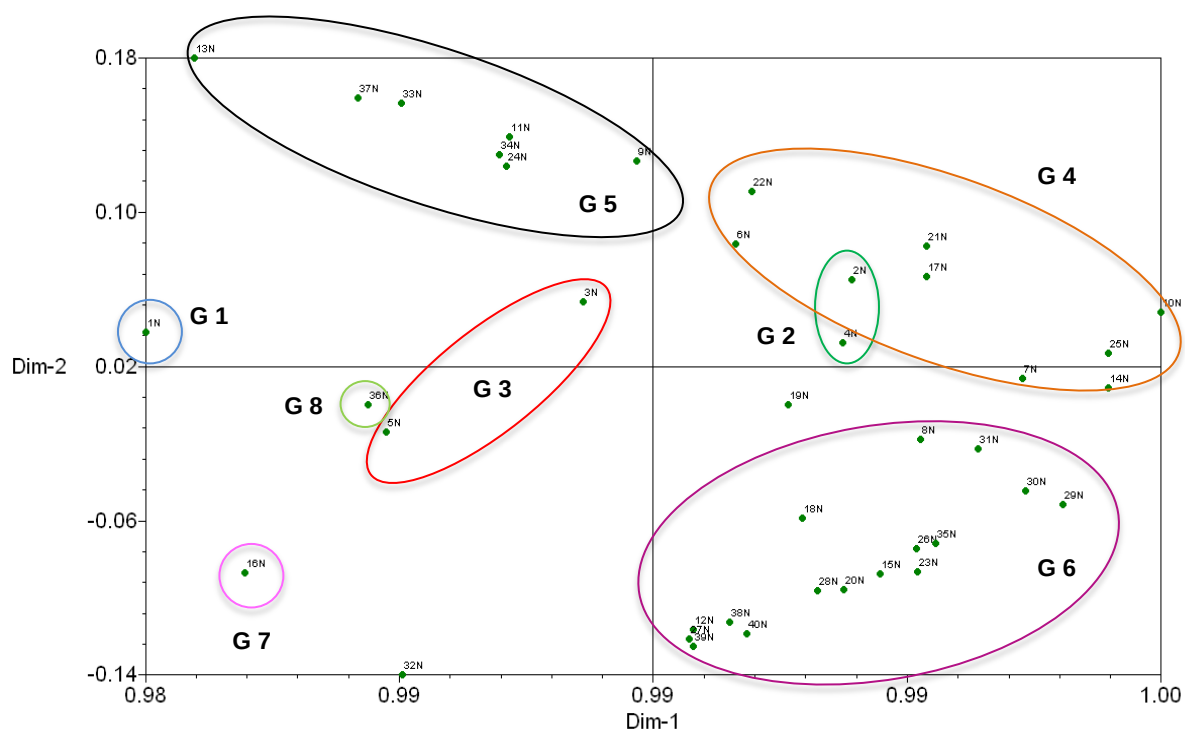


Figura 3.8. Representación gráfica en 2D de los grupos formados con individuos normales de pña utilizando variables cuantitativas y cualitativas.

3.3.3. Análisis de individuos mutantes

Los caracteres cuantitativos diferenciaron a los 40 individuos mutantes en cinco grupos a un coeficiente de distancia de 0.38 (Figura 3.9.), dentro de un rango de 0.00 a 0.69.

El grupo 1 consistió de 23 individuos: 11Pi, 12Pi, 13Pi, 15Pi, 20Pi, 21Pi y 23Pi presentaron la corona en forma de roseta; los individuos 7Pi y 17Pi se determinaron como frutos pequeños con corona en forma de roseta; 19Pi fue un fruto grande con corona en forma de roseta; 22Pi fue un fruto grande con la corona en forma de roseta y presencia de cuello; 27Pi fue un fruto grande con corona en forma cilíndrica; los individuos 8Pi, 16Pi y 18Pi fueron frutos grandes con corona en forma cilíndrica y presencia de cuello; 34Pi fue un fruto grande con corona grande; 1Pi se determinó como fruto grande con corona múltiple; 14Pi fue un fruto pequeño con corona en forma cónica; 39Pi presentó la corona en forma cilíndrica; los individuos 24Pi y 25Pi fueron frutos espinosos con corona en forma cilíndrica; 28Pi presentó la corona larga-cónica y el individuo 26Pi mostró la corona larga-cónica y presencia de fisura. Las características que se presentaron en mayor número fueron la corona en forma de roseta y la de frutos grandes, que estuvieron en 11 y 8 individuos respectivamente, aunque fueron 2 individuos que las presentaron en conjunto.

El grupo 2 incluyó a cuatro individuos: 32Pi, 33Pi y 36Pi fueron frutos grandes con coronas grandes, el individuo 29Pi presentó una corona grande y presencia de fisura.

El grupo 3 lo integraron tres individuos: los individuos 3Pi y 35Pi correspondieron a frutos pequeños con corona en forma cónica y presencia de fisura; el individuo 5Pi fue un fruto pequeño con corona en forma cónica.

El grupo 4 estuvo formado por los individuos: 4Pi fue un fruto pequeño con la corona en forma cónica y presencia de fisura; 6Pi fue un fruto pequeño con la corona grande

y presencia de fisura; 9Pi fue un fruto pequeño con la corona larga-cónica y presencia de fisura; 30Pi presentó la corona grande y presencia de fisura; 40Pi presentó un fruto espinoso y la corona en forma cilíndrica.

El grupo 5 estuvo formado por los individuos: 2Pi, 10Pi, 31Pi, 38Pi y 41Pi que correspondieron a frutos grandes con corona múltiple.

Los caracteres cualitativos discriminaron a los 40 individuos en tres grupos a un coeficiente de 0.09 (Figura 3.10); los coeficientes de distancia variaron entre 0.00 y 0.16.

El grupo 1 consistió de 13 individuos: 1Pi, 2Pi, 41Pi, 10Pi, 31Pi y 38Pi se determinaron como frutos grandes con corona múltiple; los individuos 34Pi, 32Pi, 33Pi y 36Pi fueron frutos grandes con corona grande; 29Pi y 30Pi fueron frutos con presencia de fisura; el individuo 6Pi fue un fruto pequeño con corona grande y presencia de fisura.

El grupo 2 incluyó a 25 individuos: 3Pi, 4Pi y 35Pi se determinaron como frutos pequeños con la corona en forma cónica y presencia de fisura; 5Pi y 14Pi fueron frutos pequeños con la corona en forma cónica; 11Pi presentó la corona en forma cónica; los individuos 12Pi, 13Pi, 15Pi, 20Pi, 21Pi y 23Pi presentaron la corona en forma de roseta; 7Pi y 17Pi se determinaron como frutos pequeños con la corona en forma de roseta; 19Pi fue un fruto grande con la corona en forma de roseta; 22Pi fue un fruto grande con la corona en forma de roseta y presencia de cuello; 8Pi y 18Pi fueron frutos grandes con la corona en forma cilíndrica y presencia de cuello; los individuos 27Pi y 39Pi presentaron la corona en forma cilíndrica; los individuos 24Pi, 25Pi y 40Pi se determinaron como frutos espinosos con la corona en forma cilíndrica; Pi9 fue un fruto pequeño con la corona larga-cónica y presencia de fisura; 26Pi presentó la corona larga-cónica y presencia de fisura. Las características que se presentaron en mayor número fueron 8 individuos de frutos pequeños, 10 individuos

con la corona en forma de roseta y 6 individuos con la corona en forma cónica. Fueron 5 los individuos pequeños con corona en forma cónica y 1 individuo pequeño con la corona en forma de roseta que presentaron ambas características.

El grupo 3 consistió del individuo 28Pi que presentó la corona larga-cónica. El grupo 4 incluyó al individuo 16Pi fue un fruto grande con la corona en forma cilíndrica y presencia de cuello.

Un análisis combinado de caracteres cualitativos y cuantitativos permitió la formación de ocho grupos a un coeficiente de 0.35 (Figura 3.11.), en un rango de similitud entre 0.00 a 0.64.

El grupo 1 consistió 27 individuos: 32Pi, 33Pi, 34Pi y 36Pi se determinaron como frutos grandes con corona grande; los individuos 8Pi, 16Pi y 18Pi fueron frutos grandes con la corona en forma cilíndrica y presencia de cuello; 27 Pi presentó un fruto grande con la corona en forma cilíndrica; 1Pi fue un fruto grande con corona múltiple; 22Pi se determinó como un fruto grande con la corona en forma de roseta y presencia de cuello; el individuo 19Pi fue un fruto grande con la corona en forma de roseta; los individuos 12Pi, 13Pi, 15Pi, 21Pi, 20Pi y 23Pi presentaron la corona en forma de roseta; 7Pi y 17Pi fueron individuos pequeños con la corona en forma de roseta; el individuo 29Pi mostró una corona grande y presencia de fisura; 24Pi y 25Pi fueron individuos espinosos con la corona en forma cilíndrica; el individuo 39Pi presentó una corona en forma cilíndrica; 11Pi mostró una corona en forma cónica; el individuo 14Pi fue un fruto pequeño con la corona en forma cónica; los individuos 26Pi y 28Pi mostraron una corona larga-cónica.

El grupo 2 lo integraron tres individuos: los individuos 3Pi y 35Pi correspondieron a frutos pequeños con corona en forma cónica y presencia de fisura; el individuo 5Pi fue un fruto pequeño con corona en forma cónica.

El grupo 3 estuvo formado por los individuos: 4Pi fue un fruto pequeño con la corona en forma cónica y presencia de fisura; 6Pi fue un fruto pequeño con la corona grande y presencia de fisura; 9Pi fue un fruto pequeño con la corona larga-cónica y presencia de fisura; 30Pi presentó la corona grande y presencia de fisura; 40Pi presentó un fruto espinoso y la corona en forma cilíndrica.

El grupo 4 estuvo formado por los individuos: 2Pi, 10Pi, 31Pi, 38Pi y 41Pi que correspondieron a frutos grandes con corona múltiple.

Los caracteres cualitativos fueron los que mejor diferenciaron a los individuos mutantes de acuerdo a la alta variabilidad fenotípica que presentaron. La principal variable que definió las agrupaciones fue la forma de la corona, de esta manera los individuos primeramente se agruparon en corona múltiple, corona grande, corona en forma cónica, de roseta, cilíndrica y larga-cónica.

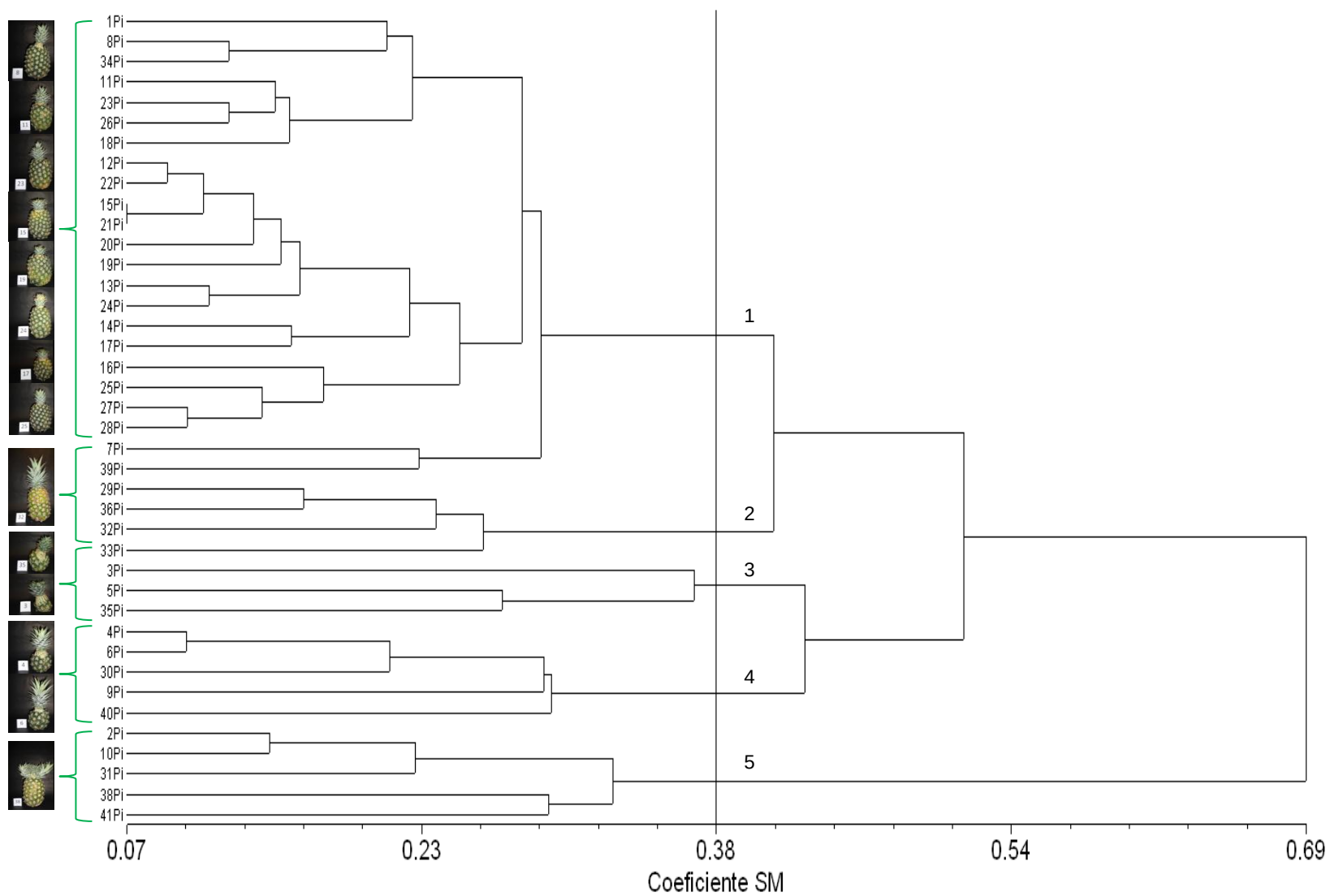


Figura 3.9. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) 40 individuos mutantes de piña.

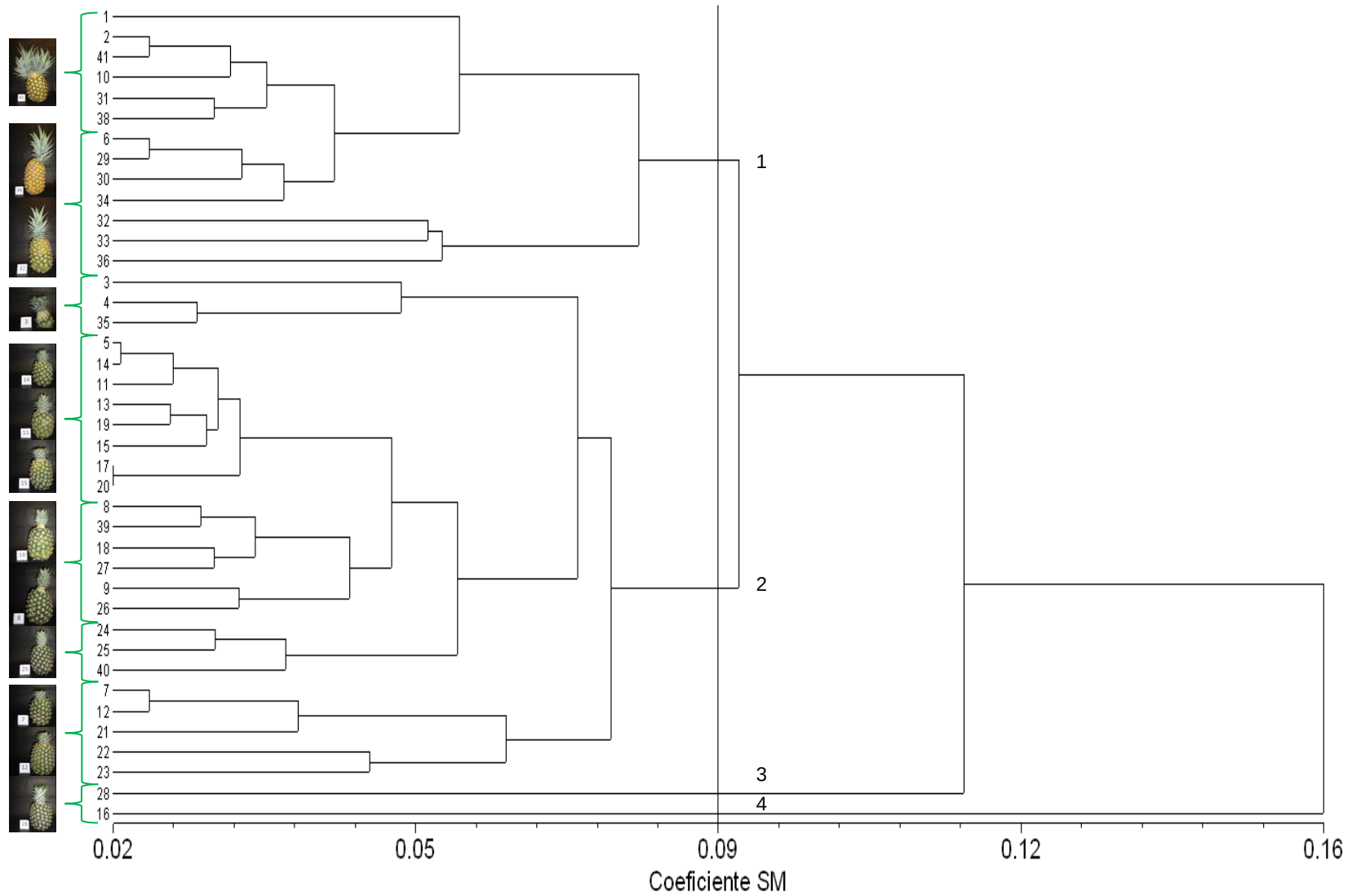


Figura 3.10. Dendrograma generado a partir de datos cualitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) 40 individuos mutantes de piña.

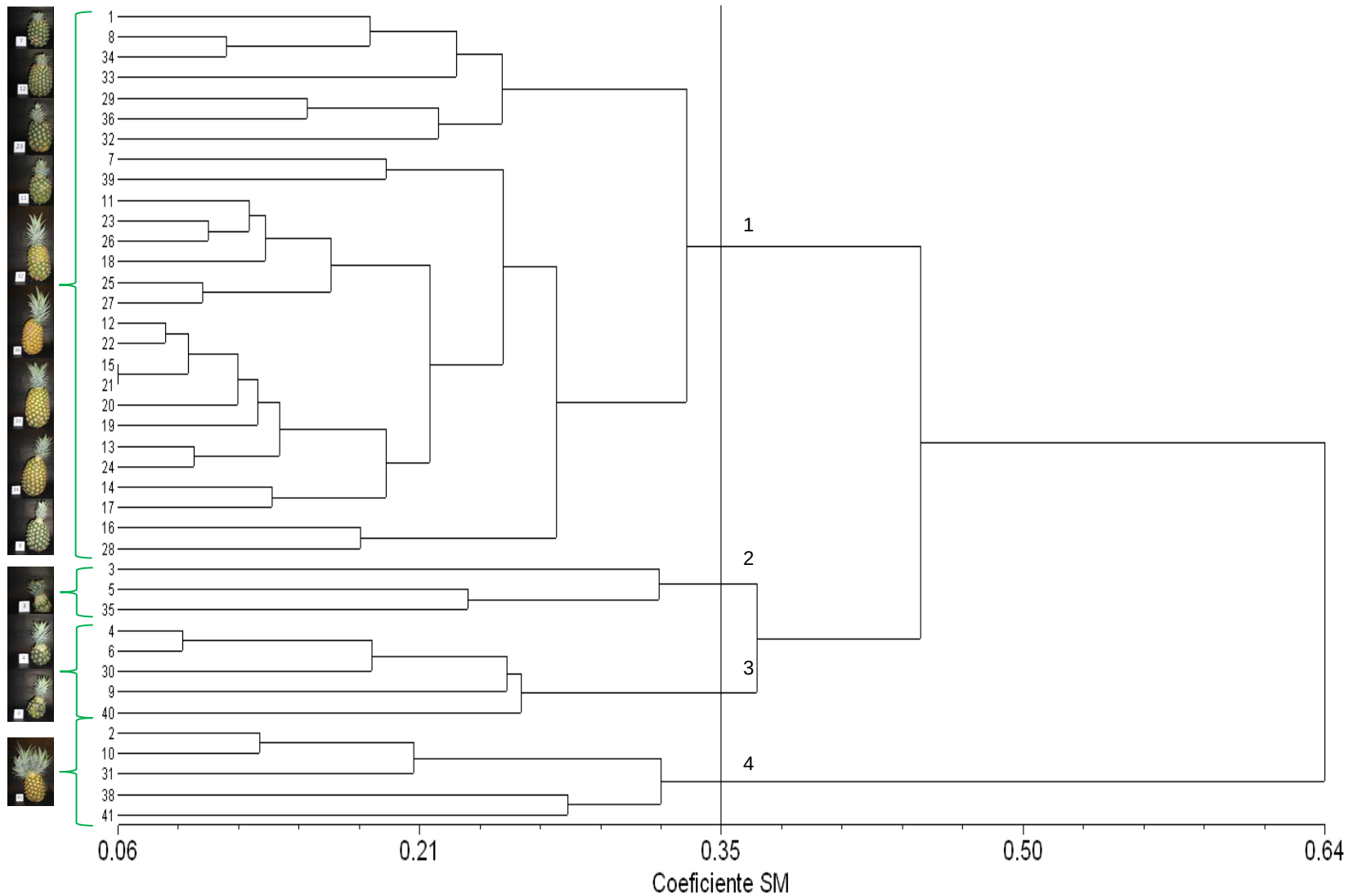


Figura 3.11. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos y cualitativos mediante el Coeficiente de Concordancia Simple (SM) 40 individuos mutantes de piña.

3.3.3.1. Análisis de componentes principales

Los vectores propios determinaron los cuatro componentes principales (CP) que explican el 84.39 % de la variabilidad observada para las variables morfológicas evaluadas en la población de individuos mutantes (Cuadro 3.6.).

Cuadro 3.6. Vectores propios y proporción explicada de 29 componentes principales, obtenidos a partir de 48 variables morfológicas de piña.

