

Desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para la micropropagación de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) ecotipo Santa Rosa provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas

Development of culture techniques for *in vitro* micropropagation of pineapple plants (*Ananas comosus* L. Merr.) Santa Rosa ecotype proceeding Rodríguez de Mendoza province, Amazonas region

Carlos E. Millones Chanamé¹

Laboratorio de Biología - Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas

RESUMEN

La presente investigación fue realizada con la finalidad de establecer un protocolo para la micropropagación de piña (*Ananas comosus* L. Merr) ecotipo Santa Rosa, para lo cual se emplearon yemas axilares de corona de piña, efectuando una doble desinfección colocando inicialmente las coronas de piña en lejía al 10% durante 30 minutos, posteriormente se eliminaron las hojas de la corona cuyos pedúnculos fueron colocados en alcohol 75° por un minuto y luego sumergidos por 15 minutos en una solución de lejía 5% más dos gotas de Tween-20; en ambos casos se realizaron enjuagues con agua destilada estéril, a continuación se extrajeron las yemas axilares y fueron emplazadas a medios de cultivo de instalación de yemas, conformado por las sales MS más 0,1 mg/L de AG_v; una vez desarrollados los brotes se escindieron y se colocaron en medios de cultivo de multiplicación a base de las sales MS con diferentes interacciones ANA (0,5, 1,0 y 2,0 mg/L) y BAP (0,5; 1,0 y 2,0 mg/L); los brotes inducidos fueron colocados en medios de enraizamiento constituido por las sales MS modificado en la reducción del 50% del nitrógeno y suplementado con ANA (0,5 y 1,0 mg/L) y AIB (0,5, 1,0 y 2,0 mg/L). Los brotes obtenidos en el medio de instalación de yemas tuvieron un adecuado desarrollo, los cuales a la sexta semana fueron colocados en medios de multiplicación suplementado con 1,0 mg/L de ANA y 2,0 mg/L de BAP, que promovió la inducción de 52 brotes/explante. El mayor número y longitud de raíces se registraron al emplear 1,0 mg/L de ANA y 2,0 mg/L de AIB, obteniendo 3,1 raíces/explante y una longitud de 7,2 cm; que permitió la supervivencia de las plántulas en su totalidad durante la fase de aclimatación.

Palabras claves: micropropagación, *Ananas comosus*, yemas axilares.

ABSTRACT

This research was conducted to establish a protocol for the micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) ecotype Santa Rosa, which were used for axillary buds of pineapple crown, making a double disinfected initially placing the crowns of pineapple in 10% bleach for 30 minutes, then remove the outer leaves whose peduncles were placed in 75° alcohol for a minute and then subjected to 15 minutes in a bleach solution of 5% plus two drops of Tween-20 in both cases were carried out with sterile distilled water, then the axillary buds were removed and were placed in culture media of plant buds, consisting of salts MS more 0,1 mg/L GA_v once developed shoots were separated and placed in culture media for multiplication composed of the salts MS with different interactions ANA (0,5; 1,0 and 2,0 mg/L) and BAP (0,5; 1,0 and 2,0 mg/L) induced shoots were placed in rooting medium consisting of salts MS modified by 50% reduction in nitrogen and supplemented with NAA (0,5 and 1,0 mg/L) and IBA (0,5; 1,0 and 2,0 mg/L). The shoots from the installation media buds were well developed, which in the sixth week were placed in multiplication media supplemented with 1,0 mg/L NAA and 2,0 mg/L of BAP, which promoted induction of 52 shoots/explant. The increased number and length of roots were recorded using 1,0 mg/L NAA and 2,0 mg/L of IBA, obtaining 3,1 roots/explant and a length of 7,2 cm, which allowed the survival of seedlings in its entirety during the acclimation.

Key words: micropropagation, *Ananas comosus*, axillary buds.

¹Lic. en Biología, Máster en Mejoramiento Genético de Plantas, Profesor Asociado TC, UNAT-Amazonas, carlos.millones@unatamazonas.edu.pe.

