



**UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA**  
"Fructuoso Rodríguez Pérez"  
Facultad de Agronomía



# Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines

Mayabeque, 2017



**Título:** “Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines”.

**Entidad ejecutora principal del resultado:** Universidad Agraria de La Habana

**Autores Principales:** Daymara Rodríguez Alfonso<sup>1</sup>, Miriam Fátima Isidró Pérez<sup>1</sup> y Marcos Edel Martínez Montero<sup>2</sup>

**Otros Autores:** Dubiel Alfonso González<sup>1</sup>, Marcia Beatriz Moya Fernández<sup>1</sup>, Ermis Yanes Paz<sup>2</sup>, Ariel Villalobo Oliveras<sup>3</sup>, Lydia Galindo Menéndez<sup>4</sup>, Neysis Pérez Fernández<sup>4</sup>, Odalys Barrios Govín<sup>5</sup>, Zoila Margarita Fundora Mayor<sup>5</sup>

**Filiación:**

<sup>1</sup>Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Autopista Nacional km. ½ Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup> Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). Carretera a Morón km.9, Ciego de Ávila, Cuba.

<sup>3</sup>Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). Carretera a Morón km.9, Ciego de Ávila, Cuba.

<sup>4</sup> Universidad de las Tunas, “Vladimir Ilich Lenin” (ULT). Avenida 30 de Nov. S/N, Reparto Aurora, Las Tunas, Cuba.

<sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), calle 1 y 2, Nr. 17200, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.

**Colaboradores: 7**

**RESUMEN:** Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA) constituyen un recurso de enorme importancia social, económica y ambiental. Su conservación permite preservar determinados genotipos o poblaciones y sus diversas combinaciones de genes. Los resultados que se obtuvieron presente investigación son un aporte al conocimiento y a la conservación de los recursos fitogenéticos de piña en Cuba. Se demostró la amenaza de pérdida de diversidad genética a la que está sometido el germoplasma de piña, sobre todo los cultivares 'Piña Blanca', 'Cabezona' y 'Cayena lisa de Oriente'; a partir de la escasa diversidad morfológica y molecular entre y dentro de los cultivares de los tres grupos hortícolas representados en el país, así como los problemas de manejo fitotécnicos del cultivo, debido a la carencia de información, por lo que se elaboró un Folleto como Instructivo Técnico para la ayuda a los productores. Se informan por primera vez para piña en Cuba un Listado de Descriptores Mínimos morfoagronómicos que facilitará los trabajos de caracterización, el diseño de nuevos cebadores SSR para estudios de diversidad genética de la especie y la creación de una Colección Núcleo en la que está representada la mayor variabilidad del germoplasma presente en el país. Los resultados alcanzados permitieron proponer acciones para minimizar la pérdida de la diversidad y recuperar el germoplasma, alternativas en la propagación *in vitro* de híbridos nacionales mediante la sustitución parcial o total de los reguladores del crecimiento por los bioproductos nacionales (BB-16 y Pectimorf®) y un protocolo de vitrificación de accesiones de piña conservadas *in vitro* para el establecimiento a largo plazo de un criobanco del germoplasma.

**Aporte científico de cada autor:**

**Daymara Rodríguez Alfonso (24%):** centró el tema de investigación durante los últimos 10 años, liderando proyectos territoriales y nacionales. Ha trabajado en la proyección de las investigaciones, el diseño, montaje y ejecución de los experimentos. Participó en las prospecciones, talleres y capacitación de productores. Centró el análisis científico-práctico de los resultados y el procesamiento estadístico de los datos procedentes de las

diferentes etapas. Ha dirigido Trabajos de Diploma relacionadas con la temática. Realizó la escritura del documento y es autor principal de las principales publicaciones y eventos de los resultados alcanzados.

**Miriam Fátima Isidró Pérez (21%):** líder científico de la temática. Trabajó en el diseño y ejecución de los experimentos relacionados con las prospecciones y la caracterización morfoagronómica. Es autora y coautora de publicaciones y participaciones en eventos. Fue tutora de Trabajos de Diploma, Tesis de Maestría y una Doctoral.

**Marcos Edel Martínez Montero (15%):** centró el tema relacionado con la crioconservación del germoplasma y participó en la organización de recolectas y manejo del germoplasma. Ha trabajado en la proyección de las investigaciones, el diseño, montaje y ejecución de los experimentos. Es autor y coautor de las publicaciones y presentaciones en eventos. Ha dirigido una Tesis de Maestría relacionada con la temática.

**Ermis Yanes Paz (8%):** trabajó de forma activa en el diseño y ejecución de los experimentos de caracterización molecular mediante el marcador tipo AFLP y es autor y coautor de publicaciones y participaciones en eventos.

**Lydia Galindo Menéndez (8%):** centró el tema relacionado con la aclimatización de los híbridos de piña y la entrega a productores del híbrido. Es autora y coautora de las publicaciones y presentaciones en eventos. Ha dirigido Trabajos de Diploma y una Tesis de Maestría relacionada con la temática.

**Neysis Pérez Fernández (5%):** realizó los experimentos de la fase de aclimatización de la piña, le dio continuidad a los híbridos entregados a los productores. Es autor y coautor de las publicaciones y presentaciones en eventos. Ha dirigido Trabajos de Diploma.

**Ariel Villalobo Olivera (5%):** trabajó en el diseño y ejecución de los experimentos de crioconservación y es autor y coautor de publicaciones y participaciones en eventos.

**Dubiel Alfonso González (5%):** participó en la realización de prospecciones y montajes de experimentos. Aportó iniciativas en la ejecución y evaluación de los resultados. Es coautor de participaciones en eventos y publicaciones.

**Marcia Beatriz Moya Fernández (3%):** participó en la realización de los experimentos de la multiplicación *in vitro* de los híbridos y el uso de bioproductos nacionales como sustitutos parciales o totales. Es autora y coautora de participaciones en eventos.

**Odalys Barrios Govín (3%):** trabajó de forma activa en el diseño de los experimentos de la caracterización morfoagronómica y del establecimiento de los descriptores mínimos. Es coautora de publicaciones y participaciones en eventos.

**Zoila Margarita Fundora Mayor (3%):** organizó y dirigió el trabajo de identificación de las amenazas de erosión genética de la diversidad *in situ* y *ex situ*, y la propuesta de acciones para minimizar los riesgos. Aportó iniciativas en las temáticas relacionadas con la caracterización morfoagronómica y en el establecimiento del listado de descriptores mínimos. Es coautora de publicaciones y participaciones en eventos.

**Colaboradores:** Carlos Lezcano Neyra<sup>1</sup>, Maria Elena Ruiz Pérez<sup>1</sup>, Jorge Ruiz Hernández<sup>1</sup>, Pedro Enrique Villar Martínez<sup>1</sup>, Remigio Zaragoza Cruz<sup>1</sup>, Roberto Méndez Pelegrín<sup>3</sup>; Julia Martínez Rodríguez<sup>2</sup>

**Autor para correspondencia:** Daymara Rodríguez Alfonso. Universidad Agraria de La Habana. Aptado 10 CP-32700, Mayabeque. Teléfono: 47860271. Correo electrónico: [maviak@unah.edu.cu](mailto:maviak@unah.edu.cu)

## 1. DESCRIPCIÓN CORTA DEL RESULTADO

La piña es un fruto tropical líder en el comercio mundial, es muy apetecida por su excelente sabor en el consumo fresco y procesado, así como por sus propiedades culinarias y medicinales. Aunque la especie es originaria de América del Sur, debido a su adaptabilidad, tolerancia a la sequía y fácil manejo del material de propagación, se cultiva en las zonas tropicales y subtropicales de los diferentes continentes.

La importancia de la conservación de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA) unida a la amenaza de erosión genética a la que están sometidos, han propiciado la necesidad de salvaguardar la diversidad genética de estos recursos. Esta es la razón por la que el Plan de Acción Mundial de la FAO, tiene el compromiso de que los gobiernos promuevan la conservación y la utilización de la diversidad, mediante sistemas apropiados de conservación *in situ* y *ex situ*.

El interés de mejorar factores de calidad comercial y de manejo agronómico, ha hecho que los institutos de investigación en mejoramiento genético lleven a cabo proyectos encaminados a completar la información que se tiene del germoplasma. Ello ha implicado la búsqueda de una gerencia eficiente de los recursos fitogenéticos (RFG), ya que su propósito no solo se limita a la conservación de especies, sino además, evaluar la variabilidad genética, realizan estudios filogenéticos y suministran información sobre la diversidad del material conservado.

A pesar del valor de los RFG de la especie, en Cuba, son muy pocos los estudios sobre diversidad morfoagronómica y molecular del germoplasma *in situ* y *ex situ* y hay problemas en su manejo y conservación. En respuesta mejorar la conservación y el manejo del germoplasma de piña y de especies afines en el presente trabajo se desarrollaron las siguientes investigaciones:

### **- Prospecciones y valoración del estado actual de la diversidad de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines en Cuba**

En las prospecciones desarrolladas se demostró el estado actual de la diversidad del germoplasma de piña en Cuba, de los cinco grupos hortícolas establecidos, solo existían tres: Española, Cayena y Pernambuco. La base genética de la especie es muy pobre, los cultivares más distribuidos y utilizados por los agricultores fueron los del grupo Española y con riesgo de pérdida 'Piña blanca'. A pesar de la calidad de los frutos, los cultivares de los grupos Pernambuco y Cayena, fueron los menos representados debido a que requieren mayores atenciones culturales y tienen menor rusticidad. Se pudo constatar las limitaciones que tienen los productores sobre el manejo adecuado y los requerimientos del cultivo. Entre las dificultades detectadas se puede mencionar la irregularidad en la densidad de plantación y la carencia del deshoje y el deshoje lo que limita la entrada en las plantaciones. En este sentido se desarrollaron talleres y capacitaciones además de la entrega de un libro electrónico. Las prospecciones y recolectas no solo ampliaron la información sobre la diversidad presente *in situ* y el *estatus* de los RFG de la especie en Cuba, además incrementaron la colección en más de 50%. Los materiales colectados fueron identificados mediante un formulario que se elaboró con los principales datos pasaporte y se clasificaron de forma preliminar de acuerdo a los grupos hortícolas para su introducción [Ed. Ciego de Ávila, 2002; Cultivos Tropicales 4 (1): 65-71, 2003; Pineapple News 13, 2006; Pineapple News 15, 2008; Fitotecnia Mexicana 40 (1): 93 – 10, 2017].



**- Determinación de la diversidad del germoplasma mediante marcadores morfológicos y moleculares y establecimiento de un Listado de Descriptores Mínimos**

La mejora de variedades y las caracterizaciones tradicionalmente se han realizado sobre la base de la evaluación del fenotipo, pero esta medida imperfecta del potencial genético se ha revertido mediante el uso de los marcadores moleculares. Los resultados sobre los patrones de diversidad morfoagronómicos obtenidos son los primeros que se notifican para el país, demostraron la baja variabilidad morfoagronómica con 27 descriptores IBPGR (Bioversity International) y ratificaron la clasificación de los diferentes grupos hortícolas. Se añaden dos estados más en el descriptor IBPGR “distribución de las espinas” al considerar la variabilidad particular del germoplasma cubano. La caracterización y el uso de herramientas estadísticas de avanzada permitieron proponer por primera vez para Cuba un Listado de Descriptores Mínimos, el cual podrá ser utilizado por investigadores y mejoradores en futuros estudios. Con los tres marcadores moleculares RAPD, AFLP y SRR se corroboró la baja variabilidad morfoagronómica detectada. Además se demostró la transferibilidad del marcador SSR y se diseñaron nuevos cebadores SSR a partir de secuencias de *Ananas comosus* var. *bracteatus* (L.) Merr y *A. comosus*. Estos cebadores permitieron la caracterización de la colección y actualmente los han utilizados otros autores como Achigan-Dako and Clément (2016) [Agropalca (9): 35-36, 2010; Crop Breeding and Applied Biotechnology 12: 104-110, 2012; Pineapple News 19: 24p, 2012; Scientia Horticulturae 156: 127–130, 2013].

**- Identificación de amenazas de pérdida de diversidad *in situ* y *ex situ* y propuesta de acciones para minimizarlas**

Se detectaron amenazas de erosión genética del germoplasma, donde se identificó la erosión de cultivares durante la conservación *in situ* y *ex situ* y el abandono de cultivares como las amenazas que más inciden en la pérdida de diversidad. Se propusieron acciones para minimizar la pérdida de diversidad como: la propagación de cultivares con riesgos de erosión genética y con limitada disponibilidad de brotes, incluidas las especies afines, el establecimiento de estrategias de conservación *ex situ* e *in situ*, que apoyen la recuperación de la diversidad erosionada en los sistemas agrícolas dañados, reforzar las colecciones con esa diversidad valiosa y promover la participación comunitaria en la protección y el manejo de la diversidad que atesoran. Las acciones propuestas son las primeras que se informan en el país como alternativas para la conservación y rescate de los RFG de la especie y están en correspondencia con el nuevo paradigma en la agricultura, FAO “Ahorrar para crecer” [Fitotecnia Mexicana 40 (1): 93 – 10, 2017].

**- Conservación del germoplasma a partir de las acciones propuesta para disminuir la pérdida de diversidad genética**

De las acciones propuestas para la conservación del germoplasma se ha logrado ejecutar: la micropropagación mediante técnicas biotecnológicas en función de los intereses productivos, como la propagación de híbridos CBCE-116 y CBCE-74, donde por primera vez al protocolo de multiplicación y enraizamiento, se le sustituyó parcial o totalmente los reguladores del crecimiento por los bioproductos nacionales BB-16 y Pectimorf®. Los resultados de los cambios en el protocolo de la micropropagación pueden ser extendidos a las biofábricas y otros centros donde se multiplique la especie. La obtención de los híbridos fue premio ACC en 2001, no así las modificaciones al protocolo de multiplicación con los bioproductos nacionales BB-16 y Pectimorf®. En la fase de aclimatización se determinaron requerimientos de riego y de sustrato, etapa en la

que se logró más de 90% de supervivencia. Se ha fomentado la conservación *in vitro* del germoplasma *ex situ* por medio de técnicas de crioconservación, al protocolo ya establecido para ápices de piña se le varió el tiempo de exposición de los explantes en PVS y se demostraron los cambios estructurales que provocaba. El protocolo de crioconservación de ápices de piña fue premio ACC en 1998, no así las modificaciones al protocolo y los resultados de la crioconservación de otros genotipos de piña que no estuvieron contemplados en el premio. Se han establecido estrategias de conservación *ex situ* (*in vitro/in vivo*) e *in situ*, que han apoyado la recuperación de la diversidad erosionada en los sistemas agrícolas dañados y así reforzar ambas colecciones con esa valiosa diversidad, como el establecimiento de la primera Colección Núcleo de piña en Cuba la cual facilitará el trabajo del curador del banco de germoplasma, de los mejoradores e investigadores ya que en ella están identificados los genotipos de mayor variabilidad. [Cryoletters, 22(2): 85-86, 2001; Biocell 31(3): 417, 2007; Ed. Intech Open Access Publisher 359-396, 2012; Agrotecnia de Cuba, 6(2):54-58, 2013; Ed. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura: 127-144, 2013; Cultivos Tropicales 37: 81-90, 2016].

#### **Novedad científica de los resultados:**

Los resultados presentados constituyen un aporte al conocimiento y a la conservación de los RFG de piña en Cuba. Se demuestra, mediante la caracterización morfoagronómica y molecular que la diversidad genética es escasa. Se ajusta el Listado de Descriptores del IBPGR (Bioversity International) para el cultivo, en el que se añaden dos estados más en el descriptor “distribución de las espinas”, al considerar la variabilidad particular del germoplasma evaluado y se establece un Listado de Descriptores Mínimos para la caracterización morfoagronómica. Se establecen en la fase de aclimatización requerimientos de riego y sustrato. Por primera vez: se diseñan nuevos cebadores SSR para piña a partir de secuencias publicadas de *A. bracteatus*. Se realiza la caracterización molecular del banco de germoplasma; se identifican los riesgos de erosión genética y se proponen acciones para minimizarlos, y se establece una colección núcleo que recoge la mayor variabilidad.

#### **Importancia práctica de los resultados:**

Los resultados obtenidos permitirán mejorar el conocimiento sobre las características y disponibilidad de los RFG de piña para los agricultores, mejoradores y la comunidad científica. Las prospecciones han rescatado cultivares que se perdieron en la colección *ex situ* y de lugares en los que se ha abandonado la tradición. Estos aspectos responden a una de las políticas del país y de las prioridades del Ministerio de Agricultura: la conservación de los RFG. La caracterización morfológica y molecular facilita el uso y manejo del germoplasma en programas de mejora. El Listado de Descriptores Mínimos ha simplificado los estudios de caracterización morfoagronómica y pueden ser usados en otros países. Los nuevos cebadores diseñados han facilitado la caracterización molecular, han sido utilizados para realizar otros estudios de diversidad en el germoplasma nacional e internacional. Con la identificación de las amenazas y las acciones propuestas se ha logrado minimizar la creciente pérdida de diversidad de algunos cultivares y el rescate de determinadas tradiciones. El protocolo de crioconservación se ha convertido en otra alternativa para la conservación a largo plazo del germoplasma de piña. El uso de bioproductos como sustitutos parciales o totales de los reguladores del crecimiento han representado una alternativa económica en la propagación *in vitro* de la especie y los requerimientos de riego y diferentes sustratos permite mejorar la supervivencia en la fase de aclimatización de los híbridos micropropagados.

## **ACREDITACIÓN DE LA INTRODUCCIÓN DEL RESULTADO Y SU IMPACTO**

Los resultados obtenidos emanan de la ejecución ocho proyectos nacionales y tres internacionales. Su importancia es acreditada por el Ministerio de Educación, el Ministerio de la Agricultura y por el CITMA a partir de la validez de los resultados obtenidos para la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines. Se adjuntan más de 32 avales de productores y personalidades de instituciones de prestigio nacional e internacional en las temáticas, los cuales son conocedoras de los resultados propuestos.

Los resultados han sido publicados en 15 artículos de revistas internacionales y nacionales tales como Crop Breeding and Applied Biotechnology, Scientia Horticulturae, Biocell, Cryoletters, Fitotecnia Mexicana, Agropalca, Pineapple News, Cultivos Tropicales y Agrotecnia de Cuba, además se han publicado tres libros y uno en prensa; así como también se ha divulgado por la web del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza y la AGRIS de la FAO. Los resultados también se han presentado en 31 eventos nacionales e internacionales y han formado parte de seis Trabajos de Diploma, cinco Tesis de Maestría y un Doctorado en Ciencias Agrícolas. Además han sido acreedor de cuatro Premios CITMA, uno MINAG y el Premio a la Mejor Tesis de Doctorado de la Sección Agropecuaria.

## **Publicaciones realizadas que guardan relación con el presente trabajo:**

### **Revistas de alto factor de impacto (Grupo I)**

1. Rodríguez D., Isidró M., Alfonso, D., Grajal, M.J., Hormaza, J.I., Herrera, L. Diversity of pineapple genetic resources in Cuba: threats and actions for minimizing losses. FITOTECNIA MEXICANA 40 (1): 93 – 101. ISSN 0187-7380 (**FI: 0.318**), 2017.
2. Yanes E., Gil K., Rebolledo L., Rebolledo A. Uriza D., Martínez U., Isidró M., Díaz L., Lorenzo J.C., Simpson J. Genetic diversity of Cuban pineapple germplasm assessed by AFLP Markers. CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY 12: 104-110. ISSN: 1984-7033 (**FI: 0.524**), 2012.
3. Rodríguez D., Grajal-Martín M.J., Isidró M., Petit S., Hormaza J.I. Polymorphic microsatellite markers in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merrill]. SCIENTIA HORTICULTURAE, 156: 127–130. ISSN: 0304-4238, (**FI: 1.504**), 2013.
4. Martínez-Montero M.E. Cryopreservation of plant germplasm: The Cuban experience. BIOCELL 31(3):417. ISSN: 0327-9545, (**FI: 0.73**), 2007.
5. Martínez-Montero M.E., González-Arno M.T., Benega R., Martínez J., Engelmann F. Application of cryopreservation techniques of pineapple (*Ananas comosus*) germplasm for long term storage. CRYOLETTERS, 22(2): 85-86. ISSN: 0143-2044. (**FI: 0.64**), 2001.

### **Revistas del Grupo II**

6. Villalobos A., Méndez R., Nápoles L., González J., Iglesias A., Martínez J., Rodríguez R.C., Lorente G., Quintana N., Rodríguez R., Vidigal F., Martínez M.E. Estrategia criogénica para el establecimiento de un banco de germoplasma de piña (*Ananas comosus* var. *comosus*) CULTIVOS TROPICALES 37: 81-90, 2016.
7. Isidró M., Rosales Y., Pifferrer A., Cisneros A., Benega R., Carvajal C. Caracterización del germoplasma de piña colectado en Cuba mediante prospección nacional: I localización, diversidad genética y situación actual. Revista CULTIVOS TROPICALES, 4 (1): 65-71, ISSN 1819-4087, 2003.

### **Revistas del Grupo III**

8. Rodríguez D., Isidró M., Barrios O., Andraca L., Fundora Z. Establecimiento y validación de la colección núcleo del germoplasma cubano de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines. Revista AGROTECNIA DE CUBA, 6(2):54-58, ISSN 2414-4673, 2013.
9. Rodríguez D., Isidró M., Hormaza J.I., Petit S., Villar P., Grajal-Martín M.J. Genetic characterization of the Cuban pineapple collection by RAPD. Revista PINEAPPLE NEWS 19, p24, <http://www.ishs-horticulture.org/workinggroups/pineapple>, 2012.
10. Pérez N., Galindo N., Peláez M., Evaluación del comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en la fase de aclimatización. Revista INNOVACIÓN TECNOLÓGICA 17 (4), ISSN- 1025-6504, 2011.
11. Rodríguez D. La piña, caracterización morfológica y molecular. Revista AGROPALCA. Especial 2º aniversario. No 9, ISBN 1889-4259, 2010.
12. Martínez-Montero M.E., Méndez R., Martínez J. Cryogenic strategy for the establishment of pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) germplasm bank. PINEAPPLE NEWS 16, p14. <http://www.ishs-horticulture.org/workinggroups/pineapple>, 2009
13. Isidró M, Rodríguez D, Valera E, Roque A, Isaac E, Hinds D. Some sustainable practices in pineapple cultivation in Cuba. Revisit PINEAPPLE NEWS 15, p56, <http://www.ishs-horticulture.org/workinggroups/pineapple>, 2008.
14. Isidró M, Cisneros A, Rosales Y, Pi A. Ferrer Escalona. Red Spanish cv. continues being “the queen” of the pineapples cultivated in Cuba. Revisit PINEAPPLE NEWS 13, p19. <http://www.ishs-horticulture.org/workinggroups/pineapple>, 2006.
15. Isidró M., Rosales Y., Cisneros A., Pifferrer A., Benega R., Carvajal C., Hidalgo M., Viera Y. National Pineapple Germplasm Prospection in Cuban Republic. Revista PINEAPPLE NEWS 9, p16, <http://www.ishs-horticulture.org/workinggroups/pineapple>, 2002.

### **Otras publicaciones:**

16. Rodríguez D. Caracterización de piña tropical (*Ananas comosus* (L.) Merrill) y especies afines. **AGRIS - FAO of the United Nations**, 2012.
17. Rodríguez D. Monografía. Mejoramiento genético de la piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill]. **BIBLIOTECA DEL IAMZ**. <http://www.iamz.ciheam.org>, 2009.

### **Libros y capítulos de libros**

1. Miriam Isidró Pérez, Daymara Rodríguez Alfonso, Guillermo Pérez García, Marcos Martínez Montero y Lourdes Yabor Cabrera. La biotecnología una herramienta en el mejoramiento de la piña. En: Genética, Genómica y Mejoramiento de Plantas Cultivadas, Ed. Maria Teresa Cornide, Editora Universitaria, La Habana (en prensa), 2017.
2. Martínez-Montero ME, González-Arnao MT, Mederos-Torres MA, García L, Fundora Desarrollo de la criopreservación de las plantas en Cuba. En: Criopreservación de plantas en América Latina y el Caribe, Edited by MT Gonzalez-Arnao, F Engelmann: chapter 10: pages 127-144; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, ISBN: 978-92-9248- 446-0 (Costa Rica), 2013.
3. Martínez-Montero ME, González-Arnao MT, Engelmann F. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation - Review of sugarcane (*Saccharum* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cases. En: Current Frontiers in Cryopreservation, Igor I. Katkov (Ed.), Chapter 18: pages 359-396; Intech Open Access Publisher, ISBN: 978- 953-51-0302-8 DOI: 10.5772/32047 (Croatia), 2012.
4. Isidró M. Algunas consideraciones técnicas del establecimiento y atenciones al cultivo de la piña. Libro electrónico: ISBN 959-16-0076-3, Ed. Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas, 2002.

### **Participación en eventos**

1. 11<sup>no</sup> Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. Rodríguez D., Isidró M., Barrios O., Fundora Z.M., Alfonso D., Hormaza J.I., Petit S., Grajal M.J. Estado actual de los recursos fitogenéticos de piña en Cuba: amenazas y acciones para minimizar su pérdida, ISBN: 978-959-16-1286, 2017.
2. XX Congreso Científico del INCA. Daymara Rodríguez, Miriam Isidró, Odalys Barrios, Zoila Fundora, Dubiel Alfonso, Sandra Petit, José Ignacio Hormaza, Armando Falcón y Maria José Grajal. Potencialidades del germoplasma cubano de piña para el mejoramiento genético, 2016.
3. II Congreso Internacional de Agricultura Urbana, Suburbana y Familiar. Daymara Rodríguez, Miriam Isidró, Odalys Barrios, Lucy Andraca, Zoila Fundora. Estado actual de la diversidad in situ de los recursos fitogenéticos de piña en Cuba, ISBN: 978-959-7223-13-9, 2015.
4. Fórum de Ciencia y Técnica, Universidad. Rodríguez-Alfonso, D.; Isidró, M.; Barrios, O; Andraca, L; Hormaza, I.; Grajal-Martín, M.J; Fundora, Z.M. Establecimiento de una colección núcleo de piña en el germoplasma cubano, 2014.
5. Fórum de Ciencia y Técnica, Municipal. Rodríguez-Alfonso D., Isidró M., Barrios O., Andraca L., Hormaza J.I., Grajal-Martín M.J., Fundora Z.M. Caracterización morfológica de la colección cubana de piña y establecimiento de un listado de descriptores mínimos. Premio Destacado, 2014.
6. 10<sup>mo</sup> Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. Rodríguez –Alfonso, D.; Barrios, O.; Hormaza, I.; Grajal, M.J.; Fundora, Z.M.; Isidró, M. Establecimiento y validación de una colección núcleo en el germoplasma cubano de piña, ISBN: 978-959-16-2390-4, 2015.
7. VI Congreso Nacional de Extensión Universitaria. Pérez N., Galindo L. Régimen de riego en plantas in vitro de piña (*Ananas comosus*), ISBN: 978-959-16-2248-8, 2014.
8. 9<sup>no</sup> Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. Rodríguez D., Grajal-Martín M.J., Isidró M., Petit S., Hormaza J.I. Polymorphic microsatellite markers in pineapple, 2013.

9. Evento de Base y Provincial - Universidad 2012, 8<sup>vo</sup> Congreso Internacional de Educación Superior, Las Tunas. Pérez N., Galindo L. Régimen de riego en plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización, 2012.
10. Congreso Internacional de Ciencias Agropecuarias AGROCIENCIAS. Rodríguez D., Isidró M., Hormaza J.I., Villar P., Petit S., Grajal-Martín M.J. Caracterización genética mediante RAPD de la colección cubana de piña. ISBN: 978-959-15-1367-7, 2011.
11. Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. Rodríguez D., Isidró M., Villar P., Martínez M., Petit S., Hormaza J.I., Grajal M.J. Valoración de la diversidad genética de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] medida por RAPDs en apoyo a su uso para condiciones climáticas adversas. ISBN: 978-959-16-1286-1, 2011.
12. IX Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Villar P., Isidró M., Rodríguez D. Estudio de algunos caracteres del germoplasma de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y establecimiento de un banco de germoplasma ISBN, 2010
13. XVII Congreso Científico Internacional de Ciencias Agrícolas, Cuba. Pérez N., Galindo L., Rodríguez E., Fernández A., Guntín P., Acosta K., Arana F., Peña L., Acosta E. Comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización, 2010.
14. Taller Provincial de Bioproductos y Alimento Animal. Moya M., Isidró M., Rodríguez D., Cabezas D. Comportamiento del BB-16 en los parámetros del crecimiento de la piña durante la micropropagación, 2008.
15. XV Congreso Científico Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba. Moya M., Isidró M., Rodríguez D., Valera E. Efecto del Pectimorf y el Biobrás-16 en la micropropagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill). CD-ROM, ISBN 959-7023-36-9, 2006.
16. XIV Congreso Científico Nacional de Ciencias Agrícolas. Rodríguez D. Isidró M., Moya M., Valera E., Cruz A., Roque A. Influencia del Pectimorf en la multiplicación "*in vitro*" de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), ISBN 959-7023-27-X, 2004.
17. XIV Congreso Científico Nacional de Ciencias Agrícolas. Miriam Isidró, R. Benega, C. Carvajal, L. Godoy, D. Rodríguez, B. Díaz, E. Héctor y A. Torres. Presentación de formulario de descripción varietal de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill), para el registro de variedades comerciales, ISBN 959-7023-27-X, 2004.
18. IV Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Carvajal, C. Isidró M., Rodríguez D. Parámetros de calidad en frutos de piña del Banco Nacional de Germoplasma de piña. ISBN 959-16-0169-7, 2003.
19. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal, BIOVEG'2003, Cuba. Isidró M. Algunas consideraciones técnicas acerca del establecimiento y atenciones al cultivo de la piña. Presentación del libro electrónico: ISBN 959-16-0076-3, 2003.
20. Fórum Ciencia y Técnica. Complejo Científico Oeste. Isidró M., Carvajal C., Benega R., Rosales Y., Pifferrer A., Díaz B., Rodríguez D., Roque A. Caracterización de los frutos de piña en accesiones de la colecta nacional de híbridos introducidos en Cuba, 2003.
21. AGROTROP. Isidró M., Rosales Y., Pifferrer A., Cisneros A., Benega R., Carvajal C. Distribución y caracterización del germoplasma de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en Cuba, 2002
22. Fourth International Pineapple Symposium, México. Isidró M., Rosales Y., Cisneros A., Pifferrer A., Carvajal C. Aplicación de las técnicas biotecnológicas en el mejoramiento de la piña en Cuba, 2002.
23. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal, BIOVEG'2001, Cuba. Isidró M., Benega R., Cisneros A. Caracterización y valoración del germoplasma de *Ananas comosus* (L.) Merr en los municipios Mayarí, Frank País y Moa, 2001
24. XIV Fórum de Ciencia y Técnica, Centro de Bioplasmas, 1<sup>era</sup> etapa. Isidró M. Colecta de Germoplasma de Piña en la Isla de la Juventud, 2001.



25. XII Seminario Científico INCA. Isidró M., Cisneros A., Rosales Y., Piferrer A. Prospección nacional de germoplasma de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) y de especies afines para su conservación genética, 2000.
26. XII Seminario Científico INCA. Isidró M. Papel del campesinado cubano en la conservación del germoplasma de piña, 2000.
27. XIII Fórum de Ciencia y Técnica, Centro de Bioplasmas, Evento de base. Isidró M., Viera Y. Colecta de Germoplasma de Piña en la Región Occidental de Cuba, 2000.
28. XIII Scientific Seminar of the CNIC. Isidró M., Benegas R., Arias E., Cisneros A., Borrás O., Rodríguez Y., Santos R., Tapia R., Pérez G., Espinosa G., Lorenzo J.C., Martínez M., González M.T. Avances en el Programa Cubano de Mejoramiento Genético y la Conservación del Germoplasma de Piña *Ananas comosus* (L.) Merr. con la ayuda de los Métodos Biotecnológicos, 2000.
29. XIII Fórum de Ciencia y Técnica, Ciego de Ávila. Miriam Isidró, Miguel Hidalgo, Carol Carvajal y Alfredo González. Colecta y Rescate de germoplasma de piña en la región central, 1999.
30. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal Bioveg'99. Miriam Isidró, Benega R., Cisneros A., Arias E., Pérez G., Lorenzo J.C.; Espinosa P. y Borroto C. Application of biotechnological and traditional methods in Cuba pineapple breeding program, 1999.
31. XII Fórum de Ciencia y Técnica, Ciego de Ávila. Miriam Isidró, Aroldo Cisneros y Yamila Rosales. Rescate de genotipos de piña y especies afines mediante prospecciones de germoplasma para su conservación genética. Mención, 1998.