CP	Vectores propios	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
1	17.43581627	60.1235	60.1235
2	4.54340634	15.6669	75.7904
3	1.36025517	4.6905	80.4810
4	1.13556205	3.9157	84.3967
5	1.02994455	3.5515	87.9482
6	0.76426662	2.6354	90.5836
7	0.54670183	1.8852	92.4688
8	0.44037680	1.5185	93.9873
9	0.41885025	1.4443	95.4317
10	0.29527393	1.0182	96.4498
11	0.27270742	0.9404	97.3902
12	0.17922219	0.6180	98.0082
13	0.13780370	0.4752	98.4834
14	0.11168419	0.3851	98.8685
15	0.09524936	0.3284	99.1970
16	0.05952714	0.2053	99.4022
17	0.04440372	0.1531	99.5554
18	0.03687451	0.1272	99.6825
19	0.02691736	0.0928	99.7753
20	0.02163589	0.0746	99.8499
21	0.01503726	0.0519	99.9018
22	0.01252798	0.0432	99.9450
23	0.00643139	0.0222	99.9672
24	0.00491730	0.0170	99.9841
25	0.00289946	0.0100	99.9941
26	0.00136339	0.0047	99.9988
27	0.00034395	0.0012	100.0000
28	0.00000000	0.0000	100.0000
29	0.00000000	0.0000	100.0000
Suma	29.000000		

De acuerdo al porcentaje acumulativo de los cuatro componentes principales se eligieron las variables con un mayor valor a -0.84 (Cuadro 3.7.). El mayor número de variables estuvo asociado con la planta madre, las variables fueron APMAHML (Ancho de la parte más ancha de la hoja más larga), EMHML (espesor medio de la hoja más larga), LE (longitud de las espinas), DP (diámetro del pedúnculo), NBP (número de las brácteas del pedúnculo) y LBP (longitud de la bráctea del pedúnculo).

Cuadro 3.7. Contribución de las variables evaluadas a los cuatro primeros componentes.

Variable	C1	C2	C3	C4
A	0.7053	0.0178	0.1695	0.1429
C	0.6207	0.0158	0.6018	-0.2129
NH	0.3598	-0.2692	0.4250	-0.5957
LHML	0.8204	-0.1900	0.0398	0.2216
APMAHML	-0.9380	-0.2265	0.1070	0.0073
EMHML	-0.9628	-0.1229	0.1541	0.0725
LE	-0.9586	-0.1713	0.0968	0.0230
LP	0.4732	-0.4367	0.1441	0.4000
DP	-0.9701	-0.1433	0.1537	0.0381
NHP	-0.7959	-0.2905	0.2752	0.0227
NBP	-0.9634	-0.1205	0.0648	0.0318
LBP	-0.9728	-0.1598	0.1006	0.0757
PF	-0.9893	-0.0377	0.1004	0.0416
AF	-0.7331	0.5286	0.0078	0.1030
DF	-0.9584	-0.1285	0.0327	0.0709
NF	0.3325	0.8977	-0.0117	0.1412
LFM	0.7059	-0.6014	-0.0684	0.0654
SFM	0.6038	-0.5667	0.0791	0.0760
TFM	0.8036	-0.4133	-0.1375	0.1137
NO	0.3325	0.8977	-0.0117	0.1412
NE	-0.8634	-0.2382	0.1167	0.1089
NOEML	-0.6631	0.5360	0.0725	0.1827
NC	-0.9796	-0.1235	0.1111	0.0621
LC	-0.7133	-0.2903	-0.4645	-0.3059
PC	-0.7413	-0.1856	-0.5261	-0.2921
NHC	-0.7526	-0.2649	0.0982	0.0269
LH	0.7451	-0.4454	0.0018	0.0862
SH	-0.3535	-0.5679	-0.1632	0.4178
TH	0.8589	-0.4133	-0.0822	-0.0179

EL CP 1 estuvo determinado por las variables APMAHM Lanchos de la parte más ancha de la hoja más larga), EMHML(espesor medio de la hoja más larga), LE (longitud de las espinas), DP (diámetro del pedúnculo),NBP (número de las brácteas del pedúnculo), LBP(longitud de la bráctea del pedúnculo), PF (peso de la fruta), DF(diámetro de la fruta), NE(número de espirales), NC(número de coronas), TH (tono de hoja). Esto indica que la planta madre mantiene una estrecha relación con la estructura de la fruta y la corona.

El CP 2 lo establecieron las variables NF (número de frutitos) y NO (número de ojos), estas estructuras se encuentran en la misma proporción. Los componentes 3 y 4 no presentaron variables con un valor mayor a -0.84, sin embargo, se eligieron aquellas variables que contribuyeron significativamente al porcentaje acumulativo, en el CP 3 fue la C (cobertura de la planta) y PC (peso de la corona) y en el CP 4 fue NH (número de hojas).

En el Cuadro 3.8 se muestra la matriz de correlación entre las variables cuantitativas que presentaron alta significancia. Se observa que existe correlación alta y positiva ($r = 1.00$) entre las variables NO (número de ojos) y NF (número de frutitos); entre las variables PF (peso de la fruta) y DP (diámetro del pedúnculo) hubo una correlación de 0.99; entre PF (peso de la fruta) y DF (diámetro de la fruta) la correlación fue de 0.96; entre PF (peso de la fruta) y NC (número de coronas) se dio una $r = 0.99$; y entre DF (diámetro de la fruta) y NC (número de coronas) la correlación fue de 0.96. Esto indica que existe una estrecha relación entre las variables de la fruta y la corona. El diámetro del pedúnculo está relacionado con el peso de la fruta, ya que esta estructura es la que soporta a la piña tras su fecundación y durante el proceso de maduración. El peso de la fruta se relaciona con el diámetro de la fruta, esto sugiere que los frutos de menor peso presentarían un diámetro menor y viceversa. El peso y el diámetro están relacionados en proporción al número de coronas, ya que en los frutos más grandes siempre se presentaron las coronas múltiples.

Cuadro 3.8. Matriz de correlación para las variables cuantitativas de la población de individuos mutantes de piña.

	A	C	NH	LHM L	APM AHM L	EMH ML	LE	LP	DP	NHP	NBP	LBP	PF	AF	DF	NF	LFM	SFM	TFM	NO	NE	NOE ML	NC	LC	PC	NHC	LH	SH	TH
A	1.00																												
C	0.49	1.00																											
NH	0.16	0.45	1.00																										
LHML	0.67	0.51	0.23	1.00																									
APMAHML	-0.64	-0.49	-0.28	-0.71	1.00																								
EMHML	-0.61	-0.50	-0.32	-0.71	0.96	1.00																							
LE	-0.66	-0.54	-0.26	-0.72	0.96	0.97	1.00																						
LP	0.44	0.20	0.22	0.61	-0.39	-0.38	-0.37	1.00																					
DP	-0.65	-0.51	-0.27	-0.73	0.97	0.99	0.99	-0.38	1.00																				
NHP	-0.49	-0.38	-0.12	-0.56	0.84	0.84	0.81	-0.16	0.84	1.00																			
NBP	-0.69	-0.52	-0.33	-0.77	0.95	0.97	0.96	-0.45	0.97	0.76	1.00																		
LBP	-0.66	-0.54	-0.33	-0.74	0.97	0.99	0.98	-0.38	0.99	0.84	0.98	1.00																	
PF	-0.66	-0.56	-0.33	-0.78	0.95	0.98	0.98	-0.43	0.99	0.81	0.97	0.99	1.00																
AF	-0.57	-0.50	-0.42	-0.67	0.55	0.64	0.61	-0.58	0.64	0.43	0.66	0.63	0.71	1.00															
DF	-0.71	-0.60	-0.32	-0.75	0.94	0.94	0.94	-0.40	0.96	0.82	0.94	0.96	0.96	0.67	1.00														
NF	0.18	0.17	-0.18	0.09	-0.50	-0.42	-0.46	-0.22	-0.44	-0.51	-0.42	-0.45	-0.36	0.24	-0.41	1.00													
LFM	0.37	0.37	0.35	0.68	-0.50	-0.61	-0.58	0.48	-0.60	-0.40	-0.58	-0.58	-0.68	-0.76	-0.55	-0.26	1.00												
SFM	0.39	0.41	0.29	0.57	-0.41	-0.47	-0.44	0.45	-0.48	-0.33	-0.47	-0.46	-0.55	-0.67	-0.52	-0.24	0.80	1.00											
TFM	0.44	0.36	0.29	0.70	-0.65	-0.74	-0.70	0.53	-0.73	-0.56	-0.73	-0.71	-0.79	-0.76	-0.68	-0.06	0.90	0.73	1.00										
NO	0.18	0.17	-0.18	0.09	-0.50	-0.42	-0.46	-0.22	-0.44	-0.51	-0.42	-0.45	-0.36	0.24	-0.41	1.00	-0.26	-0.24	-0.06	1.00									
NE	-0.67	-0.49	-0.30	-0.67	0.90	0.90	0.88	-0.30	0.89	0.78	0.89	0.91	0.88	0.54	0.88	-0.43	-0.41	-0.27	-0.56	-0.43	1.00								
NOEML	-0.53	-0.44	-0.37	-0.55	0.51	0.58	0.58	-0.50	0.59	0.36	0.60	0.58	0.65	0.83	0.62	0.26	-0.71	-0.74	-0.68	0.26	0.39	1.00							
NC	-0.65	-0.56	-0.32	-0.76	0.97	0.99	0.98	-0.38	0.99	0.83	0.97	0.99	0.99	0.65	0.96	-0.43	-0.63	-0.49	-0.74	-0.43	0.89	0.61	1.00						
LC	-0.57	-0.60	-0.24	-0.54	0.70	0.65	0.69	-0.38	0.66	0.56	0.69	0.68	0.67	0.32	0.68	-0.54	-0.34	-0.32	-0.46	-0.54	0.58	0.20	0.66	1.00					
PC	-0.59	-0.71	-0.27	-0.61	0.67	0.64	0.69	-0.37	0.65	0.50	0.68	0.67	0.68	0.38	0.67	-0.47	-0.45	-0.43	-0.53	-0.47	0.57	0.27	0.68	0.93	1.00				
NHC	-0.55	-0.53	-0.15	-0.69	0.70	0.71	0.72	-0.16	0.74	0.69	0.73	0.76	0.73	0.44	0.75	-0.54	-0.41	-0.36	-0.48	-0.54	0.68	0.40	0.77	0.44	0.52	1.00			
LH	0.39	0.47	0.30	0.66	-0.56	-0.66	-0.64	0.38	-0.65	-0.49	-0.60	-0.63	-0.71	-0.72	-0.61	-0.10	0.90	0.75	0.85	-0.10	-0.48	-0.65	-0.67	-0.46	-0.57	-0.43	1.00		
SH	-0.23	-0.37	-0.14	-0.13	0.42	0.40	0.44	0.18	0.42	0.36	0.42	0.44	0.37	-0.04	0.43	-0.53	0.10	0.06	-0.05	-0.53	0.38	0.01	0.42	0.37	0.32	0.36	-0.01	1.00	
TH	0.47	0.45	0.43	0.76	-0.72	-0.80	-0.76	0.49	-0.79	-0.59	-0.77	-0.78	-0.85	-0.79	-0.74	-0.07	0.94	0.74	0.92	-0.07	-0.63	-0.72	-0.81	-0.48	-0.56	-0.53	0.90	-0.07	1.00

En el Cuadro 3.9 se muestran las medias, desviación estándar, coeficiente de variación, máximos y mínimos de las características evaluadas en la cual observamos que los caracteres que presentaron mayor variación fueron el NC (número de coronas), NHC (número de hojas de las espinas), PC (peso de la corona), PF (peso de la fruta), LC (longitud de la corona), con coeficientes de variación de 92.10, 73.79, 72.90, 42.73 y 41.09, respectivamente. Los caracteres con menor variabilidad fueron LFM (luminosidad de la fruta en la madurez CV = 1.56 %), TH (tono de la hoja CV = 3.09 %), LH (luminosidad de la hoja CV = 5.59 %), TFM (tono de la fruta en la madurez CV = 6.06 %), SFM (saturación de la fruta en la madurez CV = 9.15 %).

Cuadro 3.9. Valores estadísticos para cada una de las variables morfológicas evaluadas en individuos mutantes.

Variable	Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Máximo	Mínimo
A	81.82	16.92	20.68	110	44
C	131.97	23.92	18.13	173	65
NH	38.5	6.63	17.22	56	27
LHML	87.25	9.91	11.36	101	57
APMAHML	5.96	0.81	13.67	8.0	4.0
EMHML	2.77	0.57	20.61	4.07	1.73
LE	1.95	0.59	30.33	3.28	1.09
LP	31.1	5.02	16.16	43	22
DP	3.18	0.36	11.61	4.03	2.36
NHP	9.55	1.86	19.54	14	5
NBP	5.67	0.91	16.15	7	4
LBP	3.12	0.35	11.25	3.86	2.41
PF	1.28	0.54	42.73	2.46	0.25
AF	15.36	4.11	26.78	24.29	5.61
DF	11.38	1.23	10.89	13.51	7.44
NF	106.75	34.45	32.27	177	8
LFM	41.54	0.64	1.56	41.87	38.62
SFM	39.00	3.57	9.15	44.25	33.09
TFM	71.02	4.30	6.06	78.8	64.48
NO	106.75	34.45	32.27	177	8
NE	9.02	1.25	13.85	12	6
NOEML	11.85	3.62	30.60	18	2
NC	1.47	1.35	92.10	7	1
LC	11.93	4.89	41.06	24.10	4.89
PC	139.25	101.51	72.90	570.2	42.9
NHC	113.92	84.07	73.79	446	64
LH	43.86	2.44	5.59	47.96	40.21
SH	16.33	2.81	17.22	20.83	11.28
TH	112.92	3.48	3.09	118.3	108.1

En la Figura 3.12 se muestra un gráfico en dos dimensiones de los grupos formados por individuos mutantes utilizando variables cuantitativas, el grupo 1 corresponde en su mayoría a individuos con frutos grandes con la corona en forma de roseta, el grupo 2 está determinado por frutos grandes con la corona grande, el grupo 3 lo conforman frutos pequeños con la corona en forma cónica, el grupo 4 corresponde a frutos pequeños con corona grande y el grupo 5 lo establecen cinco frutos grandes con corona múltiple. Estos cinco grupos corresponden de la misma forma al dendrograma generado a partir de datos cuantitativos de la Figura 3.9.

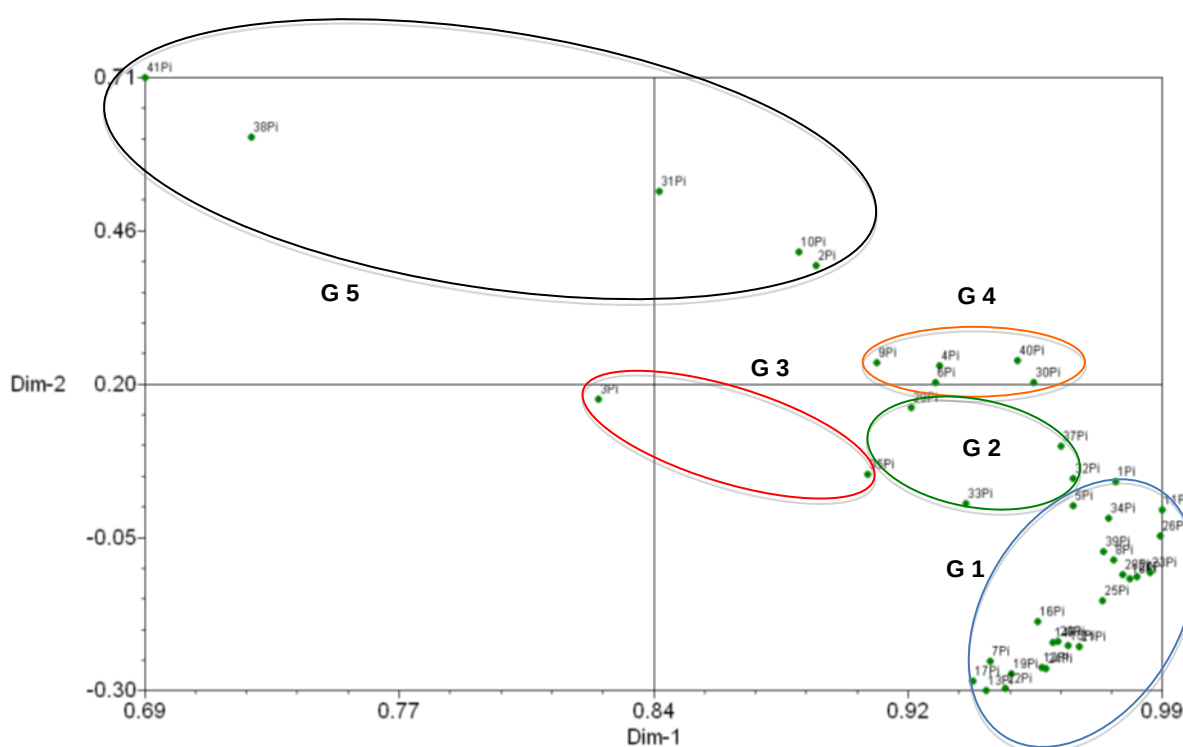


Figura 3.12. Representación gráfica en 2D de los grupos formados por individuos mutantes de piña utilizando variables cuantitativas.

La Figura 3.13 muestra un gráfico en dos dimensiones de los grupos formados por individuos mutantes utilizando variables cualitativas, el grupo 1 corresponde en su mayoría a individuos con frutos grandes con la corona grande y corona múltiple, el grupo 2 está determinado por frutos pequeños con las corona en forma de roseta, cónica, cilíndrica y larga-cónica, el grupo 3 lo conforma un fruto pequeños con la corona larga-cónica, el grupo 4 corresponde a un individuo con la corona en forma cilíndrica y presencia de cuello. Estos cuatro grupos corresponden de la misma forma al dendrograma generado a partir de datos cuantitativos de la Figura 3.10.

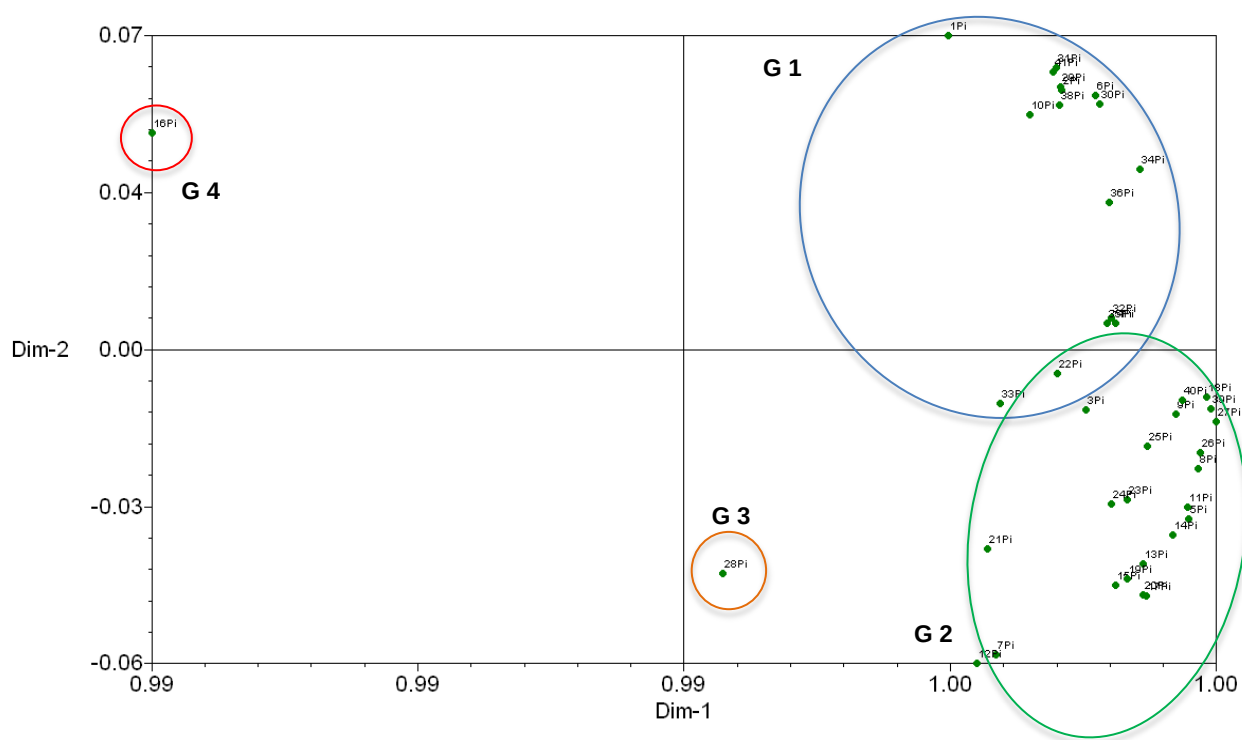


Figura 3.13. Representación gráfica en 2D de los grupos formados por individuos mutantes de piña utilizando variables cualitativas.

94

Las siguientes Figuras 3.15, 3.16, 3.17 y 3.18 muestran los fenotipos de individuos mutantes correspondientes para cada grupo formado a partir del dendrograma de caracteres cualitativos, distinguiéndose evidentemente los caracteres mutados.



Figura 3.15. Frutos con la corona en forma de roseta.

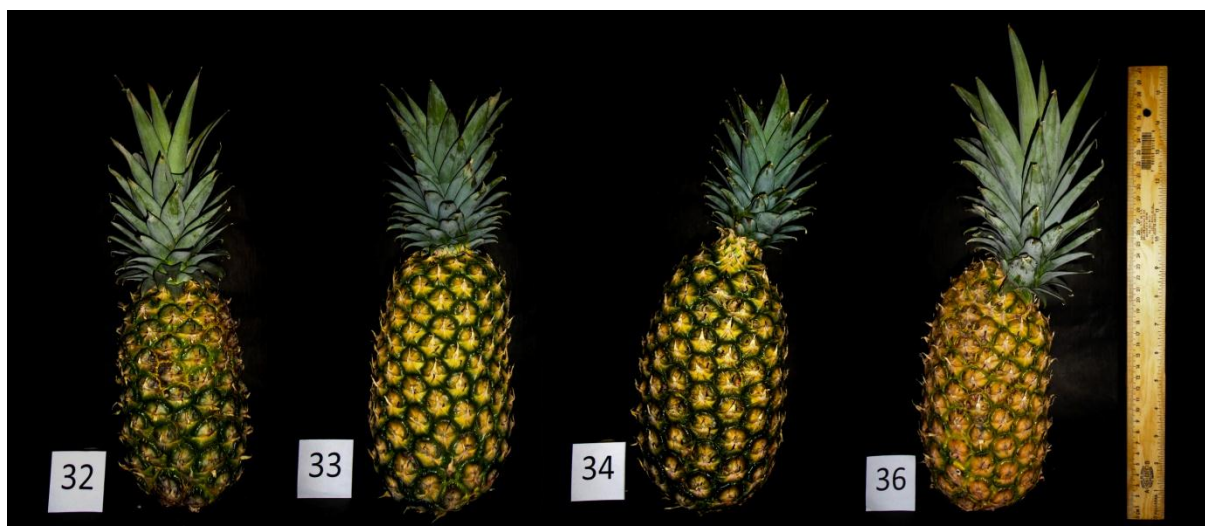


Figura 3.16. Frutos grandes con la corona grande.



Figura 3.17. Frutos pequeños y con la corona en forma cónica.



Figura 3.18. Frutos grades con la corona múltiple

3.4. CONCLUSIONES

El análisis de caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos en las dos poblaciones evaluadas de piña generó cinco grupos a un coeficiente de distancia de 0.34.

El análisis de la población de individuos normales mediante caracteres cuantitativos diferenció ocho grupos a un coeficiente de 0.16. Las variables cuantitativas más correlacionadas fueron el número de coronas con el peso de la fruta, la longitud de la bráctea del pedúnculo, el ancho de la parte más ancha de la hojas más larga y el diámetro del pedúnculo; mientras que entre el peso de la fruta y el diámetro de la fruta se dio una $r = 0.82$; las variables que presentaron mayor variación fueron el espesor medio de la hoja más larga, longitud de las espinas, el número de brácteas del pedúnculo, el número de ojos de la espiral más larga y el peso de la fruta.