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* L. Merr) se considera la especie más importante de la familia bromeliaceae; es originaria de Sudamérica y se encuentra vegetando naturalmente al sur de Brasil, norte de Argentina y Paraguay y en los bordes meridionales de la Amazonía (Páez, 1998). La piña es consumida principalmente como fruto fresco, rodajas en conserva; jugo y mermeladas; utilizándose las variedades comerciales Cayena Lisa, Gold del Monte, Queen Victoria y Ananas Boutelli; a nivel internacional la variedad Cayena Lisa es la más comercializada debido a su calidad; sin embargo, en los últimos años se ha registrado en los mercados de Estados Unidos y de la Unión Europea el ingreso de la variedad Gold del Monte, que se caracteriza por presentar una pulpa de color

amarillo-naranja, y dorado, además de un mayor contenido de azúcares en comparación con la variedad Cayena Lisa. La región Amazonas cuenta con dos ecotipos de piña sobresalientes: el ecotipo Santa Rosa (fruta de mesa) que se cultiva en la provincia de Rodríguez de Mendoza y el ecotipo Porvenir (fruta para la industria) cultivada en la provincia de Bagua (PRONAMACHCS, 2005).

La piña es una de las especies que se propaga asexualmente, empleando por lo general partes vegetativas, órganos o tejidos tales como: 1) chupón, originado a partir de las yemas por debajo del nivel del suelo; 2) hapas, brotes que desarrollan en la base del pedúnculo; 3) ramas en forma de hojas, originadas de la yema en las axilas de las hojas; 4) vástago; el cual

desarrolla fuera del pedúnculo debajo o en la base del fruto; 5) coronas, se originan en la parte superior del fruto (Rangan, 1984). El empleo de las porciones vegetativas presenta desventajas como: baja tasa de multiplicación, favorece la diseminación de plagas y enfermedades, desuniformidad en su vigor y tamaño de la semilla (DeWald *et al.*, 1988; Gallardo, 1985). En este sentido, la técnica de micropropagación puede ser utilizada para producir un gran número de plantas genéticamente iguales en un periodo relativamente corto, con uniformidad de peso y tamaño; asimismo, libres de enfermedades (Chu & Kurtz, 1990; Firoozabady & Gutterson, 2003).

Plantas de piña han sido regeneradas *in vitro* a partir de ápices o yemas axilares de la corona (Mandal *et al.* 2002; Fitchet, 1985), vástagos o yemas basales del fruto (Mandal *et al.*, 2002; Sita *et al.*, 1974), yemas laterales (Zepeda & Sagawa, 1981), chupones (Mandal *et al.*, 2002). Asimismo, se han obtenido embriones a partir de callos de anteras de piña (Benega *et al.*, 2000) y formación de brotes a partir de hojas cultivadas *in vitro* (Mercier *et al.*, 2003). La presente investigación desarrolló una metodología para la micropropagación de la piña ecotipo Santa Rosa, que brindará una herramienta adecuada para la obtención de semillas de buena calidad y libre de enfermedades que permitirá impulsar la siembra de este cultivo por parte de los productores agropecuarios de esta zona del país.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron frutos de plantas de piña ecotipo Santa Rosa sanas y vigorosas de dos años de edad, cultivadas bajo un sistema extensivo en la localidad de Santa Rosa, provincia de Rodríguez de Mendoza, ubicada a una altura de 1751 m.s.n.m. y coordenadas S: 06° 26' 59,0" WO: 77° 27' 21,1"; los cuales fueron llevados al Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, para la extracción de las yemas axilares que se emplearon como explantes para los ensayos de cultivo *in vitro*. Para la instalación de yemas axilares de coronas de piña *in vitro*, se formularon medios de cultivo que estuvieron constituidos por las sales inorgánicas MS (Murashige & Skoog, 1962), la vitamina tiamina.HCl y m-inositol; suplementado con 0,1 mg/L de ácido giberélico (AG₃); 3% de sacarosa y 0,15% de phytagel. Las coronas de frutos de piña ecotipo Santa Rosa antes de instalarse *in vitro*, fueron lavadas con agua, detergente y colocadas en lejía al 10% por 30 minutos, posteriormente se eliminaron las hojas de la corona; y en la cámara de flujo laminar el pedúnculo de la corona con las yemas axilares se desinfectaron en alcohol 70° durante 1 minuto, luego lejía 5% (hipoclorito de sodio) durante 5 minutos más dos gotas de Tween-20, realizando los enjuagues respectivos con agua destilada estéril. Las yemas axilares extraídas fueron colocadas en los tubos, frascos y/o vasos de magenta que contenían el medio de cultivo respectivo, los cuales posteriormente fueron sellados para su posterior incubación. Después de haber obtenido el crecimiento y desarrollo adecuado de los brotes provenientes de las yemas axilares de corona de piña, estos fueron colocados asépticamente en medios de cultivo de multiplicación, constituidos por las sales