#### **Trabajos de Diploma**

1. Pedro Enrique Villar Martínez. Estudio de algunos caracteres en accesiones de germoplasma de piña (*Ananas comosus* L. Merr). Establecimiento de un banco de germoplasma, Mayabeque, 2009.
2. Jorge Ruíz Hernández. Establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* del cultivo de la piña (*Ananas comosus* L. Merr), Mayabeque, 2009.
3. Julio Cesar Hernández Corría. Efectos de diferentes tiempos de inmersión y formas de aplicación de fosforina en plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización, Las Tunas, 2008.
4. Miriam Peláez Peláez. Evaluación del comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en la fase de aclimatización, Las Tunas, 2008.
5. Madelin Barroso Martínez. Comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes sustratos en la fase de aclimatización, Las Tunas, 2007.
6. Marcia Beatriz Moya. Efecto del Pectimorf y el BB-16 en la fase de multiplicación de la piña (*Ananas comosus*), Mayabeque, 2006.

#### **Tesis de Maestría**

1. Neysis Pérez Fernández. Evaluación de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización, Universidad de Las Tunas, 2011.
2. Daymara Rodríguez Alfonso. Caracterización de piña tropical (*Ananas comosus* (L.) Merrill) y especies afines. Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), España, 2010.
3. Roberto Méndez Pelegrín. Estrategia criogénica para el establecimiento de un banco de germoplasma de piña, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba, 2009.
4. Daymara Rodríguez Alfonso. Utilización de biorreguladores en las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de dos híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba, 2008.
5. Ermis Yanes Paz. Caracterización molecular de las colecciones de germoplasma de piña de Cuba y México mediante AFLP, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba, 2003.

## **Tesis de Doctorado**

1. Daymara Rodríguez Alfonso. Diversidad de los recursos fitogenéticos de piña (*Ananas comosus*) y especies afines de Cuba y Canarias. Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de La Habana, Mayabeque, 2014.

## **Premios y Reconocimientos**

1. Premio Mejor Tesis de Doctorado, Sección Agropecuaria, otorgado por la CNGC, 2015.
2. Premio MINAG. Determinación de los patrones de diversidad de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines de interés para la producción en Cuba, 2015.
3. Premio CITMA-Mayabeque. Determinación de los patrones de diversidad de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines de interés para la producción en Cuba, 2014.
4. Premio CITMA - Las Tunas. Régimen de riego en plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus*, (L.) Merrill) híbrido CBCE-116, 2012.
5. Premio CITMA - Las Tunas. Comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus*, (L.) Merr) híbrido CBCE-116, 2010.
6. Premio CITMA-La Habana. Cultivo *in vitro* de especies vegetales con bioestimulantes cubanos del crecimiento y el desarrollo, 2007.

## **Proyectos:**

### Nacionales

1. Propagación y conservación de frutales tropicales con el empleo de la Biotecnología apropiable. PROYECTO MES. Concluido 2011.
2. Propagación y conservación de frutales tropicales en el Municipio San José de las Lajas con el empleo de la Biotecnología apropiable. PROYECTO CITMA TERRITORIAL. Concluido 2011.
3. Multiplicación e introducción de nuevos híbridos de piña obtenidos dentro del programa de Biotecnología en varias provincias del país. PROYECTO MES. Concluido 2005.
4. PECTIMORF como regulador del crecimiento y desarrollo de las plantas: Evaluación de sus posibilidades biotecnológicas. PROYECTO MES. Concluido 2004.
5. Germoplasma de piña: Colecta, caracterización y conservación: multiplicación de individuos de interés a la producción. Proyecto del Programa Nacional de Mejoramiento y Recursos Filogenéticos, CITMA. Concluido 2003
6. Actividad biológica y potencialidades antiestrés de análogos de brasinoesteroides cubanos. PROYECTO MES. Concluido 2002.
7. Utilización de técnicas Biotecnológicas en el mejoramiento y conservación de germoplasma de piña. Proyecto del Programa Nacional de Biotecnología Vegetal, CITMA. Concluido 2000.
8. Conservación y caracterización molecular de la colección nacional del germoplasma *ex situ* de piña de germoplama. Concluido 2009.

### Internacionales

1. Cryopreservation technology applicable to the Pineapple Germplasm Collection using droplet vitrification of apices for long term conservation and safety duplication. EMBRAPA, Brazil, concluido 2015.
2. Caracterización molecular mediante AFLP de germoplasma de piña. Proyecto CONACYT, México, concluido 2005.
3. Acción clave de apoyo al pequeño campesino: selección, mejora y distribución de "semillas" de especies de alto potencial productivo para el consumo humano (plátano, maíz, papaya y piña). Ayuntamiento de Islas Baleares, España, concluido 2005.

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b>	1
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	3
2.1. Exploración de la diversidad de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines	3
2.2. Caracterización fenotípica del germoplasma <i>ex situ</i> de piña y especies afines	5
2.2.1. Caracterización morfológica del germoplasma	5
2.2.2. Evaluación agronómica del germoplasma	6
2.2.3. Selección de Descriptores Mínimos	7
2.3. Diversidad genética mediante los marcadores moleculares AFLP, RAPD y SSR	7
2.3.1. Diversidad genética mediante el marcador tipo AFLP	9
2.3.2. Diversidad genética mediante el marcador tipo RAPD	11
2.3.3. Diversidad genética mediante el marcador tipo SSR	12
2.4. Identificación de las amenazas de erosión genética del germoplasma de piña y acciones para minimizarlas	13
2.5. Conservación del germoplasma a partir de las acciones propuestas para disminuir la pérdida de diversidad genética	14
2.5.1. Establecimiento y validación de la colección núcleo	14
2.5.1.1. Establecimiento de la colección núcleo	14
2.5.1.2. Validación de la propuesta de colección núcleo	14
2.5.2. Crioconservación del germoplasma	14
2.5.3. Propagación <i>in vitro</i> de híbridos cubanos conservados en la colección	17
2.5.3.1. Pectimorf® en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido CBCE-116	17
2.5.3.2. Biobras-16 en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido CBCE-74	18
2.5.3.3. Respuesta del híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización	19
2.5.3.3.1. Sustratos	19
2.5.3.3.2. Régimen de riego y momento de aplicación	20
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	22
3.1. Exploración de la diversidad de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines	22
3.2. Caracterización fenotípica del germoplasma <i>ex situ</i> de piña y especies afines	27
3.2.1. Caracterización morfológica del germoplasma	27
3.2.2. Evaluación agronómica del germoplasma	30
3.2.3. Selección de los Descriptores Mínimos	33
3.3. Diversidad genética mediante los marcadores moleculares AFLP, RAPD y SSR de la colección <i>ex situ</i>	35
3.3.1. Diversidad genética mediante el marcador AFLP	35
3.3.2. Diversidad genética mediante el marcador tipo RAPD	38
3.3.3. Diversidad genética mediante el marcador SSR	44
3.4. Identificación de las amenazas de pérdida de diversidad genética del germoplasma de piña y acciones para minimizarlas	51
3.5. Conservación del germoplasma de piña a partir de las acciones propuesta para disminuir la pérdida de diversidad genética	55
3.5.1. Establecimiento y validación de la colección núcleo del banco de germoplasma	55
3.5.1.1. Establecimiento de la colección núcleo	55
3.5.1.2. Validación de la propuesta de colección núcleo	59
3.5.2. Crioconservación del germoplasma	62
3.5.3. Experimentos con la utilización de los biorreguladores en el medio de cultivo <i>in vitro</i> de los híbridos de piña.	67
3.5.3.1. Pectimorf® en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido de piña CBCE-116	67
3.5.3.2. Utilización del Biobras-16 en la fase de multiplicación del híbrido CBCE-74	73
3.5.3.3. Biobras-16 en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido de piña CBCE-74	75
3.5.4. Respuesta del híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización	77
3.5.4.1. Tipos de sustratos en la fase de aclimatización	77
3.5.4.2. Determinación de la norma y momento de riego en la fase de aclimatización	79
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	88
<b>V. RECOMENDACIONES</b>	88
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>VII. ANEXOS</b>	

## RESULTADO CIENTÍFICO TÉCNICO DETALLADO

### I. INTRODUCCION

La importancia de la conservación de los RFAA, unida a la amenaza de erosión genética a la que están sometidos, han propiciado la necesidad de salvaguardar la diversidad genética (Engels y Visser, 2007). Razón por la cual el Plan de Acción Mundial de la FAO, tiene el compromiso de que los gobiernos promuevan la conservación y la utilización de la diversidad, mediante sistemas apropiados de conservación *in situ* y *ex situ* (FAO, 1996).

Los bancos de germoplasma son una de las alternativas de conservación *ex situ*. El éxito de este tipo de conservación depende de la accesibilidad a las accesiones y su correcta caracterización (Martínez *et al.*, 1995; Lobo y Medina, 2009). Esto facilita sin lugar a dudas, el manejo racional de las colecciones y los programas de mejora, la selección adecuada de los progenitores para estrategias de cruzamiento, elimina las duplicaciones y enriquece las colecciones (Engelmann y Engels, 2002; Cubero, 2013).

Existen varias colecciones en el mundo que preservan los RFG de la especie, tales como la de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, en Brasil, con más de 800 accesiones, la del Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agrícola para el Desarrollo - Departamento de Cultivos Frutícolas y Hortícolas en Martinica, con más de 450 accesiones y la del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Hawai, con más de 130 accesiones (Coppens *et al.* 1997; Bartholomew *et al.*, 2010). En las mismas se han realizado trabajos para explorar la variabilidad existente a través de caracterizaciones morfoagronómicas (Leal *et al.*, 1986; Ferreira y Cabral, 1993; Duval *et al.*, 1996). Los estudios de diversidad genética en las colecciones de piña son muy pocos, en el caso de los marcadores moleculares RFLP se han empleado en el germoplasma brasileño (Duval *et al.*, 2001) y AFLP, ISSR y RAPD en el mexicano (Tapia *et al.*, 2005a y b; Yanes *et al.*, 2005).

Por otra parte, el interés de mejorar factores de calidad comercial y de manejo agronómico, ha hecho que los institutos de investigación en mejoramiento genético lleven a cabo proyectos encaminados a completar la información que se tiene del germoplasma (Montes, 2008). Ello ha implicado la búsqueda de una gerencia eficiente de los RFG, ya que su propósito no solo se limita a la conservación de especies, sino además, permiten evaluar la variabilidad genética, realizan estudios filogenéticos y suministran información sobre la diversidad del material conservado (Lobo y Medina, 2009). Sin embargo, la mayoría de los programas de mejoramiento de piña se han centrado en unos pocos cultivares y no han tomado en cuenta parte de la diversidad genética existente. Esta omisión está acompañada de una caracterización incompleta del germoplasma y de complejidades taxonómicas aún no resueltas del género (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997), como la clasificación de los cinco grupos hortícolas de piña propuestos por Py *et al.* (1987) y seriamente cuestionada por Duval y Coppens d'Eeckenbrugge (1993).

En Cuba, en sus inicios el Banco de germoplasma estaba reconocido internacionalmente como un banco mediano, con más de 150 accesiones, pero debido a factores bióticos y abióticos se han perdido diversas accesiones, al igual ha sucedido con los recursos *in situ* de piña por lo que ha sido necesario desarrollar una estrategia de conservación *ex situ* e *in situ* que permita rescatar y caracterizar el germoplasma para su adecuado manejo, por lo que la presente investigación tiene como:

**Objetivo general:** Conservar los recursos fitogenéticos de piña y especies afines para su adecuado manejo.

**Objetivos específicos:**

- Realizar prospecciones y recolectas de germoplasma para valorar el estado actual de la diversidad de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines.
- Determinar la diversidad del germoplasma mediante marcadores morfológicos y moleculares y establecimiento de un Listado de Descriptores Mínimos.
- Identificar las amenazas de pérdida de diversidad *in situ* y *ex situ*, así como propuesta de acciones que las minimicen.
- Conservar el germoplasma a partir de las acciones propuesta para disminuir la pérdida de la diversidad genética de la piña en Cuba.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación abarca un periodo de 17 años, desde 1997- 2014. Los experimentos se desarrollaron en diferentes instituciones.

### 2.1. Exploración de la diversidad de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines

Los recursos fitogenéticos de piña en Cuba se encuentran conservados *in situ* en huertos y fincas. Además, existe una colección *ex situ* para Cuba en el Centro de Bioplasmas perteneciente al MES, provincia Ciego de Ávila, situada a 21°47' de latitud Norte y 78°17' de longitud Este, a 80 m.s.n.m. El germoplasma está integrado por introducciones, cultivares mejorados, colectados, entre otros (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cultivares de piña y especies afines de la familia de la colección *ex situ*.

ID.	MATERIAL VEGETAL	Nº. BG.	GÉNERO	ESPECIE	GRUPO HORTICULTURAL	PROCEDENCIA
1Cu	Española roja M 35	009	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Radiaciones 35Gy)
2Cu	Champaka	030	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Brasil
3Cu	Española roja Colorada del Ramón	004	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Sgto. de Cuba)
5Cu	Española roja (18)	086	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Villa Clara)
6Cu	Barón de Rothschild	019	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cuba (Granma)
7Cu	Piña Blanca del Caney	040	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Pernambuco	Cuba (Sgto. de Cuba)
8Cu	Jupi	062	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Pernambuco	Brasil
9Cu	Puerto Rico	033	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	-	Puerto Rico
10Cu	China	050	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	?	Cuba (INCA)
11Cu	Mocaena	029	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cuba (INCA)
12Cu	Híbrido CBCE-054	099	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	-	Cuba (Prog. de mejora)
13Cu	Híbrido CBCE-021	098	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	-	Cuba (Prog. de mejora)
14Cu	Piña blanca	133	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Pernambuco	Cuba (Bolondrón)
15Cu	Cabezona	005	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Holguín)
16Cu	Española Morada	075	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Holguín)
17Cu	Piña blanca serrana	039	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Pernambuco	Cuba (Morón)
21Cu	Cayena lisa serrana	018	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cuba (Morón)
22Cu	MD-2	109	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Costa Rica
24Cu	Cayena de Hawai	037	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Hawai
25Cu	Híbrido CBCE-003	097	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	-	Cuba (Prog. de mejora)
26Cu	Española roja Florencia	044	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Florencia)
28Cu	<i>Bromelia pinguin</i>	059	<i>Bromelia</i>	<i>pinguin</i>	-	Colombia
29Cu	<i>Bromelia karatas</i>	060	<i>Bromelia</i>	<i>karatas</i>	-	Colombia
30Cu	Española roja pinareña *	001	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Ciego de Ávila)
31Cu	Branco	053	<i>Ananas</i>	<i>bracteatus</i>	-	Brasil
33Cu	Española roja un borde liso	008	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Caney)
35Cu	Cubana	025	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Pernambuco	Cuba (Baracoa)
36Cu	Curujey	061	<i>Tillandsia</i>	<i>fasciculata</i>	-	Cuba (UNAH)
37aCu	Española roja P3R5	012	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (var. somaclonal)
37bCu	Española roja P3R5	012	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (var. somaclonal)
38Cu	Cayena lisa	016	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cuba (Cienaguilla)
39Cu	Española roja	027	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Cienaguilla)
40Cu	Española roja	010	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Ceiba Agua)
41Cu	Española roja	082	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Baracoa)
42Cu	Mocaena	038	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Cayena	Cuba (Baracoa)
43Cu	Ocaena	093	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Baracoa)
44Cu	Española roja	017	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (San Cristóbal)
45Cu	Española roja	046	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Rosario)
46Cu	Española roja	118	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Española	Cuba (Viñales)



## Propuesta a Premio Academia de Ciencias de Cuba

continuación.....

ID.	MATERIAL VEGETAL	No. BG.	GÉNERO	ESPECIE	GRUPO HORTICULTURAL	PROCEDENCIA
47Cu	Española roja	077	Ananas	comosus	Española	Cuba (Aguada)
48Cu	Española roja	073	Ananas	comosus	Española	Cuba (Abreus)
49Cu	Piña blanca	071	Ananas	comosus	Pernambuco	Cuba (Rodas)
50Cu	Cayena lisa	072	Ananas	comosus	Cayena	Cuba (Rodas)
51Cu	Española roja	070	Ananas	comosus	Española	Cuba (Rodas)
52Cu	Cayena lisa	042	Ananas	comosus	Cayena	Cuba (Ceiba del Agua)
53Cu	Española roja	134	Ananas	comosus	Española	Cuba (Bolondrón)
54Cu	<i>Cryptanthus acaulis</i>	-	<i>Cryptanthus</i>	<i>acaulis</i>	-	Cuba (Cotorro)
56Cu	<i>Aechmea fasciata</i>	-	<i>Aechmea</i>	<i>fasciata</i>	-	Cuba (Cotorro)
59Cu	Española roja del Caney	007	Ananas	comosus	Española	Cuba (Caney)
60Cu	Cubana del Caney	041	Ananas	comosus	Pernambuco	Cuba (Caney)
61Cu	Española roja Colorada del Caney	003	Ananas	comosus	Española	Cuba (Caney)
63Cu	Española roja	023	Ananas	comosus	Española	Cuba (Niceto Pérez)
64Cu	Española roja	081	Ananas	comosus	Española	Cuba (Colombia)
67Cu	Cayena lisa	121	Ananas	comosus	Cayena	Cuba (Nueva Gerona)
68Cu	Española roja	084	Ananas	comosus	Española	Cuba (Arabos)
69Cu	Piña de ratón	058	<i>Bromelia</i>	<i>pinguin</i>	-	Cuba (La Habana)
70Cu	Piña blanca	065	Ananas	comosus	Pernambuco	Cuba (Baracoa)
2	Española roja Nozerán		Ananas	comosus	Española	Nozerán
6	Española roja Jíbara del Caney		Ananas	comosus	Española	Cuba (Caney)
10	Española roja M 25		Ananas	comosus	Española	Cuba (Radiaciones 35Gy)
11	Española roja Enana		Ananas	comosus	Española	Cuba (var. somaclonal)
13	Cayena lisa de Oriente		Ananas	comosus	Cayena	Cub
14	Cayena de Martinica		Ananas	comosus	Cayena	Martinica
17	Cayena de Kenia		Ananas	comosus	Cayena	Kenia
18	Cayena de México		Ananas	comosus	Cayena	México
19	Cayena de Panamá		Ananas	comosus	Cayena	Panamá
20	Cayena de Rep. Dominicana		Ananas	comosus	Cayena	República Dominicana
21	Cayena de Sao Tomé y Príncipe		Ananas	comosus	Cayena	Sao Tomé y Príncipe
22	Cayena de Ecuador		Ananas	comosus	Cayena	Ecuador
24	Mocaena		Ananas	comosus	?	Cuba
26	Primavera		Ananas	comosus	Mordilona	Brasil
27	Piña Blanca del Caney		Ananas	comosus	Pernambuco	Cuba (Caney)
28	Pomare		Ananas	comosus	?	Brasil
31	var. Típicus		Ananas	comosus	?	Brasil
34	Española roja (1)		Ananas	comosus	Española	Cuba
35	Española roja (3)		Ananas	comosus	Española	Cuba
36	Española roja (8)		Ananas	comosus	Española	Cuba
37	Española roja (9)		Ananas	comosus	Española	Cuba
38	Española roja (10)		Ananas	comosus	Española	Cuba
39	Española roja (12)		Ananas	comosus	Española	Cuba
40	Española roja (12A)		Ananas	comosus	Española	Cuba
41	Española roja (15)		Ananas	comosus	Española	Cuba
43	Cayena de Francia 921		Ananas	comosus	Cayena	Francia
44	Híbrido cxe 202		Ananas	comosus	Híbrido CxE	Cuba (Prog. de mejora)
45	Híbrido cxe 203		Ananas	comosus	Híbrido CxE	Cuba (Prog. de mejora)
46	Híbrido cxe 287		Ananas	comosus	Híbrido CxE	Cuba (Prog. de mejora)
47	Piña criolla		Ananas	comosus	Española	Cuba
48	Cayena Melba		Ananas	comosus	Cayena	Cuba (Holguín)
49	Española roja (I-122)		Ananas	comosus	Española	Cuba
50	Española roja		Ananas	comosus	Española	Cuba

continuación.....

ID.	MATERIAL VEGETAL	No. BG.	GÉNERO	ESPECIE	GRUPO HORTICULTURAL	PROCEDENCIA
51	Española roja (I-126)		Ananas	comosus	Española	Cuba
52	Española roja (I-127)		Ananas	comosus	Española	Cuba
53	Española roja (I-128)		Ananas	comosus	Española	Cuba
54	Española roja (I-129)		Ananas	comosus	Española	Cuba
55	Española roja (I-130)		Ananas	comosus	Española	Cuba
56	Española roja (I-131)		Ananas	comosus	Española	Cuba
57	Híbrido 1339		Ananas	comosus	Híbrido CxE	Cuba (Prog. de mejora)

\* genotipo no incluido en la caracterización molecular; No.BG.-número de entrada en el banco de germoplasma, ID.-número utilizado para la identificación del material, var.-variedad, Stgo.- Santiago y prog.-programa

Las recolectas se desarrollaron en varias etapas de investigación, durante los años 1997 - 2010, con la colaboración del Centro de Bioplasmas, del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de Holguín, de varias instancias del MINAG, el MES, el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, la ANAP, el Poder Popular de los diferentes territorios visitados y la UNAH. Se prospectaron varias provincias de las tres regiones, cada material colectado fue introducido en el banco de germoplasma. Para el registro de las accesiones se elaboró un formulario con los principales datos pasaporte, botánicos, geográficos, edafológicos, entre otros (Anexo 1). Cada accesión se clasificó de forma preliminar de acuerdo a los grupos hortícolas a los que pertenecían.

**Análisis de datos:** se determinó el porcentaje de los cultivares según el grupo hortícola, de las tres regiones del país y la composición del banco de germoplasma respecto a la procedencia de las accesiones (cubanas y foráneas), mediante el programa Microsoft Excel.

## 2.2. Caracterización fenotípica del germoplasma *ex situ* de piña y especies afines

La caracterización de la colección *ex situ* se realizó entre los años 2000 – 2012. Se tuvieron en cuenta tanto caracteres cualitativos como cuantitativos.

### 2.2.1. Caracterización morfológica del germoplasma

Para la caracterización morfológica del germoplasma cubano se evaluaron 10 descriptores (IBPGR, 1991) (Tabla 2). Las observaciones se realizaron en la hoja D, según lo recomendado en el cultivo por Py *et al.* (1987) y Bartholomew *et al.* (2002), en cinco plantas de cada una de las accesiones en estudio.

Un primer análisis comprendió todas las accesiones, pero debido a las limitaciones morfológicas relacionadas con las características particulares de fructificación de las seis especies afines, no fueron incluidas en el análisis morfológico, por lo que solo se realizó en 48 accesiones (cultivares, híbridos y variantes somaclonales) de la colección.

**Tabla 2.** Descriptores morfológicos evaluados en la colección *ex situ*.

No. IBPGR	DESCRIPTOR	No. IBPGR	DESCRIPTOR
4.1	<b>Vegetativos</b>	4.3.12	Color externo del fruto
4.1.8	Color de las hojas	4.3.10	Profundidad de los ojos
4.1.9	Presencia de <u>piping</u>	4.3.20	Forma de los ojos
4.1.15	Distribución de las espinas	4.4	<b>Pulpa</b>
4.1.18	Dirección de las espinas	4.4.2	Color de la pulpa
4.3	<b>Fruto</b>	4.5	<b>Corona</b>
4.3.3	Forma del fruto	4.5.9	Número de coronas

**Análisis de datos:** para el análisis de los datos cualitativos se realizó un Escalado óptimo, en el que se empleó el Análisis de Componentes Principales Categóricos (CATACP) para seleccionar los descriptores de mayor contribución en los estudios de caracterización morfológica y obtener la matriz de distancias a utilizar en el análisis de conglomerados (Navarro *et al.*, 2010). El criterio de selección de autovectores que se siguió fue el de los valores más próximos al mayor valor y la contribución en porcentaje de cada eje a la variabilidad total (Fundora *et al.*, 1992). La identificación de los grupos hortícolas, se hizo a través del análisis de conglomerados, aplicado a las Componentes Principales resultantes del CATACP. Se utilizó la matriz de Distancias Euclidianas al cuadrado y el método de Ward como forma de agregación jerárquica ascendente (Franco *et al.*, 2005). La línea de corte para la formación de las clases se estableció en base al criterio del investigador (Núñez *et al.*, 2004; Núñez y Escobedo, 2011). El procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS ver.16 (SPSS, 2002) y los valores de remuestreo se determinaron con el paquete estadístico PAST ver.2.12 (Hammer *et al.*, 2001).

En el carácter cualitativo “distribución de espinas” fue necesario introducir modificaciones al Listado de Descriptores para piña (IBPGR, 1991), pues se detectó que un grupo de accesiones mostraron rangos de variación dentro de los estados de los caracteres, que no estaban contemplados en dicho listado. A estos caracteres se le asignó un número específico que permitiera incluirlo como un estado intermedio para el carácter evaluado. El resto de los caracteres analizados (Tabla 2) fueron fácilmente identificables por el número de cada estado que aparece en el descriptor.

## 2.2.2. Evaluación agronómica del germoplasma

Para la caracterización agronómica del germoplasma cubano de piña, se evaluaron 17 descriptores (IBPGR, 1991) (Tabla 3). Las observaciones se hicieron en cinco plantas de cada una de las 48 accesiones seleccionadas para el estudio (cultivares, híbridos y variantes somaclonales), más seis especies afines de la colección.

**Tabla 3.** Descriptores agronómicos evaluados en la colección *ex situ*.

No. IBPGR	DESCRIPTOR
4.1	<b>Vegetativos</b>
4.1.3	Altura de la planta (cm)
^	Diámetro de la planta (cm) Se midió con una cinta métrica tomando como punto de referencia las hojas más largas.
4.1.11	Longitud de la hoja D (cm)
4.1.13	Ancho de la hoja D (cm)
4.3	<b>Fruto</b>
4.3.4	Masa del fruto con corona (g)
4.3.5	Longitud del fruto (cm)
4.3.6	Diámetro del fruto (cm)
4.3.22	Número de espirales
4.3.27	Número de ojos en la espiral más larga
6.4	<b>Pulpa</b>
6.4.4	Masa del fruto sin corona (g)
6.4.6	Diámetro del corazón (cm)

Continuación.....

No. IBPGR	DESCRIPTOR
^	Relación masa de la corona/masa del fruto Una vez determinada la masa de la corona y la del fruto, se calculó la relación entre ambas.
6.5	<b>Corona</b>
6.5.5	Longitud de la corona (cm)
6.5.6	Masa de la corona (g)
6.8	<b>Composición química</b>
6.8.2	Total de sólidos solubles (°Brix)
6.8.4	Acidez total
6.8.11	Contenido de ácido ascórbico (Vit. C)

^ Estos caracteres no están recogidos por el IBPGR, pero fueron evaluados por la importancia que merecen para la discriminación de los materiales cubanos

**Análisis de datos:** para seleccionar los descriptores cuantitativos de mayor contribución en la evaluación agronómica, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), basado en la matriz de correlación de Pearson y se utilizó como criterio de selección de autovectores lo recomendado por Fundora *et al.* (1992).

Los caracteres de menor contribución en los análisis iniciales (masa del fruto con corona, masa de la corona y contenido de Vit. C), fueron eliminados, no se consideraron ni en este ni en los siguientes análisis por su poco aporte a la variabilidad. Con los restantes caracteres, se realizó la evaluación agronómica. A partir de la matriz de correlación obtenida del ACP se realizó el análisis de conglomerados para la identificación de los grupos hortícolas de piña, se siguió el mismo procedimiento que en la caracterización morfológica (2.2.1.).

#### - Principales características de los grupos hortícolas de piña a partir de la integración de los caracteres morfoagronómicos

A partir de los resultados de la caracterización morfológica y agronómica se realizó la descripción de las principales características de cada grupo hortícola.

#### 2.2.3. Selección de Descriptores Mínimos

Los descriptores previamente seleccionados en los acápites 2.2.1. y 2.2.2. (ocho morfológicos y 14 agronómicos, para un total de 22), se utilizaron para el establecimiento del Listado de Descriptores Mínimos de la colección.

**Análisis de datos:** para seleccionar los descriptores mínimos se siguió el mismo procedimiento que en el análisis morfológico (acápite 2.2.1.).

#### 2.3. Diversidad genética mediante los marcadores moleculares AFLP, RAPD y SSR

**Material vegetal:** se utilizaron hojas jóvenes de plantas visiblemente sanas de 39 accesiones para el marcador molecular tipo AFLP y 57 para RAPD y SSR.

**Aislamiento del ADN genómico:** el aislamiento del ADN genómico se realizó mediante dos vías la del protocolo de Kobayashi *et al.* (1998) con algunas modificaciones y por el Kit de extracción DNeasy® de QIAGEN. La calidad y concentración del ADN se verificó en gel de agarosa al 0,8%. La concentración se estimó visualmente por comparación con una serie de

estándares de concentraciones (de 100-1000 ng.µL<sup>-1</sup>), las muestras se llevaron a una concentración de 500 ng.µL<sup>-1</sup> para el marcador AFLP y 25 ng.µL<sup>-1</sup> para RAPD y SSR.

**Análisis de datos:** con la matriz binaria generada en cada marcador se determinó la similitud genética entre los genotipos estudiados, mediante el coeficiente de Dice (1945), derivado de las propiedades de los alelos muestreados y de las similitudes genéticas entre las entradas, que se calcula mediante la fórmula:  $S = [2N_{11} / (2N_{11} + N_{10} + N_{01})]$ . Donde,  $N_{11}$  es el número de fragmentos presentes en ambos individuos,  $N_{10}$  es el número de fragmentos presentes en el individuo i y  $N_{01}$  en el individuo j; con los valores obtenidos se construyó una matriz de similitud. Los genotipos de piña estudiados se agruparon en base a sus relaciones de similitud genética con el Método de las medias aritméticas por grupo no ponderadas (UPGMA), a partir de la matriz de similitud obtenida de la proporción de fragmentos comunes (Nei y Li, 1979). La línea de corte para la formación de las clases se estableció en base al criterio del investigador (Núñez *et al.*, 2004; Núñez y Escobedo, 2011). Para medir la calidad de la clasificación del dendrograma, se calculó el coeficiente de correlación cofenética después de la construcción de la matriz cofenética; con la que se hizo la bondad del ajuste entre la matriz de similitud original obtenida al aplicar el Análisis de Conglomerados (Londoño *et al.*, 2007). Estos cálculos se efectuaron a través del paquete estadístico NTSYS-pc ver.2.11 [Exeter Software, Stauket; NY., EE.UU. (Rohlf, 2001)]. La fiabilidad de los grupos obtenidos en el dendrograma se evaluó mediante el análisis de remuestreo (*bootstrap*) (2000 réplicas) con el paquete estadístico TREECON ver.1.3b (van de Peer y De Wachter, 1994).

Para el marcador molecular tipo SSR también se le determinó a cada *locus* microsatélite la composición alélica de cada genotipo y el número total de alelos y los siguientes parámetros de diversidad:

- Frecuencia de los alelos (considerando  $p \leq 0,05$  y  $p \geq 0,9$  como alelos raros y fijados en la población respectivamente)
- Número de alelos por locus (A)
- Heterocigosidad observada ( $H_o$ , mediante recuento directo)
- Heterocigosidad esperada [ $H_e = 1 - \sum p_i^2$  donde  $p_i$  es la frecuencia de alelo  $i^{th}$  (Nei, 1973)]
- Número efectivo de alelos ( $N_e = 1/(1-H_e)$ )
- Índice de fijación de Wright ( $F = 1 - H_o/H_e$ ) (Wright, 1951)
- Probabilidad de identidad ( $PI = 1 - \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$ , donde  $p_i$  y  $p_j$  son las frecuencias de alelos  $i^{th}$  y  $j^{th}$  respectivamente). Determina la probabilidad de que dos genotipos diploides escogidos al azar, presenten el mismo perfil genético, es decir, que compartan los mismos alelos, y por tanto, sean idénticos (Paetkau *et al.*, 1995).
- Desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), con una probabilidad de  $p \leq 0,01$  para cada loci, las cuales fueron analizadas según el método de la Cadena de Markov (Markov, 1971).