El análisis de la población de individuos mutantes a través de los caracteres cuantitativos estableció cinco grupos a un coeficiente de 0.38, las variables que más se correlacionaron fueron el número de ojos y número de frutitos, el peso de la fruta se correlacionó con el diámetro de la fruta, diámetro del pedúnculo y el número de coronas; el diámetro de la fruta se correlacionó con el número de coronas. Las variables que presentaron los coeficientes más altos fueron el número de coronas, el número de hojas de la corona, la longitud de la corona, el peso de la corona y la fruta.

El peso de la fruta fue la variable que presentó la mayor variación en ambas poblaciones, sin embargo las variables del tono de hoja, la luminosidad de la hoja y el tono de la fruta en la madurez presentaron los coeficientes de variación más bajos.

Los caracteres cualitativos permitieron la mejor agrupación de los individuos en las dos poblaciones, la población con individuos mutantes presentó la mayor variabilidad fenotípica.

La caracterización morfológica estableció a los 40 individuos en las siguientes siete categorías: I) Frutos grandes con la corona múltiple, II) Frutos grandes con la corona grande, III) Frutos pequeños con la corona en forma cónica, IV) Frutos pequeños con la corona en forma cónica y presencia de fisura, V) Frutos con la corona en forma de roseta, VI) Frutos con la corona en forma cilíndrica, VII) Frutos espinosos con la corona en forma cilíndrica.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

ANÓNIMO. 2002. Caracterización de variedades de zapote. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). Boletín Técnico Núm. 6. Costa Rica. 17 p.

ASERCA. 2000. La piña un sabor reconocido en el mundo. Revista Claridades Agropecuarias. No. 86. Octubre. 44 p.

FAO. 2010. Base de datos estadísticos de la FAO. [http://www. Faostat.org.mx](http://www.Faostat.org.mx)

FRANCO, T. L.; HIDALGO, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico Núm. 8. Instituto Internacional de recursos Fitogenéticos (IPGRI). Colombia 89 p.

GONZÁLEZ, A. F. 2001. Caracterización morfológica. *In*: Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola (INEA). España. Pp. 199-217

IBPGR, (International Board for Plant Genetic Resoruces). 1990. Descriptors for the pineapple. Italy. 58 pp.

ISIDRÓN, M.; ROSALES, Y.; PIFFERRER, A.; CISNEROS, A.; BENEGA, R. Y CARVAJAL, C. 2003. Caracterización del germoplasma de piña colectado en Cuba mediante prospección nacional: I. Localización, diversidad genética y situación actual. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cultivos Tropicales. Vol. 24. No. 1. Cuba. Pp. 65-71.

ROHLF, F. J. 2000. Programme NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System: Version 2.1. Exeter Software, New York. USA.

SHELDEMAN, X.; LIBREROS, D.; JÍMENEZ, D. 2004. Desarrollo de Especies Silvestres Nativas en Cultivos de Exportación: Pasos Básicos en el Proceso International Board for Plant Genetic Resources (IPGRI). Colombia. 40 p.

TAPIA, C. E.; GUILLÉN, A. H.; GUTIÉRREZ, E. M. A. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas spp.*) mediante RAPD e ISSR. Revista Fitotecnia Mexicana. Julio – Septiembre. Año/vol. 28. Número 003. Sociedad Mexicana de Fitogenética. A.C. Chapingo, México. Pp. 187-194.

YASMIN, S.; ISLAM, M. S.; KONDOKER, M.; NASIRUDDIN, M. and ALAM, S. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. Biotechnology. 5:27-31.

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) HÍBRIDO MD-2 MEDIANTE ISSR Y RAPD

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) HÍBRIDO MD-2 MEDIANTE ISSR Y RAPD

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TWO POPULATIONS OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) MD-2 HYBRID USING ISSR AND RAPD

Garcidueñas-Paz, J. A.¹ y Rodríguez-de la O, J. L.²

RESUMEN

La caracterización molecular de dos poblaciones de piña se realizó con ISSR y RAPD. Se probaron 25 iniciadores ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas) y 25 iniciadores RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) en 28 materiales de *Ananas comosus* híbrido MD-2, provenientes del estado de Veracruz. El objetivo del análisis fue evaluar el polimorfismo entre genotipos y caracterizarlos molecularmente. Sólo 5 iniciadores ISSR y 14 iniciadores RAPD detectaron polimorfismo, y los RAPD fueron superiores que los ISSR en porcentaje de polimorfismo (91.56 y 78.66, respectivamente). En la población de individuos normales y mutantes a partir de los ISSR se diferenciaron siete grupos a un Coeficiente de Jaccard de 0.74, y los RAPD diferenciaron en catorce grupos a un Coeficiente de Jaccard de 0.68. Los agrupamientos generados tanto por ISSR como por RAPD fueron similares, ya que ambos agruparon inicialmente a los materiales más emparentados y con características morfológicas similares, pertenecientes a los individuos normales y finalmente los materiales menos emparentados fueron los individuos mutantes. La variación genética encontrada en *A. comosus* híbrido MD-2 se atribuye a la autoincompatibilidad de la especie, factores ambientales, la tasa de mutación y la variación somaclonal.

Palabras clave: Polimorfismo, genotipos, coeficiente de Jaccard.

ABSTRACT

Molecular characterization of two populations of pineapple was performed with ISSR and RAPD. 25 primers ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) primers and 25 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) were tested in 28 hybrid materials *Ananas comosus* MD-2, from the state of Veracruz. The objective of the analysis was to evaluate the polymorphism between genotypes and characterized molecularly. Only 5 ISSR primers and 14 RAPD primers detected polymorphism, and RAPD were higher than the percentage of ISSR polymorphism (91.56 and 78.66, respectively). In the population of normal and mutant individuals from the seven groups ISSR a Jaccard coefficient of 0.74 differed, and differed in fourteen RAPD groups to a Jaccard coefficient of 0.68. The clusters generated by both ISSR as RAPD were similar, since both initially grouped more closely related and the morphological characteristics similar materials belonging to normal individuals and finally the least related materials were mutant individuals. The genetic variation found in *A. comosus* hybrid MD-2 is attributed to the self-incompatibility of the species, environmental factors, the rate of mutation and somaclonal variation.

Key words: polymorphism, genotypes, Jaccard coefficient.

4.1. INTRODUCCIÓN

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr, es la especie más importante de la familia Bromeliaceae (Chao *et al.*, 2007; Collins, 1951; Leal y Coppens d'Eeckenbrugge, 1996; Luther, 2004; Páez, 1998; Ruas, 1995; Uriza Ávila, 2005). Es la segunda fruta tropical más importante en el mundo después del mango, la demanda internacional de la piña sigue en crecimiento principalmente debido a los diferentes hábitos alimenticios de los consumidores americanos y europeos que consideran a esta fruta tropical como una de las más finas del mundo, destacando en ella su agradable sabor, aroma y su contenido de vitamina C (FAO, 2010).

La producción mundial está dominada por el sureste asiático, en donde sobresalen Filipinas, Tailandia e Indonesia, en América los principales productores son Brasil y Costa Rica. En este ámbito México ocupó el noveno lugar con una participación del 3.6% (FAO, 2010).

El cultivar de piña más utilizado actualmente en México es el híbrido MD-2 desarrollado por Del Monte Fresh Produce International Inc., ha ganado cuota de mercado en los últimos años, especialmente en el mercado internacional de frutas frescas (Rebolledo *et al.*, 2005; Uriza Ávila, 2005). Esta variedad posee una alta capacidad de producción y buenas características de calidad del fruto en comparación con el cultivar “Cayena Lisa” (Chan *et al.*, 2003).

Fue a finales de la década de los 90 cuando se introdujo este cultivar en nuestro país, sin embargo, la falta de material vegetal para la propagación y gran demanda por parte de los productores fueron los principales factores para recurrir a la técnica de cultivo *in vitro* para el abastecimiento de plantas; ya que es una alternativa biotecnológica que permite la propagación masiva de plantas de piña libres de enfermedades y en tiempos relativamente cortos (Blanco, 2011; Gallardo, 1995; Smith, 2000). Sin embargo, la práctica del cultivo *in vitro*, puede presentar

el inconveniente de ocasionar variación somaclonal en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas de los mismos. La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Anu *et al.*, 2004; Brar y Brar, 1998; Kaeppler *et al.*, 2000; Larkin y Scowcroft, 1981; Mujib, 2004; Navarro y Perea, 1996; Pierik, 1998; Sahijram *et al.*, 2003).

Los materiales obtenidos mediante el cultivo *in vitro* fueron incorporados al campo junto a los propagados vegetativamente, pero nunca se estableció un programa de manejo agronómico para la evaluación y monitoreo, esto provocó la pérdida de la ubicación y mezcla de ambos materiales. No obstante el híbrido MD-2 ha comenzado a sufrir mutaciones, dentro de las cuales sobresalen los frutos grandes, frutos pequeños, la corona múltiple, pequeña, grande, con presencia de espinas o en forma de roseta; esto ha perjudicado en gran medida a los productores para la comercialización y exportación de la fruta fresca, ya que las piñas son rechazadas por no cumplir las normas de estandarización y calidad, provocando graves pérdidas económicas.

Los avances en la biología molecular han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Rallo *et al.* 2002). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en marcadores de ADN proporciona una oportunidad para caracterizar genotipos y medir las relaciones genéticas con mayor precisión que otros marcadores (Vanijajiva, 2011). Entre las diversas técnicas de marcadores moleculares de ADN polimórfico amplificado al

azar (RAPD) y la interrepetición de secuencias simples (ISSR) son fáciles de realizar, de bajo costo y no requieren información previa genética (Williams *et al.*, 1990; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Las dos técnicas se han usado eficazmente para la identificación y evaluación de germoplasma en la piña (Prakash *et al.*, 2009).

Aunque los RAPD podrían amplificar toda la información del genoma, tienen la desventaja de exhibir bandas espurias debido a la baja rigurosidad de la técnica (Zhao *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010). Los ISSR se han descrito como un enfoque alternativo para los estudios de polimorfismo (Zietkiewicz *et al.*, 1994). La alta reproducibilidad de los ISSR es atribuible al uso de cebadores más largos que permiten temperaturas de alineamiento más altas que las de los RAPD (Pradeep *et al.*, 2002). Análisis de ADN genómico utilizando la técnica de la ISSR se emplean cada vez más para determinar la diversidad genética y las relaciones en las plantas (Parvathaneni *et al.*, 2011). Los marcadores basados en ADN han disfrutado de un éxito mucho mayor en el campo de la genética de piña (Carlier *et al.*, 2004). Por ejemplo, los marcadores AFLP se han utilizado en la caracterización de las colecciones de germoplasma (Yanes *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2005), la detección de variaciones somaclonales de cultivo *in vitro* (Pérez *et al.*, 2009) y el análisis de la diversidad genética (Kato *et al.*, 2005) los RAPD también se han utilizado para el análisis de la diversidad genética (Rúas *et al.*, 2001 y Sripaoraya *et al.*, 2001), así como el estudio de variantes somaclonales que surgen durante el cultivo *in vitro* (Feuser *et al.*, 2003) los RFLP permitieron el estudio de ADN recombinante (Noyer *et al.*, 1997) y la caracterización de la diversidad genética (Duval *et al.*, 2001). Finalmente combinaciones de diferentes marcadores han sido utilizados para el mapeo genético en esta especie (Carlier *et al.*, 2012).

Por lo tanto el objetivo de este estudio fue emplear ISSR y RAPD para estudiar la diversidad genética de individuos normales y mutantes de piña y determinar las relaciones genéticas del híbrido MD-2.

4.1.1. Objetivos

Realizar la caracterización molecular mediante ISSR y RAPD para obtener la huella genética de *Ananas comosus* (L.) Merr.

Evaluar los niveles de polimorfismo entre las poblaciones de individuos normales e individuos mutantes.

Analizar la diversidad genética de los individuos, realizar la construcción de dendrogramas y establecer el tipo de mutación de acuerdo a los grupos formados.

4.2.2. Hipótesis

Mediante la caracterización molecular con ISSR y RAPD se obtendrá la huella genética y se determinará la variabilidad y relaciones genéticas entre los individuos de las dos poblaciones.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Se utilizó material vegetal de 28 individuos de la especie *Ananas comosus* híbrido MD-2 de dos poblaciones (individuos normales e individuos mutantes), los ejemplares provienen de parcelas de dos poblaciones del estado de Veracruz (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Individuos utilizados en el análisis, en las colectas realizadas en el estado de Veracruz, lugar y procedencia.

Número accesión	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Municipio	Localidad	Nombre de la parcela
26 N	18° 06' 30.7'	95° 27' 59.0'	104	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
27 N	18° 06' 30.3'	95° 27' 58.4'	101	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
29 N	18° 06' 29.9'	95° 27' 57.9'	105	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
30 N	18° 06' 29.9'	95° 27' 57.8'	102	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
33 N	18° 06' 29.8'	95° 27' 57.1'	104	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
34 N	18° 06' 30.3'	95° 27' 57.4'	101	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
35 N	18° 06' 30.0'	95° 27' 57.2'	106	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
36 N	18° 06' 30.2'	95° 27' 56.8'	108	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
37 N	18° 06' 30.1'	95° 27' 56.8'	107	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
38 N	18° 06' 30.4'	95° 27' 56.7'	110	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
39 N	18° 06' 30.1'	95° 27' 57.1'	112	Cd. Isla	Finca Carmelita	Finca Carmelita
9 Pi	17.99101	95.32958	104	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
12 Pi	17.99086	95.33009	100	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
14 Pi	17.99092	95.33017	96	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
16 Pi	17.99087	95.33012	102	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
17 Pi	17.99082	95.33012	100	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
18 Pi	17.99082	95.33012	100	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
19 Pi	17.99085	95.33008	109	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
20 Pi	17.99085	95.33007	97	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
21 Pi	17.99087	95.33002	103	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
22 Pi	17.99089	95.32999	101	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
24 Pi	17.99108	95.32978	104	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
25 Pi	17.99088	95.32992	96	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
26 Pi	17.99086	95.32995	103	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
28 Pi	17.99093	95.32986	101	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
29 Pi	17.99104	95.32936	105	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
30 Pi	17.99104	95.32936	105	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
31 Pi	17.99029	95.32954	106	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
34 Pi	17.99015	95.32941	94	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez
41 Pi	17.99025	95.32893	105	R. C.	Rodríguez Clara	Fayo Rodríguez

4.2.2. Extracción y amplificación de ADN

El ADN se extrajo de ~50-100 mg de hojas previamente deshidratadas en sílica gel. Se extrajo ADN genómico por el método de CTAB (Weising *et al.*, 1995) con algunas modificaciones que permitieron eliminar de las muestras una mayor cantidad posible de compuestos fenólicos. Al final del procedimiento el ADN se purificó con Qiaquick columns (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó en un volumen total de 25 μ L, conteniendo 50-100 ng de ADN, 200 μ M de la mezcla de dNTP's, 1X Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega, USA), 20 pM de cada uno los iniciadores específicos para cada fragmento (Cuadro 4.2 y 4.3), 2.5 mM de $MgCl_2$ y 2 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA).

La amplificación se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el equipo Techne TC-512. Los programas utilizados se ajustaron a los iniciadores que se probaron (Cuadro 4.2 y 4.3). Al final se utilizaron los siguientes programas para los ISSR el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 38 ciclos con desnaturalización de 30 s a 94 °C, alineamiento de 30 s a 50 °C, extensión de 1 min 30 s a 72 °C y 1 ciclo de extensión de 3 min a 72 °C (Figura 4.1), para los RAPD el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 38 ciclos con desnaturalización de 30 s a 94 °C, alineamiento de 30 s a 38 °C, extensión de 1 min 30 s a 72 °C y 1 ciclo final de extensión de 3 min a 72 °C (Figura 4.2).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 2 %.

Cuadro 4.2. Iniciadores utilizados para generar los marcadores ISSR para la caracterización de individuos de piña.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Temp.	Referencia
U808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	48.8 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	48.2 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	45.4 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	45.7 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	46.8 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	49.2 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	47.4 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	48.6 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	52.7 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U873	GAC AGA CAG ACA GAC A	47.4 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U880	GGA GAG GAG AGG AGA	47.9 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
U892	TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C	48.7 °C	Zhang <i>et al.</i> (2012)
ISSR 1	AGG AGG AGG AGG AGG AGG	57.5 °C	Vanijajiva, (2012)
ISSR 3	AGA GAG AGA GAG AGT	42.9 °C	Vanijajiva, (2012)
ISSR 4	GAG AGA GAG AGA GAG AC	46.8 °C	Vanijajiva, (2012)
ISSR 5	GAG AGA GAG AGA GAG AT	45.4 °C	Vanijajiva, (2012)
(AG) ₈ YA	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	48.9 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(AG) ₈ YC	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	50.2 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(AC) ₈ YG	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	51.8 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(CA) ₈ YT	CAC ACA CAC ACA CAC AYT	51.8 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(CT) ₈ RC	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	48.6 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
DBD (AC) ₇	DBD ACA CAC ACA CAC AC	50.1 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(GA) ₈ C	GAG AGA GAG AGA GAG AC	46.8 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(AG) ₈ C	AGA GAG AGA GAG AGA GC	48.8 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)
(CA) ₈ RT	CAC ACA CAC ACA CAC ART	51.8 °C	Tapia <i>et al.</i> (2005)

Cuadro 4.3. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD para la caracterización de individuos de piña.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Temp.	Referencia
OPAE 02	TCG TTC ACC C	34.4 °C	Ruas <i>et al.</i> (1995)
OPAE 14	GAG AGC CTC C	34.8 °C	Ruas <i>et al.</i> (1995)
OPA 02	TGC CGA GCT G	40.7 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPA 03	AGT CAG CCA C	34.3 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPA 04	AAT CGG GCT G	35.1 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPA 09	GGG TAA CGC C	37.4 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPA 13	CAG CAC CCA C	37.7 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 02	GTG AGG CGT C	37.6 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 05	GAT GAC CGC C	37.6 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 08	TGG ACC GGT G	39.1 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 10	TGT CTG GGT G	33.4 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 11	AAA GCT GCG G	36.9 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 12	TGT CAT CCC C	32.8 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 15	GAC GGA TCA G	31.1 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 16	CAC ACT CCA G	31.2 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 19	TTC CCC CCA G	37.4 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPC 20	ACT TCG CCA C	35.7 °C	Popluechai <i>et al.</i> (2007)
OPA 01	CAG GCC CTT C	36.4 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPA 20	GTT GCG ATC C	33.5 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPB 01	GTT TCG CTC C	33.4 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPB 19	ACC CCC GAA G	38.4 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPF 13	GGC TGC AGA A	35.6 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPM 13	GGT GGT CAA G	31.6 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPT 07	GGC AGG CTG T	40.3 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)
OPV 19	GGG TGT GCA G	37.7 °C	Santos <i>et al.</i> (2008)

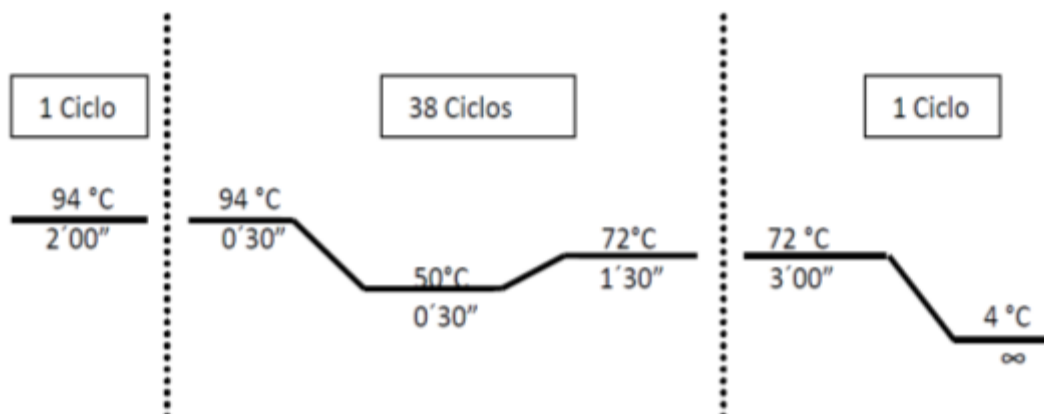


Figura 4.1. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne TC-512.

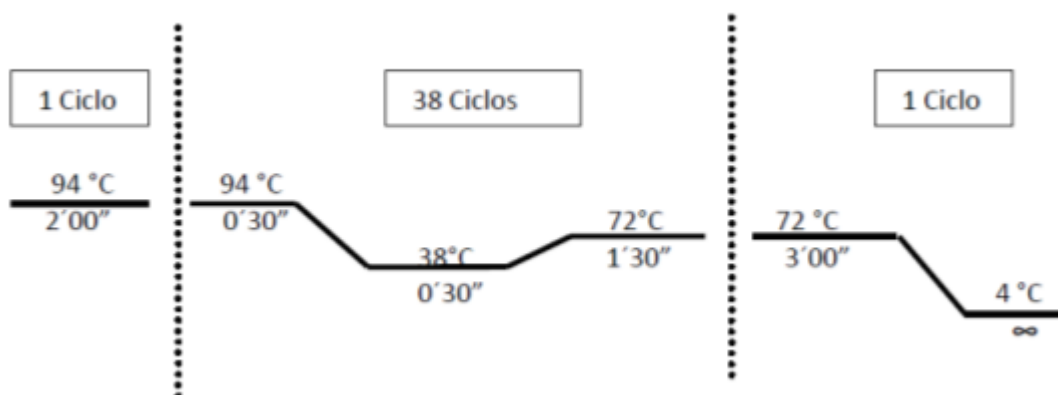


Figura 4.2. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los RAPD en el termociclador Techne TC-512.

4.2.3. Análisis estadístico de la información

Se determinó el número de bandas o polimorfismos de cada genotipo que fueron visualizados en los geles de agarosa para cada iniciador; con estos datos se generó una matriz binaria 1 y 0; donde el 1 indicó la presencia de una banda de ADN particular en una muestra y el 0 representó la ausencia de dicha banda.

La matriz de los datos se vació en una hoja de cálculo (EXCEL) para su posterior utilización en el programa NTSYS versión 2.2 (Numerical Taxonomic Analysis System), calculando similitudes genéticas entre todas las muestras. Con este procedimiento se obtuvo una matriz de similitud aplicando el coeficiente de Jaccard.

En cuanto a la construcción de dendrogramas, éstos se elaboraron según el índice de similitud de Jaccard, tomando a cada accesión como una unidad taxonómica operacional (OTU).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 4.3. Extracción de ADN genómico de piña y elaboración de geles de agarosa.

4.3.1. Análisis ISSR

Tanto para el análisis por ISSR como RAPD se consideraron como bandas polimórficas aquéllas que estaban ausentes al menos en uno de los materiales evaluados. De tal forma que aunque una banda estuviera presente en la mayoría de los materiales, si faltaba en sólo uno se consideraba polimórfica. De los 25 iniciadores ISSR probados, 5 fueron los que mayor información y nitidez mostraron (Figura 4.4 y 4.5).