inorgánicas MS (Murashige & Skoog, 1962), la vitamina tiamina.HCl y m-inositol; libre de reguladores de crecimiento. Los brotes de piña después de haber formado 4 a 5 hojas verdaderas, y con la finalidad de mejorar el número y longitud de las raíces, fueron colocados asépticamente en medios de cultivo de enraizamiento, constituidos por las sales inorgánicas MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado por la reducción del 50% de NH₄NO₃ y KNO₃, la vitamina tiamina.HCl y m-inositol; suplementado con reguladores de crecimiento como ANA 0,5 y 1,0 mg/L y AIB 0,5, 1,0 y 2,0 mg/L; agregándose también carbón activado y sacarosa como fuente de carbono.

Las plántulas de piña producidas en la etapa anterior se extrajeron de los vasos de magenta y se eliminó todo el agar adherido a las raíces, colocándose en macetas que contenían sustrato compuesto por tierra de cultivo, humus de lombriz y musgo (1: 1 : 1). Para el análisis estadístico, se procesaron los datos de la fase de multiplicación (número de brotes basales por explante) y la fase de enraizamiento (número de raíces y longitud de raíces a la tercera semana de cultivo en el medio de enraizamiento). Empleándose un Diseño Completamente al Azar (DCA) de un solo criterio de clasificación con t tratamientos y r repeticiones. Los datos del número de raíces fueron transformados mediante la $\sqrt{Y+1/2}$ antes del procesamiento de datos (Steel & Torrie, 1985). Todos los tratamientos fueron evaluados por su significación estadística a través de un análisis de varianza, y las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey 0,05 de nivel de significación.

RESULTADOS

Las plantas de piña ecotipo Santa Rosa presentaron las siguientes características morfológicas: Planta herbácea de postura normal. Raíz fibrosa que alcanza 30 - 40 cm de profundidad; tallo corto rodeado por hojas formando una espiral o roseta. Hojas lanceoladas de borde liso y color verde/rojo jaspeado. Fruto de forma cilíndrica ligeramente ahusado unido al tallo por un pedúnculo corto, pulpa crema con pequeña cantidad de fibra. Corona cónica alargada, con follaje semirecto, hojas de color verde/rojo jaspeado sin espinas. Semillas ausentes.

Las yemas axilares extraídas de las coronas de piña ecotipo Santa Rosa, desarrollaron adecuadamente en el medio de cultivo a base de las sales MS suplementado con AG₃ (Figura 1A), permitiendo obtener brotes con 4 a 5 hojas verdaderas a la 14° y 16° semana de cultivo *in vitro*, los cuales fueron colocados en medio de multiplicación para su propagación (Figura 1B y C). Los brotes desarrollados a partir de las yemas axilares de corona (Figura 1A y B), y colocados en medio de cultivo de multiplicación, se obtuvieron brotes basales a la 3° y 5° semana de cultivo *in vitro* (Figura 2A y B). Los efectos de las interacciones de la auxina ANA y con la citocinina BAP se muestran en la Tabla 1. La presencia de la citocinina BAP en una concentración de 2,0 mg/L y la auxina ANA en 1,0 y 2,0 mg/L resultó en el mayor número de brotes por explante, obteniéndose 52 y 47 brotes basales