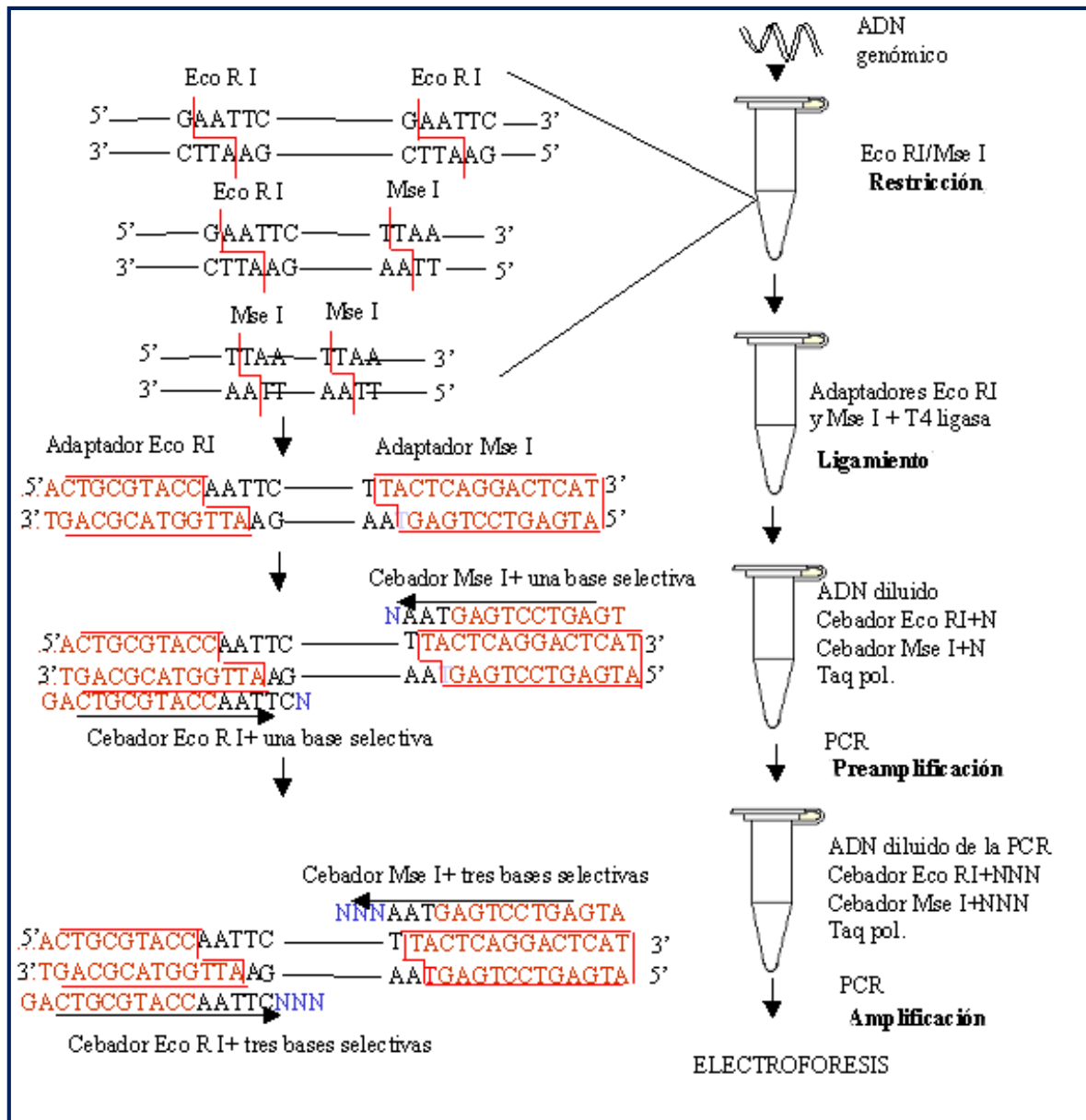
Para estos cálculos fueron utilizados distintos paquetes estadísticos, donde: el paquete ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005) se aplicó para el cálculo de A,  $H_o$ ,  $H_e$ , frecuencias de los alelos y desviaciones del HEW; el paquete POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) para  $N_e$  y F; y finalmente la PI se determinó mediante el paquete IDENTITY 1.0 (Wagner y Sefc, 1999). Por normas de los paquetes estadísticos, el genotipo poliploide (15Cu Cabezona) no fue incluido en el procesamiento de los datos mediante ARLEQUIN 3.01, POPGENE 1.32 e IDENTITY 1.0.

### 2.3.1. Diversidad genética mediante el marcador tipo AFLP

La técnica de AFLP se realizó según las descripciones de Vos *et al.* (1995). Esta técnica consta de las siguientes etapas (Fig. 1): restricción del ADN con las enzimas Eco RI y Mse I, ligamiento de adaptadores, preamplificación con una base selectiva, amplificación con tres bases selectivas, electroforesis y revelado de los fragmentos amplificados.

**Digestión del ADN genómico:** la mezcla de digestión (50  $\mu$ L) contenía 500 ng de ADN genómico, 0,2 U. $\mu$ L<sup>-1</sup> Eco RI, 0,2 U. $\mu$ L<sup>-1</sup> Mse I y 1X buffer RL [10 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HAc (pH 7,5), 10 mmol.L<sup>-1</sup> MgAc, 50 mmol.L<sup>-1</sup> KAc y 5 mmol.L<sup>-1</sup> ditiotretol]; y se incubó durante 4 h a 37°C.

Adaptador Eco RI	Adaptador Mse I
5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	3'-TACTCAGGACTCAT-5'



**Figura 1.** Descripción de las etapas involucradas en el desarrollo de la técnica de AFLP. El panel izquierdo muestra los procesos que ocurren a nivel molecular y el derecho, detalles del protocolo.



**Ligamiento de adaptadores:** a la mezcla de ADN digerido se le añadieron 10  $\mu\text{L}$  de solución de ligación [0,5  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  adaptador Eco RI, 5  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  adaptador Mse I, 1,2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP, 1X buffer RL y 0,1  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de la enzima T4 ADN ligasa. La mezcla se incubó toda la noche a 16°C.

**Preamplificación con base selectiva:** se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de ligación y se diluyeron en 38  $\mu\text{L}$  de agua (dilución 1:20). Esta solución fue el sustrato de las reacciones de amplificación. Para ello se utilizaron cebadores con una región complementaria a la región arbitraria del adaptador y otra al sitio de corte reconocido por la enzima, más un nucleótido arbitrario. Para la realización de este paso se prepararon dos mezclas por separado: la mezcla 1 (25  $\mu\text{L}$ ) contenía los cebadores Eco RI (3  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y Mse I (3  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y los dNTPs (0,8  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). La mezcla 2 (20  $\mu\text{L}$ ) contenía la Taq polimerasa (0,05  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y el buffer de PCR (1X). La mezcla final de la PCR quedó constituida por la mezcla 1 (25  $\mu\text{L}$ ), la mezcla 2 (20  $\mu\text{L}$ ) y 5  $\mu\text{L}$  de ADN diluido (1:20) de la ligación. Se realizaron 20 ciclos: 94°C (30 s), 56°C (60 s) y 72°C (60 s). Al final se realizó dilución de 1:20. Los cebadores utilizados para la preamplificación fueron EcoRI+A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') y Mse I+A (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3').

**Amplificación selectiva:** se preparó la siguiente mezcla (10  $\mu\text{L}$ ): 12,5  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  cebador Eco RI, 0,5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  enzima T4 Kinasa, 1X buffer de la kinasa, y 0,33  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP. Luego de incubarlo 1 h a 37°C, la enzima se inactivó por calor (65°C por 10 min).

Para la amplificación se prepararon dos mezclas: primera mezcla (5  $\mu\text{L}$ ) compuesta por 0,5  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior Eco RI (marcado radiactivamente con anterioridad), 6  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  Mse I y 0,8  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs. La segunda mezcla (10  $\mu\text{L}$ ) compuesta por 0,1  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  Taq polimerasa y 2X del buffer de PCR. Para realizar la PCR se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  del ADN preamplificado diluido 1:20, 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla 1 y 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla 2. Se siguió el siguiente programa: un ciclo a 94°C (30 s), 65°C (30 s) y 72 °C (60 s), disminución de la temperatura de alineamiento desde 65°C hasta 56°C durante 13 ciclos (0,7°C como promedio por ciclo) y 23 ciclos a 94°C (30s), 56°C (30 s) y 72°C (60 s). En este paso se utilizaron cuatro combinaciones de cebadores para esta amplificación. Ellas fueron EcoRI+ AAT con MseI+ AAG, ATG, AGT o ACC. Estas combinaciones resultaron las más polimórficas en un ensayo preliminar con otras seis combinaciones adicionales (datos no mostrados).

**Electroforesis:** después de la PCR se añadió buffer de carga [10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ácido etilendiaminotetracético, formamida (98%), bromofenol azul (0,06%) y xileno cianol (0,06%)], se preparó un gel de poliacrilamida 6% [19:1 acrilamida: bis acrilamida, urea (7,5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y buffer TBE (1X)], se desnaturalizaron las muestras a 95°C por 5 min y se colocaron en hielo rápidamente para evitar la renaturalización. Se cargaron en el gel y se realizó la corrida (preelectroforesis) por 20-30 min hasta que la intensidad bajó hasta 35 mA. Se cargaron las muestras y se corrieron alrededor de 3 h. Luego se secó el gel y se expuso a un filme de rayos X (Kodak) toda la noche a -80°C.

**Digestión del ADN genómico:** se preparó una mezcla de digestión 50  $\mu\text{L}$  que contenía 500 ng de ADN genómico, 0,2  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de Eco RI, 0,2  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de Mse I, buffer RL (1X) [Tris-HAc (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a pH 7,5; MgAc (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), KAc (50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y ditiotritol (5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )]. Se incubó durante 4 h a 37°C.

**Ligamiento de adaptadores:** a la mezcla de ADN digerido se le añadió 10  $\mu\text{L}$  de solución de ligación: adaptador Eco RI (0,5  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), adaptador Mse I (5  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), ATP (1,2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), buffer RL (1X), y la enzima T4 ADN ligasa (0,1  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Esta mezcla se incubó toda la noche a 16°C. La secuencia de los adaptadores empleados fue la siguiente:

**Preamplificación con base selectiva:** se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de ligación y se diluyeron en 38  $\mu\text{L}$  de agua (dilución 1:20). Esta solución fue el sustrato de las reacciones de amplificación. Para ello se utilizaron cebadores que poseen una región complementaria a la región arbitraria del adaptador y otra, al sitio de corte reconocido por la enzima, más un nucleótido arbitrario. En este paso se prepararon dos mezclas por separado: 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla 1 que contenía los cebadores Eco RI (3  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y Mse I (3  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y el *pool* de desoxirribonucleótidos (0,8  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); y 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla 2 que contenía Taq polimerasa (0,05  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), y el buffer de PCR (1X). La mezcla final de PCR se preparó de la manera siguiente: 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla 1, 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla 2 y 5  $\mu\text{L}$  de ADN diluido (1:20) de la ligación. Se realizaron 20 ciclos: 94°C (30 s), 56°C (60 s) y 72°C (60 s). Al final realizó una dilución de 1:20. Los cebadores utilizados para la preamplificación fueron EcoRI+A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') y Mse I+A (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3').

**Amplificación selectiva:** el cebador Eco RI se había marcado radiativamente con anterioridad. Para ello se preparó la siguiente mezcla (10  $\mu\text{L}$ ): cebador Eco RI (12,5  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), enzima T4 Kinasa (0,5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), buffer de la kinasa (1X), y  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP (0,33  $\mu\text{Ci}$ ). Luego de incubar 1 h a 37°C, la enzima se inactivó por calor (65°C por 10 min). Para la amplificación se prepararon dos mezclas. Una primera mezcla (5  $\mu\text{L}$ ) contuvo los cebadores Eco RI marcado (0,5  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior) y Mse I (6  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y el *pool* de desoxirribonucleótidos (0,8  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). La segunda mezcla (10  $\mu\text{L}$ ) contenía la Taq polimerasa (0,1  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y el buffer de PCR (2X). Para realizar el PCR se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  del ADN preamplificado diluido 1:20, 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla 1 y 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla 2. Por último se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando el siguiente programa: un ciclo a 94°C (30 s), 65°C (30 s) y 72°C (60 s), disminución de la temperatura de alineamiento desde 65°C hasta 56°C durante 13 ciclos (0,7°C como promedio por ciclo) y 23 ciclos a 94°C (30 s), 56°C (30 s) y 72°C (60 s).

En este paso se utilizaron cuatro combinaciones de cebadores para esta amplificación. Ellas fueron EcoRI+ AAT con MseI+ AAG, ATG, AGT o ACC. Estas combinaciones resultaron las más polimórficas en un ensayo preliminar con otras seis combinaciones adicionales (datos no mostrados).

**Electroforesis:** después de la PCR se añadió buffer de carga (ácido etilendiaminotetracético [10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , formamida (98%), bromofenol azul (0,06%) y xileno cianol (0,06%)] y se preparó un gel de poliacrilamida al 6% [19:1 acrilamida: bis acrilamida), urea (7,5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), buffer TBE (1 X)], se desnaturalizaron las muestras a 95°C por 5 min y se colocaron en hielo rápidamente para evitar la renaturalización. Se cargaron en el gel y se realizó una corrida (preelectroforesis) por 20-30 min hasta que la intensidad bajó hasta 35 mA. Se cargaron las muestras y se corrió por alrededor de 3 h. Luego se secó el gel y se expuso a un filme de rayos X (Kodak) toda la noche a -80°C. Los autorradiogramas se analizaron visualmente y se construyó una matriz binaria donde uno representa la presencia de la banda y cero, su ausencia.

### 2.3.2. Diversidad genética mediante el marcador tipo RAPD

#### A) Selección de los cebadores de mayor polimorfismo

Se probaron 93 cebadores decaéricos (Anexo 2) de Operon Technologies (Alameda CA, EE.UU.) y de Genosys Biotechnologies, Inc. (The Woodlands, TX, EE.UU.), con el ADN genómico de cuatro genotipos de piña morfológicamente diferentes ('Cabezona', 'MD-2', 'Cayena lisa' y 'Española roja'), según lo informado por la literatura (Morton, 1987; Bartholomew *et al.*, 2002). Para eliminar las variaciones en cada electroforesis y asegurar las bandas polimórficas seleccionadas, las reacciones se repitieron dos veces.

**Preparación de la mezcla maestra:** la mezcla de amplificación, para un volumen total de 15  $\mu\text{L}$ , estaba compuesta de 1X buffer (10X) [160 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 670 mM Tris-HCl (pH 8,8)]; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1 mM dNTPs (1 mM); 10 pmoles de cebadores (10 pmoles. $\mu\text{L}^{-1}$ ); 1U Taq polimerasa (5 u. $\mu\text{L}^{-1}$ ) BioTaq<sup>TM</sup> (Bioline, London, UK); 25 ng de ADN genómico y el resto a completar con agua.

**Amplificación (PCR):** las reacciones se realizaron en un termociclador PCT-100 Peltier, MJ Research Incorporated (San Francisco, EE.UU.). Se siguió un programa de 3 h aproximadas de duración, con el siguiente perfil de temperatura: un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; seguida de 35 ciclos, compuestos por una etapa de desnaturalización de 30 s a 94°C, una de hibridación a 36°C durante 30 s y una extensión a 72°C durante 1 min, la finalización del programa se hizo con un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

**Separación de los productos RAPD:** los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal, en gel de agarosa al 2,5% (1,25% de NuSieve<sup>®</sup>GTG<sup>®</sup> y 1,25% de Seakem<sup>®</sup>GTG<sup>®</sup>), en buffer 1X TBE. Se corrieron en cámara electroforética, a temperatura ambiente y a 80 V, con el marcador de peso molecular (pBR322 ADN – BstN I Digest). Previo a la carga del gel, se añadió a las amplificaciones 2,0  $\mu\text{L}$  de tinción como tampón de carga azul de bromofenol y Ficoll 400 (20%).

**Visualización de los productos:** para la visualización de los fragmentos amplificados del ADN, el gel se tiñó con solución de bromuro de etidio (0,75  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (312 nm). Los productos amplificados se fotografiaron y se analizaron visualmente; solamente fueron evaluadas las bandas polimórficas nítidas, a las que se le asignó valor “0” en ausencia y “1” en presencia, para crear una matriz de datos binarios. Se seleccionaron los cebadores más polimórficos del análisis de los datos moleculares mediante la metodología propuesta por Guzmán (2005).

#### **B) Amplificación del ADN de las accesiones de la colección con los cebadores de mayor polimorfismo**

La amplificación del ADN de las accesiones de la colección, se realizó con los siete cebadores RAPD de mayor polimorfismo. Se siguió la metodología descrita en inciso A) del presente acápite. Para eliminar las variaciones en cada electroforesis y asegurar las bandas polimórficas seleccionadas, las reacciones se repitieron dos veces.

#### **2.3.3. Diversidad genética mediante el marcador tipo SSR**

Con el objetivo de aumentar el número de marcadores disponibles y poder diferenciar los genotipos de la colección, se llevó a cabo un estudio mediante la técnica SSR.

##### **A) Diseño de cebadores SSR**

En una primera aproximación se utilizaron los marcadores microsatélites publicados en la literatura para *A. comosus* (Kinsuat y Kumar, 2007). Tras los resultados obtenidos, no satisfactorios, se procedió a diseñar nuevos cebadores a partir de las secuencias publicadas de *A. bracteatus*, en el NCBI (Blanc, 2003) y se rediseñaron otros cebadores de las secuencias usadas anteriormente (Anexo 3). El diseño se realizó mediante el paquete estadístico Primer3 ver. 0.4.0 (Steve y Helen, 2000). La nomenclatura utilizada en los cebadores fue: para los modificados “M” y para diferenciar los que se crearon de una misma secuencia “a” o “b”. Para la búsqueda de las secuencias se consultó en la base de datos del NCBI, las secuencias informadas para el género *Ananas* que no coincidieran con los mismos autores del artículo. De un total de 50, se escogieron 20 al azar de *A. bracteatus*, para el diseño de los nuevos cebadores, se siguió el mismo procedimiento anteriormente utilizado y se le asignó la siguiente nomenclatura, las letras ANBR de *A. bracteatus*, y el número

corresponde a los últimos dos dígitos de la secuencia en el banco de genes (NCBI). Por último se comprobaron los cebadores y se seleccionaron los más polimórficos.

**Preparación de la mezcla maestra:** la mezcla de amplificación, para un volumen total de 15 µL estaba compuesta de 1X buffer (10X) [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris-HCl (pH 8,8)]; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM dNTPs (1 mM); 0,4 µM de cada uno de los cebadores (indirecto 3'-5' y directo 5'-3'); 1U Taq polimerasa (5U) Bio Taq™ (Bioline, London, UK); 20 ng de ADN genómico y el resto a completar con agua.

**Amplificación (PCR):** las reacciones se realizaron en termociclador I-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se siguió un programa de 2 h de duración, con el siguiente perfil de temperatura: un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos, los cuales estuvieron compuestos por una etapa de desnaturalización de 30 s a 94°C, una hibridación 30 s a 55°C y una extensión de 1 min a 72°C; la finalización del programa se realizó con un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

**Separación de los productos SSR:** los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa de alta resolución (Metaphor, FMC Bioproducts) al 3% en buffer TBE, en cámara electroforética a 4°C y a 150 Voltios, con un marcador de pesos moleculares HyperLadder I (Bioline) de 20 pb. Previo a la carga del gel, se le añadió a las amplificaciones 5,0 µL tampón de carga.

**Visualización de los productos:** para la visualización de los productos se siguió igual procedimiento que en el acápite 2.3.2., inciso A). Se seleccionaron los cebadores que amplificaron adecuadamente y que detectaron polimorfismo.

#### **B) Amplificación del ADN de las accesiones con los cebadores más polimórficos**

La amplificación del ADN de las accesiones de la colección, se realizó con los 12 cebadores SSR que amplificaron adecuadamente y que detectaron polimorfismo. Se marcó el extremo 5' de la secuencia del cebador directo (5'-3') de cada pareja de cebadores, con los fluorocromos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> de Beckman Clouter (Proligo, Paris, Francia). La preparación de la mezcla maestra y la amplificación de la PCR se realizaron igual que en el presente acápite, inciso A).

**Visualización:** para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados, los productos de la PCR se procesaron mediante electroforesis capilar en un analizador automático de fragmentos CEQ™ 8000 (Beckmann Coulter, Fuellerton, CA, EE.UU.), en el cual las muestras fueron desnaturalizadas a 90°C durante 120 s, inyectadas a 2,0 kV durante 30 s y separadas a 6,0 kV durante 32 min. Para eliminar las variaciones en cada electroforesis y asegurar con exactitud el tamaño de los fragmentos, las reacciones se repitieron dos veces.

#### **2.4. Identificación de las amenazas de erosión genética del germoplasma de piña y acciones para minimizarlas**

Para identificar las amenazas de erosión genética del germoplasma de piña conservado tanto *in situ* como *ex situ*, se utilizó el método de Investigación-Acción-Participación (IAP) (Pérez, 1990; Santos *et al.*, 2011), en el que se consideraron los criterios recogidos en los talleres y entrevistas de 55 actores locales (agricultores) y cinco expertos, durante las prospecciones realizadas en las tres regiones de Cuba entre los años 2000-2012. En la implementación de las propuestas de las acciones para minimizar las amenazas detectadas se tuvieron en cuenta las recomendaciones derivadas de los trabajos de Coppens d'Eeckenbrugge *et al.* (2005) y Barrios (2010).

**Análisis de datos:** se agruparon los criterios emitidos que implicaban amenazas de erosión y se determinó la frecuencia y el porcentaje de cada uno por región geográfica y en el total

del país. Para seleccionar los criterios que mayor incidencia tenían en el estudio, se escogieron los que tenían  $\geq 20\%$  de coincidencia. Los datos fueron procesados por el programa Microsoft Excel.

## **2.5. Conservación del germoplasma a partir de las acciones propuestas para disminuir la pérdida de diversidad genética**

### **2.5.1. Establecimiento y validación de la colección núcleo**

#### **2.5.1.1. Establecimiento de la colección núcleo**

En el establecimiento de la colección núcleo se tuvieron en cuenta las accesiones de la colección cubana, caracterizadas en los acápites anteriores. Los grupos formados a partir del análisis de conglomerados de los Descriptores Mínimos (acápite 2.2.3.) determinaron *a priori* el tamaño de la muestra a tomar o dominio (Franco *et al.*, 2006; Fundora *et al.*, 2006; Fernández, 2009). Para la selección de las accesiones que conformaron la colección núcleo final, se utilizó el método de estratificación (Balakrishnan y Nair, 2003), el cual se basa en la selección sucesiva en cada conglomerado (formado a partir de los descriptores mínimos morfoagronómicos de la colección base). Con los resultados obtenidos en los análisis precedentes, los criterios del curador (Abadie y Berretta, 2005; Fundora *et al.*, 2006) y la representatividad de la procedencia geográfica (van Hintum *et al.*, 2003), se hizo la primera selección de los cultivares a integrar la colección núcleo. La segunda y última selección de las accesiones que integrarán la colección núcleo se realizó teniendo en cuenta el resultado de los análisis moleculares mediante RAPD y SSR. El porcentaje relativo de contribución de cada grupo a la variabilidad total de la colección núcleo se determinó por su diversidad relativa (a mayor o menor presencia) mediante el programa Microsoft Excel.

#### **2.5.1.2. Validación de la propuesta de colección núcleo**

La retención de la diversidad genética en la colección núcleo se verificó teniendo en cuenta las distancia genéticas promedio obtenidas en cada grupo horticultural formado con los dos marcadores moleculares RAPD y SSR y con el promedio de los tres grupos.

La representatividad de la colección núcleo se verificó a partir de la comparación de la variabilidad de los caracteres cuantitativos en relación con la colección base, a través de la determinación del rango de variabilidad promedio retenido para los caracteres, según la metodología propuesta por Diwan *et al.* (1995) con la siguiente expresión:

$$RR = \frac{\sum_{i=1}^t \frac{R_n CC}{R_n CB}}{t}$$

donde  $RR$  es el rango promedio retenido,  $R_n CC$  es el rango de la variable  $n$  en la colección núcleo,  $R_n CB$  es el rango de la variable  $n$  en la colección base, y  $t$  es el número total de variables comparadas. Estas estimaciones se realizaron con el empleo del paquete estadístico Microsoft Excel.

Se calcularon las coincidencias entre las frecuencias de los estados de los descriptores mínimos cualitativos para ambas colecciones (base y núcleo), con el objetivo de comparar el núcleo seleccionado con la colección base. La comparación se efectuó a partir de la estimación del coeficiente de correlación de rangos para datos no paramétricos de Spearman (Steel y Torrie, 1980; Fundora, 2007) mediante el paquete estadístico SPSS 11.5.

#### **2.5.2. Crioconservación del germoplasma**

Se utilizó como material vegetal nueve accesiones provenientes del Banco de germoplasma *in vitro* (15Cu Cabezona, 37Cu Española roja P3R5, 59Cu Española Roja



del Caney, 21Cu Cayena lisa Serrana, 22Cu MD2, 9Cu Puerto Rico, 26 Perolera, 14Cu Piña blanca, 29Cu Piñuela Karata) y se utilizó como modelo 'MD-2', micropropagadas según el protocolo establecido (Daquinta y Benegas, 1997).

**Etapas I. Acondicionamiento de las vitroplantas donantes:** se utilizaron plantas *in vitro* después de cuatro-seis subcultivos, multiplicadas en medio de cultivo líquido con sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 100 mg.L<sup>-1</sup> mioinositol + 2,1 mg.L<sup>-1</sup> BA + 0,3 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 1,0 mg L<sup>-1</sup> Tiamina + 30 g.L<sup>-1</sup> sacarosa (0,08 mol.L<sup>-1</sup>), con un pH del medio justado a 5,6. Las plantas se subcultivaron cada 30 días y crecieron a 27±2°C con fotoperíodo de luz artificial de 18 h.día<sup>-1</sup>, entre 1 500 y 2 000 lux de iluminación.

**Etapas II. Pre-cultivo de ápices:** para determinar el tipo de ápice más adecuado antes y después de inmersión en nitrógeno líquido durante 0-30 min se probaron dos tipos de ápices el ápices tipo I (2,5 - 3 mm de longitud) con una pequeña base apical y tres a cuatro primordios foliares que lo cubrían; ápice tipo II (0,8 - 1,3 mm de longitud) ápices con la base apical pequeña con uno o dos primordios foliares.

La disección del explante se realizó bajo un estéreo microscopio (ACUS SCOPE) en un gabinete de flujo laminar a partir de las vitroplantas. Los ápices se cultivaron durante dos días, cinco ápices por placa de Petri que contenían un medio de cultivo MS semisólido suplementado con 100 mg.L<sup>-1</sup> Mioinositol (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), Tiamina (30 g.L<sup>-1</sup>) y sacarosa 0,08 mol.L<sup>-1</sup>. Se determinaron los efectos del precultivo en sacarosa suplementando con 0,1; 0,3; 0,5 y 0,7 mol.L<sup>-1</sup> de sacarosa, para mejora de la supervivencia de los ápices crioconservados. Posteriormente se determinó el efecto de la solución de carga, para esto se tuvo en cuenta los mejores tratamientos del experimento anterior, donde los explantes precultivados en sacarosa se sometieron a 1 mL de las soluciones de carga (0,4 mol.L<sup>-1</sup> sacarosa+ 2,0 mol.L<sup>-1</sup> glicerol; 0,75 mol.L<sup>-1</sup> sacarosa + 1,0 mol.L<sup>-1</sup> glicerol) en crioviales con capacidad total de 2 mL durante 25 min a 25°C.

### **Etapas III. Deshidratación con la solución vitrificadora**

**PVS2:** a los dos días de precultivo los ápices pasaron a los crioviales (2 mL de volumen total) que contenían 1,5 mL de solución de PVS2 a temperatura ambiente. El material vegetal se mantuvo durante un período de tiempo (0-30 min) a 25°C, para determinar el tiempo de deshidratación en PVS2. Después se determinó el tiempo de deshidratación en PVS2 del material en un periodo de tiempo (0-180 min) a 25°C de acuerdo vegetal según la aplicación de la solución de carga antes y después de la inmersión en nitrógeno líquido. Así como también se realizó la evaluación del número total de grupos OH por siguiente la fórmula:

$$\text{Molaridad} * NA * [OH]$$

donde, NA- Constante de Avogadro 6,022 x 10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>, [OH] grupos OH por molécula.

Para mejorar la supervivencia de los ápices durante la crioconservación se evaluó el efecto de la temperatura, en la que se tuvo en cuenta los mejores tratamientos de los acápites anteriores con las siguientes modificaciones, donde el material vegetal se mantuvo durante un período de tiempo (0-540 min) a 25 y 0°C.

**Etapas IV. Inmersión en nitrógeno líquido:** posteriormente los crioviales se sumergieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron por 2 h en estas condiciones.

**Etapas V. Calentamiento:** el calentamiento de los crioviales se realizó en baño de agua a más de 40°C, durante 2-3 min.

**Etapas VI. Destoxificación (solución de descarga):** la solución vitrificadora PVS2 de los crioviales se reemplazó una vez por 1 mL de una solución de 1,2 mol.L<sup>-1</sup> de sacarosa y se mantuvo durante 30 min a 25°C.



**Etapas VII. Recuperación:** los ápices de los diferentes tratamientos se pasaron a papel de filtro que cubrió la superficie de placas de Petri que contenía el medio de micropropagación pero desprovistos de los reguladores del crecimiento.

**Etapas VIII. Evaluación de supervivencia:** a la semana, los ápices se transfirieron a placas de Petri que contenían medio de micropropagación con idénticas condiciones iniciales  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  y fotoperiodo de luz artificial de  $18\text{ h día}^{-1}$ , entre 1 500 y 2 000 lux de iluminación, durante tres semanas. La evaluación de la supervivencia se realizó según lo establecido por Martínez- Montero (2012), en el que se evaluó el porcentaje de supervivencia, el número de ápices que mostró síntomas de recrecimiento a las cinco semanas de recuperación, para esto se midió su tamaño. Los porcentajes de supervivencia se expresaron con respecto al total de ápices usados por tratamiento.

**- Efecto del precultivo en sacarosa como factor adicional en la mejora de la supervivencia de los ápices crioconservados**

Para mejorar la supervivencia de los ápices durante la crioconservación se evaluó el efecto del precultivo en sacarosa. Se tuvo en consideración el mejor tratamiento del acápite anterior con las siguientes modificaciones: En la Etapa II el medio de precultivo se suplementó con 0,1; 0,3; 0,5 y 0,7 mol.L<sup>-1</sup> de sacarosa. En la Etapa III el material vegetal se mantuvo durante 0 – 60 min a 25°C.

**- Efecto de la solución de carga en la supervivencia de los ápices**

Se evaluó el efecto de la solución de carga teniendo en consideración los mejores tratamientos de los acápites anteriores con las siguientes modificaciones: En la Etapa II los explantes precultivados en sacarosa se sometieron a 1mL de las soluciones de carga (0,4 mol/L sacarosa + 2,0 mol.L<sup>-1</sup> glicerol; 0,75 mol.L<sup>-1</sup> sacarosa + 1,0 mol.L<sup>-1</sup> glicerol) en crioviales con capacidad total de 2,0 mL durante 25 min a 25°C. En la Etapa III el material vegetal se mantuvo durante 0 – 180 min a 25°C.

**- Efecto de la disminución de la temperatura durante la deshidratación de los ápices en PVS2**

Se evaluó el efecto de la temperatura donde se consideraron los mejores tratamientos de los acápites anteriores con las siguientes modificaciones: En la Etapa III el material vegetal se mantuvo durante 0 – 540 min a 25°C y 0°C

**- Efecto de la composición química de la solución vitrificadora**

Se evaluó el efecto de la composición química de la solución vitrificadora en la que se tuvieron en consideración los mejores tratamientos de los acápites anteriores con las siguientes modificaciones: En las etapas que corresponda además del PVS2 se empleó la PVS3 como tratamiento independiente. En la Etapa III el material vegetal se mantuvo durante 0 – 540 min a 0°C.

**- Aplicación del procedimiento de vitrificación**

Para culminar la validación de la estrategia se aplicó el procedimiento de vitrificación para las nueve accesiones, se tuvo en consideración los mejores tratamientos de los acápites anteriores. Además de la supervivencia, se evaluó la formación de brotes a partir de los ápices deshidratados y crioconservados, respectivamente a las seis semanas de incubación.