En el cuadro 4.4 se presentan los resultados completos. Se obtuvieron 52 bandas en su mayoría bandas polimórficas (78.66 %) y en promedio se produjeron 10 bandas por iniciador. Para la población de individuos normales se obtuvieron 50 bandas en su mayoría bandas monomórficas, las bandas polimórficas presentaron el 1.66 % de polimorfismo. En la población de individuos mutantes se obtuvieron 46 bandas en su mayoría bandas polimórficas (75.13 %). Los iniciadores generaron los siguientes números de bandas U808 (12 bandas), U8015 (10 bandas), U834 (10 bandas), U840 (10 bandas), U844 (10 bandas), con un porcentaje de polimorfismo de 33.33 %, 100 %, 70 %, 100 %, 90 % respectivamente (Figuras 4.6 y 4.7). Este nivel de polimorfismo es superior al obtenido con isoenzimas por DeWald *et al.* (1992), donde solo dos sistemas enzimáticos de 37 probados resultaron polimórficos, superior también a lo encontrado con RFLP por Duval *et al.* (2001), quienes detectaron 43 % de polimorfismo para las sondas que utilizaron, superior a lo que encontraron Tapia *et al.* (2005) que detectaron un 75.4 % de polimorfismo en diferentes variedades de piña a través de ISSR; estos resultados también fueron superiores a lo reportado por Vanijajiva (2012) que detectó un 48.21 % en diferentes cultivares de piña utilizando ISSR. El nivel de polimorfismo aquí detectado puede dar una estimación de la alta variabilidad genética existente entre los diferentes materiales probados.

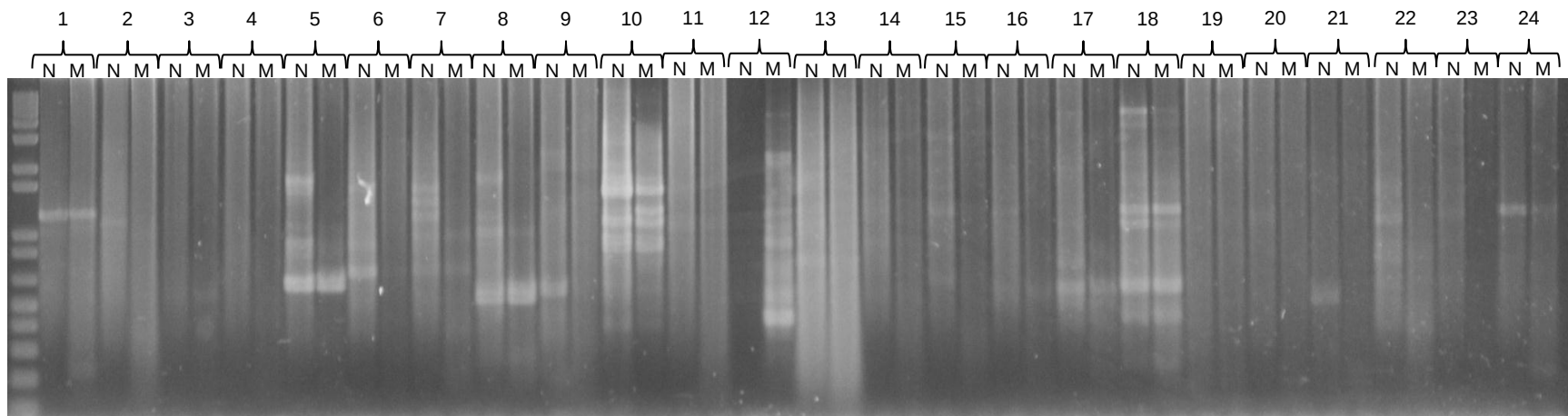


Figura 4.4. Gel de estandarización de 24 iniciadores ISSR con individuos normales y mutantes de piña.

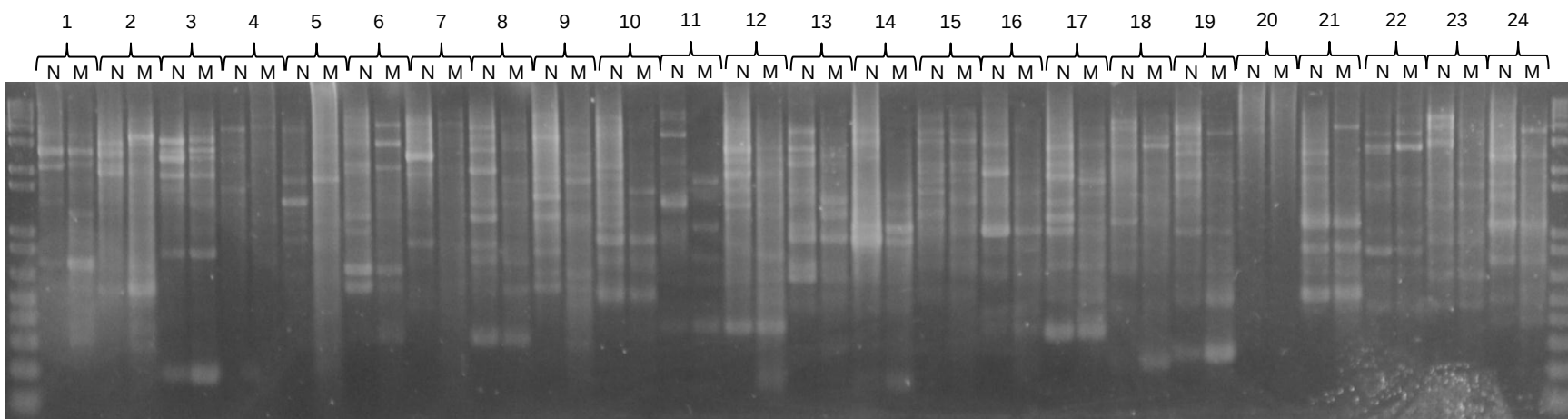


Figura 4.5. Gel de estandarización de 24 iniciadores RAPD con individuos normales y mutantes de piña.

Cuadro 4.4. Nivel de polimorfismo obtenido con 5 iniciadores de ISSR en 28 individuos normales y mutantes de piña

Población de individuos normales y mutantes				
Iniciador	Número de bandas	Número de bandas Monomórficas	Número de bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
U808	12	8	4	33.33
U815	10	0	10	100
U834	10	3	7	70
U840	10	0	10	100
U844	10	1	9	90
Total	52	12	40	
Promedio	10.4			78.66

Población individuos normales				
Iniciador	Número de bandas	Número de bandas Monomórficas	Número de bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
U808	12	11	1	8.33
U815	10	10	0	0
U834	10	10	0	0
U840	9	9	0	0
U844	9	9	0	0
Total	50	49	1	
Promedio	10			1.66

Población de individuos mutantes				
Iniciador	Número de bandas	Número de bandas Monomórficas	Número de bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
U808	11	9	2	18.18
U815	7	0	7	100
U834	10	3	7	70
U840	10	10	10	100
U844	8	1	7	87.5
Total	46	23	33	
Promedio	9.2			75.13

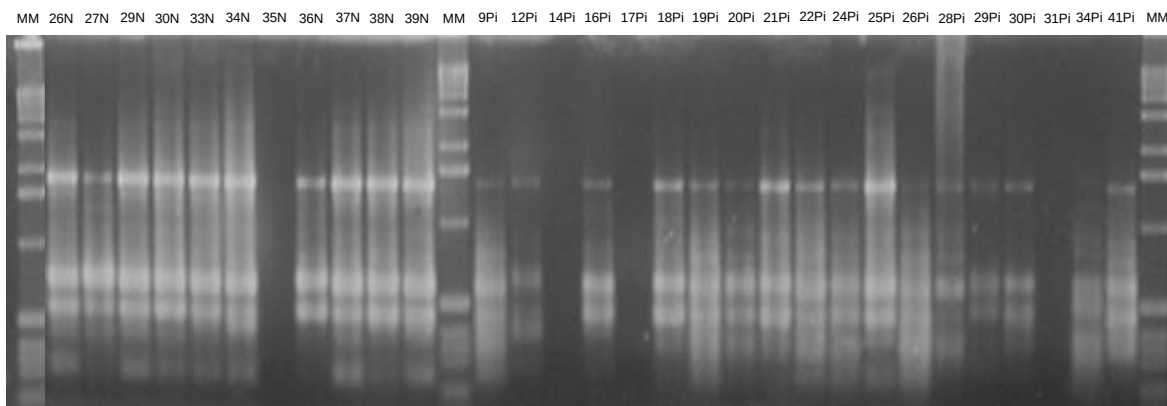


Figura 4.6. Patrones de bandeo de los genotipos de *Ananas comosus* híbrido MD-2 evaluados con ISSR obtenidos con el iniciador U815.

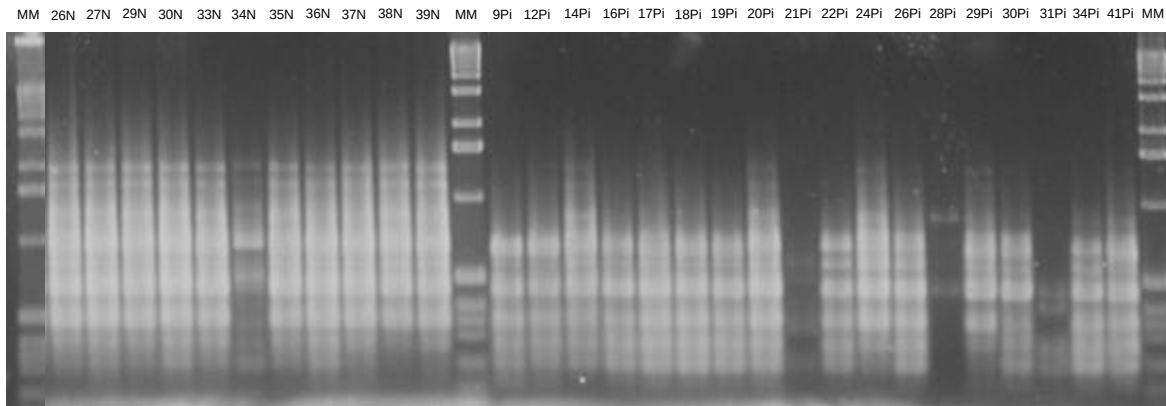


Figura 4.7. Patrones de bandeo de los genotipos de *Ananas comosus* híbrido MD-2 evaluados con ISSR obtenidos con el iniciador U834.

Aunque Wang *et al.* (1994) mencionaron que en especies vegetales las secuencias de microsatélites más comunes son dinucleótidos (AT/TA)_n seguida de las secuencias (GA/CT)_n, en el caso del genoma de piña las secuencias microsatelites más comunes fueron las de los dinucleótidos (AG/GA)_n, con base en el número de iniciadores que se amplificaron con estas secuencias y al número de bandas generadas con éstos lo cual concuerda con Tapia *et al.* (2005), seguido de los dinucleótidos (CT/TC)_n.

Una vez analizada la matriz de 0 y 1 generada a partir de los datos moleculares de las bandas de ISSR, se obtuvo una matriz de distancias genéticas (Cuadro 4.5) cuyos valores se encuentran entre 0 y 1; los valores cercanos a 1 significan que son materiales más emparentados genéticamente, mientras que los valores cercanos a 0 se refieren a materiales poco emparentados. Esto mostró que los materiales más emparentados, con base en sus coeficientes de similitud fueron: 26N/27N (1.0), 27N/29N (1.0), 29N/30N (1.0), 30N/33N (1.0), 33N/34N (0.98), 34N/35N (0.98), 35N/36N (1.0), 36N/37N (1.0), 37N/26N (1.0), 38N/34N (1.0) 39N/38N (1.0). Estos materiales presentaron un mayor número de bandas similares con los diferentes iniciadores utilizados. Los materiales con menores coeficientes de similitud genética fueron: 16Pi/14Pi (0.54), 17Pi/14Pi (0.55), 18Pi/14 (0.50), 19Pi/14Pi (0.49), 20Pi/14Pi (0.53), 21Pi/14Pi (0.52), 24Pi/14Pi (0.51), 26Pi/14Pi (0.45), 28Pi/14Pi (0.52), 29Pi (0.44), 30Pi/14Pi (0.39), 34Pi/14Pi (0.51), 41Pi (0.50).

Cuadro 4.5. Matriz de distancias genéticas para individuos normales y mutantes de piña a través de ISSR.

	26N	27N	29N	30N	33N	34N	35N	36N	37N	38N	39N	9Pi	12Pi	14Pi	16Pi	17Pi	18Pi	19Pi	20Pi	21Pi	24Pi	26Pi	28Pi	29Pi	30Pi	31Pi	34Pi	41Pi
26N	1.00																											
27N	1.00	1.00																										
29N	1.00	1.00	1.00																									
30N	1.00	1.00	1.00	1.00																								
33N	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00																							
34N	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00																						
35N	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00																					
36N	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00																				
37N	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00																			
38N	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	0.98	0.98	0.98	1.00																		
39N	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00																	
9Pi	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	1.00																
12Pi	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.59	0.61	0.61	0.61	0.59	0.61	0.77	1.00															
14Pi	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.42	0.44	0.44	0.44	0.42	0.44	0.51	0.59	1.00														
16Pi	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.59	0.61	0.61	0.61	0.59	0.61	0.77	0.73	0.54	1.00													
17Pi	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.53	0.55	0.55	0.55	0.53	0.55	0.65	0.61	0.55	0.79	1.00												
18Pi	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.71	0.73	0.73	0.73	0.71	0.73	0.88	0.67	0.50	0.84	0.76	1.00											
19Pi	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.73	0.75	0.75	0.75	0.73	0.75	0.90	0.69	0.49	0.82	0.74	0.97	1.00										
20Pi	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.67	0.69	0.69	0.69	0.67	0.69	0.83	0.66	0.53	0.84	0.71	0.90	0.88	1.00									
21Pi	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.78	0.80	0.80	0.80	0.78	0.80	0.84	0.68	0.52	0.76	0.69	0.90	0.88	0.86	1.00								
24Pi	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.57	0.59	0.59	0.59	0.57	0.59	0.70	0.54	0.51	0.62	0.54	0.68	0.71	0.76	0.66	1.00							
26Pi	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.73	0.75	0.75	0.75	0.73	0.75	0.90	0.69	0.45	0.78	0.66	0.83	0.86	0.83	0.88	0.71	1.00						
28Pi	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.78	0.80	0.80	0.80	0.78	0.80	0.88	0.72	0.52	0.76	0.69	0.90	0.93	0.81	0.95	0.66	0.88	1.00					
29Pi	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.90	0.68	0.44	0.82	0.69	0.88	0.90	0.87	0.84	0.74	0.95	0.84	1.00				
30Pi	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.54	0.56	0.56	0.56	0.54	0.56	0.70	0.54	0.39	0.70	0.62	0.73	0.71	0.76	0.70	0.63	0.71	0.66	0.74	1.00			
31Pi	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.73	0.75	0.75	0.75	0.73	0.75	0.77	0.73	0.56	0.78	0.74	0.83	0.81	0.79	0.93	0.59	0.81	0.88	0.77	0.63	1.00		
34Pi	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.63	0.65	0.65	0.65	0.63	0.65	0.87	0.69	0.51	0.83	0.70	0.85	0.87	0.89	0.77	0.71	0.83	0.81	0.87	0.76	0.70	1.00	
41Pi	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.71	0.73	0.73	0.73	0.71	0.73	0.88	0.67	0.50	0.84	0.76	0.95	0.93	0.85	0.90	0.64	0.88	0.90	0.88	0.73	0.83	0.85	1.00

De la matriz de distancias genéticas se derivó el dendrograma mostrado en la Figura 4.8, el cual se obtuvo por el método de agrupamiento UPGMA; en él que se agruparon los diferentes individuos de piña analizados con base en el Coeficiente de Jaccard determinado entre éstos. Los ISSR diferenciaron a los 28 individuos en siete grupos a un coeficiente de distancia de 0.74 (Figura 4.9) dentro de un rango de 0.48 a 1.00.

Los materiales con mayor coeficiente fueron los indicados en el grupo 1, que se caracterizó por contar con los individuos normales que presentaron las características morfológicas importantes a nivel comercial.

Los grupos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se formaron por los individuos mutantes que presentaron las características siguientes (caracterización morfológica): 9Pi fue un fruto pequeño con la corona larga-cónica y presencia de fisura; 14Pi fue un fruto pequeño con la corona en forma cónica; 17Pi fue un fruto pequeño con la corona en forma de roseta; 31Pi y 41Pi se determinaron como frutos grandes con corona múltiple; 16Pi fue un fruto grande con la corona en forma cilíndrica y presencia de cuello; 18Pi fueron fruto grande con la corona en forma cilíndrica y presencia de cuello; 34Pi fue un fruto grande con corona grande; 19Pi fue un fruto grande con la corona en forma de roseta; 12Pi, 20Pi y 21Pi presentaron la corona en forma de roseta; 24Pi se determinó como fruto espinoso con la corona en forma cilíndrica; 28Pi presentó la corona larga-cónica; 26Pi presentó la corona larga-cónica y presencia de fisura; 29Pi y 30Pi fueron frutos con presencia de fisura.

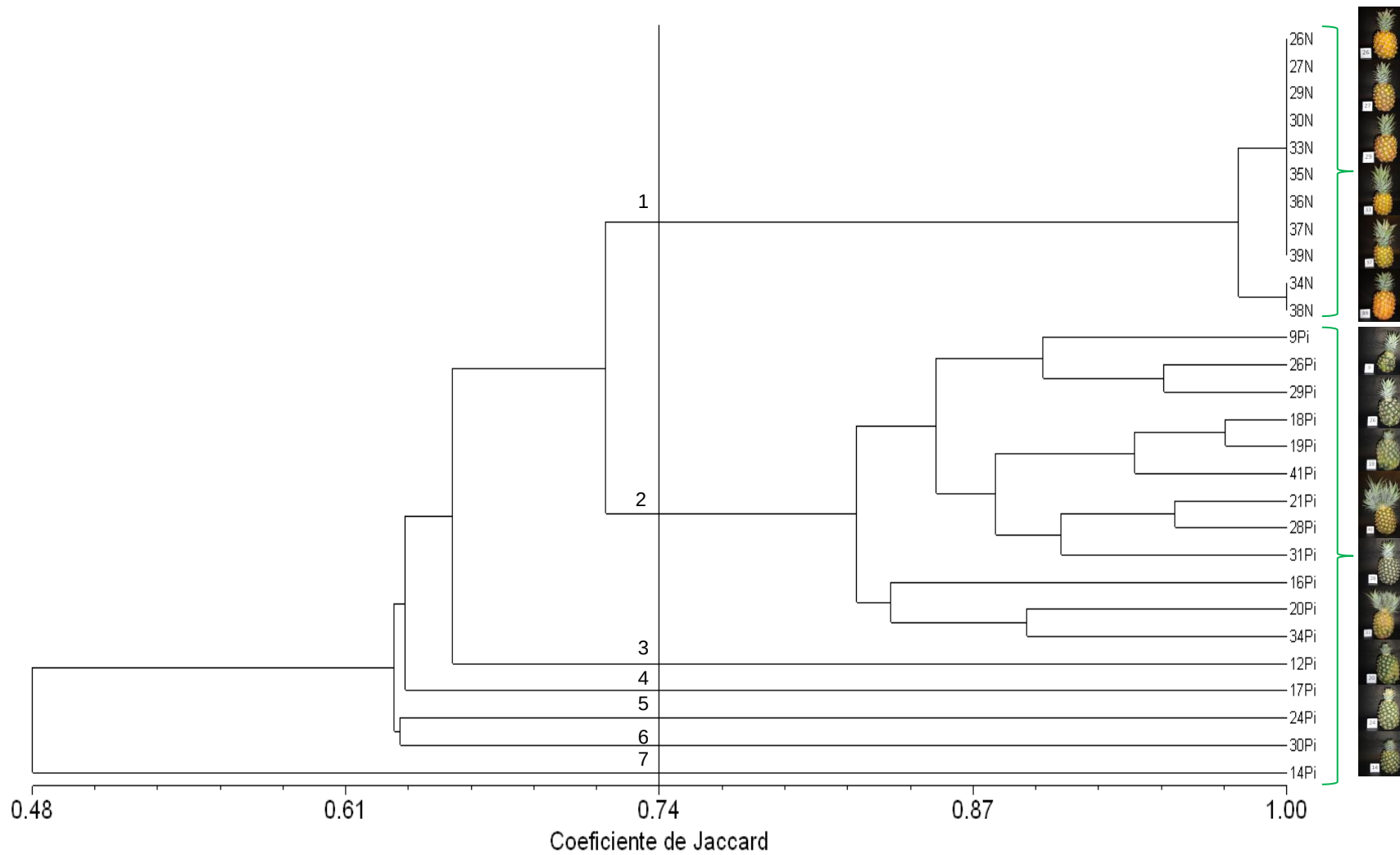


Figura 4.8. Dendrograma de agrupamiento de 28 individuos de piña, obtenido a partir de los datos moleculares de 5 iniciadores ISSR.

3.1.2. Análisis RAPD

De los 25 iniciadores decámeros, 14 fueron útiles para el propósito del trabajo, el resto se descartó por no tener buena resolución o no detectar polimorfismo. En el Cuadro 4.6 se presentan los resultados del polimorfismo detectado para cada iniciador. En total se generaron 156, de las cuales 91.56 % fueron bandas polimórficas y en promedio se produjeron 11 bandas por iniciador. Para la población de individuos normales se obtuvieron 72 bandas en su mayoría monomórficas, las bandas polimórficas representaron el 8.43 % de polimorfismo. En la población de individuos mutantes se obtuvieron 154 bandas en su mayoría bandas polimórficas (91.67 %). Los iniciadores que generaron mayor número de bandas fueron OPA-03 (12 bandas), OPA-04 (12 bandas), OPA-09 (14 bandas), OPC-05 (12 bandas), OPB-19 (15 bandas) y OPT-07 (12 bandas) con un porcentaje de polimorfismo de 91.66 %, 83.33 %, 85.71 %, 100 %, 100 % y 100 % respectivamente (Figuras 4.9).

El número de bandas promedio por iniciador resultó muy similar a lo obtenido para ISSR; es importante considerar que los iniciadores ISSR y RAPD utilizados si fueron específicos para la piña. En cuanto al nivel de polimorfismo, los ISSR resultaron menos informativos que los RAPD (78.66 % contra 91.56 %). Sin embargo diferentes autores mencionan que los ISSR superan a RAPD en cuanto al nivel de polimorfismo generado (Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Tapia *et al.*, 2005). El nivel de polimorfismo obtenido por RAPD (91.56 %) fue superior a lo obtenido por Tapia *et al.* (2005) que detectaron un 63.4 % de polimorfismo en diferentes variedades de piña a través de RAPD, estos resultados también fueron superiores a lo reportado por Rúas *et al.* (1995) en cuatro variedades de piña mediante análisis de RAPD, también fue superior a lo reportado por Popluechai *et al.* (2007) que detectaron un 70.4 % de polimorfismo y por Santos *et al.* (2008) que detectaron un 2.8 % de polimorfismo en accesiones de piña ornamental a través de RAPD.