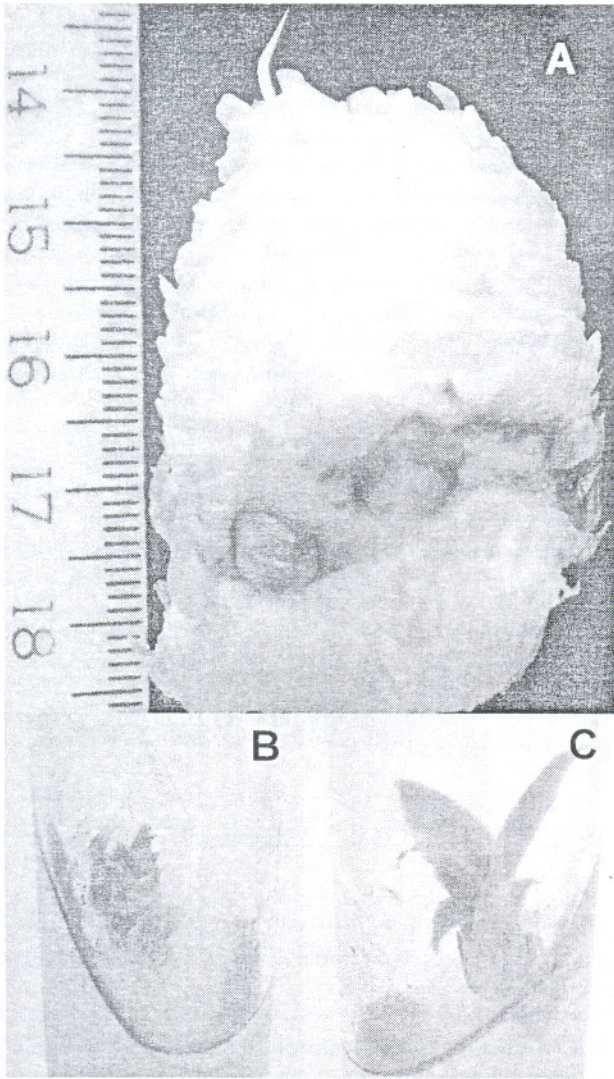


Figura 1. Proceso de introducción de yemas axilares de corona de piña ecotipo Santa Rosa *in vitro*. A. Corona de piña donadora de yemas axilares. B. Yema axilar de piña a la 6ª semana de cultivo *in vitro*. C. Yema axilar de piña a la 14ª semana de cultivo *in vitro* conformando un brote con hojas verdaderas.

respectivamente; disminuyendo este número cuando se empleó concentraciones menores de ANA. En todas las interacciones ANA y BAP se lograron obtener plántulas normales en la 2ª y 3ª semana de cultivo *in vitro* en el medio MS sin reguladores de crecimiento (Figura 2C).

Tabla 1. Efecto de la interacción del ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo de multiplicación de yemas axilares de piña ecotipo Santa Rosa cultivados *in vitro*.

Trat.	Reguladores de crecimiento (mg/L)		% de inducción de brotes	Número promedio de brotes basales / por explante (a)
	ANA	BAP		
T ₁	0,5	0,5	85,7	9,2 c d
T ₂	0,5	1,0	71,4	5,6 d
T ₃	0,5	2,0	57,1	9,0 c d
T ₄	1,0	0,5	57,1	18,5 b c d
T ₅	1,0	1,0	42,9	12,7 c d
T ₆	1,0	2,0	85,7	52,0 a
T ₇	2,0	0,5	85,7	31,7 b
T ₈	2,0	1,0	100,0	23,3 b c
T ₉	2,0	2,0	71,4	47,4 a

∗: Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos para $p \leq 0,05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Las plántulas de piña obtenidas en el medio de regeneración enraizaron adecuadamente en el medio de cultivo de enraizamiento, donde se empleó 2,0 mg/L de AIB y 1,0 mg/L de ANA, lográndose el mayor número de raíces (3,1) y longitud de raíces (7,2 cm) (Figura 3A); disminuyendo los valores cuando se utilizó menores concentraciones de los fitorreguladores (Tabla 2). El adecuado enraizamiento de las plántulas permitió tener un adecuado desarrollo de las plántulas en el proceso de aclimatación (Figura 3B), lográndose un 100% de sobrevivencia de las plántulas de piña ecotipo Santa Rosa.