**- Análisis histológico durante la crioconservación de ápices de piña**

El análisis histológico se realizó a partir de muestras de ápices deshidratados y crioconservados en el cultivar MD2, los cuales fueron sometidos durante 0, 180, 300, 420 y 540 min en la solución vitrificadora PVS3 a 0°C. Se siguió un procedimiento similar en las

muestras las cuales fueron fijadas en solución F.A.A (formol - ácido acético - alcohol etílico) al 5-5-50% (v/v), respectivamente. Se lavaron en agua corriente durante 24 h para eliminar el exceso de fijador. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en concentraciones seriadas de alcohol etílico (30, 50, 70, 80 y 90%) y tres veces por alcohol etílico absoluto, durante 2 h en cada pase. Después del proceso de deshidratación las muestras se aclararon en alcohol- Bensol (50% v/v), Luego se continuó la deshidratación en tres pases de Bensol durante 1 h y finalmente se embebieron en una serie de tres pases de parafina con un período de impregnación de 1 h por pase. Seguidamente se incluyeron en bloques de parafina a los que se le realizaron cortes seriados con un grosor de 20  $\mu\text{m}$ , en un micrótopo manual de deslizamiento vertical. La técnica de tinción utilizada fue la tinción de Flemming (Johansen, 1940).

Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Carl Zeiss al cual se le acopló una cámara digital Canon Power Shot A620, con la que se tomaron las imágenes. Después de realizado el procedimiento de vitrificación, fue validado en nueve accesiones del banco de germoplasma nacional piña (15Cu Cabezona, 37aCu Española roja P3R5, 59Cu Española roja del Caney, 21Cu Cayena lisa Serra, 22Cu MD2, 25 Puerto Rico, 26 Perolera, 14Cu Piña blanca y 29Cu Piñuela Karata); se seleccionaron los mejores tratamientos de los acápite anteriores. Las variables evaluadas fueron la supervivencia de los ápices deshidratados y crioconservados, a las seis semanas de incubación.

**Procesamiento estadístico de los datos:** se realizaron análisis monofactoriales con más de dos niveles, con cinco repeticiones y se aplicó un Diseño completamente aleatorizado. En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el utilitario SPSS ver. 11.5 para Windows (IBM SPSS, 2011). Se comprobó la distribución normal de los datos mediante la prueba de homogeneidad de las varianzas a través de la prueba Levene. Se aplicó a las variables Análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA completamente aleatorizado). Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey HSD  $p < 0,05$ . En algunos casos se necesitó la transformación de datos según  $x' = 2 \arccos(x/100)$  0,5.

### 2.5.3. Propagación *in vitro* de híbridos cubanos conservados en la colección

**Material vegetal:** se utilizó plantas *in vitro* de los híbridos cubanos de piña CBCE-74 y CBCE-116, obtenidos por Benega *et al.* (1999) en el Programa de Biotecnología del Centro de Bioplasmas de Ciego de Ávila.

**Montaje de los experimentos:** en los experimentos se utilizó el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), modificado por Daquinta (1998), el cual constituyó el control para las variantes experimentales. Se modificaron los reguladores del crecimiento, tanto en la fase de multiplicación como en la de enraizamiento. Los tratamientos corresponden a la aplicación de diferentes concentraciones de dos biorreguladores: Pectimorf®, producido por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) y el BB-16 producido por la Facultad de Química de la Universidad de la Habana, combinados con los reguladores del crecimiento empleados por Daquinta (1998). La metodología de trabajo utilizada en cada uno se describe a continuación.

#### 2.5.3.1. Pectimorf® en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido CBCE-116

En la Tabla 4 se muestran los tratamientos de Pectimorf® combinado con los reguladores del crecimiento o solo en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido CBCE-116, para comprobar su efectividad como sustituto parcial o total de los reguladores.

**Tabla 4.** Tratamientos en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido de piña CBCE-116 con el empleo del Pectimorf y los reguladores del crecimiento ANA, 6 BAP y GA<sub>3</sub>.

MULTIPLICACIÓN					ENRAIZAMIENTO				
Tratamientos		ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	6 BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	Pectimorf (mg.L <sup>-1</sup> )	Tratamientos		6 BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Pectimorf (mg.L <sup>-1</sup> )
Control		0,3	2,1	-	Control		0,5	1	-
T1	A			1	T1	A			1
	B	-	-	5		B	-	1	5
	C			10		C			10
T2	A			1	T2	A			1
	B	0,3	2,1	5		B	0,5	-	5
	C			10		C			10
T3	A			1					
	B	0,3	1	5					
	C			10					
T4	A			1					
	B	0,3	0,5	5					
	C			10					

#### 2.5.3.2. Biobras-16 en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido CBCE-74

En la Tabla 5 se muestran los tratamientos de BB-16 combinado con los reguladores del crecimiento o solo en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido CBCE-74, para comprobar su efectividad como sustituto parcial o total de los reguladores.

**Tabla 5.** Tratamientos en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido de piña CBCE- 74 con el empleo de BB-16 y los reguladores del crecimiento ANA, 6 BAP y GA<sub>3</sub>.

MULTIPLICACIÓN					ENRAIZAMIENTO				
Tratamientos		ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	6 BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	BB-16 (mg.L <sup>-1</sup> )	Tratamientos		6 BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	BB-16 (mg.L <sup>-1</sup> )
Control		0,3	2,1	-	Control		0,5	1	-
T1	A	-		0,01	T1	A	-	1	0,01
	B	-	2,1	0,05		B			0,05
T2	A	0,3		0,01	T2	A	0,5	-	0,01
	B		-	0,05		B			
T3	A	0,3	1	0,01					
	B								
T4	A	0,15	2,1	0,01					
	B								
T5	A	0,15	1	0,01					
	B								
T6	A	-	-	0,01					
	B								

**Condiciones del cultivo:** el medio de propagación utilizado fue líquido, 15 mL por frasco a pH 5,8. Se esterilizaron en autoclave por espacio de 20 min a 121°C con 1,5 atmósferas de presión. El almacenamiento de los medios fue por 72 h antes del cultivo de los explantes. Se colocaron cinco brotes por tratamiento y un total de ocho réplicas. Una vez propagado el material vegetal se trasladó a la cámara de cultivo con temperatura de 25± 2°C, humedad

relativa de 80-90%, luz artificial con fotoperiodo de 16 h luz y la intensidad luminosa de  $18,75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . En la fase de multiplicación cada subcultivo se realizó cada 45 días y comenzaron desde el cuarto subcultivo hasta el noveno; en el de enraizamiento no se subcultivaron porque esta etapa solo comprende 45 días.

**Evaluación de los experimentos:** se realizó a los 45 días del subcultivo en la fase de multiplicación y antes del pase a la fase de aclimatización en la de enraizamiento. El tratamiento T4B (ANA  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  + 6 BAP  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  + 5  $\text{mg.L}^{-1}$  Pectimorf) se contaminó por lo que no se evaluó. Las variables evaluadas fueron:

**FASE DE MULTIPLICACIÓN:**

- Coeficiente de multiplicación
- Número de hojas
- Altura de la planta (cm)
- Ancho de las hojas (cm)
- Masa fresca (g)
- Masa seca (g)
- Número de brotes

**FASE DE ENRAIZAMIENTO:**

- Altura de la planta (cm)
- Longitud de las hojas (cm)
- Ancho de las hojas (cm)
- Número de hojas
- Número de raíces
- Longitud de las raíces (cm)
- Masa fresca (g)
- Masa seca (g)

**Análisis de datos:** se procesaron mediante Análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA completamente aleatorizado). Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey HSD  $p < 0,05$  (Zar, 1999). Con los valores de las medias de cada variable se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), por el paquete estadístico SPSS ver. 20 (SPSS, 1986 - 2001). Los valores de las variables coeficiente multiplicación, número de hojas, de brotes y raíces se transformaron mediante la fórmula  $\sqrt{X + 1}$ .

**2.5.3.3. Respuesta del híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización**

La investigación se realizó en el área de aclimatización del Centro Universitario “Vladimir Ilich Lenin”, de la provincia Las Tunas.

**Material vegetal:** plantas *in vitro* del híbrido CBCE-116, con igual tamaño, aproximadamente 5-10 cm.

**2.5.3.3.1. Sustratos**

**Sustratos:** se utilizaron diferentes sustratos Humus de Lombriz, Cachaza y Zeolita en diferentes proporciones (Tabla 6). Se empleó un diseño completamente aleatorizado para comparar las diferentes combinaciones de los sustratos empleados. La plantación se realizó en cajuelas de poliespuma para 50 plantas. El riego se realizó según las exigencias establecidas para esta etapa en el cultivo.

**Tabla 6.** Tratamientos en la etapa de aclimatización del híbrido de piña CBCE- 116.

ACLIMATIZACIÓN			
Tratamientos	Cachaza (%)	Zeolita (%)	Humus de lombriz (%)
T1			100
T2	100		
T3	75	25	
T4	50	50	
T5	50	25	25

Las evaluaciones se realizaron a 35 plantas controles, a excepción de las variables de las hojas y las raíces en las que se trabajo solo con 10 plantas.

**Variables evaluadas:**

**Días a los que se evaluaron**

- Supervivencia: por el método observacional y conteo de plántulas	desde los 7 hasta los 92
- Número de hojas	desde los 7 hasta los 92
- Diámetro del tallo (cm)	92
- Longitud de las hojas (cm)	92
- Ancho de la hoja D Masa fresca (g)	92
- Masa fresca de las hojas (g)	92
- Masa seca de las hojas (g) en estufa durante 72 h a 70°C hasta peso constante.	92
- Longitud máxima y media de las raíces (cm)	92
- Masa fresca de las raíces (g)	92
- Masa seca de las raíces (g)	92

**Análisis de datos:** los datos obtenidos fueron procesados mediante Análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA completamente aleatorizado). Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey HSD  $p < 0,05$  (Zar, 1999). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics plus versión 5.1. Los valores del porcentaje de supervivencia se transformaron mediante la fórmula  $2 \arcsen \sqrt{p}$  donde p: porcentaje de la fracción.

**2.5.3.3.2. Régimen de riego y momento de aplicación**

Las normas de riego de 15 y 20 mL con dosis únicas y fraccionadas que se utilizaron (Tabla 7) fueron productos de los resultados obtenidos en otras especies de plantas *in vitro* en el Proyecto de Alternativas de plantas de interés económico realizado en los años 2001-2003. Las mismas fueron aplicadas en dos momentos, días alternos y diarios, con los dos mejores sustratos del experimento anterior.

- A. Sustrato: Humus de lombriz 100%, Fecha de inicio: 14 de enero de 2010 y terminación: 14 abril de 2010.
- B. Sustrato: Cachaza 100%, Fecha de inicio: 11 de junio de 2010 y terminación: 10 de septiembre de 2010.

**Tabla 7.** Normas y momentos de riego a las vitroplantas de piña en la fase de aclimatización en distintos sustratos.

TRATAMIENTOS/ Norma de agua (mL) y momento		
T1	15	mañana diarios
T2		mañana días alternos
T3	10+5	mañana + tarde diarios
T4		mañana + tarde días alternos
T5	5+10	mañana + tarde diarios
T6		mañana + 1 tarde días alternos
T7	20	mañana diarios
T8		mañana días alternos.
T9	10+10	mañana + tarde diarios
T10		mañana + tarde días alternos
T11	15+5	mañana + tarde diarios
T12		mañana + tarde días alternos
T13	5+15	mañana + tarde diarios
T14		mañana + tarde días alternos

Se controlaron las precipitaciones ocurridas con la ayuda de una lámina de polietileno que impidió que las plantas tomaran más agua que las suministradas a través de las diferentes normas de riego objeto de estudio.

Las evaluaciones se realizaron en 10 plantas de cada tratamiento, desde los 15 hasta 90 días, mediante el método observacional y conteo de las plántulas

**Variables evaluadas:**

- Número de hojas activas

- Diámetro del tallo (cm)

- Longitud y ancho de la hoja D

- Longitud máxima y media de las raíces (cm)

- Masa fresca y seca de las hoja D (g)

- Longitud máxima y media y numero de raíces (cm)

- Masa fresca y seca de las raíces (g)

**Días a los que se evaluaron**

a partir de los 15 hasta los 92 días

90

60-90 días

90

90

90

90

**Análisis de datos:** los datos fueron procesados mediante ANOVA completamente aleatorizado. Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey HSD  $p < 0,05$  (Zar, 1999). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics plus versión 5.1. Los valores del porcentaje de supervivencia se transformaron mediante la fórmula  $2 \arcsen \sqrt{p}$  donde p: porcentaje de la fracción.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Exploración de la diversidad de los recursos fitogenéticos de piña y especies afines

En las prospecciones realizadas en las tres regiones de Cuba, se observó que de los cinco grupos hortícolas establecidos para piña por Py *et al.* (1987), cultivados *in situ*, solo existían tres: Española, Cayena y Pernambuco. En la Tabla 8 se muestra la diversidad, la distribución y los principales cultivares. Como bien se aprecia en esta tabla y en la figura 2, la base genética de la especie es muy pobre, los cultivares del grupo Española fueron los más distribuidos y los más utilizados por los agricultores, por esta razón Española roja se consideró la “reina” de los campos de Cuba. A pesar de que se caracterizan por tener espinas muy agresivas y frutos pequeños, presenta gran rusticidad y adaptabilidad, lo que explica su amplia distribución y aceptables rendimientos.

Los cultivares menos representados fueron de los grupos hortícolas Pernambuco y Cayena. Estos, aunque poseen un fruto con mejor aceptación en el mercado por sus excelentes cualidades, requieren de mayores atenciones culturales y tienen menor rusticidad, lo que hace que los agricultores pierdan interés por cultivarlos. La baja diversidad que se presenta en los recursos fitogenéticos de piña y el predominio del cv. 'Española roja', se corresponde con lo observado en las primeras colectas.

Se pudo constatar que muchos productores tienen un conocimiento limitado sobre el manejo adecuado y los requerimientos del cultivo. Entre las dificultades detectadas se puede mencionar que la densidad de plantación es irregular, en muchos casos emplean una excesiva distancia entre surcos, lo que no sucede con otros cultivos tradicionales como: frijoles, yuca, ajíes, tomate y maíz. No realizan el deshije, el deshoje, lo que limita la entrada en las plantaciones, el apropiado desarrollo de las labores agrotécnicas y de las cosechas, sobre todo en aquellas que cuentan con varios años. En muchas áreas no se induce la floración, lo que afecta negativamente la uniformidad en la fructificación. Las plantaciones eran heterogéneas debido a la mezcla de las fuentes de propágulos del cultivo (Fig. 3) y en ocasiones las establecen en suelos no apropiados debido a sus características de pH ( $\geq 4$  y  $\leq 6,5$ ) y de pobre drenaje y aireación (IIFT, 2009).

Las dificultades relacionadas con las labores culturales del cultivo, se minimizaron a través de la capacitación, talleres y entrega a los productores de folletos técnicos del cultivo elaborado por autora de la investigación. Igual forma de capacitación ha sido recomendada por Barrios (2010), quien a través de talleres en comunidades rurales de Cuba, ha logrado mejorar el trabajo de los agricultores en el manejo y la conservación de cultivares tradicionales de *Capsicum* spp.

Las prospecciones y los intercambios con los agricultores y la comunidad permitieron valorar el estado de la erosión genética presente en *A. comosus* y promover la necesidad de la conservación de los recursos fitogenéticos. Además posibilitaron la actualización de los productores sobre el manejo y conservación del cultivo y la motivación al intercambio de los cultivares 'Barón de Rothschild', 'Cabezona' y 'Piña blanca', que apenas se localizan en determinadas zonas del país y en muy pequeña cuantía. Los intercambios de material vegetal tienen gran importancia, estos según Castiñeiras *et al.* (2000) son vitales en la preservación de la diversidad, tanto para las actuales como para las futuras generaciones.

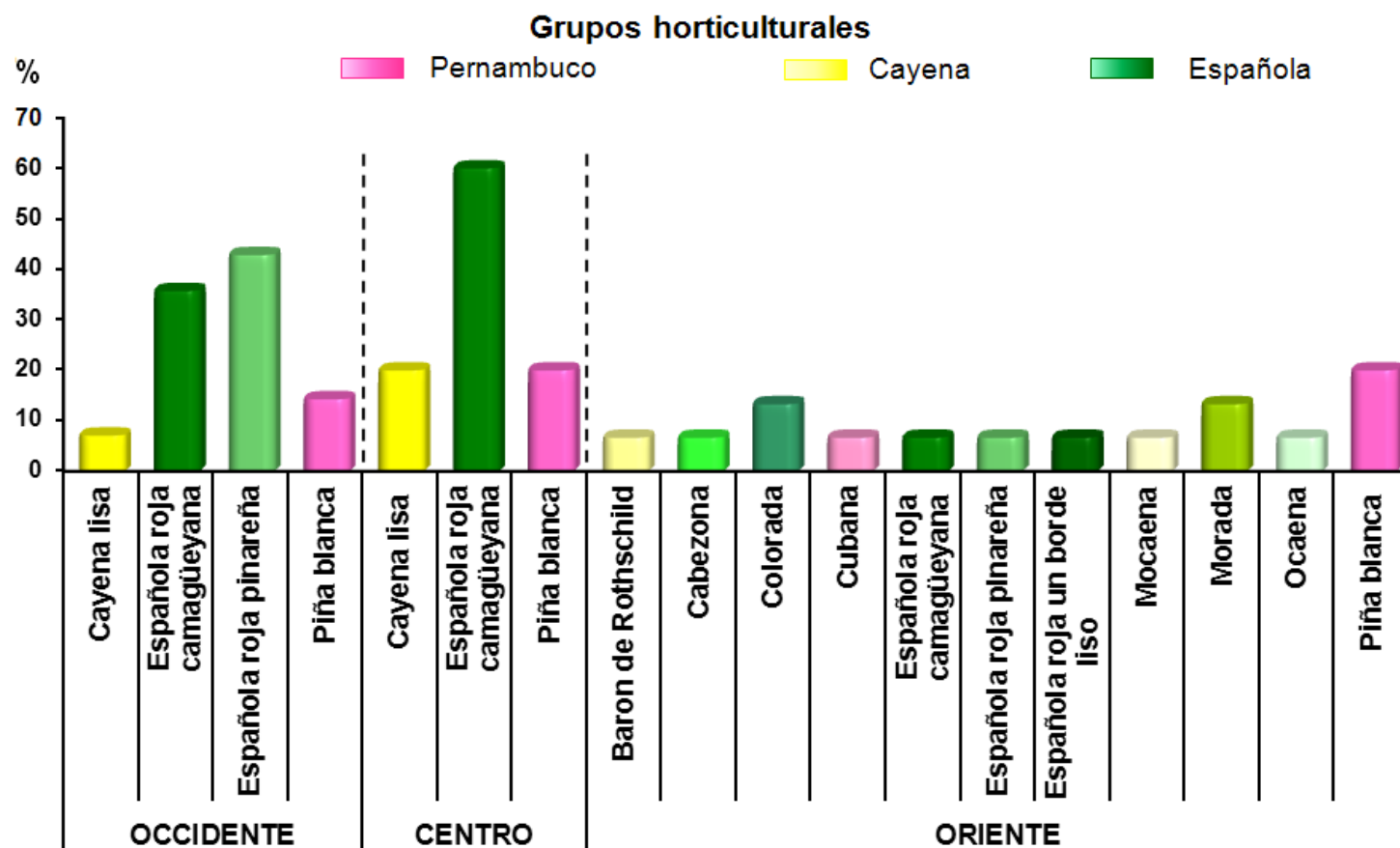


**Tabla 8.** Diversidad, distribución y principales cultivares de piñas colectadas.

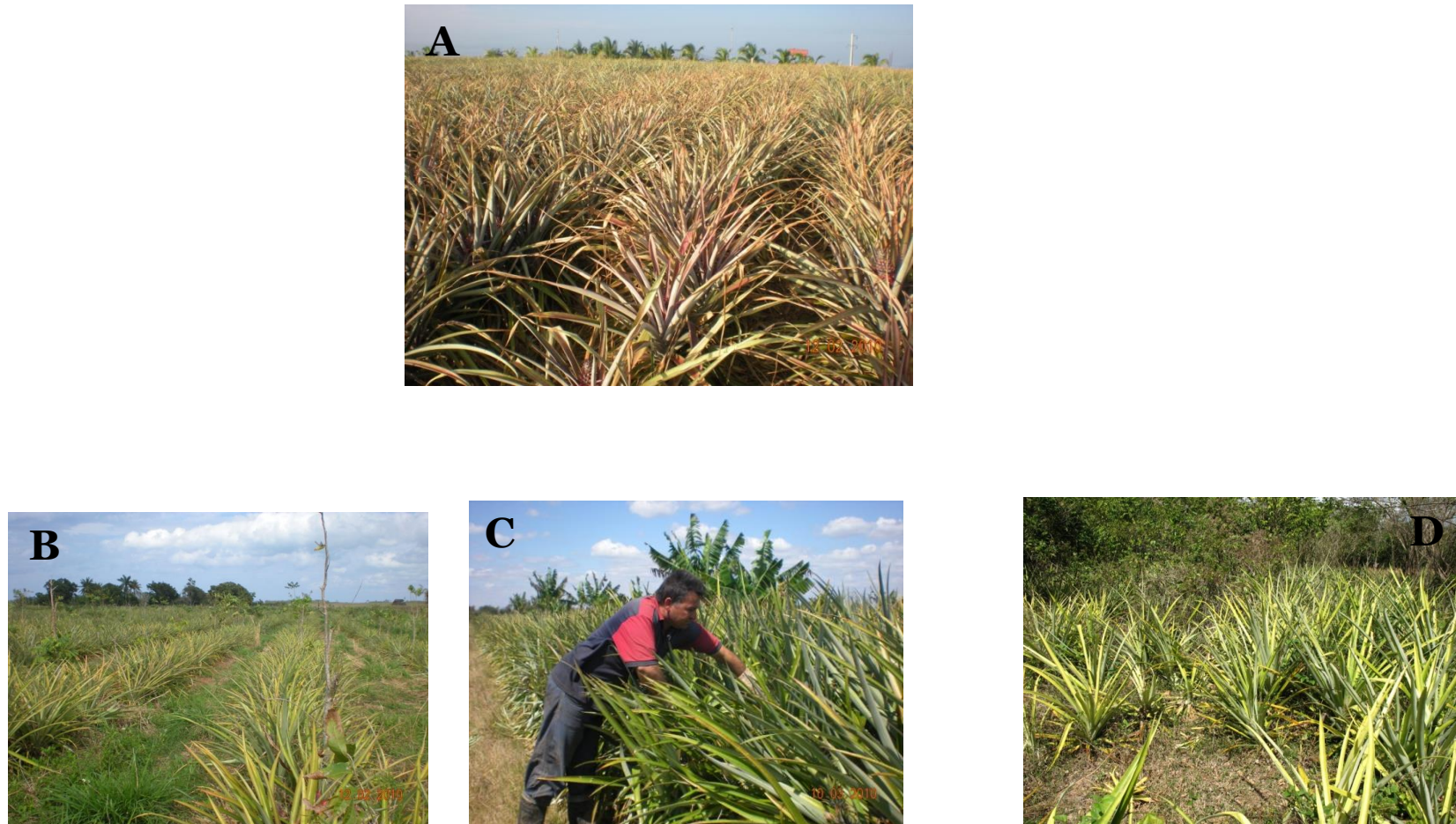
REGIÓN	PROVINCIA	LUGAR DE COLECTA	NOMBRE DE LAS ACCECIONES y PRINCIPALES CULTIVARES	GRUPO HORTICULTURAL
<b>OCCIDENTE</b>	Pinar del Río	La Palma	Española roja pinareña*	Española
		Viñales	Española roja camagüeyana	Española
		Rosario	Española roja camagüeyana	Española
	Artemisa	San Cristóbal	Española roja camagüeyana	Española
		Candelaria	Española roja camagüeyana*	Española
		San Antonio	Española roja camagüeyana	Española
		Alquizar	Española roja pinareña y Piña blanca	Española y Pernambuco
		Artemisa	Española roja pinareña y camagüeyana	Española
	Mayabeque	Madrugá	Española roja pinareña	Española
		Jaruco	Española roja pinareña	Española
	Matanzas	Bolondrón	Española roja pinareña, Piña blanca* y Cayena lisa*	Española, Pernambuco y Cayena
		Jagüey Grande	Española roja pinareña y Piña blanca	Española, Pernambuco
		Los Arabos	Española roja pinareña y camagüeyana	Española
<b>CENTRO</b>	Villa Clara	Santo Domingo	Española roja camagüeyana	Española
		Corralillo	Española roja camagüeyana	Española
		Caibarién	Española roja camagüeyana	Española
	Cienfuegos	Rodas	Española roja camagüeyana, Cayena y Piña blanca*	Española, Cayena y Pernambuco
		Abreu	Española roja camagüeyana	Española
		Aguada de Pasajeros	Española roja camagüeyana	Española
	Ciego de Ávila	Morón	Cayena lisa serrana*, Española roja camagüeyana*	Cayena y Española
		Florencia	Española roja camagüeyana*	Española
	Camagüey	Casorro	Española roja camagüeyana	Española
		Esmeralda	Piña blanca	Pernambuco
<b>ORIENTE</b>	Granma	Cienaguilla	Española roja camagüeyana y Barón de Rothschild	Española y Cayena
		Gibara	Cabezona*	Española
	Holguín	Moa	Española roja camagüeyana, Piña blanca, Cayena lisa	Española, Pernambuco y Cayena
		Frank País	Morada*, Piña blanca y Mocaena*	Española y Pernambuco
	Santiago de Cuba	Santiago de Cuba	Piña blanca*, Española roja un borde liso, Colorada del Ramón y Colorada del Caney*	Pernambuco y Española
	Guantánamo	Baracoa	Española roja pinareña, Cabezona, Piña blanca y Ocaena	Española, Pernambuco y Cayena
		Niceto Pérez	Morada* y Cubana*	Española y Pernambuco
<b>Municipio especial</b>	Isla de la Juventud	La Fe	Cayena lisa	Cayena
			Española roja camagüeyana*	Española
		Gerona	Española roja camagüeyana	Española

\*Principales cultivares





**Figura 2.** Porcentaje de los cultivares colectados en las tres regiones.



**Figura 3.** Irregularidades en la densidad de plantación en el cultivo de la piña en Cuba A) Plantación adecuada, B) Excesiva distancia entre surcos, C) Insuficiente distancia entre plantas y no deshierbe, D) Plantación irregular.

El objetivo de los talleres con los agricultores del occidente y el centro, estuvo orientado mayormente a la necesidad de intercambiar e introducir nuevos cultivares. Como se pudo apreciar en la anterior Figura 2, estas regiones resultaron ser las más carentes de diversidad, resultado lógico si se tiene en cuenta que en estas se concentran las mayores superficies de producción del país. La tendencia de las entidades estatales productoras de piña, por ejemplo en Ciego de Ávila, es plantar un solo cultivar, en la actualidad en esta solo se fomenta el cv. 'MD-2'. Sin embargo en la región oriental, el objetivo de estos intercambios estuvo más encaminado a la preservación de los recursos fitogenéticos, porque esta región atesora la mayor riqueza genética de piña en la isla. Las ferias y talleres, según Manrique y Cruzalegui (2006) y Castiñeiras *et al.* (2009) son alternativas válidas para lograr que los agricultores y la comunidad se apropien de los conocimientos necesarios para el manejo y conservación *in situ* de los RFG, y promueven el intercambio de conocimientos y de germoplasma.

Aunque el cultivo de la piña requiere suelos con pH ácido y buen drenaje interno, este se extiende por todo el país. La mayor riqueza se encuentra en la zona oriental, donde está representado, al menos, un cultivar de los tres grupos hortícolas. Del grupo Española existen plantaciones de los cultivares 'Colorada del Caney', 'Cabezona', 'Morada', 'Española roja' camagüeyana y 'Española roja' pinareña; del grupo Pernambuco los cultivares 'Piña blanca' y 'Cubana', y del grupo Cayena el cv. 'Mocaena'. La amplia diversidad en esta región puede deberse a que en esta zona existe una menor tecnificación de los cultivos y un mayor arraigo de la producción de subsistencia.

Otro factor que influye en la preservación *in situ* de la diversidad en piña en la región oriental, es la ubicación geográfica de la comunidad, que afecta el número de cultivares empleados en aquellas áreas de difícil acceso y alejadas del mercado, por lo que hay una tendencia mayor a la conservación local de los RFG. También la comunidad influye en la motivación de los campesinos por producir esta fruta y decide la permanencia o no de algunos cultivares. Ejemplo el cv. 'Barón de Rothschild' en la zona de Cienaguilla, provincia Granma, el que a pesar de la espinosidad de las hojas y su susceptibilidad a hongos, se mantiene intercalado en algunas plantaciones. También se encuentra el cv. 'Cabezona' este solo se localiza en algunas localidades de Gibara, provincia Holguín, el cual posee muy poco valor comercial a pesar de tener un fruto muy grande (hasta 5 kg), por su baja consistencia, lo que dificulta el manejo de postcosecha. En otras especies como en maíz Collado *et al.* (2004) demostraron que la lejanía de las comunidades en la Amazonía peruana contribuyó considerablemente a la preservación de la mayor riqueza de este cultivo.

Si bien se han ejecutado algunas acciones para ampliar la base genética del país, los programas de mejora genética no han logrado diversificar los cultivares de piña. Parte de los híbridos obtenidos por Benega *et al.* (1999) quienes combinaron la rusticidad de 'Española roja pinareña' y los rasgos productivos y calidad del fruto de 'Cayena lisa serrana'; se han multiplicado *in vitro* para introducirlos en el sector privado y estatal. Sin embargo se considera que los esfuerzos realizados por el sector estatal, no han sido suficientes.

Las prospecciones efectuadas no solo ampliaron la información sobre la diversidad presente *in situ* y el *estatus* de los recursos fitogenéticos de la especie en Cuba, sino también incrementaron la colección cubana en más de un 50%. Los datos pasaporte que fueron tomados en cada sitio visitado permitieron el completamiento de la información de cada accesión. Una vez incorporadas las accesiones recolectadas al banco de germoplasma cubano se determinó la estructura del mismo, el cual quedó constituido por un total de 56 accesiones (Tabla 1). Un análisis detallado de la misma permite establecer que el 87,5% procede de las prospecciones nacionales y el 12,5% es material foráneo. Del total de la colección el 44,6% pertenece al grupo hortícola Española, el 19,6% a Cayena, el 12,5% a Pernambuco y el resto a híbridos y especies afines.

Durante la realización de la presente investigación solo se produjo introducción de material foráneo en los dos primeros años (1997-1999). A la colección se incorporaron, después de una rigurosa cuarentena, más de 30 accesiones de los grupos hortícolas Cayena, Pernambuco y Perolera, así como especies afines; las mismas procedían de Brasil, Martinica, México, Colombia, Puerto Rico, Hawái, Francia, República Dominicana, Panamá, Kenia, Ecuador y Costa Rica. No obstante, al observar en la anterior Tabla 1 la columna “procedencia” de las accesiones, se aprecia que ya no están presentes genotipos introducidos de algunos de los países antes mencionados, lo que implica una disminución de la diversidad en la colección *ex situ* y por ende su pérdida.

El enriquecimiento de las colecciones mediante la introducción de nuevos materiales, es un aspecto fundamental en la ampliación de la base genética de los cultivos. Sin embargo, su utilización por mejoradores y productores es ilimitada, esto está en correspondencia con lo expresado por Fowler y Hodgkin (2004), quienes plantearon que gran parte de los bancos de germoplasma funcionan más como un sitio de conservación a puerta cerrada que como una fuente constante de intercambio de germoplasma. Al respecto, Franco (2007) también sugirió que en estos debe haber una actividad intensa de distribución e intercambio de accesiones, que se conoce como flujo de recursos fitogenéticos.

A pesar del trabajo realizado por el curador y la institución encargada, la preservación *ex situ* ha sufrido afectaciones debido a problemas de organización e inclemencias climáticas. Algunas de las accesiones perdidas han sido repuestas, gracias a la labor de los curadores, a partir de los RFG conservados *in situ* por los agricultores. Esto corrobora lo planteado por Engels y Visser (2007), quienes destacan la importancia de la complementación de las conservaciones *in situ* y *ex situ* para prevenir la erosión genética debido a las catástrofes naturales o a las provocadas por el hombre. El aporte de los campesinos en la preservación del germoplasma de piña ha sido y será decisivo en el futuro, así como también la labor que desarrolla el curador del banco de germoplasma y las instituciones que están responsabilizadas en la conservación de los recursos fitogenéticos de esta especie.