Cuadro 4.6. Nivel de polimorfismo obtenido con 5 iniciadores de ISSR en 28 individuos normales y mutantes de piña

Población de individuos normales y mutantes				
Iniciador	Número de bandas	Número de bandas Monomórficas	Número de bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
OPAE 02	10	0	10	100
OPAE 14	11	2	9	81.81
OPA 02	8	1	7	87.5
OPA 03	12	1	1	91.66
OPA 04	12	2	10	83.33
OPA 09	14	2	12	85.71
OPC 02	10	0	10	100
OPC 05	12	0	12	100
OPC 08	8	0	8	100
OPC 11	11	1	10	90.90
OPC 12	11	1	10	90.90
OPB 19	15	0	15	100
OPT 07	12	0	12	100
OPV 19	10	3	7	70
Total	156	13		
Promedio	11.14			91.56

Población individuos normales				
Iniciador	Número de bandas	Número de bandas Monomórficas	Número de bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
OPAE 02	0	0	0	0
OPAE 14	7	7	0	0
OPA 02	3	3	0	0
OPA 03	1	1	0	0
OPA 04	9	4	5	55.55
OPA 09	8	3	5	62.5
OPC 02	5	5	0	0
OPC 05	8	8	0	0
OPC 08	4	4	0	0
OPC 11	6	6	0	0
OPC 12	8	8	0	0
OPB 19	0	0	0	0
OPT 07	5	5	0	0
OPV 19	8	8	0	0
Total	72	62	10	8.43
Promedio	4.92			

Población de individuos mutantes				
Iniciador	Número de bandas	Número de bandas Monomórficas	Número de bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
OPAE 02	10	0	10	100
OPAE 14	11	2	9	81.81
OPA 02	8	2	6	75
OPA 03	12	4	8	66.66
OPA 04	12	2	10	83.33
OPA 09	14	2	12	85.71
OPC 02	10	0	10	100
OPC 05	12	0	12	100
OPC 08	8	0	8	100
OPC 11	10	0	10	90.90
OPC 12	11	1	10	100
OPB 19	15	0	15	100
OPT 07	12	0	12	100
OPV 19	9	4	5	91.67
Total	154			
Promedio	11			

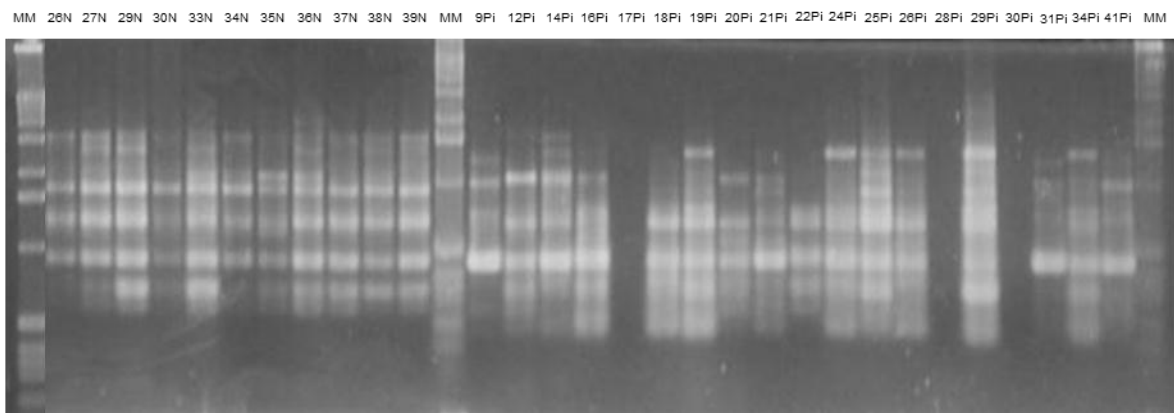


Figura 4.9. Patrones de bandeo de los genotipos de *Ananas comosus* híbrido MD-2 evaluados con RAPD obtenidos con el iniciador OPC08

El análisis de distancia genéticas (Cuadro 4.7) mostró que los materiales con mayor similitud genética fueron: 27N/26N (0.93), 29N/26N (0.96), 20N/27N (0.97), 33N/29N (0.96), 34N/33N (0.94), 35N/33N (1.00), 36N/34N (0.93), 37N/36N (0.94), 38N/35N (0.97), 39N/37N (0.98). Estos materiales presentaron un mayor número de bandas similares con los diferentes iniciadores utilizados. Los materiales con menores coeficientes de similitud genética fueron: 17Pi/14Pi (0.37), 18Pi/14Pi (0.47), 19Pi/17Pi (0.49), 20Pi/17Pi (0.42), 21Pi/14Pi (0.42), 22Pi/17Pi (0.48), 26Pi/14Pi (0.42), 28Pi/14Pi (0.37), 29Pi/14Pi (0.37), 30Pi/14Pi (0.37), 31Pi/14Pi (0.40), 34Pi/17Pi (0.35), 41Pi/17Pi (0.38).

Con la matriz de distancias genéticas se hizo el dendrograma por el método de agrupamiento de UPGMA (Figura 4.10), en el que se presenta la formación de catorce grupos a través del Coeficiente de Jaccard. Los RAPD diferenciaron a los 28 individuos en catorce grupos a un coeficiente de distancia de 0.68 (Figura 4.13) dentro de un rango de 0.37 a 1.00. En el grupo 1 se encontraron los individuos con un alto grado de parentesco debido a que todos pertenecen al grupo de individuos normales. El resto de los grupos lo integraron los individuos mutantes que mostraron alta variabilidad genética.

En los dos tipos de análisis moleculares (RAPD e ISSR), se encontraron resultados similares en los coeficientes de similitud genética obtenidos, así como en el ordenamiento de los dendrogramas. Dichos resultados indican alta variabilidad entre los materiales estudiados. Los análisis por separado de ISSR y RAPD, fueron similares en cuanto al arreglo de los materiales en sus respectivos dendrogramas. En estos se observa una tendencia a formar un grupo compacto con los materiales más emparentados entre sí, como es el caso de los individuos normales. La cantidad de polimorfismo observado entre los materiales, sobre todo aquéllos que se sospechaban iguales se puede atribuir a la clasificación basada en la anterior caracterización morfológica.

Cuadro 4.7. Matriz de distancias genéticas para individuos normales y mutantes de piña a través de RAPD.

	26N	27N	29N	30N	33N	34N	35N	36N	37N	38N	39N	9Pi	12Pi	14Pi	16Pi	17Pi	18Pi	19Pi	20Pi	21Pi	24Pi	26Pi	28Pi	29Pi	30Pi	31Pi	34Pi	41Pi
26N	1																											
27N	0.93	1																										
29N	0.96	0.94	1																									
30N	0.93	0.97	0.94	1																								
33N	0.91	0.93	0.96	0.95	1																							
34N	0.94	0.87	0.93	0.9	0.94	1																						
35N	0.91	0.93	0.96	0.95	1	0.94	1																					
36N	0.9	0.86	0.89	0.89	0.9	0.93	0.9	1																				
37N	0.93	0.91	0.94	0.94	0.96	0.93	0.96	0.94	1																			
38N	0.91	0.9	0.96	0.93	0.97	0.94	0.97	0.93	0.98	1																		
39N	0.94	0.9	0.93	0.93	0.94	0.94	0.94	0.93	0.98	0.97	1																	
9Pi	0.41	0.39	0.43	0.39	0.42	0.42	0.42	0.4	0.41	0.42	0.41	1																
12Pi	0.42	0.39	0.43	0.39	0.42	0.42	0.42	0.41	0.43	0.44	0.42	0.75	1															
14Pi	0.48	0.44	0.48	0.44	0.47	0.48	0.47	0.47	0.48	0.49	0.49	0.61	0.68	1														
16Pi	0.4	0.38	0.39	0.38	0.39	0.4	0.39	0.38	0.4	0.39	0.41	0.63	0.61	0.5	1													
17Pi	0.3	0.3	0.29	0.3	0.31	0.31	0.31	0.3	0.29	0.29	0.31	0.46	0.43	0.37	0.44	1												
18Pi	0.36	0.36	0.35	0.36	0.35	0.35	0.35	0.33	0.34	0.34	0.35	0.53	0.52	0.47	0.56	0.51	1											
19Pi	0.37	0.37	0.36	0.37	0.36	0.36	0.36	0.35	0.36	0.36	0.37	0.52	0.54	0.5	0.55	0.49	0.78	1										
20Pi	0.28	0.29	0.3	0.29	0.3	0.29	0.3	0.27	0.28	0.29	0.28	0.45	0.43	0.45	0.41	0.42	0.42	0.44	1									
21Pi	0.4	0.43	0.42	0.43	0.43	0.41	0.43	0.39	0.4	0.41	0.4	0.53	0.49	0.42	0.56	0.45	0.54	0.55	0.49	1								
24Pi	0.36	0.33	0.37	0.35	0.38	0.37	0.38	0.35	0.37	0.38	0.36	0.66	0.63	0.49	0.53	0.48	0.51	0.55	0.44	0.54	1							
26Pi	0.35	0.34	0.33	0.34	0.33	0.34	0.33	0.32	0.32	0.32	0.33	0.52	0.51	0.42	0.55	0.44	0.57	0.64	0.37	0.61	0.53	1						
28Pi	0.34	0.36	0.34	0.36	0.35	0.33	0.35	0.32	0.34	0.33	0.33	0.46	0.48	0.37	0.49	0.47	0.53	0.59	0.43	0.6	0.53	0.6	1					
29Pi	0.37	0.36	0.36	0.37	0.36	0.36	0.36	0.35	0.35	0.35	0.35	0.49	0.46	0.37	0.52	0.43	0.59	0.62	0.41	0.61	0.5	0.66	0.64	1				
30Pi	0.35	0.34	0.37	0.36	0.38	0.36	0.38	0.35	0.35	0.36	0.35	0.49	0.47	0.37	0.49	0.43	0.48	0.48	0.46	0.59	0.59	0.53	0.51	0.52	1			
31Pi	0.38	0.38	0.36	0.38	0.36	0.38	0.36	0.35	0.36	0.35	0.36	0.46	0.46	0.4	0.51	0.42	0.58	0.65	0.4	0.54	0.51	0.64	0.69	0.64	0.46	1		
34Pi	0.37	0.35	0.39	0.36	0.38	0.38	0.38	0.35	0.37	0.38	0.36	0.53	0.52	0.41	0.49	0.35	0.55	0.54	0.41	0.54	0.54	0.48	0.54	0.55	0.47	0.6	1	
41Pi	0.37	0.34	0.39	0.36	0.38	0.37	0.38	0.35	0.36	0.38	0.36	0.54	0.53	0.44	0.48	0.38	0.53	0.55	0.43	0.52	0.54	0.49	0.51	0.51	0.5	0.54	0.85	1

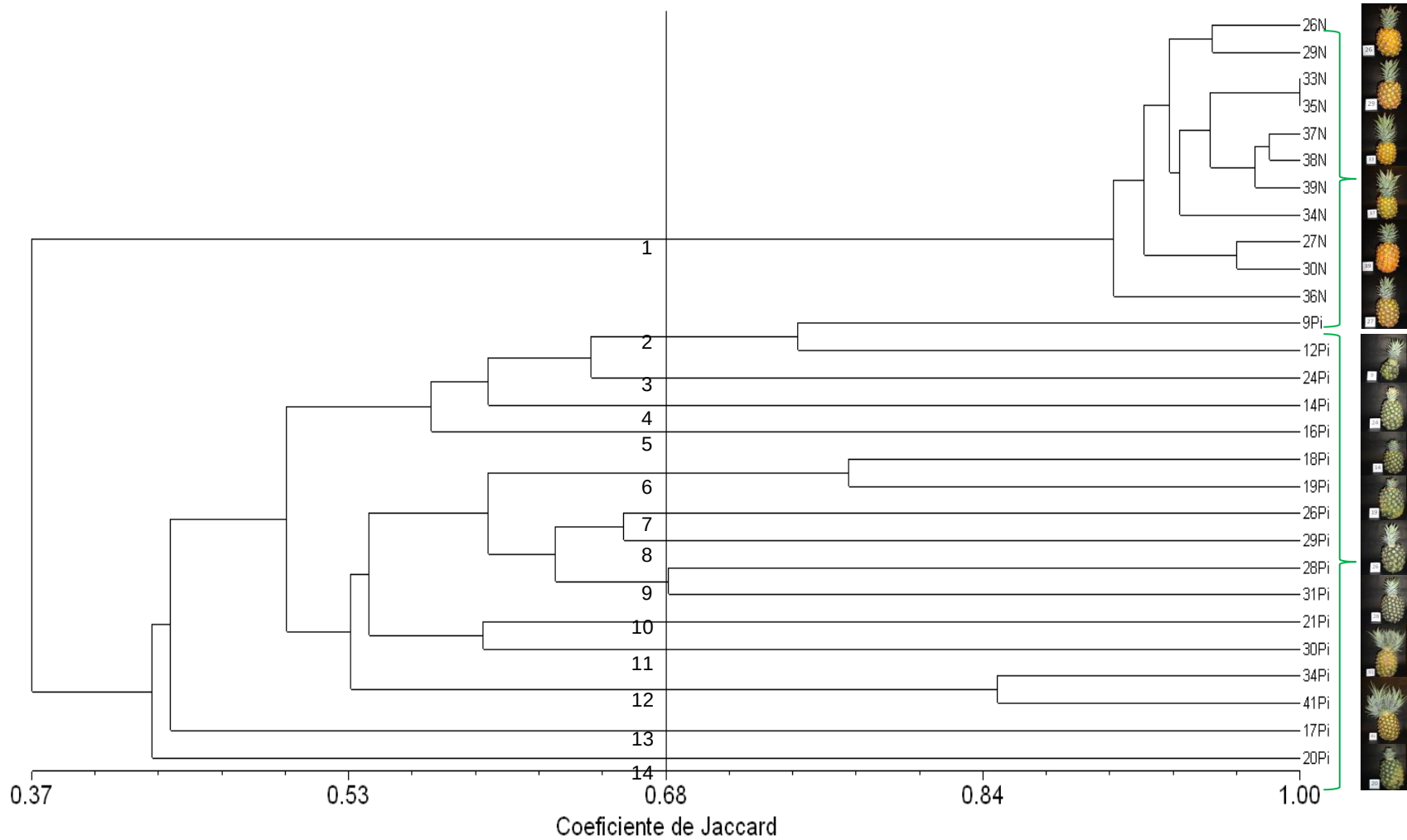


Figura 4.10. Dendrograma de agrupamiento de 28 individuos de piña, obtenido a partir de los datos moleculares de 14 iniciadores RAPD.

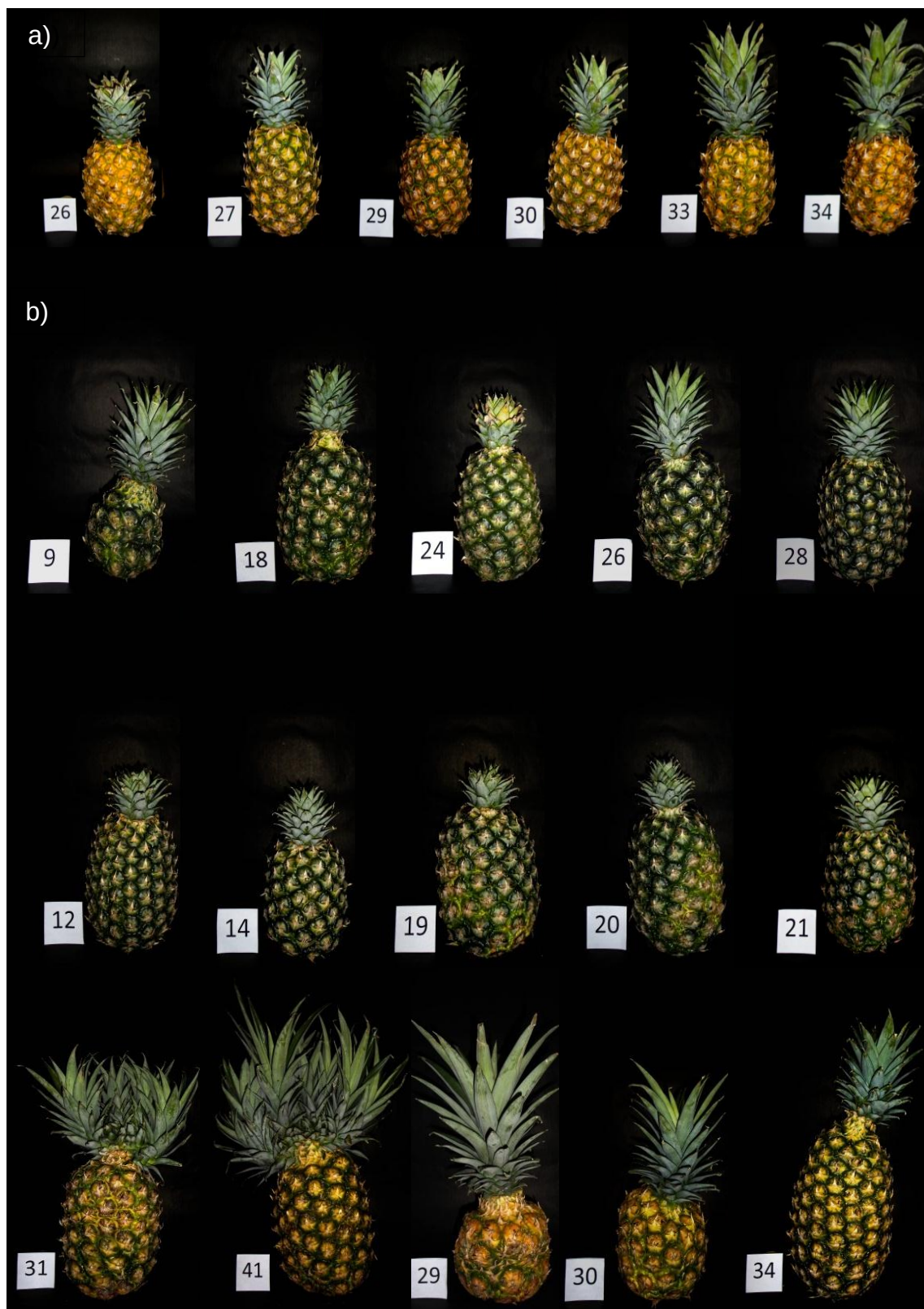


Figura 4.11. a) Individuos normales de piña. b) Individuos mutantes de piña

Las condiciones ambientales, nutrición estado de desarrollo de las plantas, densidad de plantación e incluso el ataque de plagas y enfermedades , influyen en la expresión de las características morfológicas, anatómicas y fisiológicas de la piña, lo que da como resultado materiales muy parecidos, incluso iguales fenotípicamente; pero a nivel genético estos materiales son diferentes e incluso poco relacionados. Pi *et al.* (1988) y Tapia *et al.* (2005) mencionan que la tasa de mutación en piña es un factor relevante que incide en la variabilidad genética del género.

Otra explicación a los resultados obtenidos es la amplia variabilidad existente entre los materiales, debido principalmente a la autoincompatibilidad de la piña, fenómeno que ha favorecido el cruzamiento y ha conducido a un alto nivel de heterocigocis. Esto concuerda con Carlier *et al.* (2004), DeWald *et al.* (1992), Mallikarjuna *et al.* (1994), Popluechai *et al.* (2007), Rúas *et al.* (1995), Santos *et al.* (2008), Tapia *et al.* (2005) y Vanijajiva (2012) quienes reportaron una amplia variabilidad en *Ananas comosus*.

Otra fuente de variabilidad genética es la que se obtiene por variación somaclonal (Pierik, 1998; Williams y Fleisch, 1993) que según Duval *et al.* (2001), Feuser *et al.* (2003) y Wasaka (1989) es muy común en plantas de piña a partir del cultivo de tejidos. Una posible variación somaclonal puede explicar los resultados obtenidos en cuanto al material MD-2 de los individuos mutantes generado por micropropagación el cual molecularmente presentó alta variabilidad genética y morfológicamente resultaron diferentes.

4.4. CONCLUSIÓN

Los análisis por ISSR y RAPD permitieron detectar una alta variabilidad genética entre los materiales de piña evaluados, sobre todo en los pertenecientes a los individuos mutantes. Las diferencias moleculares encontradas con respecto a las características morfológicas, se atribuyen a la heterocigosis de la especie, al número reducido de repeticiones por individuo y en menor grado a la tasa de mutación, variaciones somaclonales, manejo agronómico y los efectos ambientales que influyen sobre esta variabilidad. Tanto los ISSR como los RAPD permitieron detectar polimorfismos en los materiales de piña, sobre todo con los RAPD.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

ANU, A.; BABU, K. N.; PETER, K.V. 2004. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 261-267.

BLANCO, F. H. A.; VARGAS, T. E. y GARCÍA, E. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. Interciencia 36(6):437-443.

BRAR, S. M. and BRAR, D. S. 1998. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In Jain, SM; Brar, DS. eds. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, Kluwer. pp:15-37.

CARLIER, J. D.; REIS, A.; DUVAL, M. F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. and LEITAO, J. M. 2004. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. Plant Breeding 123:186-192.

CARLIER, J.; SOUSA, N. H.; SANTO, T. E.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. and LEITAO, J. M. 2012. A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

CHAN, Y. K.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. and SANEWSKI, G. M. 2003. Breeding and variety improvement. In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G. (Eds.), The Pineapple Botany, Production and Uses. CAB International, Wallingford. pp:33-55.

CHAO, M.; SHENG-YUAN, X.; ZHEN-GUO L.; WEI, W. and LI-JUN, D. 2007. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography 1165:39-44.

COLLINS, J.L. 1951. Notes on the origin, history, and genetic nature of the Cayenne pineapple. Pacific Science 5(1):3-17.

DEWALD, M. G; **MOORE**, G. A. and **SHERMAN**, W. B. 1992. Isozymes in *Ananas* (Pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:491-496.

DUVAL, M.F.; **NOYER**, J.L.; **PERRIER**, X.; **EECKEN- DRUGGE**, C.; **HAMON**, P. 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 102(1):83-90.

FAO. 2010. Base de datos estadísticos de la FAO. [http://www. faostat.org.mx](http://www.faostat.org.mx)

FEUSER, S.; **MELER**, K.; **DAQUINTA**, M.; **GUERRA**, M.P.; **NODARI**, R.O. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72(3):221-227.

GALLARDO, M. 1995. Biotecnología aplicada al cultivo de la piña. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 p.

KAEPPLER, S. M.; **KAEPPLER**, H. F. and **RHEE**, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43:179-188.

KATO, C.Y.; **NAGAI**, C.; **MOORE**, P.H.; **ZEE**, F.; **KIM**, M.S.; **STEIGER**, D.L.; **MING**, R. 2005. Intraspecific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution 51(8):815- 825.

KUMAR, S.; **JENA**, S. N. and **Nair**, N. K. 2010. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. Scientia Horticulturae 123: 350–359.

LARKIN, P.J. and **SCROWCROFT**, W. R. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 60:197-214.