Tabla 2. Efecto de la interacción del ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indolbutírico (AIB) en el medio de cultivo de enraizamiento de brotes de piña ecotipo Santa Rosa cultivados *in vitro*.

Trat.	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Nº de raíces (a)	Longitud de raíces (cm) (a)
	ANA	AIB		
T ₁	0,5	0,5	1,7 b	4,3 b c
T ₂	0,5	1,0	1,9 b	5,3 b c
T ₃	0,5	2,0	2,1 a b	5,4 b
T ₄	1,0	0,5	1,9 b	5,3 b c
T ₅	1,0	1,0	1,9 b	4,2 c
T ₆	1,0	2,0	3,1 a	7,2 a

∗: Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos para $p \leq 0,05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

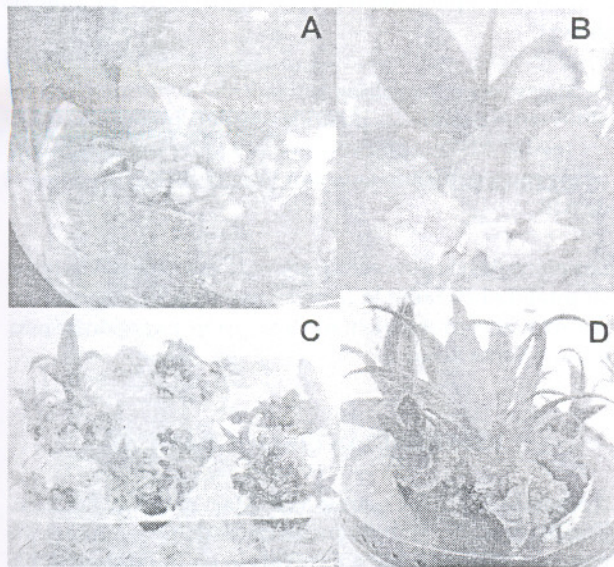


Figura 2. Multiplicación *in vitro* de brotes vegetativos de piña ecotipo Santa Rosa. A y B. Brote axilar a la 3ª y 5ª semana de cultivo *in vitro* en el medio de multiplicación. C. Plántulas de piña en la 2ª-3ª semana de colocadas en el medio de regeneración. D. Plántulas de piña en medio de enraizamiento.

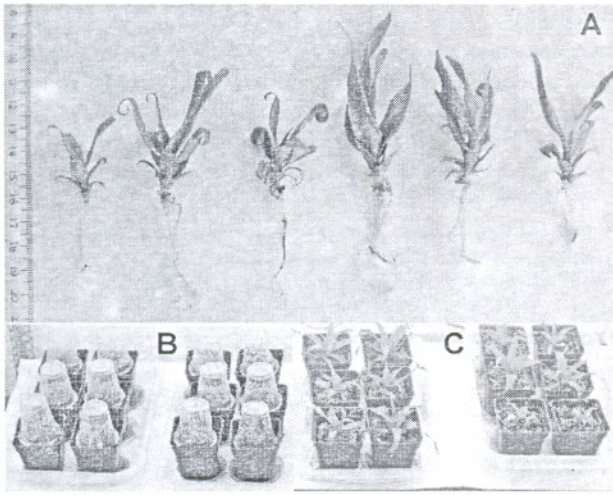


Figura 3. Enraizamiento y aclimatación de plántulas de piña ecotipo Santa Rosa. A. Plántulas de piña enraizadas en medio de cultivo con diferentes interacciones de ANA y AIB. B y C. Aclimatación de plántulas de piña.