### **3.2. Caracterización fenotípica del germoplasma *ex situ* de piña y especies afines**

#### **3.2.1. Caracterización morfológica del germoplasma**

La caracterización morfológica es el primer paso en la descripción de un material vegetal, esta puede realizarse con mayor o menor detalle. El incremento en el uso y conservación de los recursos genéticos en las plantas según Gutiérrez y Rincón (2011) hace necesario una caracterización y clasificación detallada de la diversidad existente en ellos, mediante los marcadores morfológicos.

Los resultados del CATACP para los caracteres cualitativos evaluados se muestran en la Tabla 9. La variabilidad total observada fue del 82,71%, la que se explica con las dos primeras componentes, la primera extrajo el 61,06% y la segunda el 21,68%.

Los descriptores que más aportaron a la variabilidad (con valores superiores al 90%) fueron: color externo del fruto, distribución de las espinas, forma de los ojos, forma del fruto y profundidad de los ojos. Estos descriptores, según Bartholomew *et al.* (2002, 2010), son atributos que se tienen en cuenta para identificar los cultivares de piña. El primero permite estimar el índice de maduración del fruto y el último su factibilidad para el uso industrial. Además de ser útiles en la caracterización del germoplasma también favorecieron la identificación de cada cultivar en relación con los grupos hortícolas a los que pertenecen. Por tanto, los ocho descriptores fueron seleccionados para integrar el análisis del establecimiento de los descriptores mínimos.

En general, el grupo hortícola Española presentó frutos con forma de barril (escala-3), ojos muy profundos (escala-7) y rectangulares (escala-1); el grupo Pernambuco tiene frutos



con forma piramidal (escala-6) y ojos medianamente profundos (escala-5) y redondeados (escala-5); y el grupo Cayena posee frutos cilíndricos (escala-7) y ojos poco profundos (escala-3) y hexagonales (escala-3) (Anexo 4). Las características de este último grupo favorecen su empleo en la industria para la elaboración de rodajas.

**Tabla 9.** Porcentaje de variabilidad explicada en el CATACP para los caracteres cualitativos de la colección *ex situ*.

Componentes	Autovalores iniciales	
	% Varianza explicada	% Acumulado
CP 1	61,06	61,06
CP 2	21,68	82,71
Variables analizadas	Porcentaje de contribución relativa	
	CP 1	CP 2
Color de la hoja	0,353	<b><u>0,735</u></b>
Color de la pulpa del fruto	<b><u>0,873</u></b>	0,131
Color externo del fruto	<b><u>-0,915</u></b>	0,004
Dirección de las espinas	0,257	<b><u>0,541</u></b>
Distribución de las espinas	-0,095	<b><u>0,922</u></b>
Forma de los ojos	<b><u>0,931</u></b>	0,009
Forma del fruto	<b><u>0,919</u></b>	0,075
Profundidad de los ojos	<b><u>-0,982</u></b>	-0,031

Letras en negritas y subrayadas indican mayor contribución

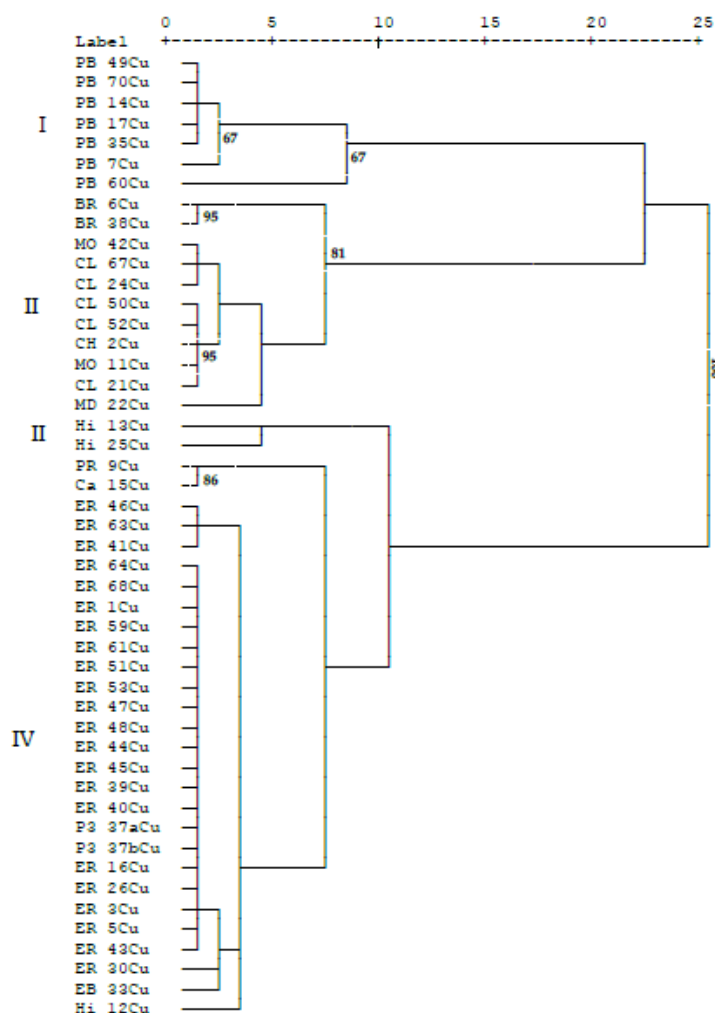
El color externo del fruto es otro descriptor que también contribuyó a determinar la variabilidad del germoplasma en estudio. La mayoría de las accesiones del grupo horticultural Española se caracterizaron por presentar los frutos naranja-rojizo (escala-8); las de Cayena, amarillo-naranja (escala-7) o amarillo dorado (escala-6); y las de Pernambuco, verde-amarillo (escala-3).

El color de las hojas también contribuyó a determinar la variabilidad, pero en la segunda componente. Este es un descriptor que apoya la ubicación de los cultivares en los diferentes grupos horticulturales, los que en ocasiones se distinguen por su coloración. En el grupo Española, predominan las hojas verdes con tintes rojos (escala-3); en el grupo Pernambuco las verdes (escala-1), y en el grupo Cayena pueden ser verdes (escala-1) o verdes con tinte rojo (escala-3). Según Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (1995) este carácter está codificado por un gen dominante, el cual determina el rojo oscuro de las hojas de ciertos cultivares. Los genotipos homocigóticos recesivos muestran fenotipos con niveles variables de antocianinas de acuerdo al ambiente, sin embargo los heterocigóticos expresan densidades muy superiores.

A pesar de que la distribución de las espinas en el margen de las hojas es el carácter más estudiado desde el punto de vista genético, en la colección cubana apenas están representados tres de los cinco tipos de espinas reconocidas por Kinjo (1993), quien las clasifica como: hojas con espinas en los extremos (Few), hojas con espinas de forma irregular (Scallop) y hojas con márgenes totalmente espinosos (Spiny). Este autor también estableció el orden de dominancia del carácter donde: Few>Scallop>Spiny. Sin embargo, Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (1995) establecieron solo cuatro tipos de espinas en las hojas; según esta clasificación los grupos horticulturales Española y Pernambuco se

caracterizan por tener márgenes de tipo espinoso y está determinado por la presencia de un alelo o una familia de alelos recesivos (s). El grupo Cayena presenta hojas con bordes lisos correspondientes a la presencia de un alelo dominante (S), y con espinas solo en la base y el extremo de las hojas (Py *et al.*, 1987). Al carácter distribución de las espinas (IBPGR 4.1.15) se le realizaron modificaciones en sus categorías, porque algunas accesiones mostraron rangos de variación que no estaban contemplados en el mismo. Se les asignó un número específico donde 5 es para identificar otras distribuciones y 6 para las hojas sin espinas.

En el análisis de conglomerados (Fig. 4), la línea de corte se estableció en el valor 10, lo que permitió la formación de cuatro clases. La primera está compuesta por las accesiones pertenecientes al grupo horticultural Pernambuco, todas del tipo 'Piña blanca'; la segunda por las Cayenas, donde aparecen los cultivares 'Cayena lisa' de diferentes localidades, 'Barón de Rothschild', 'Mocaena' y 'MD-2'. La tercera clase está formada por dos de los tres híbridos en estudio; y la cuarta por las accesiones del grupo Española, donde se agruparon los cultivares 'Española roja' colectadas a lo largo del país, 'Cabezona', 'Española roja Puerto Rico' y el híbrido restante. Las tres clases establecidas se corresponden con los grupos horticulturales para piña propuestos por Py *et al.* (1987). A pesar de que esta clasificación ha sido criticada por Duval y Coppens d'Eeckenbrugge (1993), se ha demostrado que en el argot productivo y comercial, se siguen reconociendo estos grupos.



**Figura 4.** Dendrograma generado a partir de la distancia Euclidiana de los caracteres cualitativos de 48 accesiones de la colección *ex situ* de piña en Cuba. Se representan los valores de bootstrap superiores al 60%.

Los resultados obtenidos, mediante la caracterización morfológica, ratifican la clasificación de los diferentes grupos hortícolas establecidos por Py *et al.* (1987). Además, permitieron constatar la poca variabilidad morfológica presente para estos atributos en el germoplasma cubano.

### 3.2.2. Evaluación agronómica del germoplasma

Los resultados del ACP para los caracteres agronómicos evaluados se muestran en la Tabla 10. El 69,46% de la variabilidad total observada se explica con tres componentes; la primera extrajo el 37,17%, la segunda el 21,13% y la tercera el 11,16%. Es característico según Fundora *et al.* (1992) en estudios que involucran gran cantidad de descriptores, como el de la presente investigación, que se distribuya la variabilidad en la mayoría de los ejes factoriales y que los primeros solo acumulen entre el 50 y el 60%.

**Tabla 10.** Porcentaje de variabilidad explicada en el ACP para los caracteres agronómicos de la colección *ex situ* de piña.

	Autovalores iniciales		
Componentes	% Varianza explicada	% Acumulado	
CP 1	37,17	37,17	
CP 2	21,13	58,30	
CP3	11,16	69,46	
Variables analizadas	Porcentaje de contribución relativa		
	CP 1	CP 2	CP3
Acidez total (%)	<u>0,498</u>	-0,341	0,283
Altura de la planta (cm)	<u>-0,534</u>	0,469	-0,282
Ancho de la hoja (cm)	<u>0,625</u>	0,220	<u>-0,592</u>
Diámetro de la planta (cm)	0,132	<u>0,838</u>	-0,199
Diámetro del corazón (cm)	<u>0,734</u>	0,107	-0,042
Diámetro del fruto (cm)	<u>0,854</u>	0,062	0,067
Longitud de la corona (cm)	0,144	0,160	<u>0,663</u>
Longitud de la hoja (cm)	-0,405	<u>0,549</u>	-0,284
Longitud del fruto (cm)	<u>0,562</u>	0,457	0,487
Número de espirales	0,055	<u>0,594</u>	0,119
Número de ojos en la espiral mayor	-0,394	<u>0,620</u>	0,479
Masa del fruto sin corona (g)	0,357	<u>0,614</u>	0,129
Relación masa de la corona/masa del fruto	0,224	-0,426	<u>0,755</u>
Sólidos solubles (°Brix)	-0,268	-0,253	<u>0,787</u>

Letras en negritas y subrayadas indican mayor contribución

Los descriptores que más aportaron a la variabilidad fueron: el diámetro del fruto, de la planta y del corazón, el contenido de sólidos solubles y la relación masa de la corona/masa del fruto, con valores cercanos al 80%. De estos cinco caracteres, cuatro están relacionados con el fruto, los cuales son considerados por Bartholomew *et al.* (2002, 2010) como descriptores importantes para su comercialización.

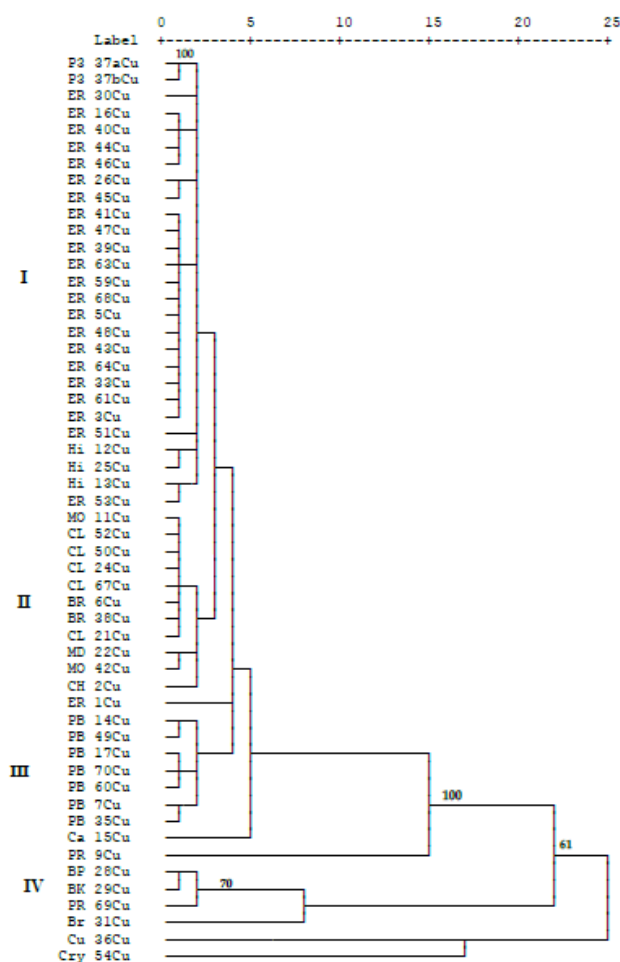
El diámetro del corazón es un descriptor que se tiene en cuenta en la industria de la fruta. Dentro de los materiales en estudio (Anexo 4), las accesiones que corresponden a los grupos hortícolas de Cayena y Pernambuco, fueron las que tuvieron valores inferiores o cercanos a 1 cm. Sin embargo, este último grupo no es recomendado para su procesamiento



industrial, por la forma piramidal del fruto y su sensibilidad a los golpes, que concede a criterio de Bartholomew *et al.* (2002), a los cultivares del grupo Cayena mayor aceptación en la industria. El porcentaje de sólidos solubles es otro carácter que permite evaluar la calidad del fruto. En la investigación sobresalieron los grupos hortícolas Cayena y Pernambuco, con valores superiores a los 16°Brix.

El estudio riguroso de los descriptores agronómicos en programas de mejoramiento en piña, implican un arduo trabajo de recolección y sincronización de datos. En ellos, también es importante tener en cuenta la autoincompatibilidad que caracteriza al género *Ananas*. A pesar de estas dificultades, Kumar *et al.* (2003) señalaron que para cualquier programa de mejoramiento en este cultivo, es requisito indispensable estudiar la contribución de los caracteres cuantitativos.

En el análisis de conglomerados (Fig. 5), la línea de corte se estableció alrededor del valor tres, lo que permitió la formación de cuatro clases y algunas accesiones no agrupadas. Este bajo valor de la distancia Euclidiana confirma la escasa variabilidad entre los cultivares para los caracteres cuantitativos, la cual es más baja que la obtenida en el análisis morfológico, y es menos evidente entre los grupos hortícolas Española y Cayena. Este resultado se corresponde con los obtenidos por Morton (1987) y Bartholomew *et al.* (2002), quienes detectaron una superposición de los datos en algunos caracteres agronómicos de los diferentes grupos hortícolas. Por ejemplo, el rango de la altura de las plantas en los cultivares del grupo Española es entre 80-110 cm, en los de Cayena entre 60-90 cm y en los de Pernambuco entre 80-100 cm.



**Figura 5.** Dendrograma formado con los caracteres agronómicos a partir de la distancia Euclidiana de 54 accesiones de la colección *ex situ*. Se representan los valores de bootstrap superiores al 60%.

El poder discriminante y la importancia de los caracteres agronómicos, en la caracterización de los cultivares del género *Ananas*, ha sido comprobado por diversos investigadores. Santos *et al.* (2003) incluyeron los caracteres agronómicos: altura de la planta, longitud de la hoja, masa, diámetro y longitud del fruto; masa y longitud de la corona, diámetro del corazón y sólidos solubles en la evaluación del cv. 'Imperial'. Sin embargo, Fournier *et al.* (2007), solo tuvo en cuenta la masa de la planta y las características de la hoja D (número de hojas, masa, longitud y ancho) en un estudio comparativo del crecimiento entre los cultivares 'MD-2', 'Flhoran 41' y 'Cayena lisa'. También han sido utilizados en la caracterización de plantas ornamentales del género *Ananas*, así Souza *et al.* (2012) seleccionaron 11 descriptores cuantitativos, para determinar la diversidad entre accesiones conservadas en la colección *ex situ* de la EMBRAPA en Brasil.

La caracterización agronómica, al igual que la morfológica, corroboró la clasificación de las accesiones en correspondencia con los grupos horticulturales establecidos por Py *et al.* (1987). Además permitió complementar la identificación de los cultivares conservados *ex situ* y ratificar la poca variabilidad presente de estos atributos en el germoplasma en estudio.

**- Principales características de los grupos horticulturales de piña a partir de la integración de los caracteres morfoagronómicos**

Las plantas pertenecientes al grupo horticultural Cayena (Anexo 4A), se caracterizaron en su mayoría por ser medianas, con hojas verdes o verdes con tintes rojos y espinas solo en los bordes de la zona apical o basal. El fruto era en forma cilíndrica, amarillo-rojizo, con siete u ocho espirales/fruto, ojos de forma hexagonal y poco profundos, el diámetro del corazón pequeño con valores en su mayoría inferiores a 1 cm. La pulpa era amarilla, jugosa, con un porcentaje de azúcares totales que supera los 13°Brix y llega alcanzar valores de hasta 18°Brix. Los genotipos que mostraron mejores características fueron los cultivares 'Barón de Rothschild' (6Cu), 'Cayena lisa serrana' (21Cu) y 'Mocaena' (42Cu).

Las plantas pertenecientes al grupo horticultural Pernambuco (Anexo 4B), se caracterizaron en su mayoría por ser plantas medianas, con hojas verdes que presentan espinas muy pequeñas y menos agresivas que los cultivares de Española. El fruto era en forma piramidal, verde-amarillo, generalmente con ocho espirales y ojos redondeados. La pulpa era blanca, muy jugosa, con elevado contenido de azúcares totales alrededor de los 17°Brix y un contenido de vitamina C entre 11 y 15 mg.100 g<sup>-1</sup>. Los genotipos que mostraron mejores características fueron los cultivares 'Piña blanca' (14Cu), 'Cubana del Caney' (60Cu) y 'Cubana' (35Cu).

Las plantas pertenecientes al grupo horticultural Española (Anexo 4C), se caracterizaron por ser las de mayor altura, en su mayoría tuvieron hojas verdes con tintes rojos, espinas a lo largo y en ambas márgenes, las cuales pueden ser más o menos agresivas en dependencia del cultivar. El fruto era en forma de barril, naranja-rojizo, con un número de espirales entre siete y ocho, el diámetro del corazón fue mayor a 1 cm y llegó alcanzar valores superiores en algunas accesiones. La pulpa era blanca y fibrosa, con poco jugo, el nivel de azúcares totales alrededor de los 11°Brix y presentó una media aproximadamente de 18 mg.100 g<sup>-1</sup> de vitamina C. Los genotipos que mostraron mejores características fueron los cultivares 'Ocaena' (43Cu), 'Española roja' de Florencia (26Cu), 'Española roja pinareña' (30Cu) y 'Española roja morada' (16Cu).

Las especies afines, clase IV (Anexo 5), se caracterizaron por ser plantas de porte alto y diámetro ancho, con hojas muy espinosas y agresivas. Por tener frutos en forma de baya, rojo-naranja, muy ácidos y aromáticos. Su importancia industrial y como fármaco radica, según Montinola (1991), Orellana *et al.* (2004) y Sandoval *et al.* (2004), en la obtención de fibra para la confección de sogas, como cerca viva y para el control de la erosión del suelo; además son muy utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la tosferina,

como antiparasitario, en la disminución del estado de embriaguez, como abortiva y tienen actividad citotóxica sobre células del carcinoma humano.

Las restantes especies afines [*C. acaulis* (54Cu), Curujey (36Cu) (*T. fasciculata*) y *A. bracteatus* cv. 'Branco' (31Cu)] (Anexo 5B), se diferenciaron entre sí por el color de sus hojas, la altura y el diámetro de la planta, la longitud y el ancho de las hojas, la presencia o no de espinas, el tipo de fructificación y el hábito de crecimiento.

### 3.2.3. Selección de los Descriptores Mínimos

Un primer análisis con los 22 descriptores morfoagronómicos (acápites 3.2.1. y 3.2.2.) seleccionados para establecer los descriptores mínimos, permitió decantar los siete que menor contribución tuvieron. Con los 15 restantes se realizó el CATACP para la selección de los caracteres que más contribuyeron a la variabilidad (Tabla 11). El 75,65% de la variabilidad total observada se explicó con tres componentes; la primera extrajo el 40,91%, la segunda el 22,82% y la tercera el 11,92%. El análisis se llevó hasta la tercera componente, por la importancia que tienen los caracteres relacionados con la masa del fruto.

**Tabla 11.** Porcentaje de variabilidad explicada en el CATACP para los descriptores mínimos.

	Autovalores iniciales		
Componentes	% Varianza explicada	% Acumulado	
CP 1	40,91	40,91	
CP 2	22,82	63,73	
CP 3	11,92	75,65	
Variables analizadas	Porcentaje de contribución relativa		
	CP 1	CP 2	CP 3
Acidez total (%)	<u>-0,523</u>	0,406	0,245
Ancho de la hoja (cm)	0,303	<u>0,726</u>	0,021
Color de la hoja	<u>0,542</u>	<u>0,642</u>	0,104
Color de la pulpa del fruto	<u>-0,785</u>	0,528	0,094
Color externo del fruto	<u>0,947</u>	0,204	0,150
Diámetro del corazón (cm)	-0,088	<u>0,677</u>	0,427
Diámetro del fruto (cm)	-0,187	<u>0,786</u>	0,182
Distribución de las espinas	<u>0,661</u>	-0,340	0,066
Forma de los ojos	<u>-0,947</u>	-0,128	-0,004
Forma del fruto	<u>-0,911</u>	-0,204	-0,062
Longitud del fruto (cm)	-0,421	<u>0,597</u>	0,302
Masa del fruto sin corona (g)	-0,109	0,432	<u>0,735</u>
Profundidad de los ojos	<u>0,947</u>	-0,174	-0,069
Relación masa de la corona/masa del fruto	0,086	-0,046	<u>-0,899</u>
Sólidos solubles (°Brix)	<u>-0,796</u>	-0,390	0,017

Letras en negritas y subrayadas indican mayor contribución

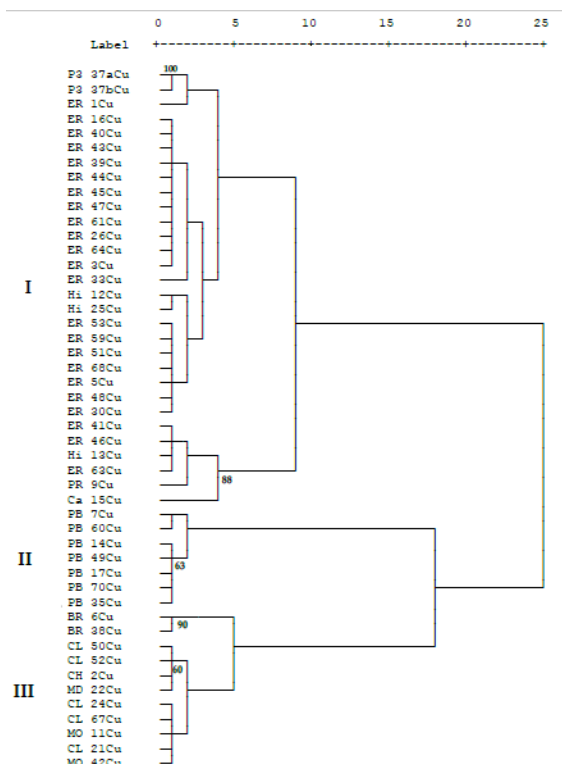
Los descriptores mínimos seleccionados en esta investigación para evaluar la colección cubana, fueron los 15 caracteres morfoagronómicos que mayor variabilidad aportaron (Tabla 12). Estos representaron el 14% de la lista propuesta por el IBPGR (1991), que propone 115 descriptores para la caracterización de las plantas de piña. Un número igual de descriptores propuso Barrios (2010) para caracterizar accesiones de *Capsicum* spp. conservadas en el banco de germoplasma del INIFAT y resultaron más bajo que el número de descriptores

establecidos por Rodríguez *et al.* (2010) para evaluar cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.) de la colección *ex situ* del IIFT.

**Tabla 12.** Listado de descriptores mínimos seleccionados para la caracterización morfoagronómica de la colección cubana del género *Ananas*.

No	CUALITATIVOS	No	AGRONÓMICOS
DESCRITORES MÍNIMOS	<u>Fruto</u>	DESCRITORES MÍNIMOS	<u>Fruto</u>
	1 Forma de los ojos		8 Sólidos solubles
	2 Forma del fruto		9 Diámetro del fruto
	3 Profundidad de los ojos		10 Diámetro del corazón
	4 Color externo del fruto		11 Longitud del fruto
	5 Color de la pulpa del fruto		12 Acidez total
	<u>Hoja</u>		13 Masa del fruto sin la corona
DESCRITORES MÍNIMOS	6 Distribución de las espinas	DESCRITORES MÍNIMOS	14 Relación masa de la corona/masa del fruto
	7 Color de la hoja		<u>Hoja</u>
			15 Ancho de la hoja

En el análisis de conglomerados a partir de los descriptores mínimos, la línea de corte se estableció en el valor 10, lo que permitió la formación de tres clases (Fig. 6). El uso de estos descriptores corroboró los grupos de variabilidad obtenidos a partir de la caracterización morfológica y agronómica, por lo que se pueden considerar como los descriptores mínimos para la colección cubana. El establecimiento de un Listado de Descriptores Mínimos, según Hoogendijk y Williams (2002), es efectivo para la evaluación de la diversidad, lo que reduce en ahorro de tiempo y esfuerzo en los trabajos de caracterización de germoplasma.



**Figura 6.** Dendrograma formado con los descriptores mínimos a partir de la distancia Euclidiana de 48 accesiones de la colección *ex situ* de piña. Se representan los valores de bootstrap superiores al 60%.

Los descriptores mínimos seleccionados permitieron la identificación y la caracterización de los RFG de piña en Cuba. Aunque se han utilizados descriptores con diferentes objetivos, no existen precedentes del establecimiento de un Listado de Descriptores Mínimos para la especie. En algunos de los trabajos publicados se hace uso de un conjunto de descriptores para caracterizar el género *Ananas*, tales como Duval *et al.* (1996) en la colección *ex situ* conservada en el CIRAD-FLIIR de Martinica, y Santos y Ferreira (1999) en accesiones de *A. bracteatus*, *A. ananassoides* y *A. nanus*, pertenecientes a la EMBRAPA en Brasil. Por su parte, para diseñar una clave de identificación de variedades comerciales de piña, Leal (1990) seleccionó caracteres agronómicos y cualitativos de la planta, la flor y del fruto en la colección de Venezuela; en la misma colección Paez (1998) utilizó descriptores para diferenciar especies silvestres de importancia económica.

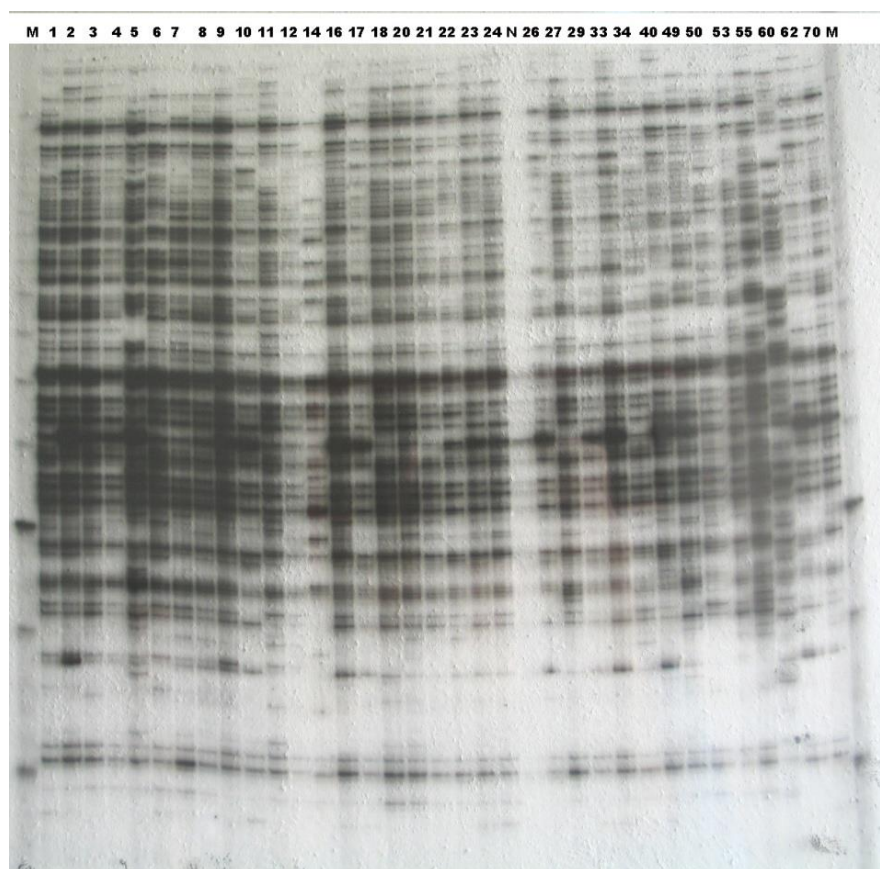
La selección de un mínimo de descriptores, es una herramienta útil en las caracterizaciones morfoagronómicas de los recursos fitogenéticos. El trabajo con el total de los descriptores establecidos por el IBPGR o IBGRI para cada cultivo, es muy engorroso y generalmente innecesario, debido a la compleja naturaleza de la diversidad de los materiales. En este sentido Lobo y Medina (2009), plantearon que la selección de los descriptores mínimos, permiten la adecuación de los mismos a las particularidades de cada país. Por otra parte, Abadie y Berretta (2005) y Fundora *et al.* (2006) informaron que no es necesario que cada curador realice la caracterización de las accesiones con los caracteres que aparecen en el Listado de Descriptores Mínimos, solo deben ser empleados los que se consideren útiles para el manejo del germoplasma.

El Listado de Descriptores Mínimos establecidos en la presente investigación responde de manera eficiente a la caracterización del germoplasma cubano. Este listado podrá ser utilizado en futuros estudios del género *Ananas* en Cuba, así como también facilitará el trabajo de los mejoradores y los curadores del banco de germoplasma y de otros países.

### **3.3. Diversidad genética mediante los marcadores moleculares AFLP, RAPD y SSR de la colección *ex situ***

#### **3.3.1. Diversidad genética mediante el marcador AFLP**

El ADN de los genotipos en estudio amplificó con las cuatro combinaciones de cebadores empleadas para la amplificación selectiva (Fig. 7). Así como también se pudo diferenciar a los somaclones M-35 y P3R5, este último no había podido ser diferenciado por Pérez (2003) con marcadores morfológicos ni isoenzimáticos por lo que se trata de verdaderos mutantes.



**Figura 7.** Patrones de bandas obtenidos de la amplificación del ADN de accesiones de la colección *ex situ* con los cebadores Eco RI+AAT y Mse I+AAG en la técnica de AFLP. M-marcador de peso molecular, N-patrón débil, no considerado en el análisis. Los números corresponden con el número de la accesión en el Banco de germoplasma.