LEAL, F.J. and **COPPENS D'EECKENBRUGGE**, G. 1996. Pineapple. In: J. Janick and J.N. Moore. (Eds.).Fruit Breeding. Vol. I. Tree and Tropical Fruits. John Wiley & Sons.New York. USA. pp:565-606.

LUTHER, H.E. 2004. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. 9th ed. The Bromeliad Society International. Inc.: Orlando. FL. USA.

MALLIKARJUNA, K. A.; ZEE, F. and MARSHARDT, R. M. 1994. Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica* 79:87-99.

MUJIB, A. 2004. *In vitro* variability in tissue culture: a fresh look. In Mujib, A.; Myeong-je, C.; Predieri, S.; Banerjee, S. eds. *In vitro* application in crop improvement. Enfield. EUA. Science Publishers. pp. 261-271

NAVARRO, W. and PEREA, M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. EUNA, Heredia, CR. 105p.

NOYER, J.; LAUNAD, C.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. and DUVAL, M. F. 1997. RFLP study on rDNA variability in *Ananas* genus. *Acta Hortic.* 425:153–160.

PÁEZ, M.G. 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas* spp. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 42:128-132.

PARVATHANENI, R. K.; NATESAN S.; DEVARAJ A. A.; MUTHURAJA R.; VENKATACHALAM R.; SUBRAMANI A. P. and LAXMANAN P. (2011). Fingerprinting in Cucumber and Melon (*Cucumis* spp.) genotypes using morphological and ISSR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14: 39-43.

PÉREZ, E. 2009. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185p.

PIERIK, R. 1998. *In vitro* culture of Higher Plants: 4th Edition. Springer. Dordrecht. The Netherlands. 353p.

POPLUECHAI, S.; ONTO, S. and EUNGWANICHAYAPANT, P.D. 2007. Relationships between some Thai cultivars of pineapple (*Ananas comosus*) revealed by RAPD analysis. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(6):1491-1497.

PRADEEP, R. M.; SARLA, N. and SIDDIQ, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.

PRAKASH, J.; BHATTACHARYYA, S.; CHATTOPADHYAY K.; ROY S.; DAS S. P. and SINGH N. P. 2009. PQM-1: A newly developed superior clone of pineapple for northeastern India as evident through phenotype, fruit quality and DNA polymorphism. *Scientia Horticulturae* 120: 288-291.

PY, C.; LACOEUILHE, J. J. and TEISSON, C. 1984. L'ananas, sa culture, ses produits. París: G.P. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T. 562 p.

RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; TRUJILLO, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojunio_2000/almazara/almazara1.htm

RATNAPARKHE, M. B.; TEKEOGLU, M. and MUEHLBAUER, F. J. 1998. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as useful for finding markers associated with disease resistance genes clusters. *Theor. Appl. Gen.* 97:515-519.

REBOLLEDO, M. L.; URIZA, A. D. E.; REBOLLEDO, M. A.; ZÁGADA, G. 2005. Slip production of MD-2 hybrid pineapple by three methods: gaullin, leaf pruning and a growth regulator. *Acta Hort.* 666:277-285.

RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CABRAL, J.R. 2001. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers. *Euphytica* 119(3):245-252.

RUAS, P.M.; RUAS, C. F.; FAIRBANKS, D. J.; ANDERSEN, W. R. and CABRAL, J. R. S. 1995. Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Brazilian Journal of Genetic.* 18(3):413-116.

SAHIJRAM, L.; SONEYI, J. R. and BOLLAMMA, K. T. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). *In Vitro cellular and Developmental Biology Plant* 39:551-556.

SANTOS, M. D. M.; BUSO, G. C. S. and TORRES, A. C. 2008. Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus*

var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers. Genetics and Molecular Research 7(4):1097-1105.

SMITH, R. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. Academic Press. San Diego. USA. 231pp.

SRIPAORAYA, S.; BLACKHALL, N.; MARCHANT, R.; POWER, J.; LOWE, K.; DAVEY, M. 2001. Relationships in pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Plant Breeding 120(3):265.

TAPIA, C. E.; GUILLÉN, A. H.; GUTIÉRREZ, E. M. A. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas* spp.) mediante RAPD e ISSR. Revista Fitotecnia Mexicana. Julio – Septiembre. Año/vol. 28. Número 003. Sociedad Mexicana de Fitogenética. A.C. Chapingo, México. pp. 187-194.

URIZA AVILA, D. 2005. IV International Pineapple Symposium Foreword and Preface. Acta. Hort. 666.

VANIJAJIVA, O. 2012. Assessment of genetic diversity and relationships in pineapple cultivars from Thailand using ISSR marker. Journal of Agricultural Technology 8(5):1829-1838.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G. and TANKSLEY S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor.Appl. Gen. 88:1-6.

WAKASA, K. 1989. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 5 Trees II. Y P S Bajaj. (ed). Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. pp:13-29.

WEISING, K.; ATKINSON, R.G., AND R.C. GARDNER. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. PCR Meth Applications 4:249-255.

WILLIAM, J. G.; KUBLIK, K.; LIVAK, K. J. and RAFALSKI, K. J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 18:6531-6535.

WILLIAMS, D.D.F. and FLEISCH, H. 1993. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. Acta Horticulturae 334:67-76.

YANES, E.; GIL, K.; REBOLLEDO, L.; REBOLLEDO, A.; URIZA, D., MARTÍNEZ, O.; ISIDRÓN, M.; DÍAZ, L.; LORENZO, J. C. and SIMPSON, J., 2012. Genetic diversity of Cuban pineapple germplasm assessed by AFLP markers. *Crop Breed. Appl. Biotech.* 12:104–110.

ZHAO, G. H.; LI, J.; ZOU, F. C.; MO, X. H.; YUAN, Z. G.; LIN, R. Q.; WENG, Y. B. and ZHU, X. Q. 2009. ISSR, an effective molecular approach for studying genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different provinces in mainland China. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 903–907.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. and LABUDA, D. 1994. Genoma fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

CAPITULO V

ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) Merr HÍBRIDO MD-2

ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE PIÑA *Ananas comosus* (L.) Merr HÍBRIDO MD-2

in vitro ESTABLISHMENT OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) Merr HYBRIDO MD-2

Garcidueñas-Paz, J. A.¹ y Rodríguez-de la O, J. L.²

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la finalidad de establecer un protocolo para el establecimiento *in vitro* de piña híbrido MD-2 *Ananas comosus* (L.) Merr, así como determinar los mejores procesos de desinfección, tamaños y tipos de explantes, concentraciones de reguladores de crecimiento y antioxidantes en la fase de establecimiento. El establecimiento *in vitro* de los explantes resultó la etapa más crítica para la micropropagación de la piña, debido a la alta contaminación que se presentó, ocasionando la pérdida de una gran cantidad de explantes. La contaminación fue principalmente ocasionada por hongos. Este es un problema común en el cultivo *in vitro* de plantas y difícil de eliminar. Los procesos de desinfección implican un compromiso entre explantes libres de contaminación y explantes que conserven la capacidad de crecer y desarrollarse *in vitro*. El mejor proceso de desinfección se obtuvo utilizando Timsen al 100% de 1-3 min, H₂O₂ DE 3-5 min, NaOCl 20 % durante 18 min y bactericida por 10 min disminuyó un 90 % de contaminación. Utilizando la L-cisteína como antioxidante a 140 mg.L⁻¹ disminuyó a un 100 % la oxidación de los explantes. Se utilizaron 31 tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y 2 testigos, únicamente 3 tratamientos promovieron la brotación en porcentajes menores al 20 %, las yemas axilares como fuente de explante tuvieron la mejor respuesta a brotación.

Palabras clave: explantes, reguladores de crecimiento, yema axilar.

ABSTRACT

The present study aimed in order to establish a protocol for the *in vitro* establishment of hybrid MD-2 pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr and determine the best disinfection processes, sizes and types of explants regulator concentrations antioxidants growth and establishment phase. The *in vitro* establishment of explants was the most critical stage for micropropagation of pineapple, due to high pollution arose, causing the loss of a large number of explants. Contamination was mainly caused by fungi. This is a common problem in plant cultivation *in vitro* and difficult to remove. Disinfection processes involve a compromise between uncontaminated explants and explants retain the ability to grow and develop *in vitro*. 31 treatments were used with different concentrations of growth regulators and two witnesses, only 3 treatments promoted sprouting in percentages below 20 %, the axillary buds as explant source had the best response to sprouting.

Key words: explants, growth regulators, axillary bud.

5.1. INTRODUCCIÓN

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr., ($2n = 50$), es una planta perenne herbácea monocotiledónea tropical de la familia Bromeliaceae y es una de las frutas tropicales de mayor importancia comercial que constituyen un producto de exportación importante para algunos países (Duval *et al.*, 2001).

Todas las partes de la planta son útiles. La fruta se utiliza para la industria conservera y en la preparación de jugos, mermelada, jalea y la fruta cristalizada. El alcohol, nitrato de calcio, ácido cítrico y vinagre son otros productos para los que se utiliza el jugo de piña. Las hojas, tallos y frutos de la planta de la piña contienen bromelina que es una mezcla industrialmente importante de enzimas proteolíticas (Liu *et al.*, 2005). Últimamente, ha habido un interés creciente en el uso de fibras celulósicas naturales como el refuerzo de la matriz polimérica. Se ha informado que la fibra de la hoja de piña, es rica en celulosa (Arib *et al.*, 2004).

Sudáfrica, Tailandia, Filipinas, India, México, Costa Rica, Nigeria, Kenia, Indonesia, Brasil, China y Hawái en los EUA. son los principales productores de piña en el mundo (FAO, 2010). En el país la piña alcanza rendimientos de alrededor de 42 Ton/Ha siendo menor que en otros países como Panamá, que supera los 80 Ton/Ha e Indonesia con 69 Ton/Ha (Dussel, 2002; FAO, 2010).

Estos bajos rendimientos son debidos principalmente a la carencia de plantas ya que la tasa de multiplicación es muy baja en forma natural (Gallardo, 1995; Griffith, 1998; Mogollón *et al.*, 2004; Montilla, 1992), el tiempo requerido para la fructificación, a partir de la siembra de propágulos, es cercano a un año (Roostika y Mariska, 2003).

La piña se propaga vegetativamente por coronas, coronas axilares, bulbillos, brotes e hijuelos. Las coronas son el material de plantación preferida en la mayoría de los países productores de piña, ya que tienen el potencial para desarrollar mejores sistemas de raíces. Cada corona puede ser seccionada y plantada aumentará el material de siembra, pero a menudo no es suficiente y hay que buscar vías alternas (Bartholomew *et al.*, 2002; Mhatre, 2007).

La propagación por el método convencional (vegetativo) de las plantas de piña produce un número muy limitado de propágulos, lo cual restringe la disponibilidad de material vegetal para la plantación a gran escala. Además de la limitación del método convencional las plantaciones se encuentran infestadas de una gran variedad de patógenos, además de la falta de material vegetativo con calidad seleccionada, lo cual resulta en un decremento gradual en su vigor, calidad y rendimiento (Blanco *et al.*, 2011; Guzmán, 1988).

De tal manera que uno de los problemas fitosanitarios más importantes en el cultivo de la piña, lo constituyen las enfermedades causadas por insectos, hongos y bacterias que producen marchitamiento, fusariosis y la pudrición de la base del tallo, enfermedades que perjudican el cultivo afectando negativamente la producción comercial del fruto (Blanco, 2011; Coppens *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002; Santos y Matos, 1995). Problemas que se ven favorecidos por la forma tradicional de propagación (coronas, brotes, bulbillos, hijuelos y otros), y por la falta de cuidado en el manejo de material madre, lo cual permite que las enfermedades se transmitan en cada generación (Guzmán, 1988).

El cultivo *in vitro* es una alternativa biotecnológica que permite la propagación masiva de plantas de piña libres de enfermedades y en tiempos relativamente cortos (Blanco, 2011; Gallardo, 1995; Smith 2000). El método de micropropagación ha sido utilizado por diferentes autores, obteniéndose diversos protocolos para el establecimiento de cultivo *in vitro*, los cuales han sido estandarizados para algunas

variedades (Casale y De García, 1987; De García *et al.*, 2008; Mogollón *et al.*, 2004; Saucedo *et al.*, 2008; Sripaoraya *et al.*, 2003). Puesto que todas las plántulas se desarrollaron a partir de un cultivo inicial, la mayoría de ellos debe florecer y consolidados los frutos, se transfieren al campo (Mhatre, 2007).

El éxito con los estudios *in vitro* en la piña se limita a través de micropropagación latente de yemas axilares de coronas (Soneji *et al.*, 2002a) y la inducción de múltiples brotes producidos *in vitro* en la base de la hoja de piña (Soneji *et al.*, 2002b). La preparación de semillas sintéticas es otra opción para la conservación de la piña y la micropropagación (Soneji *et al.*, 2002c). La propagación en biorreactores de inmersión temporal (Espinosa *et al.*, 2002), pretende ser una mejor opción sobre el protocolo de micropropagación existente, ya que reporta un mejor rendimiento de este tipo de plántulas propagadas que por los métodos convencionales.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo establecer la metodología que permita la obtención y propagación de plantas de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD- 2.

5.1.1. Objetivos

Establecer las condiciones que permitan el establecimiento *in vitro* de piña *Ananas comosus* híbrido MD-2.

Evaluar las respuestas de diferentes tamaños de explantes, medios de cultivo, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento para la proliferación de brotes.

5.1.2. Hipótesis

La presencia de una citoquinina en el medio de cultivo promoverá la brotación de las yemas axilares.

Una combinación de auxinas y citoquininas aumentarán la proliferación de brotes.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Desinfección de los explantes

Se utilizaron tallos de coronas y yemas axilares de la corona de piña, estas se deshojaron completamente, quedando el tallo expuesto. El tallo se separó de la parte apical y basal en cuatro regiones; se localizaron las yemas axilares. Ambos se lavaron con agua, detergente y tween-20. Se evaluaron 5 procesos de desinfección.

PD 1: alcohol al 70 % de 1 - 3 min, hipoclorito de sodio (NaOCl) 10 %, 15 min.

PD 2: los explantes se dejaron en agitación 24 h en solución de 2 g por litro de Captan, posteriormente en alcohol 70 % de 1 - 3 min, NaOCl 10 %, 15 min.

PD 3: los explantes se dejaron en agitación 24 h en solución de 2 g por litro de Promyl, posteriormente en alcohol 70 % de 1 - 3 min, NaOCl 10 %, 15 min.

PD 4: alcohol al 70 % durante 40 seg, NaOCl 20 %, 18 min.

PD 5: Timsen al 100% de 1 - 3 min, agua oxigenada de 3 - 5 min, NaOCl 20 % durante 18 min, bactericida por 10 min.

Finalmente, se realizó 3 lavados de los explantes con agua destilada estéril, dentro de una campana de flujo laminar. Cada tratamiento consistió de 25 explantes.

5.2.2 Fase de establecimiento

En la cámara de flujo laminar se disectó y cultivó 24 explantes de tejido medular en disco (1.0 cm de diámetro y 0.2 mm de grosor), 25 yemas axilares (0.3-0.5 cm), por cada tratamiento de desinfección descrito. Los explantes de desinfección se colocaron en los medios de cultivo que contenían las sales MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementadas con reguladores de crecimiento y vitaminas (Cuadro 5.1).

Se evaluaron 3 tipos de antioxidantes para evitar el necrozamiento de los explantes el carbón activado al 0.5 %; L-cisteína a 60, 80, 100, 120, 140 mg.L⁻¹; ácido ascórbico y cítrico 150 y 100 mg.L⁻¹, respectivamente.

Se utilizó 15 ml de medio en tubos de 25 X 150 mm. El medio fue autoclavado por un período de 20 min a una temperatura de 121 °C y una presión de 2 Kg/cm². Una vez inoculados los explantes, los tubos se colocaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h y con una temperatura de 24-26 °C.

A los ocho días se cuantificó: a) el porcentaje de sobrevivencia, b) el porcentaje de explantes oxidantes y c) el número de brotes que produjeron los explantes.

Cuadro 5.1. Tratamientos de los medios de cultivo.

Tratamientos	BA mg.L ⁻¹	ANA mg.L ⁻¹	AIB mg.L ⁻¹	K mg.L ⁻¹	TDZ mg.L ⁻¹	2ip mg.L ⁻¹
Discos del tallo						
Testigo	-	-	-	-	-	-
1*	3.0	-	1.0	-	-	-
2	3.0	-	1.0	-	-	-
3**	-	1.0	-	3.0	-	-
4	-	1.0	-	3.0	-	-
5	0.5	1.0	1.0	-	-	-
6	1.0	2.0	2.0	-	-	-
7	2.0	1.0	1.0	-	-	-
8	-	-	-	-	1.0	-
9	-	-	-	-	-	1.0
10	-	-	-	-	1.0	1.0
11	5.0	1.5	1.5	-	-	-
12	3.0	1.5	1.5	-	-	-
13	1.5	3.0	3.0	-	-	-
14	1.5	1.0	1.0	-	-	-
15	1.0	1.5	1.5	-	-	-
16	0.5	0.5	0.5	-	-	-
17	0.1	0.1	0.1	-	-	-
Yemas						
Testigo	-	-	-	-	-	-
18	5.5	-	-	-	-	-
19	-	9.5	-	-	-	-
20	5.5	9.5	-	-	-	-
21	1.0	-	-	-	-	-
22	1.0	1.0	-	-	-	-
23	-	1.0	-	-	-	-
24	3.0	-	-	-	-	-
25	3.0	3.0	-	-	-	-
26	-	3.0	-	-	-	-
27	5.5	5.5	-	-	-	-
28	-	5.5	-	-	-	-
29	11.0	-	-	-	-	-
30	11.0	11.0	-	-	-	-
31	-	11.0	-	-	-	-

* Suplementado con 5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 5 mg.L⁻¹ de ácido pantoténico, 5 mg.L⁻¹ de ácido fólico y , 5 mg.L⁻¹ de piridoxina y 1 mg.L⁻¹ de tiamina.

** Suplementado con 200 % de nitratos.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El establecimiento *in vitro* de los explantes resultó la etapa más crítica para la micropropagación de la piña, debido a la alta contaminación que se presentó, ocasionando la pérdida de una gran cantidad de explantes. La contaminación fue principalmente ocasionada por hongos. Este es un problema común en el cultivo *in vitro* de plantas y difícil de eliminar.

La menor contaminación se presentó en el proceso de desinfección 2 y 3, estos procesos de desinfección con concentraciones de 2 g por litro de fungicidas permitieron obtener un alto porcentaje de explantes limpios, pero produjeron una inhibición total de la brotación. El porcentaje promedio de contaminación disminuyó al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl). Sin embargo el proceso de desinfección 5 mostró la mayor sobrevivencia de explantes con el uso de 20 % de NaOCl y 18 min de inmersión (Figura 5.1).

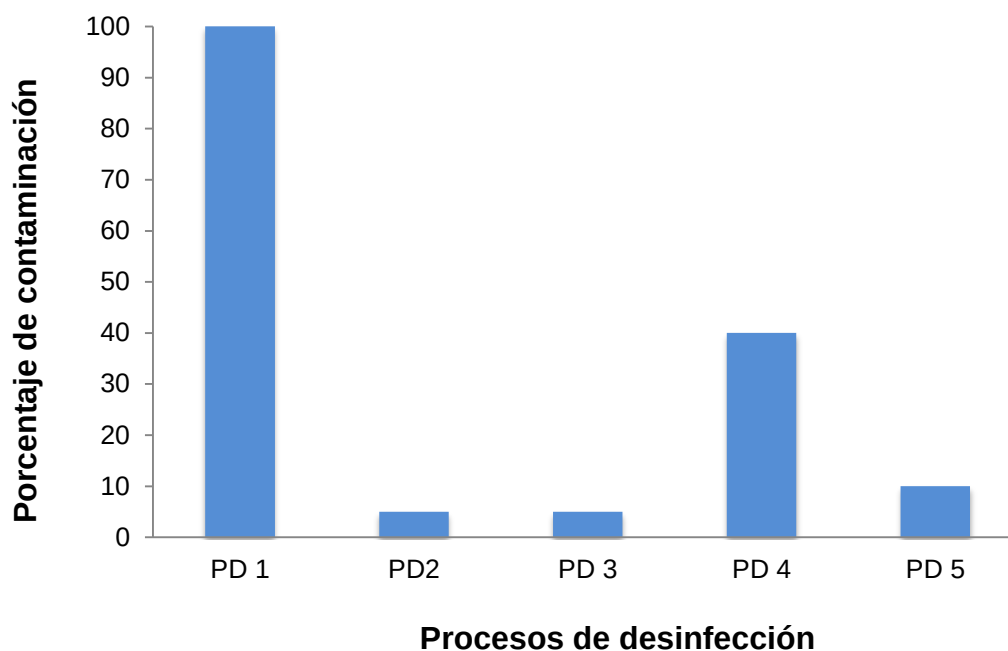
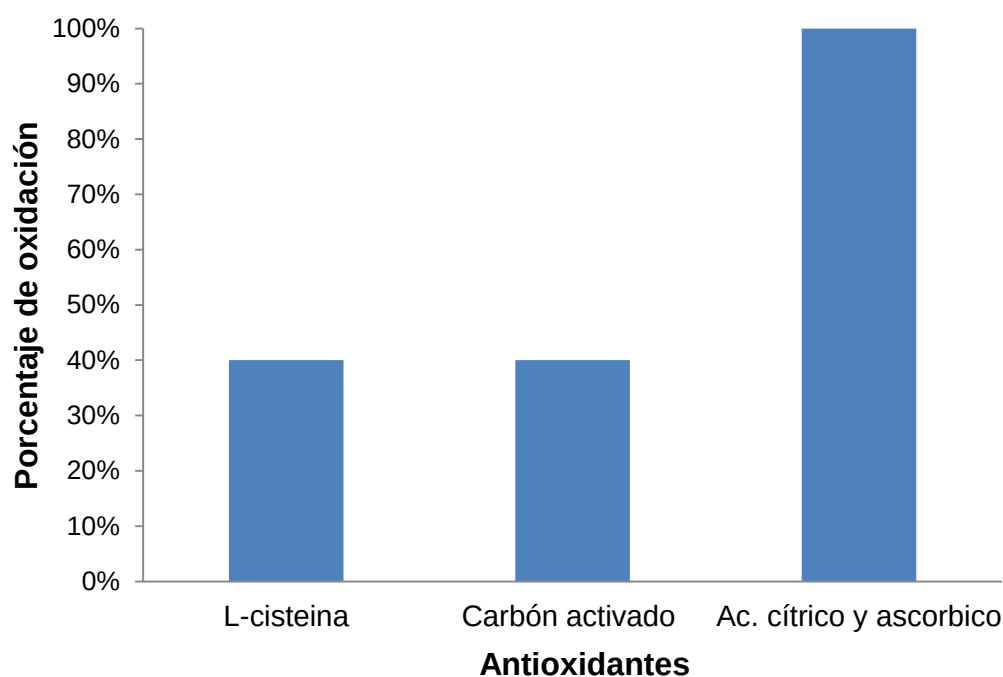


Figura 5.1. Efecto de los procesos de desinfección sobre la contaminación.