DISCUSIÓN

En la presente investigación yemas axilares de corona de piña ecotipo Santa Rosa desarrollaron adecuadamente hasta la conformación de brotes con 4 a 5 hojas cuando fueron cultivados en medio de cultivo a base de las sales y vitaminas MS suplementado con 0,1 mg/L de AG₃; ello indica que una dosis moderada de AG₃ es efectiva para el crecimiento de brotes (Farhatullah & Jaffer, 2007); asimismo, el AG₃ estimula el crecimiento de los brotes y yemas al incrementar la extensibilidad de la pared celular (Davies, 1987). Los presentes resultados concuerdan con las observaciones hechas por Calderón-Baltierra (1994) quien al emplear 0,1 mg/L de AG₃ obtuvo alargamiento de brotes adventicios con desarrollo normal de hojas en *Eucalyptus globulus*.

La inducción de estructuras embriogénicas en los brotes axilares de piña ecotipo Santa Rosa cultivados *in vitro* fue favorecida por la combinación de la auxina ANA y la citocinina BAP; siendo el empleo de 1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP la combinación que permitió obtener el mayor número de brotes axilares (52 brotes/explante); el rol de la auxina en el medio de multiplicación incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance citocinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada y se inhiba el enraizamiento, estimulando la brotación (Daquinta, 1998; citado por Saucedo *et al.*, 2008). El número de brotes inducidos en la presente investigación fueron superiores a los reportados por Mercier *et al.* (2003) quienes emplearon las mismas concentraciones de auxina-citocinina en hojas de piña Cayena Lisa obteniendo 3,5 brotes/hoja; Mogollón *et al.* (2004) utilizando 0,01 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de BAP lograron inducir 38,6 brotes/explante en piña variedad Queen Australia; Hamad & Taha (2008) empleando 1,75; 2,0; 2,25 y 3,5 mg/L de BAP obtuvieron 12 brotes/explante en piña Cayena Lisa; Saucedo *et al.* (2008) utilizando 3,5 mg/L y 4,0 mg/L de BAP logró 12 brotes por explante en piña variedad Champaka y Hawaiana.

La rizogénesis es un etapa crítica en la técnica de micropropagación, de la cual depende el éxito de la etapa de aclimatación y la sobrevivencia de las plantas en

campo, el enraizamiento de los explantes está ligado a las condiciones genéticas y fisiológicas de los mismos, asimismo a las condiciones físicas y composición del medio de cultivo durante el tratamiento de enraizamiento (Dufour, 1988; citado por Amarante *et al.*, 2001). Asimismo, la aplicación exógena de auxinas naturales o sintéticas favorecen el enraizamiento, y estas han sido utilizadas por un largo tiempo en la horticultura (Gaspar *et al.*, 1992; citado por Amarante *et al.*, 2001). En la presente investigación los brotes de piña ecotipo Santa Rosa obtenidos en el medio de multiplicación se colocaron en un medio MS reguladores de crecimiento, donde los brotes indujeron una sola raíz delgada y pequeña; mejorando el número y longitud de las raíces de piña cuando se empleó medio de enraizamiento conformado por las sales MS modificado en la concentración del nitrógeno a la mitad, 1 mg/L de ANA y 2 mg/L de AIB, alcanzándose a obtener 3,1 raíces por plántula de piña y 7,2 cm de largo, permitiendo que la totalidad de los brotes prosperaran en la fase de aclimatación. Estos datos difieren a los registrados por Mogollón *et al.*, (2004) quienes reportaron 28,4 raíces/explante de piña variedad Queen Australia al emplear 2 mg/L de ANA, pero menor longitud (0,5 cm); Santa Cruz *et al.* (2004) registró 14,7 raíces por explante de híbrido de piña PExSC-52 al emplear 1 mg/L de ANA.

CONCLUSIONES

Se desarrolló técnicas adecuadas para la desinfección, instalación, multiplicación y enraizamiento de yemas axilares de corona de piña (*Ananas comosus* L. Merr) ecotipo Santa Rosa.

El crecimiento y desarrollo de yemas axilares hasta la conformación de brotes con 4 a 5 hojas se obtuvo cuando se empleó 0,1 mg/L de AG₃.

El mayor número de brotes de piña ecotipo Santa Rosa (52 brotes/explante) se logró cuando se empleó medio de cultivo MS suplementado con 1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP.