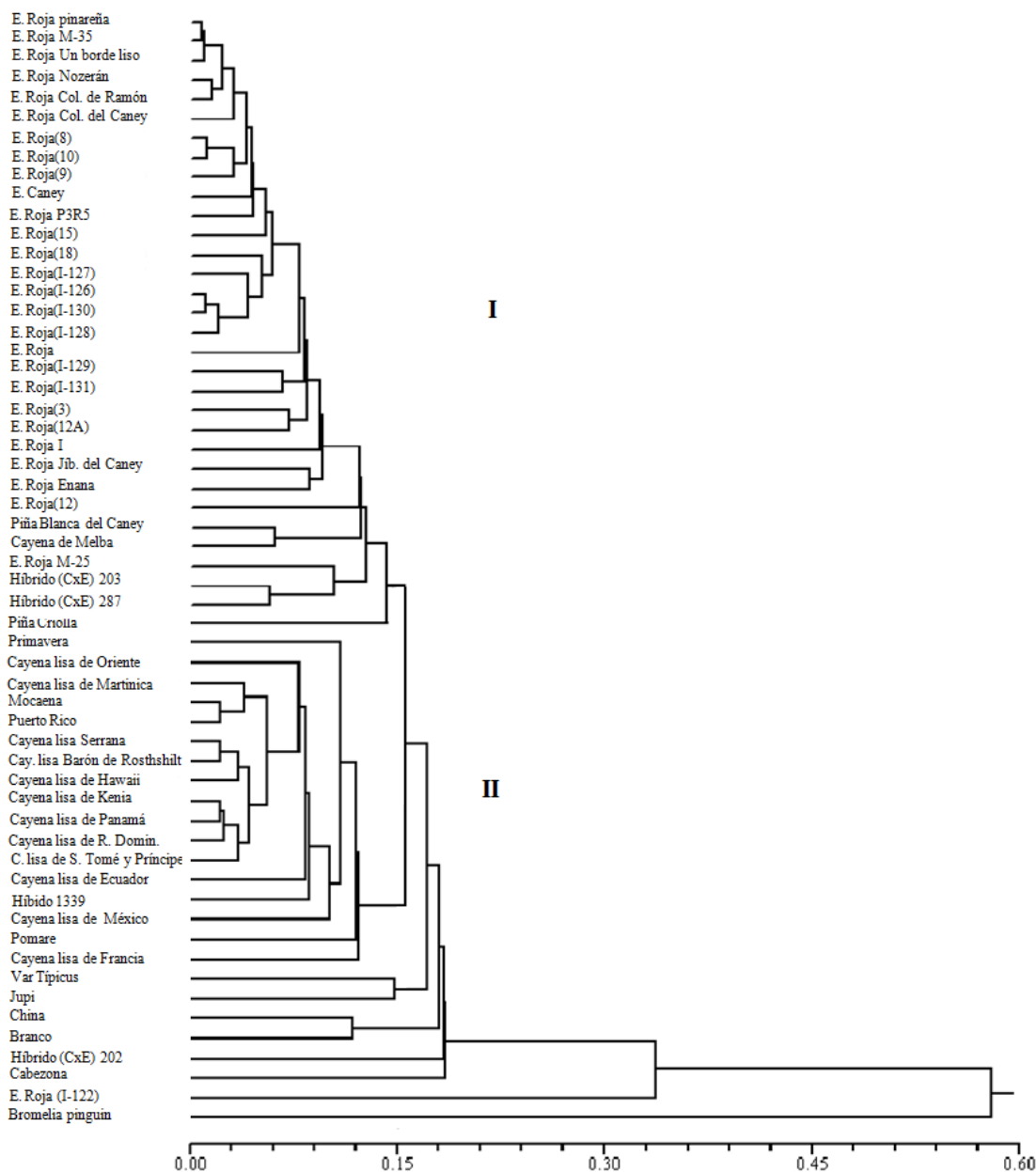
Se obtuvieron 191 bandas totales producto de la amplificación con cuatro combinaciones de cebadores (Tabla 13). La propia tabla muestra los niveles de polimorfismo por combinación de cebadores, 87,4% de polimorfismo si se consideran todos los genotipos de la colección (un genotipo de *B. pinguin*, uno de *A. bracteatus* y 53 de *A. comosus*), 64,3% de polimorfismo al considerara solo el género *Ananas* y 61,1% cuando se tomó en cuenta solo la especie *A. comosus*.

**Tabla 13.** Combinación de cebadores empleada para la amplificación selectiva del ADN de las accesiones de la colección *ex situ* en relación con el porcentaje de polimorfismo revelado.

Combinación de cebadores	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)	Bandas polimórficas en <i>Ananas</i>	Polimorfismo (%)
Eco -AAT, Mse-AAG	46	36	78,2	17	37,0
Eco- AAT, Mse AAC	43	37	86,0	29	67,4
Eco -AAT, Mse-AGT	50	46	92,0	40	80,0
Eco- AAT, Mse ATG	52	48	92,3	37	71,1
<b>TOTAL</b>	<b>191</b>	<b>167</b>	<b>87,4</b>	<b>123</b>	<b>64,3</b>



En el análisis de conglomerados UPGMA de la matriz de similitud obtenida a partir del marcador tipo AFLP, la línea de corte se estableció alrededor del valor 0,15 lo que permitió la formación de dos clases y ocho accesiones no agrupadas (Fig. 8). La clase I formada por los cultivares del grupo Española e híbridos y la clase II por los de Cayena. El resto de las accesiones no agrupadas fueron cultivares de otra especie y de otros grupos hortícolas como la especie silvestre *B. pinguin*, que se diferenció del resto de los cultivares del género *Ananas*, con notables diferencias morfológicas en relación con el género.



**Figura 8.** Dendrograma generado con el método UPGMA que muestra el agrupamiento de los genotipos de la colección *ex situ* de acuerdo a la distancia genética entre ellos.

La mayoría de los genotipos del grupo Española se separaron de las Cayenas. Los genotipos Española roja (8), Española roja (9) y Española roja (10) fueron muy similares morfológicamente lo que es de esperar porque tuvieron el mismo origen. De igual modo un grupo de cultivares colectados en la Isla de la Juventud [(Española roja (I-127), Española roja



(I-126), Española roja (I-130), Española roja (I-128), Española roja (I-129) y Española Roja (I-131)] también se ubicaron muy cercanos (distancia inferior a 0,08). Sin embargo Española roja (I-122) quedó como un genotipo no agrupado, esto probablemente se deba a una mala clasificación ya que sus características morfológicas no se correspondían con las del grupo Española.

Por otra parte es de destacar que los híbridos (CxE) 203 y (CxE) 287 se ubicaron en una posición intermedia entre los grupos Cayena y Española, pero con mayor similitud con el segundo que es su progenitor masculino, no así en el híbrido (CxE) 1339 el cual se agrupó con la clase II que representa las Cayenas. Estos resultados eran de esperar ya que los híbridos evaluados fueron obtenidos por Benega *et al.* (1999) a partir del cruzamiento de Cayena lisa Serrana x Española roja pinareña. El híbrido (CxE) 202 no se agrupó en ninguna de las dos clases, este quedó un poco alejado, resultado que se explica desde el punto de vista molecular, por lo que requiere de un análisis morfológico completo de esta accesión para darle una respuesta a esta distancia genética.

Los cultivares Mocaena, Puerto Rico y Pomare, cuyo grupo horticultural se desconoce, parecen pertenecer a las Cayenas. Sin embargo, a la hora de analizar el agrupamiento de determinado genotipo en uno u otro grupo horticultural se debe tener en cuenta que la clasificación en grupos horticulturales se basa según Duval y Coppens (1993) en unos pocos rasgos morfológicos. La mayoría de los clones de Cayena presentes en la colección y algunos de los cultivares pertenecientes a otros grupos horticulturales no se cultivan en Cuba, por lo que sería aconsejable su introducción en áreas de algún productor para evitar la pérdida de diversidad y constituyen fuentes de reservorio de genes de resistencia.

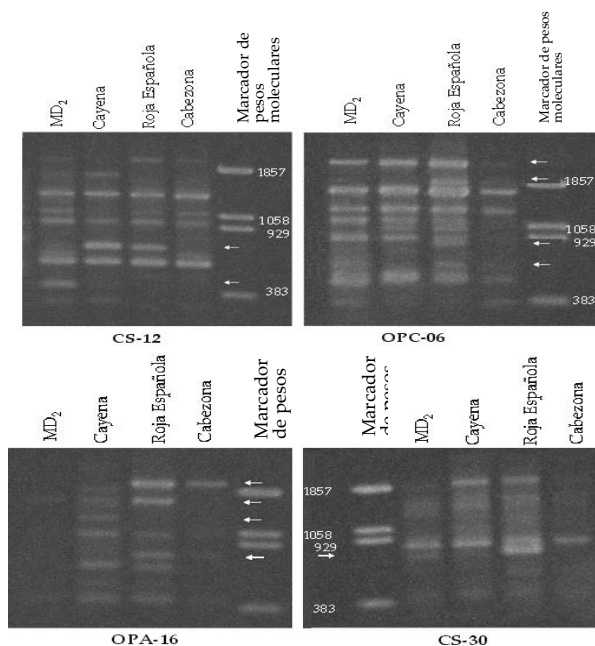
Por lo que se pudo apreciar la base genética del germoplasma de piña en Cuba es baja, para que esta sea más representativa debería enriquecerse con variedades cultivadas y no cultivadas provenientes de otras colecciones. La mayoría de los genotipos de la colección cubana pertenecen a los grupos horticulturales Cayena o Española y la distancia genética entre los integrantes de cada grupo fue relativamente baja. Esto no sucede con las colecciones de Brasil, Martinica y Hawai que han sido caracterizadas por Leal *et al.* (1986), Ferreira y Cabral (1993); Duval *et al.*, 1996 con marcadores morfológicos y por Duval *et al.* (2001) con marcadores moleculares en la brasileña las cuales mostraron mayor diversidad.

El marcador molecular tipo AFLP permitió detectar diferencias entre las accesiones en estudio pero estas podrían ser mayores ya que solo explora una parte del genoma, por lo que es conveniente el empleo de otras técnicas moleculares para demostrarlo y para la eliminación de duplicados.

### **3.3.2. Diversidad genética mediante el marcador tipo RAPD**

#### **A) Selección de los cebadores de mayor polimorfismo**

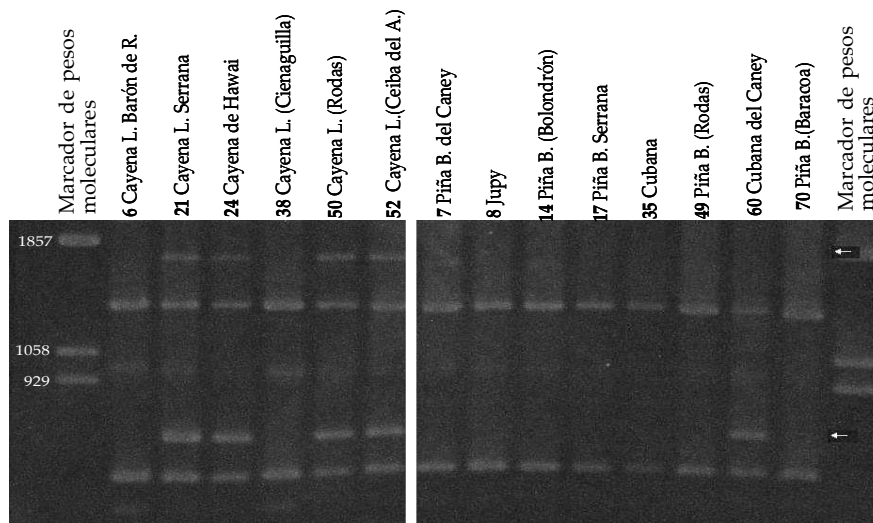
El ADN de los cuatro genotipos seleccionados para el testaje amplificó con los 93 cebadores probados. Los productos de amplificación revelaron en los geles para cada accesión, entre una y cuatro bandas polimórficas nítidas, lo que se corroboró en ambas réplicas. Los siete cebadores más polimórficos seleccionados fueron: OPA-16, OPC-06, CS-12, CS-30, OPC-13, OPF-06 y OPH-01, los cuatro primeros se escogieron porque diferenciaron el cv. 'Cayena lisa' de 'MD-2', del cual es progenitor el primero (Fig. 9). Ello está en correspondencia con lo planteado por Duval *et al.* (2001), quienes alegan que los cultivares del grupo horticultural Cayena tienen poca variación genética entre sí.



**Figura 9.** Amplificaciones del ADN con el marcador molecular RAPD de los cultivares 'MD-2', 'Cayena lisa', 'Española roja' y 'Cabezona' con los cebadores CS-12, CS-30, OPA-16 y OPC-06. Las flechas indican los polimorfismos.

### B) Amplificación del ADN de las accesiones de la colección con los cebadores de mayor polimorfismo

Los siete cebadores seleccionados proporcionaron productos de amplificación para los 54 cultivares conservados en la colección *ex situ*. El patrón de bandas generado por los iniciadores RAPD, fue característico para cada grupo horticultural y permitió distinguirlos perfectamente (Fig. 10).



**Figura 10.** Amplificaciones del ADN de cultivares del grupo horticultural Cayena y Pernambuco de la colección *ex situ* de piña con el cebador CS-12. Las flechas señalan los polimorfismos

En la Tabla 14 se pueden observar las tallas de los fragmentos amplificados, las que fluctuaron entre 383 y 2500 pb. Con igual técnica Santos *et al.* (2008) obtuvieron rangos superiores (hasta 5090 pb) en el estudio de la estabilidad genética en plantas micropropagadas de *A. bracteatus*, e inferiores (1 400 pb) por Burhooa y Ranghoo-Sanmukhiya (2012), en la evaluación de diferentes cultivares de piña y plantas ornamentales.

**Tabla 14.** Tamaño de bandas polimórficas (pb), número de alelos de los grupos hortícolas ( $A_h$ ), número de alelos de especies afines ( $A_e$ ) y número total de alelos ( $A_t$ ) de las amplificaciones del ADN con los cebadores seleccionados mediante el marcador tipo RAPD.

	Cebadores							Total	Media
	OPA-16	OPH-01	CS-12	CS-30	OPC-06	OPC-13	OPF-06		
Tamaño (pb)	1865-450	2500-500	1750-450	2000-800	1800-400	2000-850	1720-400		
$A_h$	<u>9</u>	5	4	4	5	7	<u>2</u>	36	5,1
$A_e$	4	5	1	3	1	3	1	18	2,6
$A_t$	<u>13</u>	10	5	7	6	10	<u>3</u>	54	7,71

En el total de 51 bandas polimórficas (Tabla 14), la media de bandas/cebador RAPD fue de 7,3; donde el menor número lo generó el cebador OPF-06 (3) y el mayor el cebador OPA-16 (13). En otras especies, con los cebadores de la serie OPA también han obtenido elevado polimorfismo Ronning *et al.* (1995) en el género *Annona*, Zain *et al.* (2009) en *Artemisia capillaris* L. y Gutiérrez y Rincón (2011) en *Phaseolus vulgaris* L.

En cuanto al número de bandas polimórficas estos resultados fueron inferiores a los informados por Ruas *et al.* (2001), quienes detectaron 136 bandas en el estudio de las relaciones genéticas entre accesiones de *Ananas* y *Pseudananas* conservadas en el banco de germoplasma de la EMBRAPA en Brasil; sin embargo Burhooa y Ranghoo-Sanmukhiya (2012), obtuvieron número similar de bandas polimórficas (48) entre accesiones del banco de germoplasma de Mauritius.

El número de bandas polimórficas (51) obtenidas se debe, en gran medida, a los productos de amplificación generados por las especies afines, la mayoría de estas bandas eran exclusivas para cada una. Como ejemplo de ello se puede señalar que el Curujey (36Cu) (*T. fasciculata*) con un patrón de amplificación diferente a *B. pinguin* y *B. karatas*; de igual manera se comportaron el Curujey (36Cu) y cada una de las especies afines evaluadas (datos no mostrados).

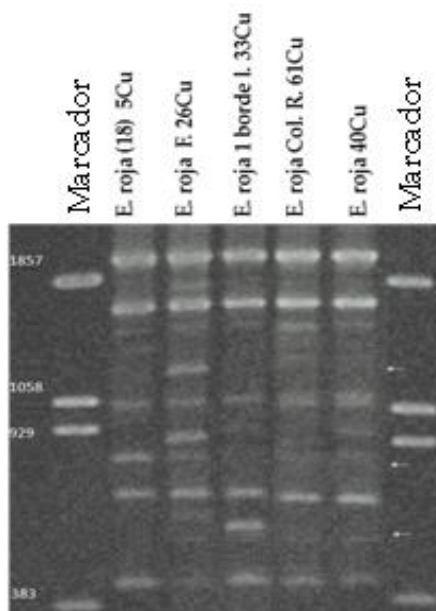
Al analizar de forma independiente los cultivares de cada grupo hortícola (Tabla 14), el número de bandas polimórficas detectadas disminuyó en gran medida (entre 2 y 9 bandas/cebador), lo que demuestra la diversidad genética que aportan las especies afines en estudio. Estos resultados fueron similares a los obtenidos, con igual marcador, por Sripaoraya *et al.* (2001), en la caracterización de la colección de piña de Tailandia, donde el mayor número de bandas polimórficas (41) lo observaron entre especies afines y el menor entre los cultivares comerciales (16). Con otro marcador (isoenzimático) Rodríguez *et al.* (2007) también detectaron mayor polimorfismo en las especies afines respecto a los cultivares de piña, en la colección *ex situ* de Venezuela.

En la Tabla 15, se muestra el número de bandas únicas reveladas por seis de los siete cebadores utilizados, donde el mayor valor (3) se detectó en el cv.'Mocaena' (42Cu) del grupo horticultural Cayena y el menor número de bandas (1) se obtuvo en la mayoría de los cultivares.

**Tabla 15.** Bandas únicas obtenidas mediante el marcador tipo RAPD en las accesiones de piña.

<b>ACCESIONES</b> pb	<b>CEBADORES RAPD</b>											
	<b>OPA-16</b>					<b>OPC-13</b>	<b>CS-30</b>		<b>OPF-06</b>		<b>CS-12</b>	<b>OPH-1</b>
	<b>1190</b>	<b>800</b>	<b>720</b>	<b>640</b>	<b>500</b>	<b>1850</b>	<b>1780</b>	<b>870</b>	<b>1180</b>	<b>350</b>	<b>800</b>	<b>1200</b>
<b>Cayena lisa (21Cu)</b>				X								
<b>Mocaena (42Cu)</b>							X		X			X
<b>Cayena lisa (50Cu)</b>									X			
<b>Cayenas</b>						X						
<b>Española roja (5Cu)</b>		X										
<b>Española roja (26Cu)</b>	X											
<b>Española roja (33Cu)</b>					X							
<b>P3R5 (37 a y b Cu)</b>			X									
<b>Piña blanca (60Cu)</b>											X	
<b>Jupi (8Cu)</b>								X				X
<b>Híbrido 054 (12Cu)</b>									X			
<b>Cabezona (15Cu)</b>										X		

Por otra parte, las cuatro bandas únicas generadas por el cebador OPA-16, que caracterizaron a tres de las accesiones del grupo horticultural Española ['Española roja' (5Cu, 26Cu, 33Cu)] y al somaclón 'P3R5' (37a y b Cu), permitieron diferenciarlas del resto de los materiales de este grupo (Fig. 11) y ninguna tiene igual patrón de amplificación. En el resto de los materiales, con este cebador OPA-16, solo se detectó una banda única (640 pb) en el cv. 'Cayena lisa' (21Cu).



**Figura 11.** Bandas únicas de las Amplificaciones al azar del ADN de cultivares del grupo horticultural Española que presentaron diferencias genéticas respecto al resto, con el cebador OPA-16. Las flechas indican los polimorfismos.

Dentro de las accesiones que solo presentaron una banda única están el cv. 'Piña blanca' (60Cu) con el cebador CS-12 (800 pb) y el híbrido CBCE-54 con OPF-06 (1 180 pb), en igual cebador se encontró una banda única para el cv. 'Cabezona' (15Cu) a 350 pb. En otras especies como en el género *Capsicum* con el marcador AFLP también han sido determinadas por Barrios (2010) bandas únicas, lo que le permitió establecer patrones de diversidad en las accesiones que evaluó. La presencia de bandas únicas ratifica la utilidad de las mismas en la caracterización de la diversidad de las colecciones.

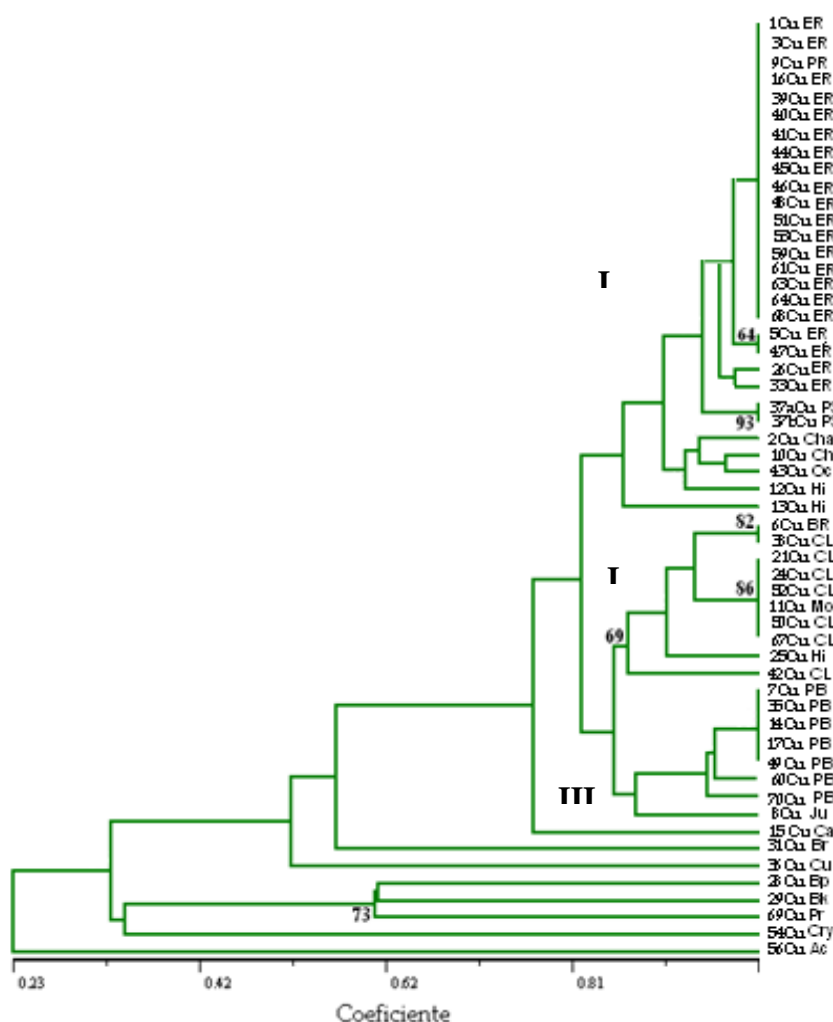
La correlación cofenética entre la matriz cofenética y la de similitud Dice, del dendrograma obtenido a partir de los siete cebadores RAPD, fue de  $r=0,97$ , este valor es muy elevado, lo que sugiere robustez en la clasificación de los genotipos. El remuestreo realizado al agrupamiento permitió diferenciar las clases de forma consistente.

Los valores de la matriz de similitud (datos no mostrados) obtenidos entre los diferentes genotipos variaron de 0,21 a 1,00 para una media de 0,80. El menor valor es entre 'Branco' (31Cu) y *B. pinguin* (28Cu) y el mayor valor en más de 100 combinaciones entre cultivares de igual grupo (Española, Pernambuco y Cayena). Estos valores los más bajos para las especies afines y los más altos para los cultivares de piña están en correspondencia con los obtenidos por otros autores con igual o diferentes marcadores, como los detectados por Ruas *et al.* (2001), los cuales alcanzaron menor coeficiente de similitud (0,57) entre las especies silvestres *Pseudananas sagenarius* (I-43949) y *A. lucidus*, y mayor coeficiente (0,91) entre dos cultivares del grupo horticultural Perolera mediante RAPD y con igual marcador, Burhooa y Ranghoo-Sanmukhiya (2012), consiguieron una relación genética inferior (0,605) entre las especies Wild (*A. bracteatus*) y 'Honey' (*A. comosus*) y mayor (0,803) entre los cultivares 'Bourgault' y 'Cayena lisa'. De igual manera, pero con el marcador AFLP, Tapia *et al.* (2005b) obtuvieron los menores valores en las especies afines y ornamentales, donde 0,009 fue entre 'Tricolor' y 'MD-2/' Carmelita' y 0,37 entre 'Tricolor' y 'MD-2/' Primavera'; el mayor valor (0,96) entre dos cultivares de 'Champaka' del grupo horticultural Cayena, resultado que era de esperar porque se consideraban materiales morfológicamente iguales.

En el análisis de conglomerados UPGMA de la matriz de similitud obtenida a partir del marcador RAPD, la línea de corte se estableció alrededor del valor 0,75; lo que permitió la formación de tres clases y ocho accesiones no agrupadas (Fig. 12). La representación de los grupos horticulturales establecidos en este análisis es semejante a la obtenida en la caracterización morfológica (acápite 3.2.1).

La clase I está integrada por accesiones del grupo horticultural Española y de otros grupos. Como se puede apreciar más del 60% de los cultivares 'Española roja' en estudio, comparten igual información genética y solo revelaron posibles diferencias con el cebador OPA-16, los cultivares 'Española roja' 18 (5Cu), 'Española roja' de Florencia (26Cu), 'Española roja' con un borde liso (33Cu) y 'P3R5' (37a y b Cu) (Fig. 10). Este último, se trata de un mutante que según Pérez (2003) no había sido posible clasificarlo mediante marcadores isoenzimáticos; sin embargo con el marcador AFLP se pudo corroborar que era un nuevo genotipo de piña.

A esta clase I, también están incorporados los cultivares 'Champaka' (2Cu) y 'China' (10Cu); el primero debería haberse agrupado con Cayena y no con Española, este resultado pudiera deberse a un error de identificación del curador. Del segundo cultivar no se tiene clara su relación de parentesco desde el punto de vista morfológico y en el análisis molecular se encuentra entre estos dos grupos. Este resultado concuerda con los obtenidos por el marcador AFLP, donde tampoco se logró una clara ubicación de este cultivar en ningún grupo horticultural.



**Figura 12.** Dendrograma de los genotipos conservados en la colección *ex situ*, basado en un análisis de agrupamiento UPGMA, la matriz de similitud generada con el coeficiente Dice, a partir de los datos moleculares de los siete cebadores RAPD. Se representan los valores de bootstrap superiores al 60%.

En la clase II se encuentran los cultivares pertenecientes a Cayena, en un primer subgrupo aparece el 'Barón de Rostshilt' (6Cu) y 'Cayena lisa.' (Granma) (38Cu) sin diferencias genéticas pero si con el resto de las Cayenas. Morfológicamente sucede lo mismo la diferencia de estos cultivares está dada por la presencia de pequeñas espinas a lo largo de la hoja. Estos dos últimos cultivares pueden ser un duplicado, porque la procedencia del material fue la misma, lo que justifica la similitud genética y morfológica entre ellos. La otra subclase está compuesta por más del 50% de las Cayenas de la colección, en las que no se detectaron diferencias y quedan separadas dentro de esta clase el híbrido CBCE-003 (25Cu) y el cv. 'Mocaena' (42Cu). Los resultados obtenidos se corresponden con los alcanzados con el marcador tipo AFLP y por Duval *et al.* (2001), Kato *et al.* (2004) quienes mediante el uso de los marcadores moleculares RFLP y RAPD respectivamente, revelaron algunas diferencias entre los cultivares de este grupo. Los tres híbridos cubanos CBCE-054 (12Cu), CBCE-021 (13Cu) y CBCE-003 (25u), se ubicaron en el intermedio de sus progenitores Cayena y Española. Resultado que concuerda con el obtenido con el marcador AFLP.

Resulta interesante que la clase III formada por las accesiones del grupo horticultural Pernambuco presentan una distribución más homogénea, en la mayoría de estas no se



detectan diferencias genéticas. Solo se separan los cultivares 'Cubana del Caney' (60Cu), 'Piña blanca' (70Cu) y 'Jupi' (8Cu), este último es un material introducido desde Brasil.

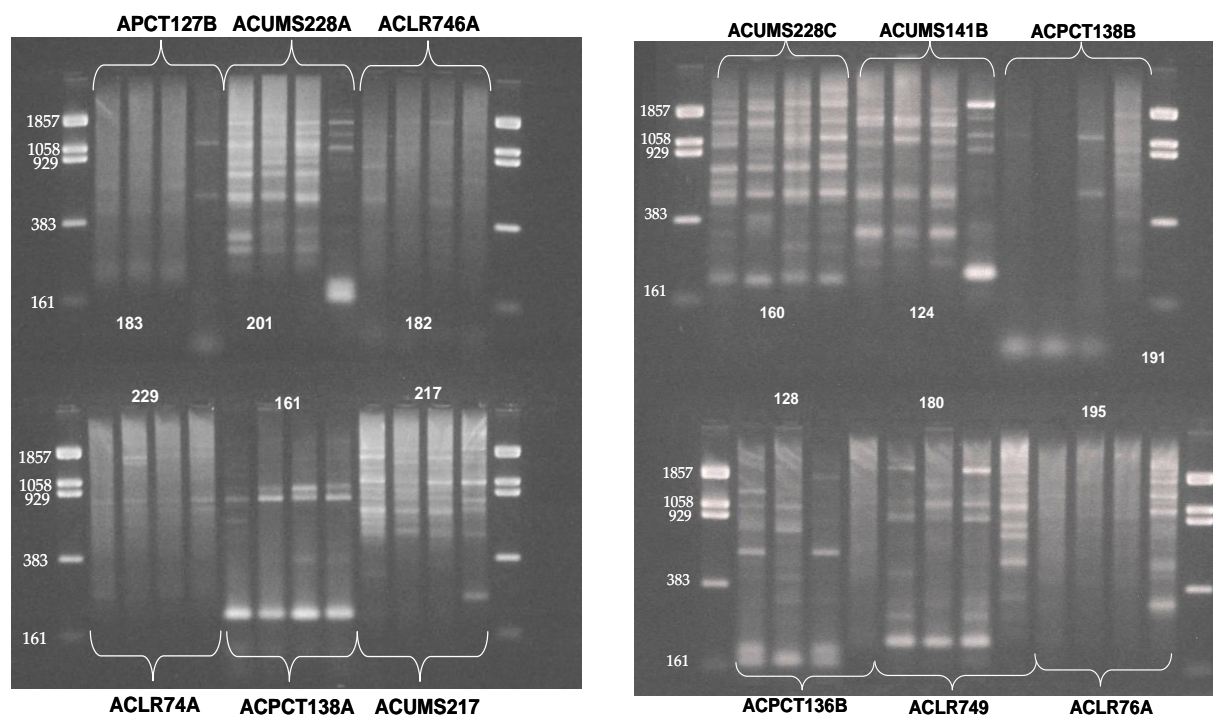
El resto de las accesiones no agrupadas fueron: el cv. Cabezona (15Cu) que aparece más relacionado genéticamente con el grupo horticultural Pernambuco que con Española. Esta afirmación se contradice con los resultados informados por Collins (1960), Py *et al.* (1987) y Dujardin (1991) quienes sostienen que este cultivar es un poliploide natural (3n) de Española. Le sigue a la accesión 'Branco' (31Cu) perteneciente a la especie *A. bracteatus*, el Curujey (36 Cu) del género *Tillandsia*, las especies afines *B. pinguin* (28Cu), *B. karatas* (29Cu) y Piña de Ratón (69Cu) que independientemente del alto valor (73) de bootstrap no se agruparon debido al criterio de corte, y por último las ornamentales *C. acaulis* (54Cu) y *A. fasiata* (56Cu). Los marcadores bioquímicos y moleculares utilizados por Duval *et al.* (2001), Tapia *et al.* (2005b), Rodríguez *et al.* (2007) en estudios taxonómicos del género, han permitido determinar la similitud genética de las especies afines con *A. comosus* y por tanto rectificar las clasificaciones propuestas para la familia *Bromeliaceae*.

Los resultados alcanzados con el marcador molecular RAPD permitieron detectar la variabilidad entre los genotipos de cada grupo. Para ganar en mayor precisión también se recomienda estudiar la colección con un tercer marcador molecular, en este caso por SSR.

### 3.3.3. Diversidad genética mediante el marcador SSR

#### A) Testaje de los cebadores informados en la literatura

Los productos amplificados de los genotipos de piña seleccionados para el testaje con los cebadores SSR informados por Kinsuat y Kumar (2007) para *A. comosus*, no fueron los esperados. En su mayoría amplificaron como cebadores inespecíficos, dando como resultado un número de bandas inusuales en este tipo de marcador molecular (Fig. 13).