Los procesos de desinfección implican un compromiso entre explantes libres de contaminación y explantes que conserven la capacidad de crecer y desarrollarse *in vitro*. Los explantes soportaron concentraciones de NaOCl de hasta un 20 %, concentraciones mayores a lo obtenido por Garita y Gómez (2000), sin que se afectara su desarrollo *in vitro*.

En general, la oxidación presentada en los explantes fue alta, para minimizar los efectos se probaron tres antioxidantes con concentraciones diferentes, la combinación del ácido cítrico y ascórbico mostró el porcentaje promedio de oxidación más alto, la L-cisteína y el carbón activado disminuyeron un 60 % la oxidación en los explantes (Figura 5.2.).



5.2. Efecto de los antioxidantes sobre los explantes de piña.

Aunque la L-cisteína y el carbón activado fueron los mejores antioxidantes que disminuyeron el proceso de oxidación. Sin embargo, se evaluaron diferentes concentraciones de la L-cisteína de 60 – 140 mg.L⁻¹ para contrarrestar los efectos de la oxidación.

El porcentaje promedio de oxidación disminuyó al aumentar la concentración de L-cisteína. La concentración de 140 mg.L⁻¹ presentó la menor oxidación en promedio en los dos tipos de explantes de piña (Figura 5.3). En trabajos realizados para la micropropagación de piña realizados por Blanco *et al.* (2011); Garita y Gómez (2000); Mogollón *et al.* (2004); Romero y Escobedo (2003); Saucedo *et al.* (2008); no mencionaron utilizar ningún tipo de antioxidante para controlar la oxidación. En la Figura 5.4 se muestra el proceso de desinfección y el establecimiento *in vitro* de piña en el medio sólido.

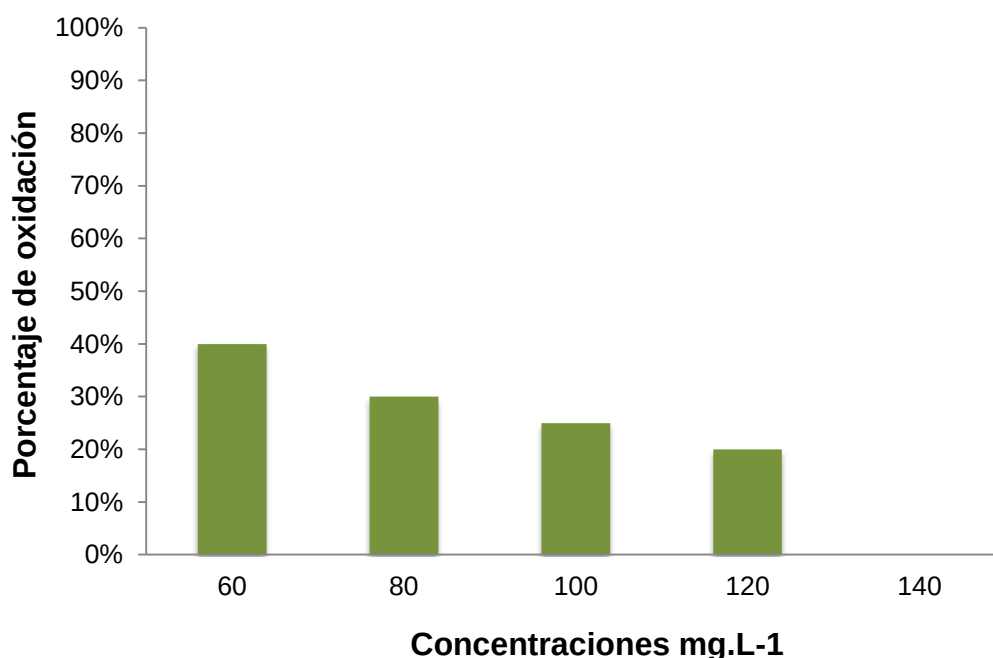


Figura 5.3. Diferentes niveles de L-cisteína para evitar la oxidación.

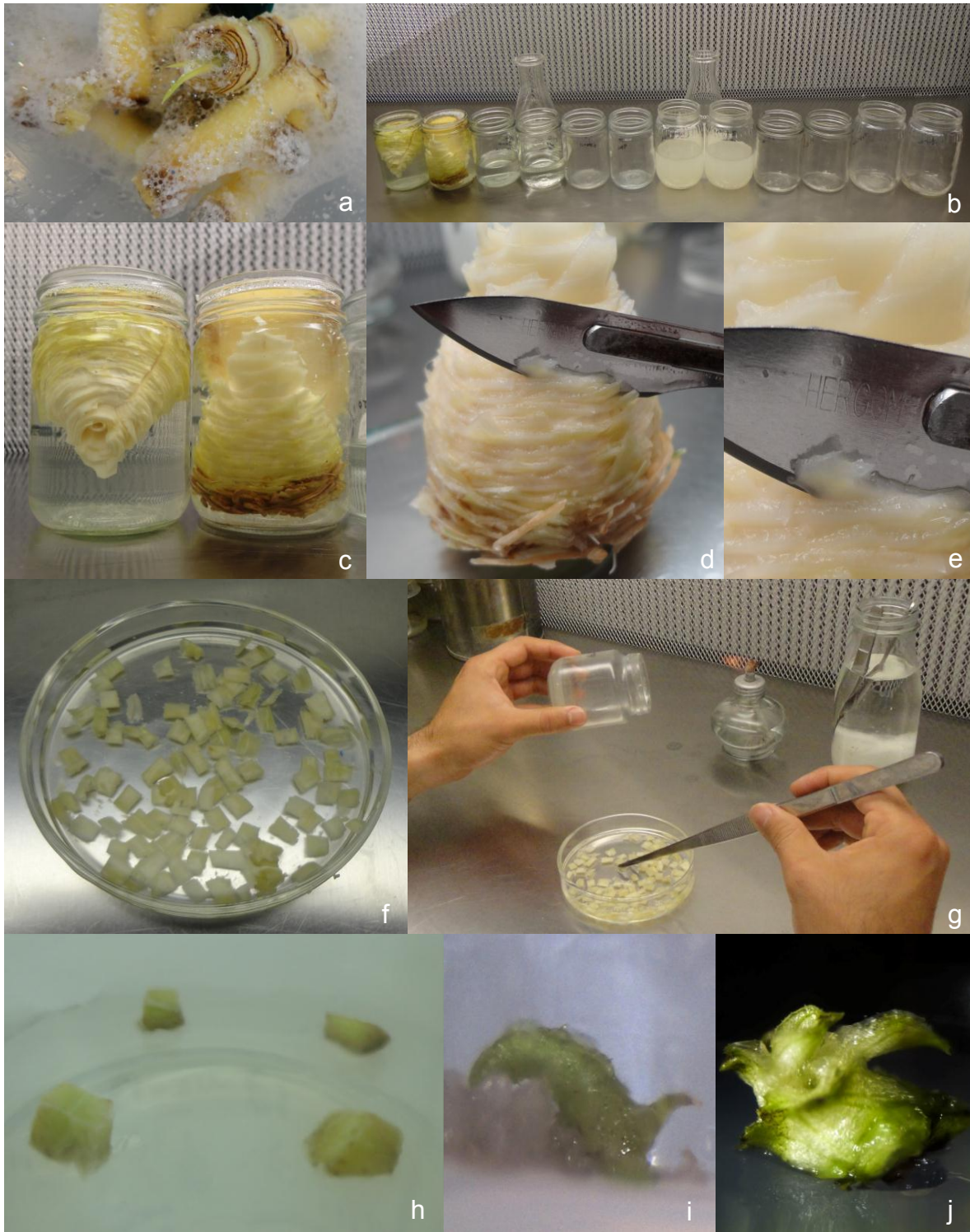


Figura 5.4. Establecimiento *in vitro* de piña. a) lavado de cormos, b) proceso de desinfección, c) desinfección de cormos, d) localización de yemas axilares, e) cortes de yemas, f) yemas axilares, g) siembra de yemas axilares, h) explantes en medio sólido, i) primer brote a los ocho días, j) brotación de yemas axilares latentes a 30 días.

En el Cuadro 5.2 se presentan los tratamientos utilizados para la fase de establecimiento y los dos tipos de explantes utilizados. El menor porcentaje de oxidación y contaminación, y el mayor porcentaje se presentaron al utilizar los discos de tallo, sin embargo, este tipo de explante no promovió la brotación. Las yemas axilares fueron el segundo tipo de explante utilizado, no obstante la contaminación causada por hongos fue un factor que provocó un porcentaje promedio de sobrevivencia del 81 % mayor a lo obtenido por Garita y Gómez (2000). La oxidación se presentó en un porcentaje del 6.13 % valor menor a lo reportado por Garita y Gómez (2000) quienes obtuvieron una mayor contaminación; no obstante Saucedo *et al.*, (2008) obtuvieron porcentajes de contaminación de 1.72 %.

Las yemas axilares como fuente provocaron mayores porcentajes de contaminación a diferencia de los discos del tallo, Garita y Gómez (2000) también reportaron una alta contaminación al utilizar yemas en comparación con los ápices que mostraron menor contaminación. Esto indica que el material proveniente de campo debe desinfectarse antes de introducirlo a condiciones asépticas. Por esta razón se recomienda introducir el material al invernadero y tratarlo en un período prudente con fungicidas para bajar la incidencia de patógenos endógenos.

El crecimiento de plantas donadoras de explantes en condiciones controladas ha probado ser efectivo en la reducción de la contaminación *in vitro*, particularmente si dicho acondicionamiento incluye el manejo del agua y la aplicación de antibióticos y fungicidas (Reed *et al.*, 1998).

Los concentraciones que promovieron mayor número de brotes a partir de las yemas axilares fueron el T22 que contenía 1 mg.L⁻¹ de BA y 1 mg.L⁻¹ de ANA que promovió un 20 %, seguido por T22 1 mg.L⁻¹ de BA se obtuvo un 12 % y finalmente el porcentaje más bajo se obtuvo con el T23 que contenía 1 mg.L⁻¹ de ANA. Para la comparación de las medias se empleó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 95 %. El tratamiento más significativo fue el T22.

La concentración de BA es la misma reportada por Blanco *et al.* (2011); Romero y Escobedo (2002) y Saucedo *et al.* (2008); para la obtención de brotes a las cuatro semanas, mientras que el ANA lo utilizaron a la mitad y al doble de la concentración.

Los resultados obtenidos fueron muy bajos a los obtenidos por Blanco *et al.* (2011) que obtuvieron de 6.83, 9.18 y 7.13 número de brotes / explantes en tres variedades nativas de la región amazónica con concentraciones de 1.0 mg.L⁻¹ de BA y tres concentraciones de ANA a 0.5, 2.0 y 0.01 mg.L⁻¹ respectivamente. Romero y Escobedo (2002) reportaron que en las variedades MD-2 y Champaka se obtuvieron 4 y 4.3 brotes / explantes respectivamente, utilizando en los tratamientos 1 mg.L⁻¹ de BA sin ANA. Saucedo *et al.*, (2008) reportaron 9.75 y 8.67 número de brotes / explantes en las variedades Champaka y Hawaiana respectivamente con concentraciones 3.5 y 4.0 mg.L⁻¹ de BA.

Daquinta (1998) menciona que la aplicación de auxina al medio incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina – auxina provoca la estimulación de la brotación. Blanco *et al.* (2011), Casale y García (1987), García *et al.* (2008), Garita y Gómez (2000), Saucedo (2008) y Sepúlveda (2008) también mencionan la importancia de la presencia de auxina – citocinina en el medio de cultivo, en concentraciones dependientes de la concentración endógena de dichas sustancias en el explante, para poder lograr la supresión de latencia de yemas axilares en plantas adultas de diferentes variedades de piña cultivadas *in vitro*, utilizando principalmente BA y ANA como reguladores de crecimiento. Casale y García (1987) sugieren utilizar sulfato de adenina (SA) para estimular el rompimiento de la latencia en yemas axilares de piña. Sin embargo la relación auxina – citocinina y el tipo de regulador de crecimiento pueden variar según el genotipo (variedad de piña) (Garita y Gómez, 2000; Hosoki y Asahira, 1980; Mathews y Rao, 1982).

Cuadro 5.2. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre la contaminación, la sobrevivencia, la oxidación y la brotación para 2 diferentes explantes de piña híbrido MD-2.

Explante	Tratamiento	Oxidación (%)	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)	Brotación (%)
Discos	Testigo	-	-	100	-
	1	-	-	100	-
	2	4	-	100	-
	3	-	-	100	-
	4	-	-	100	-
	5	-	4	96	-
	6	-	-	100	-
	7	-	-	100	-
	8	-	-	100	-
	9	4	-	96	-
	10	-	-	100	-
	11	-	4	100	-
	12	-	-	100	-
	13	-	-	100	-
	14	-	-	100	-
	15	-	4	96	-
	16	-	-	100	-
	17	-	-	100	-
	Promedio	0.44	0.66	99.33	-
Yemas	Testigo	8	12	80	-
	18	4	16	80	-
	19	4	8	88	-
	20	8	16	76	-
	21	12	8	80	12
	22	4	12	84	20
	23	8	8	84	8
	24	4	12	84	-
	25	4	20	76	-
	26	4	16	80	-
	27	8	4	88	-
	28	12	8	80	-
	29	4	12	84	-
	30	4	16	80	-
	31	4	12	84	-
	Promedio	6.13	12	81.86	2.67

5.4. CONCLUSIONES

En la fase de establecimiento el mejor proceso de desinfección fue el lavado de los explantes con detergente más Tween-20, seguido del Timsen al 100 % de 1 - 3 min, agua oxigenada de 3 - 5 min, NaOCl 20 % durante 18 min y el bactericida por 10 min disminuyó el 90 % de la contaminación, obteniéndose un buen porcentaje de sobrevivencia.

La L-cisteína a una concentración de 140 mg.L^{-1} redujo en un 100 % la oxidación de los explantes. El mejor medio de cultivo para esta fase de establecimiento fue el MS suplementado con 1.0 mg.L^{-1} de BA y 1.0 mg.L^{-1} de ANA que promovió el 20 % de brotación.

Las yemas axilares como fuente de explante tuvieron la mejor respuesta a brotación. La ruptura de la latencia en las yemas en los explantes de la variedad estudiada constituyó un obstáculo para el establecimiento del cultivo, la supresión de la latencia se obtuvo a los ocho días de cultivo en explantes. Los resultados sugieren que es indispensable la presencia de una auxina y citocinina en la misma proporción.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

ARIB, R.M.N., SAPUAN, S.M., AHMAD, M.M.H.M., PARIDAH, M.T. and KHAIRUL ZAMAN, H.M.D. 2004. Mechanical properties of pineapple leaf fibre reinforced polypropylene composites. *Mater. & Des.* 43:169-183.

BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E. and ROHRBACH, K. G. 2002. *The Pineapple: botany, production and uses.* University of Hawaii at Manoa. CABI Publishing. Honolulu. USA. 301pp.

BLANCO, F. H. A.; VARGAS, T. E. y GARCÍA, E. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. *Interciencia* 36(6):437-443.

CASALE, I. y DE GARCÍA, E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *ACEV- IV* 2: 3-18.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. and DUVAL, M.F. 1997. Germplasm resources of pineapple. *Horticultural Reviews* 21:133-175.

DAQUINTA, M. 1998. Propagación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Avila, Cuba. 99 p.

DUSSEL, P. E. 2002. Condiciones y propuestas de política para los clusters del limón mexicano en Colima y la piña en Veracruz. Editorial Plaza y Valdés. México. 270 pp.

DUVAL, M. F.; NOYER, J. L.; PERRIER, X.; EECKEN- DRUGGE, C.; HAMON, P. 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102(1):83-90.

ESPINOSA, P., LORENZO, J.C., IGLESIAS, A., YABOR, L., MENENDEZ, E., BORROTO, J., HERNANDEZ, L. and ARENCIBIA, A.D. 2002. Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. *Plant Cell* 21:136–140.

FAO. 2010. Base de datos estadísticos de la FAO. [http://www. Faostat.org.mx](http://www.Faostat.org.mx)

GALLARDO, M. 1995. Biotecnología aplicada al cultivo de la piña. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 pp.

GARCÍA, E.; GARAY, A.; VARGAS, T. E.; BLANCO, H. 2008. Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). Mem. Inst. Biol. Exper. (UCV) 5:181-184.

GARITA, H. y GÓMEZ L. 2000. Micropropagación de la variedad de piña Champaka F-153. Agronomía Costarricense 24(1):63-73.

GRIFFITH, L.P. 1998. Tropical Foliage Plants. A Grower's Guide. Ball Publishing Batavia, Illinois. USA. 318pp.

GUZMAN, N. M. A. 1988. Obtención de plantas de piña (*Ananas comosus*, (L.) Merr) por cultivo *in vitro* a partir de yemas axilares de la corona. Tesis de Ingeniero Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México. 59pp.

HOSOKI, T.; ASAHRA, T. 1980. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. HortScience 15(5):603-604.

LIU, W., MISRA, M., ASKELAND, P., DRZAL, L.T. and MOHANTY, A. K. 2005. Green composites from soy based plastic and pineapple leaf fiber: fabrication and properties evaluation. Polymer 46:2710-2721.

MATHEWS, V.; RAO, P. 1982. In vitro plant regeneration in lateral bud explants of *Cryptanthus bromelioides* Var. Tricolor M. B. Foster. Plant Cell Reports 1:108-110.

MHATRE, M. 2007. Micropropagation of pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Editors: Mohan J. S. and Häggman H. Ed. Springer. 559 pp.

MOGOLLÓN, N.; DÍAZ, J. G. y HERNÁNDEZ, N. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. Queen y Australia. Revista Facultad de Agronomía 21(Supl. 1):15-21.

MONTILLA DE BRAVO, I. 1992. El cultivo de la piña en la Región Occidental. En: Tirado, M. (Ed.). Curso sobre Fruticultura Tropical. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Estación Experimental Monagas. Maturín. 184 pp.

RODRÍGUEZ, Y.; MOSQUEDA, M.; COMPANIONI, B.; ARZOLA, M.; BORRAS, O.; PÉREZ, M.C.; LORENZO, J.C.; SANTOS, R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of cultivar pineapples resistance levels to Heart Rot disease. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 38: 613-616.

ROMERO, R. B. y ESCOBEDO, B. L. 2003. Micropropagación y formación de callo de dos cultivares de piña Champaka y MD-2. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 25-31Pp.

ROOSTIKA, I. and MARISKA, I. 2003. *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. *Bul. AgroBio* 6:34-40.

SANTOS, J.R. and MATOS, A. P. 1995. Pineapple breeding for resistance to Fusariosis in Brazil. *Rev. Fac. Agron.* 21:137-145.

SAUCEDO, A. S. G.; RAMOS G. L. E.; VARAS, G. E. y CARMIGNIANI, C. F. 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* 1:49-54.

SEPÚLVEDA, N.; MURILLO, M. V.; PALACIOS, A.; MURILLO, W. and MEDINA, M. A. 2008. Micro propagación clonal y enraizamiento ex vitro de *Ananas comosus* L. "pina Castilla del Choco". *Inv. Bio- div. Des.* 27: 144-147.

SMITH, R. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. Academic Press. San Diego. USA. 231pp.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S. and MHATRE, M. 2002a. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillarybuds of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 77, 28–32.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S. and MHATRE, M. 2002b. *In vitro* regeneration from leaf explants of pineapple (*Ananas comosus*) *J. Plant Biochem. Biot.* 11:117-119.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S. and MHATRE, M. 2002c. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). Plant Cell Rep. 20, 891–894.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 39:450-454.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Los caracteres cualitativos permitieron la mejor agrupación de los individuos en las dos poblaciones, la población con individuos mutantes presentó la mayor variabilidad fenotípica.

El análisis de la población de individuos normales mediante caracteres cuantitativos diferenció ocho grupos a un coeficiente de 0.16. Las variables que presentaron mayor variación fueron el espesor medio de la hoja más larga, longitud de las espinas, el número de brácteas del pedúnculo, el número de ojos de la espiral más larga y el peso de la fruta.

El análisis de la población de individuos mutantes a través de los caracteres cuantitativos estableció cinco grupos a un coeficiente de 0.38. Las variables que presentaron los coeficientes más altos fueron el número de coronas, el número de hojas de la corona, la longitud de la corona, el peso de la corona y la fruta.

El peso de la fruta fue la variable que presentó la mayor variación en ambas poblaciones, sin embargo las variables del tono de hoja, la luminosidad de la hoja y el tono de la fruta en la madurez presentaron los coeficientes de variación más bajos. La caracterización morfológica estableció a los 40 individuos en las siguientes siete categorías: I) Frutos grandes con la corona múltiple, II) Frutos grandes con la corona grande, III) Frutos pequeños con la corona en forma cónica, IV) Frutos pequeños con la corona en forma cónica y presencia de fisura, V) Frutos con la corona en forma de roseta, VI) Frutos con la corona en forma cilíndrica, VII) Frutos espinosos con la corona en forma cilíndrica.

Los análisis por ISSR y RAPD permitieron detectar una alta variabilidad genética entre los materiales de piña evaluados, sobre todo en los pertenecientes a los individuos mutantes. Las diferencias moleculares encontradas con respecto a las características morfológicas, se atribuyen a la heterocigosis de la especie, al número reducido de repeticiones por individuo y en menor grado a la tasa de mutación, variaciones somaclonales, manejo agronómico y los efectos ambientales que influyen sobre esta variabilidad. Tanto los ISSR como los RAPD permitieron detectar polimorfismos en los materiales de piña, sobre todo con los RAPD.

El establecimiento *in vitro* de los explantes resultó la etapa más crítica para la micropropagación de la piña, debido a la alta contaminación que se presentó, ocasionando la pérdida de una gran cantidad de explantes. La contaminación fue principalmente ocasionada por hongos. Este es un problema común en el cultivo *in vitro* de plantas y difícil de eliminar.

En la fase de establecimiento el mejor proceso de desinfección fue el lavado de los explantes con detergente más Tween-20, seguido del Timsen al 100 % de 1 - 3 min, agua oxigenada de 3 - 5 min, NaOCl 20 % durante 18 min y el bactericida por 10 min disminuyó el 90 % de la contaminación, obteniéndose un buen porcentaje de sobrevivencia. La L-cisteína a una concentración de 140 mg.L^{-1} redujo en un 100 % la oxidación de los explantes. El mejor medio de cultivo para esta fase de establecimiento fue el MS suplementado con 1.0 mg.L^{-1} de BA y 1.0 mg.L^{-1} de ANA que promovió el 20 % de brotación.

Las yemas axilares como fuente de explante tuvieron la mejor respuesta a brotación. La ruptura de la latencia en las yemas en los explantes de la variedad estudiada constituyó un obstáculo para el establecimiento del cultivo, la supresión de la latencia se obtuvo a los ocho días de cultivo en explantes. Los resultados sugieren que es indispensable la presencia de una auxina y citocinina en la misma proporción.

7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

ADUGNA, W.; LABUSCHAGNE, M. T. and VILJOEN, C. D. 2006. The use of morphological and AFLP markers in diversity analysis of linseed. *Biodiversity and Conservation* 15:3193-3205.