El mayor número y longitud de raíces por explante se obtuvieron cuando las plántulas de piña fueron colocadas en medio MS modificado en la reducción al 50% del nitrógeno y suplementado con 1 mg/L de ANA y 2 mg/L de AIB.

Las plántulas de piña ecotipo Santa Rosa sobrevivieron en su totalidad durante la fase de aclimatación, lográndose desarrollar el protocolo para la micropropagación de piña ecotipo Santa Rosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amarante, L.; D.S. Colares; M.P. Mariot; G.R.L. Fortes; F. Zanella & A. Alves. Influências do ácido naftaleno acético e escuro e atividade da peroxidase no enraizamiento *in vitro* de aspargo (*Asparagus officinalis* L.). Rev. Bras. Agrobiociência. 2001:7:4-9.

Benega, R.; J. Martínez; M. Daquinta; E. Arias; M. Hidalgo;

- M.C. Gonzáles; & M. Isidró. 2000. Efecto del thidiazuron sobre la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras en piña. *Cultivos Tropicales*. 21(3):47-50.
- Calderon-Baltierra, X.V. 1994. Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. *Bosque*. 15:33-38.
- Chu, I. & S. Kurtz. 1990. Commercialization of plant micropropagation. In: *Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for propagation and breeding*. MacMillan Publishing Company, New York, USA. 5:126-64
- Davies, P.J. 1987. Plant hormones and their role in plants growth and development. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht / Boston / Lancaster.
- DeWald, M; Moore, G.; Sherman, W. & M. Evans. 1988. Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Reports*. 7:535-37.
- Farhatullah, Z.A. & S. Jaffer. 2007. *In vitro* effects of gibberellic acid on morphogenesis of potato explant. *International Journal of Agriculture & Biology*. 9:181-182.
- Firoozabady, E & N. Gutterson. 2003. Cost effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Report*. 21: 844-50.
- Fitchet, M. 1985. Tissue culture of pineapples. *Inf.o. Bull. Citrus and Subtropical Fruit Res. Inst.* 149:1-2
- Gallardo, M. 1995. Biotecnología aplicada al cultivo de la piña. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP-LARA); Venezuela. 6pp.
- Hamad, A.M. & R.M. Taha. 2008. Effect of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation and growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Smooth Cayenne. *Journal of Applied Sciences*. 8:4180-85.
- Mandal, A.B.; A. Maiti & R. Elanchezhian. 2002. *In vitro* micropropagation of *Ananas comosus* L. (Merr.) var. Queen. *Jour. Appl. Hort.* 4: 107-112.
- Mercier, H.; M.S. Beatriz; j.E. Kraus; R.M. Hamasaki & B. Sotta. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.*, 15(2):107-112.
- Mogollón, N., J.G. Díaz & N. Hernández. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21 Supl. 1: 15-21.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- Páez, M.G. 1998. Caracterización morfológica de *Ananas* spp. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 42:128-32.
- PRONAMACHCS. 2005. El cultivo de piña en Amazonas. Ministerio de Agricultura. Programa de Manejo de Cuencas Hidrográficas y Conservación de Suelos (PRONAMACHCS - Gerencia Departamental de Amazonas, Perú). 44pp.
- Rangan, T.S. 1984. Pineapple. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada (eds.). *Handbook of plant cell culture 3. Crop Species*. Macmillan, New York. p.373-382.
- Santa Cruz, S.B.; L.S. Caldas & L.A. Copati. 2004. Micropropagação do híbrido PEXSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia*. 39:725-33.
- Saucedo, S.G.; L.E. Ramos; E. Varas; & F. Carmigniani. 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología, Ecuador*. 1:49-54.
- Sita, L.G.; R- Sing & C.P.A. Iyer. 1974. Plantlets through shoot tip culture in pineapple. *Current Science*. 45:724-725.
- Steel R.G.D & J.H. Torrie. 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2 Edic. Edit. McGraw-Hill Latinoamericana, Colombia. 622 pp.
- Zepeda, C. & Y. Sagawa. 1981. *In vitro* propagation of pineapple. *Hortscience*. 16:495.