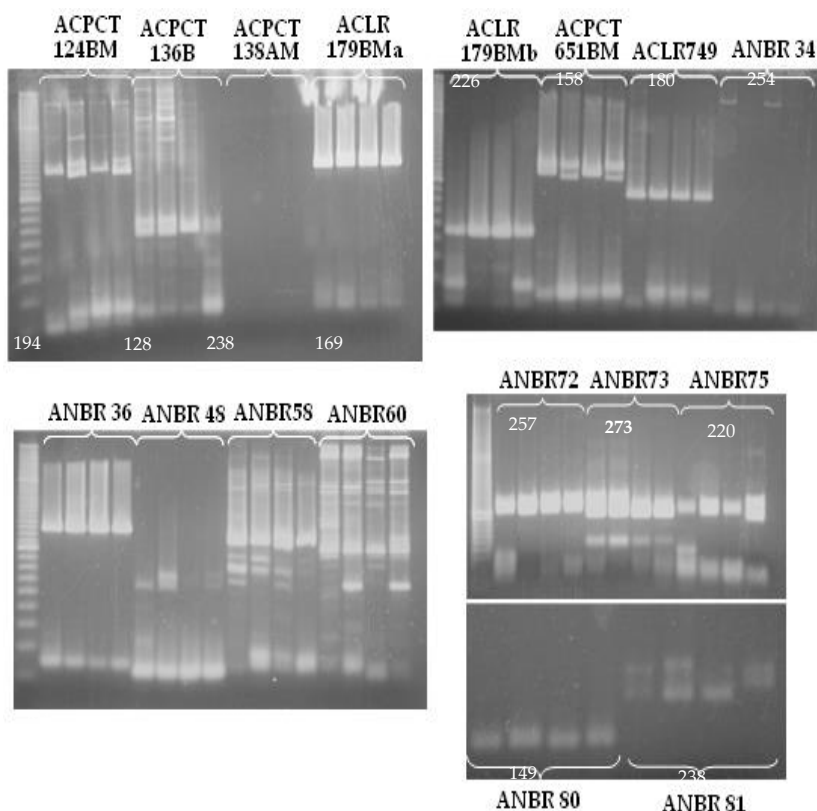


**Figura 13.** Amplificación del ADN de cuatro genotipos de piña con 12 cebadores SSR informados por Kinsuat y Kumar (2007). En ambos extremos se señala el marcador de pesos moleculares.



El análisis detallado de cada una de las secuencias correspondiente a cada loci informado por esos autores y publicadas en la base de datos NCBI, permitió detectar que en 15 *loci* SSR (ACLR179C, ACUMS217, ACUMS228A, ACLR746A, ACLR76A, ACLR776B, ACPCT127B, ACPCT124B, ACUMS141B, ACPCT610A, ACPCT643A, ACPCT662A, ACPCT651B, ACUMS228C y ACPCT662A), el motivo repetido estaba contenido dentro de la secuencia del cebador directo e indirecto. En el *locus* ACLR179B no aparecían los cebadores informados; en dos *loci* SSRs (ACLR179C y ACUMS217) se omitió o se cambió una base en el cebador respecto a la secuencia y en tres, el número de identificación de la secuencia fue incorrecto, dos correspondían a una especie de pez (*Naso vlamingii*) (ACPCT138B y ACPCT138A) y uno (ACLR74A) a otra secuencia de piña. Finalmente, de los 20 *loci* analizados, dos (ACLR749y ACPCT136B) no presentaron dificultades y en solo cuatro (ACLR179B, ACPCT124B, ACPCT651B y ACPT138A) se pudieron realizar modificaciones para la presente caracterización de piña.

De las 20 secuencias seleccionadas al azar de *A. bracteatus* (Blanc, 2003), se pudieron diseñar 10 pares de cebadores nuevos. Del total de cebadores utilizados (17) (los modificados y correctos del artículo, y los desarrollados a partir de *A. bracteatus*) (Anexo 3) en la presente investigación, permitieron la amplificación del ADN de los cuatro genotipos diferentes de piña utilizados en el testaje. Esto permitió seleccionar los 12 *loci* más polimórficos: ACPCT124BM, ACPCT136B, ACLR179BMa, ACLR179BMb, ACPCT651BM, ACLR749, ANBR58, ANBR72, ANBR73, ANBR75, ANBR80 y ANBR48 (Fig. 14).



**Figura 14.** Comprobación de las amplificaciones del ADN de piña con los 17 nuevos cebadores diseñados. En el extremo izquierdo se señala el marcador de pesos moleculares.

**B) Amplificación del ADN de las accesiones con los nuevos cebadores polimórficos**

La amplificación del ADN de los genotipos en estudio con los seis cebadores, diseñados a partir de *A. bracteatus*, se debe a la transferibilidad de los SSRs entre especies diferentes. La transferibilidad de este marcador ha sido comprobada por Hormaza (2002), quien caracterizó diferentes genotipos de *Prunus armeniaca* L. con cebadores SSR diseñados a partir de *Prunus persica* L. y por Valdés-Infante *et al.* (2009) quienes diseñaron cebadores SSR en guayabo para estudios moleculares de los géneros *Psidium*, *Zyzygium* y *Eugenia* pertenecientes a la familia *Myrtaceae*.

Estos resultados permiten superar la limitada disponibilidad de cebadores que dificultaba en sus inicios el uso de los marcadores SSR. El amplio conocimiento sobre el grado de conservación de las regiones flanqueantes, según Ciampi *et al.* (2008), Elazreg *et al.* (2011) y Cota *et al.* (2012), reduce la necesidad de diseñar cebadores específicos para identificar cada especie o géneros de una misma familia.

En la Tabla 16 se muestra la composición alélica del conjunto de genotipos de piña, obtenidos a partir del análisis molecular realizado con los 10 marcadores SSR. Se descarta la posibilidad de que los valores nulos que se presentaron con el *locus* ACLR179BMb, en las accesiones *B. karatas* (29Cu) y con el *locus* ACPCT124BM, estas accesiones, más los cultivares 'Cubana' (35Cu), 'Mocaena' (42Cu), 'Ocaena' (43Cu), 'Española roja' (53Cu, 63Cu y 64Cu), y las especies afines Curujey (36Cu) y Piña de Ratón (69Cu), se deban a errores en la extracción del ADN y a su amplificación porque este proceso se repitió dos veces.

La frecuencia de los alelos osciló entre 0,009 y 0,849 por lo que no hay ninguno fijado ( $p \geq 0,90$ ). Se encontraron 22 alelos raros ( $p \leq 0,05$ ) que representa casi la mitad del total de alelos (46%) y la mayoría de estos pertenecen a las especies afines a la familia. Excepto en los *loci* ANBR80 y ANBR81, en el resto de los *loci* (80%) se evidencia la presencia de alelos exclusivos. Por solo citar algunos ejemplos en *B. pinguin* (28Cu), *B. karatas* (29Cu) y Piña de Ratón (69Cu) [ANBR58 (197), ANBR75 (198), ANBR81 (250) y ACPCT651BM (170/180)]; en 'Branco' (31Cu) [ANBR58 (249), ANBR72 (233), ANBR75 (191) y ACLRB179BMb (112)]; en Curujey (36Cu) [ANBR58 (172/244) y ACPCT651BM (213/270)]. Esto evidencia la diversidad genética que aportan estas especies, resultado que coincide con lo informado por Duval *et al.* (2001), señalaron la mayor distancia genética entre estas especies respecto *A. comosus*. También Clemente *et al.* (2010) plantearon que las especies afines presentan características genéticas y morfológicas diferentes a los cultivares.

Cuando se analizó por separado la frecuencia de los alelos para los tres grupos hortícolas presentes en la colección *ex situ* de Cuba, se evidenció en cultivares del grupo Española, alelos fijados para los *loci* ANBR58 (233), ANBR72 (239) y ACLR179BMb (109); y la presencia de alelos raros en el cv. 'Española roja Morada' (16Cu) para el *locus* ANBR75 (200). En cultivares del grupo Cayena se identificó un alelo fijado para el *locus* ANBR80 (147); y alelos raros en el cv. 'Cayena lisa' (50Cu) para el *locus* ANBR75 (221) y en 'Champaka' (2Cu) para los *loci* ANBR80 (149) y ACLR179BMa (288). En el grupo Pernambuco solo se detectaron alelos fijados en los cultivares 'Piña blanca' para los *loci* ANBR58 (233), ANBR72 (239) y ANBR73 (211). En piña no hay información disponible al respecto, pero los datos son comparables con otros frutales como los obtenidos por Valdés-Infante *et al.* (2007) en *P. guajava*, donde detectaron 24 alelos comunes y 10 alelos raros, al utilizar siete combinaciones de cebadores SSR.

Tabla 16. Composición alélica obtenida del análisis molecular realizado con 10 marcadores SSR

No.	Genotipo	ANBR 58	ANBR 72	ANBR 73	ANBR 75	ANBR 80	ANBR 81	ACLR 179BMa	ACLR 179BMb	ACPCT 651BM	ACPCT 124BM
1Cu	Española roja M 35	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
2Cu	Champak	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	110	219 / 245	273 / 284
3Cu	Española roja Col. del Ramón	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
5Cu	Española roja (18)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
6Cu	Cayena lisa Barón de Rostshilt	229 / 233	239	211	200 / 210	147	240 / 260	280 / 284	109 / 110	229	284
7Cu	Piña blanca del Caney	233	239	211	220	147 / 149	268	280 / 288	109 / 110	219 / 245	273 / 284
8Cu	Jupi	233	241	211 / 217	210 / 220	147	240	279 / 280	109	229 / 245	284
9Cu	Puerto Rico	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
10Cu	China	233	239 / 255	211	220	147	240	279 / 280	109	219	273 / 284
11Cu	Mocaena	229 / 233	239 / 241	211 / 227	210 / 220	147	260	280 / 284	109	229	273 / 284
12Cu	Híbrido CxE 054	229 / 233	228 / 239	227	210 / 221	147 / 149	260 / 268	280	109	229 / 245	273
13Cu	Híbrido CBCE-021	229 / 233	239	211	210 / 221	147	260 / 268	280 / 284	109	219 / 229	273 / 284
14Cu	Piña blanca (Bolondrón)	233	239	211	220	147 / 149	268	280 / 288	109 / 110	219 / 245	273 / 284
15Cu	Cabezona	233	239 / 241	211	200 / 220	147 / 149	268	280	109	219 / 245	273 / 287
16Cu	Española roja Morada (Holguín)	233	239	211 / 227	200 / 220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
17Cu	Piña blanca Serrana	233	239	211	220	147 / 149	268	280 / 288	109 / 110	219 / 245	273 / 284
21Cu	Cayena lisa Serrana	229 / 233	239 / 241	211 / 227	210 / 220	147	260	280 / 284	109	229	273 / 284
22Cu	MD-2	229 / 233	239	211 / 227	220	147	240 / 260	280	109	229 / 245	284
24Cu	Cayena de Hawaii	229 / 233	239 / 241	211 / 227	210 / 220	147	260	280 / 284	109	229	273 / 284
25Cu	Híbrido CxE003	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
26Cu	Española roja Florencia	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273
28Cu	<i>Bromelia pinguin</i>	197	239 / 243	211 / 227	192 / 198	147 / 149	250	280	* / *	170 / 180	* / *
29Cu	<i>Bromelia karatas</i>	197	239 / 241	211 / 227	196 / 198	147 / 149	250	280 / 288	* / *	170 / 180	* / *
31Cu	Branco	233 / 249	233 / 239	211	191 / 220	149	260	280	109 / 112	245	258 / 284
33Cu	Española roja 1 borde liso	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273
35Cu	Cubana (Baracoa)	* / *	239	211	220	* / *	* / *	* / *	109 / 110	219 / 245	* / *
36Cu	Curujey	172 / 244	253	211 / 227	179	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	213 / 270	* / *
37aCu	Española roja P3R5	233	239	211 / 227	221	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
37bCu	Española roja P3R5	233	239	211 / 227	221	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
38Cu	Cayena lisa (Granma)	229 / 233	239	211	200 / 210	147	240 / 260	280 / 284	109	229	284
39Cu	Española roja (Granma)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
40Cu	Española roja (La Habana)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
41Cu	Española roja (Baracoa)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
42Cu	Mocaena	* / *	239	211 / 227	220	* / *	* / *	* / *	109	229 / 245	* / *
43Cu	Ocaena	* / *	239	211 / 227	220	* / *	* / *	* / *	109	219 / 245	* / *
44Cu	Española roja (San Cristobal)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
45Cu	Española roja (Rosario)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
46Cu	Española roja (Viñales)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
47Cu	Española roja (Aguada)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
48Cu	Española roja (Abreus)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
49Cu	Piña blanca (Rodas)	233	239	211	220	147 / 149	268	280 / 288	109 / 110	219 / 245	273 / 284
50Cu	Cayena lisa (Rodas)	229 / 233	239	211	210 / 221	147	260 / 268	280 / 284	109	219 / 229	273 / 284
51Cu	Española roja (Rodas)	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
52Cu	Cayena lisa	229 / 233	239 / 241	211 / 227	210 / 220	147	260	280 / 284	109	229	273 / 284
53Cu	Española roja (Bolondrón)	* / *	239	211 / 227	220	* / *	* / *	* / *	109	219 / 245	* / *
59Cu	Española roja del Caney	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
60Cu	Cubana del Caney	233	239 / 241	211 / 227	210 / 221	147	240 / 260	280	109 / 110	229 / 245	273 / 284
61Cu	Española roja Colorada del C.	233	239	211 / 227	220	147 / 149	240 / 268	280 / 288	109	219 / 245	273 / 284
63Cu	Española roja (Niceto Pérez)	* / *	239	211 / 227	220	* / *	* / *	* / *	109	219 / 245	* / *
64Cu	Española roja (Las Tunas)	* / *	239	211 / 227	220	* / *	* / *	* / *	109	219 / 245	* / *
67Cu	Cayena lisa (Isla J.)	229 / 233	239 / 241	211 / 227	210 / 220	147	260	280 / 284	109	229	273 / 284
69Cu	Piña de Ratón	197	228 / 239	211 / 227	196 / 198	147 / 149	250	280	106 / 109	170 / 180	* / *
70Cu	Piña blanca (Guantánamo)	233	239	211	220	147 / 149	268	280 / 288	109 / 110	219 / 245	273 / 284

\* / \* Ausencia de amplificación

Los parámetros de diversidad genética obtenidos a partir del análisis molecular con los cebadores SSR se presentan en la Tabla 17. Del total de 48 alelos generados (A) a partir de la amplificación de los genotipos en estudio, el *locus* que presentó mayor polimorfismo fue ANBR75 (9 alelos) y el de menor polimorfismo ANBR80 (2 alelos). Se obtuvo una media de 4,8 alelos/*locus*, con una fluctuación del número efectivo (Ne) de 1,29 (ACLR179BMb) a 3,27 (ACPCT651BM), para un promedio de 2,08. La media de alelos/*locus* obtenida con este marcador fue similar a la de Shoda *et al.* (2012) quienes con 18 cebadores SSRs en genotipos de piña de la colección de Japón fue de 4,1 alelos/*locus*. Al compararlo con el de Tapia *et al.* (2005b), en la caracterización de 15 genotipos de piña para el marcador ISSR fue inferior, 6 alelos/*locus*. Sin embargo, Rodríguez *et al.* (2007), con tan solo cuatro sistemas enzimáticos, detectaron una media muy superior (18,5 bandas/enzima) en el estudio de 789 individuos.

**Tabla 17.** Parámetros de diversidad genética del conjunto de genotipos analizados de la colección *ex situ* con 10 marcadores SSRs: número de alelos (A), heterocigosidad esperada y observada (He y Ho), índice de fijación Wright (F), probabilidad de identidad (PI), número efectivo de alelos (Ne) y p-valor para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Nombre del Locus	Tamaño de los fragmentos (pb)	A	Ne	He	Ho	F	PI	Desviación de HWE
ANBR58	172-249	6	1,57	0,38	0,28	0,24	<u>0,41</u>	**
ANBR72	228-253	6	1,37	0,29	0,23	0,16	0,33	0,17
ANBR73	211-227	3	1,94	0,49	0,75	-0,55	0,32	**
ANBR75	179-221	<u>9</u>	1,97	0,51	0,32	0,35	0,39	**
ANBR80	147-149	<u>2</u>	1,88	0,47	0,70	-0,50	0,16	**
ANBR81	240-268	4	3,17	0,69	0,66	0,04	0,33	**
ACLR179BMa	279-288	4	2,33	0,58	<u>0,87</u>	-0,53	<u>0,13</u>	**
ACLR179BMb	106-112	4	<u>1,29</u>	<u>0,25</u>	<u>0,21</u>	0,05	0,33	0,58
ACPCT651BM	170-270	7	<u>3,27</u>	<u>0,70</u>	0,83	-0,19	0,23	**
ACPCT124BM	258-284	3	2,04	0,52	0,84	-0,65	0,19	**
Media		4,8	2,08	0,49	0,57	-0,33	0,28	

\*\* Significación con  $p \leq 0,01$

La media de la probabilidad de identidad (PI) fue de 0,28, con valores que varían entre 0,13 en el *locus* ACLR179BMa hasta 0,41 en el *locus* ANBR58. También se observaron desviaciones significativas  $p \leq 0,01$  del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en ocho de los 10 *loci*. Se observó una relación inversa entre los valores He respecto a Ne y a PI, lo que implica la elevada heterocigosidad que revelan los microsatélites, lo cual corrobora que son marcadores apropiados para la identificación varietal. De esta forma, los *loci* ACLR179BMa (PI=0,13) y ACPCT651BM (He=0,70) resultaron ser los más informativos. Además, el 40% de los *loci* fueron altamente informativos con  $He \geq 0,5$  y  $PI \leq 0,35$  respectivamente. Este resultado permite afirmar que con tan solo cuatro de los *loci*, con mayor He y menor PI, se puede obtener la misma resolución en la identificación de los genotipos estudiados que con el resto de los SSRs utilizados en el presente trabajo. Este criterio coincide con los informados por Martín *et al.* (2011) en el frutal *P. armeniaca*, en el que demostraron una relación inversa entre los valores de heterocigosidad (0,60) respecto a los índices Ne (2,74) y PI (0,39).

La media de la heterocigosidad esperada (He) fue de 0,49, con valores que varían desde 0,25 en el *locus* ACLR179BMb hasta 0,70 en el *locus* ACPCT651BM. La heterocigosidad

observada ( $H_o$ ) presentó una media de 0,57, con valores que van desde los 0,21 en ACLR179BMb a 0,87 en ACLR179BMa. Estos resultados guardan relación con los alcanzados por Shoda *et al.* (2012) en *A. comosus*, quienes obtuvieron valores de 0,52 en la media de  $H_e$ , pero con diferencias en el rango de variaciones (0,09 y 0,76).

El Índice de fijación de Wright ( $F$ ) mostró que el 50% de los *loci* tienen valores positivos y el otro 50% valores negativo, lo que indica que no hay un marcado déficit de heterocigotos. Este valor podría ser menor si se eliminan las especies afines ya que fueron las que más alelos nuevos aportaban. Una de las razones que puede explicar estos resultados, está fundamentada según Coppens d'Eeckenbrugge y Duval (1995), por la ausencia de cruzamiento entre los cultivares, debido al tipo de reproducción asexual y a la autoincompatibilidad en los mismos.

Los resultados obtenidos permiten resaltar la importancia de los SSRs como una herramienta eficaz en la optimización del manejo de colecciones de germoplasma. Los marcadores desarrollados en la presente investigación pueden tener una aplicación práctica: en la estimación del nivel de variación entre poblaciones naturales y el manejo de los bancos de germoplasma, en el estudio de estructura poblacional, estudios taxonómicos, en procesos de domesticación y movimiento de material entre diferentes países, este último permite dilucidar los problemas de sinonimias, homonimias y ser de gran ayuda en los programas de mejora.

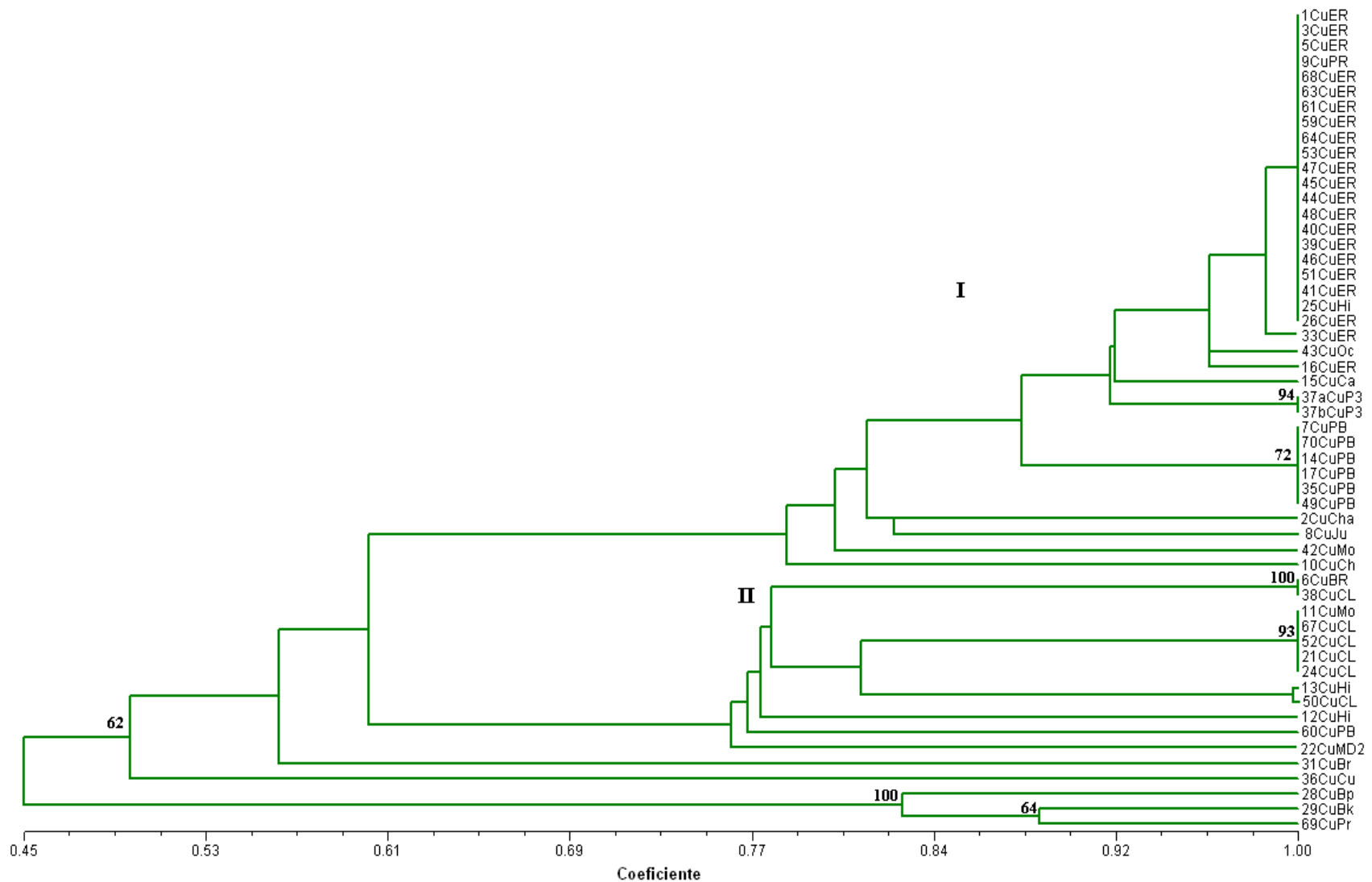
Los 10 cebadores SSRs seleccionados proporcionaron productos de amplificación para 54 accesiones de piña evaluadas. De los dendrogramas obtenidos, se eligió aquel que presentó mayor correlación cofenética ( $r=0,96$ ) entre la matriz cofenética y la de similitud Dice. El remuestreo realizado al agrupamiento permitió diferenciar las clases de forma consistente.

Los valores de la matriz de similitud (datos no mostrados) obtenidos entre los diferentes genotipos variaron de 0,24 a 1,00 para una media de 0,74. El valor más pequeño aparece entre *B. pinguin* (28Cu) y 'Puerto Rico' (9Cu) y el mayor valor en más de 150 combinaciones entre cultivares de igual grupo (Española, Pernambuco y Cayena). La mayoría de los cultivares conglomeraron a una distancia genética cercana a la de los grupos hortícolas de piña.

En el análisis de conglomerados UPGMA de la matriz de similitud obtenida a partir del marcador tipo SSR, la línea de corte se estableció alrededor del valor 0,70; lo que permitió la formación de dos clases (Fig. 15), una menos que en el caso de los RAPDs (Fig. 11) y algunas accesiones no agrupadas.

En la clase I, a diferencia que con el marcador tipo RAPD y AFLP, las accesiones pertenecientes a los grupos hortícolas Española y Pernambuco se conglomeraron en dos subclases, perfectamente diferenciadas. A excepción del cv. 'Cubana del Caney' (60Cu) en el resto de los cultivares que integran este último grupo no se detectó diversidad genética y en los de Española, la mayoría no presentaron diferencias, lo que ratifica la escasa diversidad de la colección. Con este marcador tan solo se diferenciaron los cultivares: 'Española roja' (16Cu), 'Española roja con un borde liso' (33Cu) y 'P3R5' (37a y b Cu).

También con SSR el cv. Cabezona (15Cu) aparece más relacionado genéticamente con las accesiones del grupo hortícola Pernambuco que con las del grupo Española. Sin embargo, Tapia *et al.* (2005b) mediante marcadores RAPD e ISSR lograron agrupar los cultivares 'Cabezona' con Española, lo que está en correspondencia con la clasificación que hacen Py *et al.* (1987).



**Figura 15.** Dendrograma de los genotipos de piña de la colección *ex situ*, basado en un análisis de agrupamiento UPGMA, se utilizó la matriz de similitud con el coeficiente Dice, obtenida a partir de los datos moleculares de 10 *loci* SSR. Se representan los valores de bootstrap superiores al 60%.



La clase II está integrada por accesiones del grupo horticultural Cayena, que se separa en dos subclases. La primera está constituida por los cultivares 'Barón de Rothschild' (6Cu) y 'Cayena lisa' (Granma) (38Cu), con la misma ubicación que la obtenida mediante RAPD. La otra subclase está compuesta por la mayoría de los cultivares de Cayena. La similitud genética entre ellas obedece, según Collins (1960) y Noyer (1991) a que algunos cultivares de Cayena se originaron de plantas domesticadas de este grupo en Guyana Francesa. Además, se consideran clones con poca variación genética, lo cual coincide con lo planteado por Kato *et al.* (2004), quienes afirmaron que la clasificación de estos genotipos es difícil debido a la estrecha base genética y a la similitud morfológica, que tienen los mismos.

Otras dos accesiones que se agruparon en esta clase y que no presentaron diferencias genéticas con los 10 SSRs utilizados, fueron el híbrido CBCE-021 (13Cu) y 'Cayena lisa' (Rodas) (50Cu), los cuales tuvieron características morfológicas distintas. Este híbrido, está descrito por Benega *et al.* (1999), que se obtuvo a partir de un cruzamiento entre 'Cayena lisa serrana' y 'Española roja pinareña', mientras que 'Cayena lisa' (50Cu) es una accesión colectada en la región central del país. Es de destacar que el cv. 'Cubana del Caney' (60Cu) formó parte de esta clase aunque por sus características morfológicas debería pertenecer al grupo horticultural Pernambuco. Esto puede deberse a la transferibilidad de los SSR estudiados, los que según Oliveira *et al.* (2006), pueden ser capaces de identificar las diferencias entre clases pero no dentro de estas.

El resto de las accesiones no agrupadas fueron: 'Branco' (31Cu), Curujey (36 Cu) y las especies afines *B. pinguin* (28Cu), *B. karatas* (29Cu) y Piña de Ratón (69Cu) que independientemente del alto valor (100 y 64 respectivamente) de bootstrap no se agruparon debido al criterio de corte. Los resultados obtenidos mediante el marcador SSR resultaron ser informativos y detectaron el polimorfismo en la colección en estudio. Según Wünsch y Hormaza (2002) y Pérez (2008), este se ha convertido en el marcador molecular más efectivo para la identificación varietal de las especies. La transferibilidad de los SSRs permitió agrupar los cultivares en los grupos horticulturales y diferenciar las especies afines; sin embargo esta pudo ser también la causa de no detectar diferencias genéticas entre accesiones de un mismo grupo.

La caracterización realizada mediante los 10 *loci* SSR, los siete cebadores RAPD y las cuatro combinaciones de cebadores AFLP, revelaron polimorfismo y permitieron distinguir los perfiles genéticos de las accesiones de piña. Estos marcadores permitieron evaluar su diversidad genética y corroborar, en su mayoría, la caracterización morfológica. La diversidad genética de las accesiones de la colección es baja, se debe enriquecer con cultivares y especies afines del género, provenientes de otras colecciones del mundo. La mayoría de los genotipos conservados pertenecen a los grupos horticulturales Española y Cayena, los cuales tienen una distancia genética baja. Para lograr una mejor organización y manejo de esta colección se podría construir una colección nuclear más pequeña que represente la diversidad de la colección mayor. La construcción de esta colección nuclear no implica la eliminación de los genotipos no incluidos en ella, pues aunque la diferencia sea mínima entre dos genotipos, esta puede ser importante.

### **3.4. Identificación de las amenazas de pérdida de diversidad genética del germoplasma de piña y acciones para minimizarlas**

El análisis de la pérdida de diversidad genética que experimenta el germoplasma de piña se resume en la Tabla 18. En ella se muestran los resultados de los criterios emitidos, por los actores locales y los expertos, en las entrevistas y talleres desarrollados durante las prospecciones, agrupados para cada región de Cuba.

**Tabla 18.** Frecuencia (F) y porcentaje de los criterios de los agricultores y expertos, recogidos en entrevistas y talleres desarrollados en las prospecciones, que implican amenazas de pérdida de diversidad genética de piña en Cuba.

AMENAZAS DE EROSIÓN	Occidente		Centro		Oriente		TOTAL PRODUCTORES		EXPERTOS	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
Abandono de cultivares	13	23,64	8	14,5	7	12,7	28	50,84	5	100
Vulnerabilidad de los cultivares frente a condiciones naturales adversas	5	9,09	1	1,82	5	9,09	11	20,00	2	40
Abandono de la tradición del cultivo de piña	12	21,82	3	5,45	2	3,64	17	30,91	3	60
Erosión de cultivares durante la conservación <i>in situ-ex situ</i> de la variabilidad única	11	20,00	2	3,64	1	1,82	14	25,45	5	100
Escasa posibilidad real para la reposición de los cultivares perdidos de la colección <i>ex situ</i>	-								4	80
Escasa posibilidad real para la introducción de nuevos cultivares a la colección <i>ex situ</i>	-								3	60

Entre las principales amenazas se identificaron las siguientes:

✓ **Abandono de cultivares.**

Esta fue la amenaza que mayor incidencia tuvo en el país tanto para los productores (50,84%) como para los expertos (100%). Varios cultivares han sido abandonados en diferentes regiones por su susceptibilidad a enfermedades fungosas, sus bajos rendimientos y el escaso material de propagación que producen (semilla agámica). Estos factores según Barrios (2010) están contemplados dentro de las formas de erosión genética.

Los cultivares del grupo horticultural Pernambuco ('Piña blanca') tienen mayor riesgo de erosión, ya que gran parte de las áreas en las que se plantaba este cultivar han sido sustituidos fundamentalmente por el cv. 'Española roja'. Esto ha incidido en sus bajos rendimientos, así como la fragilidad de los frutos por el llamado "golpe de sol" y su poca rusticidad, a pesar de la textura de su fruto y excelente sabor.

Por otra parte los cultivares del grupo horticultural Cayena, que en décadas anteriores según Herrera (1974) se encontraban presentes en las provincias Pinar del Río, La Habana y Ciego de Ávila, ahora han desaparecido prácticamente de los campos, lo que se debe a su baja tasa de multiplicación, las exigencias agronómicas y la susceptibilidad a diferentes factores bióticos y abióticos.

Otro caso interesante resultó el cv. 'Cabezona' el cual se describió en Santo Domingo, provincia Villa Clara, en Gibara, provincia Holguín y en "Niceto Pérez", provincia Guantánamo, y actualmente solo quedan pequeñas plantaciones en Gibara y algunos ejemplares en Guantánamo.

✓ **Vulnerabilidad de los cultivares frente a condiciones adversas.**

Esta fue la amenaza que menor incidencia tuvo tanto por los productores (20%) como por los expertos (40%). La ubicación geográfica de la isla favorece las afectaciones del

fondo genético de los cultivos, por el paso de las tormentas tropicales y los huracanes, que para el caso de la piña implica daños por inundaciones temporales de las plantaciones y desprendimiento de las plantas por el arrastre de las aguas. Contradictoriamente, aunque la piña se comporta como una planta de poco requerimiento de agua, las condiciones de sequía prolongadas que han ocurrido en el país (Fundora *et al.*, 2006), han deteriorado o deshidratado plantaciones de fomento en diversas regiones.

Los cultivares menos representados en número y áreas cultivadas son los que corren mayor riesgo de perderse, tal es el caso de los cultivares 'Cabezona' (Gibara), 'Cayena lisa' ("Frank País") y 'Barón de Rothschild' (Cienaguilla), este último es el más amenazado, ya que su densidad poblacional *in situ* es muy baja.