AGAWAL, M.; SHRIVASTAVA, N. and PADH, H. 2008. Advances in molecular marker technique and their application in plant science. *Plant Cell* 27:617-631.

ALARCÓN, C. N. 2009. Caracterización morfológica y molecular de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) del estado de Guerrero, México. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. 112p.

ÁLVAREZ, G. M. 2011. La selección asistida por marcadores (MAS, «Marker-Assisted Selection») en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales* 32(3):46-58.

ANU, A.; BABU, K. N.; PETER, K.V. 2004. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 261-267.

ARNOLD, C.; ROSETTO, M.; MCNALLY, J. and HENRY, R. J. 2002. The applications of ISSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. *Am. J. Bot.* 89:22-28.

ASERCA. 2000. La piña un sabor reconocido en el mundo. *Revista Claridades Agropecuarias* 86:44.

AUREOLES, R. F. 2006. Micropropagación y caracterización molecular de “maguey bruto” (*Agave inaequidens* Koch). Tesis doctoral. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. 79pp.

BARRITA, R. M. y **PACHECO**, P. J. A. 2010. Etanol a partir de desechos lignocelulósicos del cultivo de piña [*Ananas comosus* (L.) Merr] con dos microorganismos (*Sacharomyces cerevisiae* y *Zymomona mobilis*). Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Estado de México. México. 73pp.

BAKER, A. J. 2000. Molecular Methods in Ecology. Blackwell Science Ltd. Oxford. U. K.

BARTHOLOMEW, D. P.; **PAULL**, R. E. and **ROHRBACH**, K. G. 2002. The Pineapple: botany, production and uses. University of Hawaii at Manoa. CABI Publishing. Honolulu. USA. 301pp.

BLANCO, F. H. A.; **VARGAS**, T. E. y **GARCÍA**, E. 2011. Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. *Interciencia* 36(6):437-443.

BOLÍVAR, Z. F. G. 2007. Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna. Segunda Edición. El Colegio Nacional. 718p.

BORÉM, A. y **CAIXETA**, E. T. 2009. Marcadores moleculares. Ed. Folha de Vicosá, eds. A. Borém y E. T. Caixeta. 532p.

BORNET, B. and **BRANCHARD**, M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.

BOSTEIN, D.; **WHITE**, R. L.; **SKOLNICK**, M. and **DAVIS**, R. W. 1980, Construction of linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Human Genet.* 32:314-331.

BRAR, S. M. and **BRAR**, D. S. 1998. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. *In* Jain, SM; Brar, DS. eds. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, Kluwer. Pp:15-37.

BUEREN, E.; BACKER, G.; VRIEND, H. and OSTERGARD H. 2010. The role of molecular markers and marker assisted selection in breeding for organic agriculture. *Euphytica* 175(1):51-64.

CARLIER, J. D.; REIS, A.; DUVAL, M. F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. and LEITAO, J. M. 2004. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. *Plant Breeding* 123:186-192.

CASALE, I. y DE GARCÍA, E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *ACEV- IV* 2: 3-18.

CASTILLO, A. 2001. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) Las Brujas, Argentina. Consultada en: 2010-04-19.

Disponible en:

http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf

CHAO, M.; SHENG-YUAN, X.; ZHEN-GUO L.; WEI, W. and LI-JUN, D. 2007. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1165:39-44.

CISNEROS, A.; BENEGA, R.; BORRAS, O.; MARTÍNEZ, J.; ARZOLA, M. ARIAS; E., HIDALGO, M. and ISIDRÓN, M. 1998. Mutation induction in pineapple using Co Gamma rays. In: *Abstracts of the Third International Pineapple Symposium, 17-20 November 1998*. Department of Agriculture, Pattaya, Thailand. 53pp.

CLAROS, D. y M. G. 1998. Marcadores moleculares: que son, como se obtienen, y para que valen. *Encuentros en la Biología* 49. Universidad de Malaga. Consultado en: 2011-11-20. Disponible en:

<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

COLLINS, J. L. 1951. Antiquity of the pineapple in America. *Southwestern J. Anthropol.* 7:145-155.

COLLINS, J.L. 1951. Notes on the origin, history, and genetic nature of the Cayenne pineapple. *Pacific Science* 5(1):3-17.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; DUVAL, M.F. and VAN MIEGROET, F. 1993. Fertility and self in compatibility in the genus *Ananas*. *Acta Horticulturae* 334: 45-51.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. and DUVAL, M.F. 1997. Germplasm resources of pineapple. *Horticultural Reviews* 21:133-175.

DAQUINTA, M. A.; CISNEROS, A.; RODRÍGUEZ, Y.; ESCALONA, M.; PEREZ M. C.; LUNA, I. y BORROTO, C. G. 2002. Somatic embryogenesis in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Acta Horticulturae* 425.

DE ALMEIDA, W. A. B.; DE MATOS, A. P. y DA SOUSA A. 2002. Effects of Benzylaminopurina (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr.) *Acta Horticulturae* 425.

DE GARCÍA, E.; GARAY, A.; VARGAS, T.E.; BLANCO, H. 2008. Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). *Mem. Inst. Biol. Exper. (UCV)* 5:181-184.

DE REZENDE, A.; BORTOLOTTI, A. y PASQUAL, M. 2000. Aclimatacao de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) obtenidas *in vitro*: efeitos do substrato. *Cien. Agrotec. Lavras.* (241):9-12.

DUSSEL, P. E. 2002. Condiciones y propuestas de política para los clusters del limón mexicano en Colima y la piña en Veracruz. Editorial Plaza y Valdés. México. 270 pp.

DUVAL, M. F.; NOYER, J. L.; PERRIER, X.; EECKEN- DRUGGE, C.; HAMON, P. 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102(1):83-90.

ESTOPÀ, M. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista Extra* 2005. Consultado en 2010-04-19. Disponible en: http://www.horticom.com/revistasonline/extra05/M_Estopa.pdf

FAO. 2010. Base de datos estadísticos de la FAO. [http://www. faostat.org.mx](http://www.faostat.org.mx)

FAROOQ, S; AND AZAM, F. 2002. Molecular markers in plant breeding–1: concepts and characterization. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(10): 1135-1140.

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(3):221-227.

GALLARDO, M. 1995. Biotecnología aplicada al cultivo de la piña. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA). 6 pp.

GARCÍA, S. M. D. y SERRANO, H. 2005. La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. *Contactos* 56:55-61.

GARITA, H. y GÓMEZ L. 2000. Micropropagación de la variedad de piña Champaka F-153. *Agronomía Costarricense* 24(1):63-73.

GEORGE, E. D.; HALL, M. A. y DE KLERK G. J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Third edition. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 501pp.

GIBAULT, G. 1912. *Histoire des légumes*. Librairie Horticole, Paris.

GÓMEZ, U. V. L. 2007. Obtención de bromelina a partir de los tallos, corazón y fruto de la piña (*Ananas comosus* L.). Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Estado de México. México. 68pp.

GONZÁLEZ, E., A.; CEDILLO, P. E.; DÍAZ, G. L. 2007. Morfología y anatomía de las plantas con flores. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. 276pp.

GOYTIA, J. M. A.; MORA, R. B.; MOZQUEDA, B. R.; URIZA, A. D.; REBOLLEDO, M. L. 2005. Extracción de fibra textil a partir de la hoja de piña. Universidad Autónoma Chapingo. 19pp.

GRIFFITH, L.P. 1998. Tropical Foliage Plants. A Grower's Guide. Ball Publishing Batavia, Illinois. USA. 318pp.

GUILLEMIN, J. P.; GIANINAZZI, S. y GIANINAZZI- PEARSON, V. 2002. Endomicorrhiza Biotechnology and micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). Acta Horticulturae 425.

GUZMAN, N. M. A. 1988. Obtención de plantas de piña (*Ananas comosus*, (L.) Merr) por cultivo *in vitro* a partir de yemas axilares de la corona. Tesis de Ingeniero Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México. 59pp.

HERNÁNDEZ, O. M. 2008. Elaboración y caracterización de papel artesanal de la corona del fruto de dos variedades de piña *Ananas comosus* (L.) Merr. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. División de Ciencias Forestales. México. 25-30pp.

HIDAYATA, T.; ABDULLAHA, I. F.; KUPPUSAMYA, C.; SAMADA, A. A. and WAGIRAN, A. 2012. Molecular Identification of Malaysian Pineapple Cultivar based on Internal Transcribed Spacer Region. APCBEE Procedia 4:146-151.

IBPGR, (International Board for Plant Genetic Resources). 1990. Descriptors for the pineapple. Italy. 58pp.

JAIN, S. M. 2001. Tissue culture derived variation in crop improvement. Euphytica 118:153-166.

JIMÉNEZ, D. J. A. 2000. Tecnología para la producción de piña en el trópico. Instituto del Trópico Húmedo de Tabasco. México. 126p.

JONAH, P.M; Bello, L. L.; Lucky, O.; Midau, A. and Moruppa, S. M. 2011. Review: The Importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes. Global Journal of Science Frontier Research 11(5):5-12.

JOSHI, S.P.; PRABHAKAR K.; RANJEKAR, P.K. and GUPTA, V.S. 2011. Molecular markers in plant genome analysis. [http://www.ias.ac.in/currsci/jul25/articles 15. htm](http://www.ias.ac.in/currsci/jul25/articles%2015.htm). Pp 1-19.

KAEPPLE, S. M.; **KAEPPLE**, H. F. and **RHEE**, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179-188.

KARAM, L.; **DUTRA**, J.; **DIAS**, D. y **BENEVENGA**, M. 2007. *Micropropagacao* de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.): Efeito de benzilaminopurina na multiplicacao. *Cien. Agrotec. Lavras* 31(5):1380-1385.

KARP, A.; **KRESOVICH**, S.; **BHAT**, K. V.; **AYAD**, W. G. y **HODGWING**, T. 1997. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: Opportunities and Challenges. *Nature Biotechnology* 15:625-628.

KATO, C.Y.; **NAGAI**, C.; **MOORE**, P.H.; **ZEE**, F.; **KIM**, M.S.; **STEIGER**, D.L.; **MING**, R. 2005. Intraspecific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51(8):815- 825.

KERNS, K.R., **COLLINS**, J.L. and **KIM**, H. 1936. Developmental studies of the pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. *The New Phytologist* 35:305-317.

KRAUSS, B.H. 1948. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. I. Introduction, organography, the stem and the lateral branch or axillary buds. *Botanical Gazette* 110:159-217.

KUBIS, S. E.; **CASTILHO**, A. M. M. F.; **VERSHININ**, A. V. and **HESLOP-HARRISON**, J. S. 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 52:69-79.

LARKIN, P.J. and **SCROWCROFT**, W. R. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214.

LAUFER, B. 1929. The American plant migrations. *Science Monthly* 28:239-251.

LEAL, F.J. and **COPPENS D'EECKENBRUGGE**, G. 1996. Pineapple. In: J. Janick and J.N. Moore. (Eds.). *Fruit Breeding. Vol. I. Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons. New York. USA. Pp:565-606.

LEDIG, F. T. 2004. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. *In*: VARGAS H.; BERMEJO V., J. B. y LEDIG, F. T. (eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. 2-18.

LOYOLA, V. V. M. y VAZQUEZ, F. F. 2006. Plant Cell Culture Protocols. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán. Segunda Edición. México. 411pp.

LUTHER, H.E. 2004. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. 9th ed. The Bromeliad Society International. Inc.: Orlando. FL. USA.

LV, L.;DUAN, J.;XIE, J.;WEI, C.;LIU, Y.;LIU, S. and SUN, G. 2012. Isolation and characterization of a flowering locus T homolog from pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Gene*:505:368-373.

MAGALLANES-CEDEÑO, M. E. 2004. Aplicación de la tecnología del Cultivo *In vitro* en la Propagación de Especies Forestales. *In*: VARGAS, H.; BERMEJOV, J. B. y LEDIG, F. T. (eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. Segunda Edición. Colegio de Posgraduados, Montecillos, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan Jalisco.

MENDOZA, H.A. y SIMPSON, J. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. XV Aniversario de la Unidad Irapuato. Avances y Perspectivas 16:53-57.

MOGOLLÓN, N.; DÍAZ, J. G. y HERNÁNDEZ, N. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. Queen y Australia. *Revista Facultad de Agronomía* 21(Supl. 1):15-21.

MOHLER, V. and SCHWARZ, G. 2005. Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphisms to Single Nucleotide Polymorphisms. *In*: LÖRZ, H. y WENZEL, G. (eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 55 Molecular Marker Systems. Springer. Berlín, Alemania. 478pp.

MONTILLA DE BRAVO, I. 1992. El cultivo de la piña en la Región Occidental. En: Tirado, M. (Ed.). Curso sobre Fruticultura Tropical. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Estación Experimental Monagas. Maturín. 184pp.

MORRISON, S. E. 1963. Journals and Other Documents of the Life and Voyages of Christopher Columbus. Heritage Press, New York. USA.

MUJIB, A. 2004. *In vitro* variability in tissue culture: a fresh look. In Mujib, A.; Myeong-je, C.; Predieri, S.; Banerjee, S. eds. *In vitro* application in crop improvement. Enfield. EUA. Science Publishers. Pp. 261-271

NAVARRO, W. and PEREA, M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. EUNA, Heredia, CR. 105pp.

NEWSPINEAPPLE. 2007. Issue No. 14 Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science. 38pp.

NIETO, R., J. E.; RAMOS, G. L. y MOTTE D., EMMERIK. 2005. Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. Foresta Veracruzana 7(002):1-6.

NORO, Y; TAKANO-SHIMIZU, T; SYONO, S.; KISHIMA, Y. and SANO, Y. 2007. Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the *EPSPs-RPS2* region. Theoretical and Applied Genetics 114:705-711.

NUEZ, F.; CARRILLO, J. M. y DE RON, A. M. 2000. Problemas básicos de la mejora vegetal. En: F y Carrillo, J. M. (eds.), Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. 579pp.

NUNEZ, H.; CANTLIFFE, D.; KLEE, H.; OCHOA, N.; RAMÍREZ, R. y PÉREZ, E. 2006. Methods in Plant Tissue Culture. In: SHETTY, K.; PALIYATH, G.; POMETTO, A. y LEVIN, R. E. (eds.). Food Biotechnology. Taylor & Francis Group. New York, USA. 650pp.

OKIMOTO, M.C. 1948. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. *Botanical Gazette* 110:217-231.

SAKAI, W.S. and SANFORD, W.G. 1980. Ultrastructure of the wáter absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). Annals of Botany 46:7-11.

OLMOS, S.; LUCIANI, G. y GALDEANO, E. 2010. Parte V, Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. *In*: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBISTEIN, C.; HOPP, E. y MROGINSKI, L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Buenos Aires, Argentina. 643pp.

ORONA, C. F.; PECINA, Q. V.; ROCHA, P. A.; CADENA, H. M. A.; MARTÍNEZ, V. O. O.; ALMEYDA L. I. H. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa. *Agric. Téc. Méx.* 2:171-180.

PAZ DA SILVA, R; VILLEGAS, A. 2009. Niveles de sacarosa en el enraizamiento *in vitro* y aclimatación *in vivo* de plántulas del portainjerto de vid R110. *Interciencia* 34(12):897-902.

PÁEZ, M.G. 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas* spp. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 42:128-132.

PARAN I. and MICHELMORE, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985–993.

PÉREZ, E. 2009. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185pp.

PERROTET, S. 1825. Catalogue raisonné des plantes introduites dans les colonies francaises de Mascareigne et de Cayuene, et de celles rapports'ees vivantes des mers d'Asie et de la Guyane, au Jardin des Plantes de Paris. *Memoires Society Linneas* 3(3):89–151.

PIERIK, R. 1998. *In vitro* culture of Higher Plants: 4th Edition. Springer. Dordrecht. The Netherlands. 353pp.

PINHO-GUEDES, N. M.; MARIA J.; ZAMBOLIN, L. y VENTURA J. 2002. Protoplast isolation of *Annanas comosus* (L.) Merr. Cv. Perolera. *Acta Horticulturae* 425 .

POPLUECHAI, S.; ONTO, S. and EUNGWANICHAYAPANT, P.D. 2007. Relationships between some Thai cultivars of pineapple (*Ananas comosus*) revealed by RAPD analysis. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(6):1491-1497.

PY, C. 1969. La Piña Tropical. Título original de la colección: Techniques Agricoles ET productions Tropicales. Título original de la obra: L'Ananas. España. 278pp.

PY, C.; Lacoeyllhe, J.-J. and Teisson, C. 1987. L'Ananas, sa culture, ses produits. G.P. Maisonneuve & Larose, Paris. France.

RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; TRUJILLO, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojunio_2000/almazara/almazara1.htm

RAO, A.N. and WEE, Y.C. 1979. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. The New Phytologist 83:485-497.

RAYA, M.; YURIXHI, A.; VILLEGAS, M. Á. y ARELLANO O. G. 2009. Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. Revista Fitotecnia Mexicana 32(2):111-117.

RICO, R. D. R. 2009. Etanol a partir de jugo de desecho de piña *Ananas comosus* (L.) Merr por medio de dos microorganismos. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Estado de México. México. 59pp.

ROCHA, E. A.; PAIVA, L. V.; DE CARVALHO, H. H.; GUIMARAES, C. T. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 10:204-210.

RODRÍGUEZ, D.; GRAJAL-MARTÍN, M. J.; ISIDRÓN, M.; PETIT, S. and J.I. HORMAZA. 2013. Polymorphic microsatellite markers in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Scientia Horticulturae 156:127-130.

RODRÍGUEZ, Y.; MOSQUEDA, M.; COMPANIONI, B.; ARZOLA, M.; BORRAS, O.; PÉREZ, M.C.; LORENZO, J.C.; SANTOS, R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of cultivar pineapples resistance levels to Heart Rot disease. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 38:613-616.

ROHLF, F. J. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.1). State University of New York. USA.

ROJAS, S; GARCÍA, J; ALARCON, M. 2004. Propagación asexual de plantas. CORPOICA, Ministerio de agricultura y Desarrollo rural de Colombia, PRONATTA. Colombia.

ROMERO, R. B. y ESCOBEDO, B. L. 2003. Micropropagación y formación de callo de dos cultivares de piña Champaka y MD-2. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 25-31Pp.

ROOSTIKA, I. and MARISKA, I. 2003. *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. Bul. AgroBio 6:34-40.

RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CABRAL, J.R. 2001. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers. Euphytica 119(3):245-252.

RUAS, P.M.; RUAS, C. F.; FAIRBANKS, D. J.; ANDERSEN, W. R. and CABRAL, J. R. S. 1995. Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Brazilian Journal of Genetic. 18(3):413-116.

SAHIJRAM, L.; SONEYI, J. R. and BOLLAMMA, K. T. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). *In Vitro* cellular and Developmental Biology Plant 39:551-556.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. and ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

SAMSON, J. A. 1991. Fruticultura Tropical. Limusa. Primera edición. México. 396 pp.

SÁNCHEZ, T. L. F; QUIRÓZ, F. F; LOYOLA, V. V. and INFANTE, D. 2003. Culture induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. Molecular Biotechnology 23:107-115.

SANTOS, J.R. and **MATOS, A. P.** 1995. Pineapple breeding for resistance to Fusariosis in Brazil. *Rev. Fac. Agron.* 21:137-145.

SANTOS, M.D.M.; **BUSO, G.C.S.** and **TORRES, A.C.** 2008. Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppins and Leal] using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 7(4):1097-1105.

SAUCEDO, A. S. G.; **RAMOS G. L. E.;** **VARAS, G. E.** y **CARMIGNIANI, C. F.** 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* 1:49-54.

SINGH, R. and **IYER, C.P.A.** 1997. Standardisation of dosimetry and techniques for inducing mutations in pineapple. In: Nijjar, G.S. (ed.) *Fruit Breeding in India.* Oxford & IBH. 212pp.

SMITH, R. 2000. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments.* Academic Press. San Diego. USA. 231pp.

SMULDERS, M. J. M. 2005. Are there adequate methods for assessing somaclonal variation in tissue culture propagated plants? In: Libiaková, G.; Gaidosová, A. eds. *Final conference / Cost 843 and Cost 851 (June- 28 – July 3, 2005, Slovakia).* Pp:201-203.

SPOONER, D.; **VAN TREUREN, R.** and **DE VICENTE, M. C.** 2005. Molecular Markers for genebank management. International Plant Genetic Resources Institute. IPGRI Technical Bulletin 10. Roma. Italy. 126pp.

SRIPAORAYA, S.; **BLACKHALL, N.;** **MARCHANT, R.;** **POWER, J.;** **LOWE, K.;** **DAVEY, M.** 2001. Relationships in pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Breeding* 120(3):265.

SRIPAORAYA, S.; **MARCHANT, R.;** **POWER, J. B.;** **DAVEY, M. R.** 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39:450-454.

TAPIA, C. E.; GUILLÉN, A. H.; GUTIÉRREZ, E. M. A. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas* spp.) mediante RAPD e ISSR. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(3):187-194.

TRIGIANO, R. N.; CAETANO, A. G.; BRANT J.; BASSAM, G. B. and WINDHAM, M. T. 1995. DNA amplification fingerprinting provides evidence that *Discula destructiva*, the cause of dogwood anthracnose in North America, is an introduced pathogen. *Mycología* 87(4):490-500.

URIZA AVILA, D. 2005. IV International Pineapple Symposium Foreword and Preface. *Acta. Hort.* 666.

VALADEZ, M. E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147pp.

VALADEZ, M. E.; KAHL, G.; RAMSER, J; HÜTTEL, B. Y RUBLÚO, I. A. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex.* 24(1):103-120.

VANIJAJIVA, O. 2012. Assessment of genetic diversity and relationships in pineapple cultivars from Thailand using ISSR marker. *Journal of Agricultural Technology* 8(5):1829-1838.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. and ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.

WELSH, J. and MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.

WEBER, J. L. and MAY, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K. y KAHL G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants, Principles, Methods, and Applications. Segunda Edición, Taylor & Francis Group. Florida, USA. 470pp.

WILLIAM, J. G.; KUBLIK, K.; LIVAK, K. J. and RAFALSKI, K. J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 18:6531-6535.

WILLIAMS, D.D.F. and FLEISCH, H. 1993. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. Acta Horticulturae 334:67-76.

WOHRMANN, T. and WEISING K. 2011. *In silico* mining for simple sequence repeat *loci* in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. Theor. Appl. Genet. 123:635-647.

YASMIN, S.; ISLAM, M. S.; KONDOKER, M.; NASIRUDDIN, M. and ALAM, S. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. Biotechnol. 5:27-31.

YEH, C. y YANG, R. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Tim Boyle, Center for International Forestry Research. 29p.

ZEPEDA, C. y SAGAWA. Y. 1981. *In vitro* propagation of pineapple. Hort. Sci. 16:495.

ZHANG, F.; GE, Y.; WANG, W.; YU, X.; SHEN, X.; LIU, J.; LIU, X.; TIAN, D.; SHEN, F. and YU, Y. 2012. Molecular Characterization of Cultivated Bromeliad Accessions with Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. International Journal of Molecular Sciences 13:6040-6052.

ZIETKIEWICZ,E.; RAFALSKI, A. and LABUDA, D. 1994. Genoma fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183.

8. ANEXOS