✓ **Abandono de la tradición del cultivo de piña.**

Es la segunda causa identificada como amenaza con una incidencia según los productores (30,94%) y los expertos (60%). La tradición del cultivo de esta fruta se abandona paulatinamente porque los descendientes de los productores tienen otros intereses y dejan perder las plantaciones. Aunque esto afecta a varias regiones del país, tienen mayor incidencia las que están cercanas a los polos turísticos, en especial en la provincia Ciego de Ávila para el cv. 'Cayena lisa serrana' (21Cu) y en Matanzas el cv. 'Piña blanca' (14Cu).

✓ **Erosión de cultivares durante la conservación *in situ* y *ex situ* de la variabilidad única.**

La variabilidad única del germoplasma de piña es una amenaza más valorada por los expertos (100%) que por los productores (25,45%), debido a la importancia que se le concede por los especialistas a la conservación de la diversidad tanto *in situ* como *ex situ*. Esta variabilidad se ha perdido por diversos motivos de índole material, como la escasez de recursos para la conservación y el manejo de las colecciones vivas (labores, ataque de plagas, entre otras), agravados por la baja población disponible en el campo y la escasa cantidad de muestras conservadas *in vitro*. Por ejemplo, las accesiones 'Primavera' y otras Cayenas (Cayena de Ecuador, Guinea y México), que se perdieron definitivamente, debido al inadecuado manejo del germoplasma y otros factores relacionados con la actividad del hombre.

Referente a la conservación *in situ* se han erosionado valiosos cultivares debido al poco conocimiento por parte de los productores del papel que juegan los mismos en la preservación del germoplasma. Dentro los cultivares erosionados podemos resaltar la pérdida del cv. 'Cabezona' en las regiones occidental y central.

✓ **Escasa posibilidad real para la reposición de los cultivares perdidos de la colección *ex situ* de germoplasma.**

Los expertos consideran (80%) que es muy difícil la reposición de los cultivares perdidos en la colección *ex situ* a partir de nuevas colectas en sus lugares de origen, debido a la poca disponibilidad de recursos financieros para la organización y realización de expediciones con este fin. Las accesiones que proceden de colectas anteriores y que se han perdido en el germoplasma *ex situ*, no pueden ser repuestas fácilmente y las amenazas a los que están sometidos los RFG *in situ*, agravan esta situación.

✓ **Escasa posibilidad real para la introducción de nuevos cultivares a la colección *ex situ* de germoplasma.**

A pesar de que en el país se han realizado introducciones de material de piña foráneo, los expertos consideran (60%) que esta no es una alternativa asequible en la actualidad

para incrementar la diversidad de la colección *ex situ*, debido a las limitaciones en los mecanismos de cuarentena. Un ejemplo de esto lo constituye las dificultades para la entrada al país de cultivares que se han identificado en otros bancos de germoplasmas, pero sería necesario una reestructuración en las condiciones para la cuarentena en el país y poder cumplir las reglamentaciones establecidas a este efecto en la importación de material vegetal.

La utilización del método de Investigación-Acción-Participación (IAP) (Pérez, 1990; Santos *et al.*, 2011) fue acertada para la identificación de las diferentes amenazas de erosión genética del germoplasma de piña en Cuba. Aunque para detectar estas amenazas se tuvieron en cuenta los criterios de los actores locales de las comunidades, su participación en la solución de las mismas es aún poco efectiva para garantizar de forma sostenible su contribución al desarrollo local (Mirabal, 2006), en especial para conservar la diversidad *in situ* del género *Ananas*.

### **Acciones para minimizar la erosión del germoplasma de piña**

A partir del análisis de las amenazas de erosión genética identificadas, se proponen las siguientes acciones para minimizarlas:

1. Favorecer la propagación de cultivares con riesgos de erosión genética y con limitada disponibilidad de brotes, de los híbridos obtenidos del Programa Nacional de Mejora y de las especies afines.
2. Establecer estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* (*in vitro/in vivo*), que apoyen la recuperación de la diversidad genética perdida en los sistemas agrícolas dañados y reforzar estas colecciones con esa valiosa diversidad.
3. Establecimiento de una colección núcleo donde estén los cultivares que más aportan a la diversidad.
4. Promover la participación comunitaria en la protección y el manejo de la diversidad que conservan y favorecer el intercambio de germoplasma y de conocimientos locales, en función del rescate de las tradiciones culturales que propicien la conservación y uso de la agrobiodiversidad.
5. Realizar el reconocimiento social, por parte de las instituciones pertinentes, de los agricultores y comunidades involucradas en la actividad de conservación de la diversidad de la especie para motivar el desarrollo de esta labor.
6. Confeccionar materiales didácticos de corte popular que se adecuen a los propósitos mencionados en la acción No. 3.
7. Garantizar la conservación de los parientes silvestres en su hábitat natural y *ex situ*.
8. Apoyar los programas de micropropagación mediante técnicas biotecnológicas en función de los intereses productivos y de la conservación.
9. Fomentar la conservación *in vitro* del germoplasma *ex situ* por medio de técnicas de crioconservación.
10. Proponer la asignación de fondos estatales para realizar colectas, conservación *ex situ* y capacitaciones a los agricultores que permitan verdaderamente afrontar las graves amenazas de erosión mencionados.
11. Promover la presentación y aprobación de proyectos nacionales e internacionales para poder trabajar de forma efectiva y minimizar la erosión de los RFG de la especie en Cuba

12. Abogar por un programa inmediato de rehabilitación de la Cuarentena Vegetal en el país que permita la introducción de nuevos materiales a la colección *ex situ*, para apoyar futuros programas de mejoramiento.

En Cuba, también se han desarrollado acciones para minimizar la erosión genética como las realizadas por Fundora *et al.* (2006) y Shagardsky *et al.* (2009), ambos del grupo de Recursos Genéticos del INIFAT en especies de hortalizas, granos básicos y oleaginosas, así como también por Barrios (2010), quien propuso un conjunto de acciones para minimizar la erosión genética del género *Capsicum* después de evaluar el germoplasma cubano conservado *ex situ* e *in situ*. Estas acciones están en correspondencia con el nuevo paradigma de la agricultura (FAO, 2011) de “Ahorrar para crecer”.

Los estudios realizados en la presente investigación, permitieron advertir sobre la vulnerabilidad a la que está expuesta la diversidad conservada *in situ* de los RFG del cultivo en Cuba, la cual se mantendrá en la colección *ex situ* del Centro de Bioplasmas. Con la puesta en marcha de algunas de las acciones sugeridas, se ha favorecido el intercambio con los campesinos y la entrega de documentación ha contribuido a un manejo más eficiente del cultivo, así como a la conservación *in situ* del germoplasma de piña. De esta forma, será posible salvaguardar los recursos fitogenéticos de esta valiosa fruta.

### 3.5. Conservación del germoplasma de piña a partir de las acciones propuesta para disminuir la pérdida de diversidad genética

#### 3.5.1. Establecimiento y validación de la colección núcleo del banco de germoplasma

##### 3.5.1.1. Establecimiento de la colección núcleo

En el análisis de conglomerados para el germoplasma cubano con los Descriptores Mínimos (acápito 3.2.3.), se formaron tres clases que estaban en correspondencia con los grupos hortícolas: Española, Pernambuco y Cayena. La proporción de individuos incluidos en cada una de estas clases se observa en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Composición de las clases y número de accesiones de los grupos formados en la colección base (CB).

COMPOSICIÓN DE LAS CLASES				
CLASES	No. Acc.	Región del país/BG.	No. Acc.	Cultivares
I	30	<b>Occidente</b>	8	ER 40Cu, ER 44Cu, ER 45Cu, ER 47Cu, ER 53Cu, ER 68Cu, ER 48Cu y ER 46Cu
		<b>Centro</b>	4	ER 26Cu, ER 51Cu, ER 30Cu y ER 5Cu
		<b>Oriente</b>	11	ER 16Cu, ER 43Cu, ER 39Cu, ER 61Cu, ER 64Cu, ER 3Cu, ER 33Cu, ER 59Cu, ER 41Cu, ER 63Cu y Ca 15Cu
		<b>Banco de G.</b>	7	P3R 37Cu a y b, ER 1Cu, Hi 12Cu, Hi 25Cu, Hi 13Cu y PR 9Cu
II	7	<b>Occidente</b>	1	PB 14Cu
		<b>Centro</b>	2	PB 49Cu y PB 17Cu
		<b>Oriente</b>	4	PB 7Cu, PB 60Cu, PB 70Cu y PB 35Cu
III	11	<b>Occidente</b>	2	CL 52Cu y CL 67Cu
		<b>Centro</b>	2	CL 21Cu y CL 50Cu
		<b>Oriente</b>	3	BR 6Cu, BR 38Cu y MO 42Cu
		<b>Banco de G.</b>	4	CH 2Cu, MD 22Cu, CL 24Cu y MO 11Cu

I- Española, II- Pernambuco y III- Cayena BG.- Banco de germoplasma

A partir de los resultados agromorfológicos, el criterio del curador y la distribución geográfica se realizó una primera aproximación de la colección núcleo respecto a la colección base, la cual representó el 47,9% de las accesiones. En una segunda aproximación, se consideró también el criterio de selección a partir de los análisis moleculares mediante RAPD y SSR (acápites 3.3.2 y 3.3.3).

La colección núcleo de piña en Cuba después de las selecciones quedó constituida por 16 accesiones lo que representa un 33,3% de la colección base (Tabla 20). Esta cifra puede parecer elevada cuando se compara con el tamaño del núcleo de otras especies, por ejemplo Knüpfner y van Hintum (1995) establecieron una colección núcleo con menos del 0,3% (1600 accesiones) del total de accesiones existentes en la Colección Internacional de Cebada. Así como también, Spillane *et al.* (inédito) citado por van Hintum *et al.* (2003), crearon una colección núcleo de sorgo con 1,5% (600 accesiones) del total de los materiales (40 000 accesiones) conservados en el ICRISAT en la India. Es importante señalar que en estos casos, según Fundora *et al.* (2006), los núcleos se obtuvieron de colecciones completas de bancos de germoplasma representativos de la diversidad de todo el mundo, en los que se hizo una catalogación muy completa de los grupos de diversidad existentes en las especies.

**Tabla 20.** Composición de la colección núcleo establecida a partir de la colección base (CB).

COMPOSICIÓN DE LAS CLASES					
CLASES	No. Acc.	% CB	Región del país/BG.	No. Acc.	Cultivares seleccionados
I	9	18,8	<b>Occidente</b>	-	-
			<b>Centro</b>	3	ER 26Cu y ER 30Cu, ER 5Cu
			<b>Oriente</b>	4	ER 33Cu, ER 63Cu, ER 16Cu y Ca 15Cu
			<b>Banco de G.</b>	2	P3 37aCu y Hi 12Cu
II	2	4,2	<b>Occidente</b>	1	PB 14Cu
			<b>Centro</b>	-	-
			<b>Oriente</b>	1	CC 60Cu
III	5	10,4	<b>Occidente</b>	-	-
			<b>Centro</b>	1	CL 21Cu
			<b>Oriente</b>	2	BR 6Cu y MO 42Cu
			<b>Banco de G.</b>	2	CH 2Cu y CL 24Cu
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>33,3</b>	I Española, II- Pernambuco y III- Cayena		

El tamaño obtenido en la colección núcleo resultó adecuado para las condiciones de Cuba. Este resultado está en correspondencia con los alcanzados por Fundora *et al.* (2006), quienes establecieron en el país colecciones núcleo con un 25 y 30% de representación respecto a la colección base, en especies de hortalizas, granos básicos y oleaginosas.

Sobre el tamaño de las colecciones núcleos existen diferentes criterios, según Brown y Spillane (1999) estas deben tener un tamaño entre 5 y 20% respecto a la colección base; en cambio Noirot *et al.* (1996) y Bhattacharjee *et al.* (2007), sugirieron porcentajes mayores, entre 20 a 30%. Aunque estos son los porcentajes, otro criterio respecto al tamaño de las colecciones núcleo es el de Castillo *et al.* (2008), quienes plantearon que si la colección a partir de la cual se desarrolla una colección núcleo es muy grande, el tamaño porcentual puede ser menor que 5%, pero si la colección base es pequeña este valor se incrementa.



### Descripción de los grupos de variabilidad que componen la colección núcleo

- Clase I: quedó constituida por nueve cultivares del grupo horticultural Española, este es el más representativo del país y a pesar de las condiciones en las que se planta tiene buenos rendimientos. Dentro de las accesiones seleccionadas se encuentra, uno de los híbridos obtenidos a partir de un programa de mejora cubano; el poliploide 'Cabezona', planta con un fruto de gran tamaño, utilizado en el turismo y la variante somaclonal 'P3R5', con características superiores respecto a su progenitor (Española). De manera general, el resto de los cultivares tienen mayor rusticidad que los del grupo horticultural Cayena y Pernambuco, poseen frutos más fibrosos, menos dulces y pequeños.
- Clase II: fue la más pequeña, está constituida solamente por dos cultivares del grupo horticultural Pernambuco; son plantas con características morfoagronómicas y moleculares similares, y presentan mayor riesgo de erosión genética en el país. Estos cultivares se caracterizan por presentar frutos en forma piramidal, son extremadamente dulces y jugosos.
- Clase III: quedó constituida por cinco accesiones del grupo horticultural Cayena, el más importante en el mercado internacional; por el cv. 'Baron de Rothschild', con características morfológicas diferentes al resto de los cultivares respecto a la espinosidad de la hoja; por dos introducciones procedentes de Brasil y Hawai, las cuales enriquecen la colección; por el cv. 'Mocaena', cultivada solo en una zona aislada de Baracoa, provincia Guantánamo y por el cv. 'Cayena lisa serrana', que ha sido utilizada como progenitora femenina en programas cubanos de mejoramiento genético. De manera general, los cultivares de esta clase se caracterizan por presentar frutos con amarillo-naranja muy llamativo tanto en la cáscara como en la pulpa, de poca fibra, abundante jugo y un dulzor muy agradable al paladar.

Además, en la Tabla 21, se muestra la descripción de las accesiones que integran la colección núcleo establecida a partir de las clases formadas mediante los descriptores mínimos, por: región de procedencia, grupo horticultural al que pertenecen y la media de los caracteres cuantitativos por accesión y grupo. Aunque la colección núcleo se estableció con dominio para los cultivares comerciales, debido al valor que presentan las especies afines del género para programas de mejora, también se incluyeron las accesiones Branco (*A. bracteatus*), *B. pinguin*, *B. karatas*, Piña de ratón (*B. pinguin*) y Curujey (*T. fasciculata*).

**Tabla 21.** Descripción de las accesiones que integran la colección núcleo establecida a partir de las clases formadas mediante los descriptores mínimos, región de procedencia, grupo horticultural al que pertenecen, caracteres cualitativos y la media de los caracteres cuantitativos por accesión y clase.

ID.	ACCESIONES	P	GH	CH	DE	FF	CF	PO	FO	CP	DP	AH	DF	LF	DC	MFsC	Rel	SS	AT
12Cu	Híbrido CBCE-054	BG	Española	VtR	C	B	NR	M	R	B	107,0	2,5	15,8	17,8	2,1	886,3	0,10	11,4	1,30
5Cu	Española roja (18)	C	Española	VtR	RA	B	NR	P	R	B	100,5	4,3	14,2	15,2	1,2	1085,4	0,10	9,1	1,37
15Cu	Cabezona	OR	Española	VtR	I	B	NR	P	R	Ap	148,0	5,8	17,6	22,6	2,5	3281,1	0,08	9,3	0,98
16Cu	Española roja Morada	OR	Española	VtR	RA	B	NR	P	R	B	94,5	3,7	12,7	16,5	1,3	1014,9	0,24	8,7	1,80
26Cu	Española roja	C	Española	VtR	RA	B	NR	P	R	B	115,6	3,2	15,6	18,6	1,8	942,8	0,13	14,4	1,50
30Cu	Española roja pinareña	C	Española	V	R	B	NR	P	R	B	117,0	4,6	12,0	13	1,6	764,1	0,24	8,7	1,30
33cu	Española roja un borde l.	OR	Española	VtR	C1b	B	NR	P	R	B	93,2	4,5	11,0	12,3	1,5	627,2	0,21	8,5	0,95
37Cu	Española roja P3R5	BG	Española	VtR	Rp	B	NR	P	R	B	82,5	4,2	16,3	15,6	1,8	664,6	0,30	13,4	1,30
63Cu	Española roja	OR	Española	VtR	I	B	NR	P	R	B	122,7	4,5	13,0	16,8	1,6	1011,2	0,18	8,7	0,97
<b>CLASE I ESPAÑOLA</b>											<b>109,3</b>	<b>4,4</b>	<b>14,1</b>	<b>16,3</b>	<b>1,7</b>	<b>1173,9</b>	<b>0,20</b>	<b>10,1</b>	<b>1,30</b>
14Cu	Piña blanca	OC	Pernambuco	Vcl	R	Pi	VA	M	Rd	B	102,8	1,8	9,6	19,8	1,1	959,8	0,09	17,8	1,71
60Cu	Cubana del Caney	OR	Pernambuco	V	R	Pi	VA	M	Rd	B	90,5	2,7	12,0	14,7	1,3	971,8	0,16	16,5	1,20
<b>CLASE II PERNAMBUCO</b>											<b>96,6</b>	<b>2,2</b>	<b>10,8</b>	<b>17,2</b>	<b>1,2</b>	<b>965,8</b>	<b>0,12</b>	<b>17,1</b>	<b>1,45</b>
2Cu	Champaka	BG	Cayena	VtR	C	Ci	AN	PP	H	A	108,0	5,2	15,0	20,0	1,3	1677,6	0,11	17,4	1,52
6Cu	Baron de Rothschild	OR	Cayena	Rz	Es	Ci	AN	PP	H	A	99,5	4,1	20,6	19,8	2,6	831,9	0,27	12,4	1,90
21Cu	Cayena lisa serrana	C	Cayena	VtR	C	Ci	AN	PP	H	A	95,7	4,0	16,5	20,5	1,8	719,7	0,30	14,8	1,80
24Cu	Cayena de Hawaii	BG	Cayena	V	C	Ci	AN	PP	H	A	90,0	4,3	20,0	16,8	1,6	800,4	0,25	12,8	1,70
42Cu	Mocaena	O	Cayena	V	C	Ci	AN	PP	H	A	97,2	3,8	12,3	14,7	2	776,2	0,17	15,2	2,30
<b>CLASE III CAYENA</b>											<b>98,1</b>	<b>4,3</b>	<b>16,9</b>	<b>18,4</b>	<b>1,9</b>	<b>961,2</b>	<b>0,20</b>	<b>14,5</b>	<b>1,80</b>

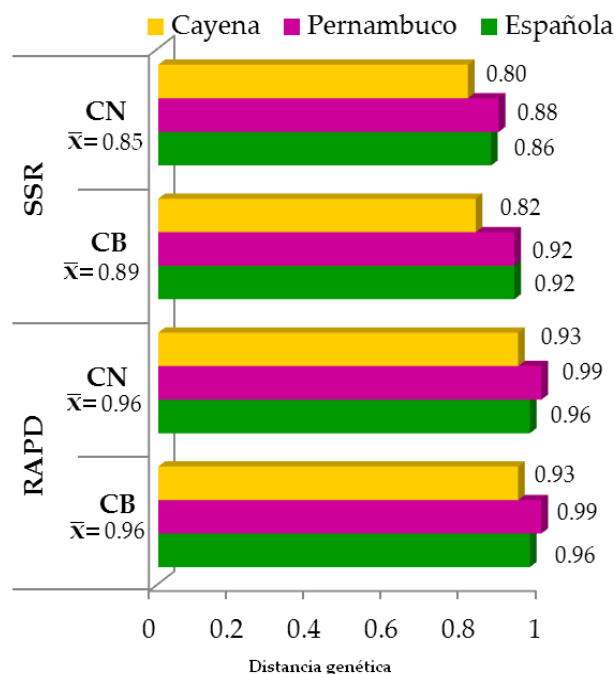
ID.- número utilizado para la identificación del material; P- procedencia: BG- banco de germoplasma, Oc- Occidente, C- Centro, Or- Oriente; GH.- grupo horticultural; CH-color de la hoja: VtR-verde con tintes rojos, V-verde, Vcl- verde claro, Rz- rojiza, C-cayena; DE- distribución de las espinas: RA- regular alta, I- irregular, R- regular, C1b- con un borde liso, Rp- regular poca, R- regular, Es- española; FF- forma del fruto: B-barril, Pi- pirameidal, Ci- cilíndrico; CF- color externo del fruto: NR- naranja rojizo, VA- verde amarillo, AN- amarillo naranja; PO- profundidad de los ojos: M- medianamente profundos, P- proyectados, PP- poco profundos; FO- forma de los ojos: R- rectangulares, Rd- redondeados, H- hexagonales, B-blanca, Ap- amarilla pálida, A- amarilla. DP- diámetro de la planta (cm), AH- ancho de la hoja (cm), DF- diámetro del fruto (cm), LF- longitud del fruto (cm), DC- diámetro del corazón(cm), MFsC- masa del fruto sin corona (g), Rel- relación masa de la corona/masa del fruto con corona, SS- sólidos solubles (°Brix), AT- acidez total (%).

### 3.5.1.2. Validación de la propuesta de colección núcleo

#### - Comprobación de la selección adecuada de las accesiones, con los marcadores moleculares RAPD y SSR

Los criterios morfoagronómicos y moleculares permitieron agrupar correctamente a las accesiones de ambas colecciones, estas siguieron una adecuada distribución y contaron con la presencia de más de una accesión de cada grupo horticultural. Este resultado se corresponde con los obtenidos por van Hintum *et al.* (2003), quienes sugirieron que en las colecciones núcleo se deben incluir todos los grupos de variabilidad, aunque alguno de ellos solo esté integrado por uno o dos individuos. Una selección diferencial, que sea proporcional solo al tamaño del grupo para tener oportunidad de ser escogido, podría eliminar del núcleo una parte importante de la variabilidad, en eso consiste precisamente la selección estratificada. Ello permitió realizar la comprobación de la selección apoyado por el estudio genético con los marcadores RAPD y SSR.

Al analizar el promedio de la distancia genética, en la colección base y en la colección núcleo, de los tres grupos horticulturales con los marcadores moleculares RAPD y SSR se pudo apreciar (Fig. 16), que para RAPD fue igual a 0,96, tanto para la colección núcleo como para la colección base, por lo que todo el fondo genético para este marcador está representado en igual proporción entre los grupos horticulturales, no así con el marcador SSR en el cual se evidenció una pequeña diferencia entre la CB (0,89) y la CN (0,85). Respecto a la distancia genética de las clases la constituida por las accesiones del grupo Cayena fue la más baja con ambos marcadores (0,93 en RAPD y 0,80 en SSR).



**Figura 16.** Medias de las distancias genéticas obtenidas mediante los marcadores moleculares RAPD y SSR de cada grupo horticultural y por marcador, en la colección base (CB) y la colección núcleo (CN).

En los grupos horticulturales Pernambuco y Española, con el marcador SSR, se observó una discreta disminución de la diversidad genética respecto a la colección base. La selección efectuada retuvo gran parte de la diversidad genética de la colección detectada por ambos marcadores, en el grupo horticultural Cayena esta variabilidad se maximizó. Las distancias genéticas también han sido utilizadas para validar la selección de las colecciones núcleo por Puldón *et al.* (2006), Barrios (2010) y Belaj *et al.* (2012) en *O. sativa*, *Capsicum* spp. y *Olea europaea* L., respectivamente.

**- Comprobación de la variabilidad retenida en las accesiones seleccionadas en la colección núcleo para los atributos morfoagronómicos**

En la Tabla 22 se muestran los valores de retención de los caracteres cuantitativos. Donde la máxima retención de los rangos en la colección núcleo para la variabilidad agronómica fue efectiva con un valor promedio general de 87%. Los rangos retenidos por grupo de variabilidad en el núcleo seleccionado oscilaron entre 58% (clase II) y 94% (clase III). Este bajo valor observado en la clase II se explica porque del grupo horticultural Pernambuco solo se seleccionaron dos cultivares, parte de la variabilidad agronómica se sacrificó en función de la inclusión de variantes moleculares de los otros dos grupos horticulturales, y de esta forma no incrementar el tamaño del núcleo. Porcentajes de retención bajos también han sido obtenidos por Barrios *et al.* (2012) al confeccionar clases con tan solo una o dos accesiones en *Capsicum* spp. Esto sugiere que en las clases con menor número de accesiones, se debe hacer una selección más minuciosa de las accesiones a incluir en el núcleo, para no afectar el rango de retención de variabilidad de los caracteres cuantitativos y así no perder variabilidad

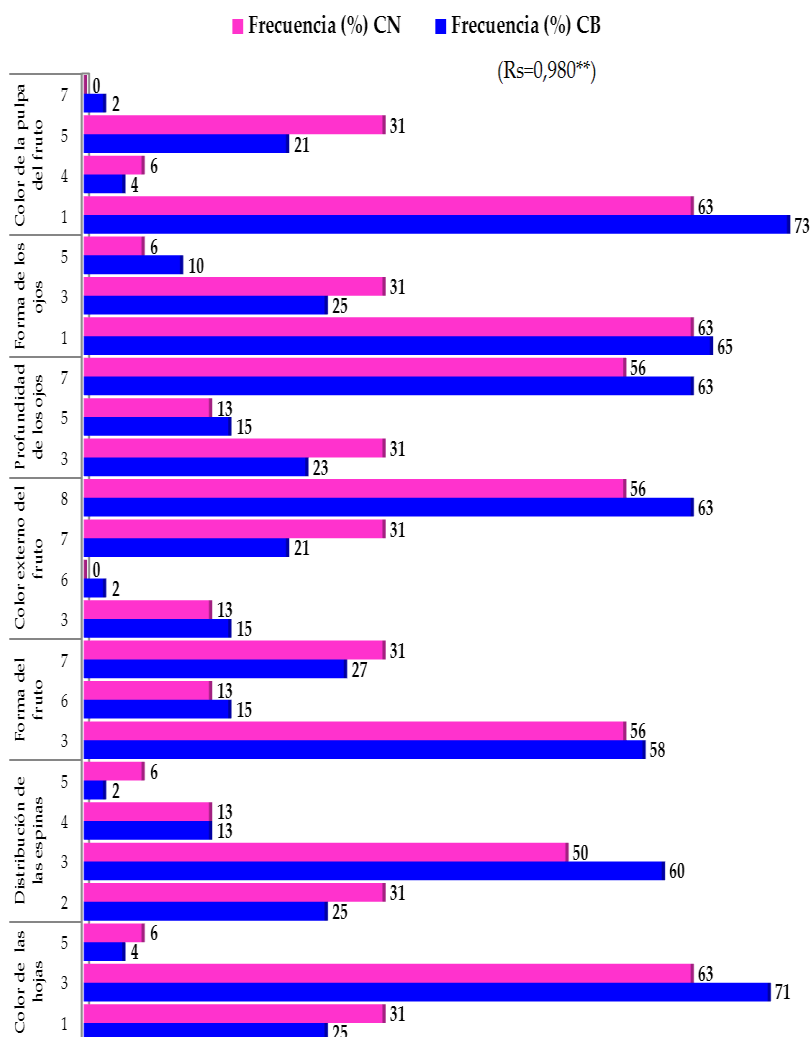
**Tabla 22.** Coincidencia de retención de los caracteres cuantitativos mediante el coeficiente Diwan, para las accesiones de las clases en la colección base y las accesiones de la colección núcleo.

		Rango promedio retenido en la colección núcleo (Coef. Diwan)
Española	Clase I	0,87
Pernambuco	Clase II	0,58
Cayena	Clase III	0,94
<b>TOTAL</b>		0,87

El comportamiento de los caracteres cualitativos fue muy similar entre la colección base y la colección núcleo. La coincidencia entre ambas colecciones fue altamente efectiva ( $R_s=0,98^{**}$ ) (significativa al 1% de probabilidad de error). Este resultado indica una correcta representatividad en la colección núcleo de estos atributos y una retención casi perfecta de los estados de los descriptores morfológicos (Fig. 17).

En el análisis de la frecuencia de los estados para los siete caracteres cualitativos mediante la correlación de Spearman, en las accesiones de la colección base y de la colección núcleo de piña, solo dos estuvieron ausentes, el amarillo dorado para el color externo del fruto y el amarillo oro para el color de la pulpa, ambos presentes en el mismo cultivar (MD-2). Este cultivar, a pesar de tener interés comercial, no se seleccionó por decisión del curador de la colección, ya que no hay seguridad de que realmente esté bien identificado, razón por la cual se incluyó en los análisis moleculares en aras de despejar esta duda. Las amplificaciones del ADN con ambos marcadores, presentaron dificultades, por lo que no se pudo arribar a conclusiones certeras y se prefirió conservar la decisión anterior.

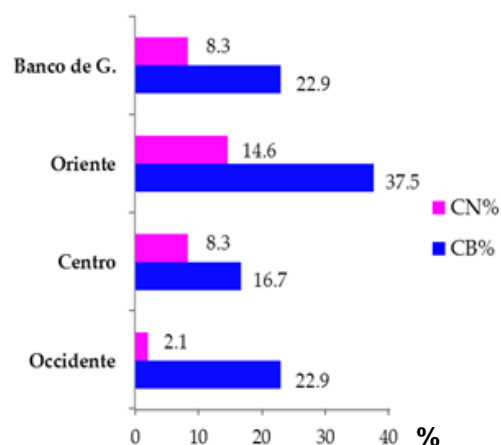
La retención de la variabilidad ha demostrado la efectividad de la selección de las accesiones en cuanto a los atributos morfológicos. Valores de retención superiores a 0,90 también han sido alcanzados en otras especies por Fundora *et al.* (2006), de 0,94 en la colección núcleo de *A. hypogaea*, por Fernández (2009) en la colección de *Z. mays* (0,95) y por Barrios (2010) en la colección de *Capsicum* spp. (0,90).



**Figura 17.** Frecuencia de cada una de los estados de los caracteres cualitativos mediante la correlación de Spearman en las accesiones de la colección base (CB) y colección núcleo (CN) de piña.

En cuanto a la procedencia geográfica de la colección núcleo respecto a la colección base hay que resaltar que ambas comprenden todas las regiones del país (occidente, centro y oriente) (Fig. 18). Además se consideraron las accesiones conservadas en el banco de germoplasma que han sido introducidos en el país. La zona oriental es la más representada, con un 14,6%, como se ha podido apreciar en geográfica de la colección núcleo propuesta, fue aceptable. Este criterio es muy importante en el establecimiento de las colecciones núcleo, por lo que se coincide con Del Río y Bamberg (2006); igual prioridad en la selección, le confieren Bhattacharjee *et al.* (2007) y Zhang *et al.* (2012), a la representatividad geográfica para englobar la mayor diversidad genética posible.

Los resultados obtenidos en el establecimiento de la colección núcleo demostraron que el muestreo estratificado fue efectivo para la selección de la misma. Este resultado coincide con lo planteado por Malosetti *et al.* (2000), quienes resaltan la importancia de este

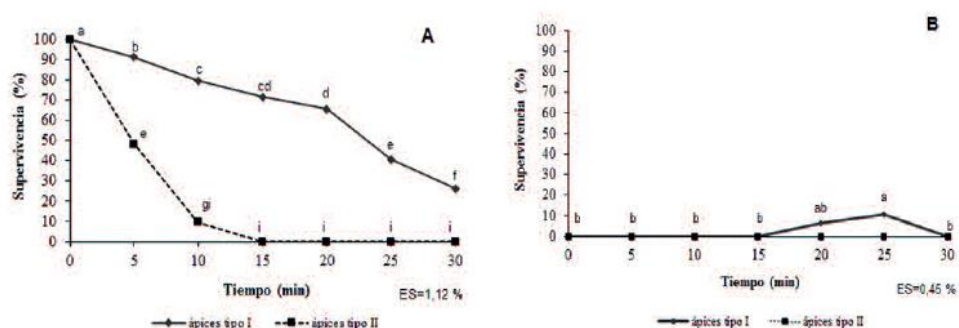


**Figura 18.** Porcentaje según la procedencia geográfica de la colección base (CB) y colección núcleo (CN).

método de selección. Estos autores indicaron que la inclusión de la participación del mejorador en el proceso de selección hace más efectivo el método, porque estos profesionales agregan información de valor que complementa al análisis estadístico, lo que incrementa su utilidad en la colección esta región no se encontró variabilidad genética de interés, solo sobresale el cv. 'Piña blanca' (14Cu), del grupo horticultural Pernambuco. Este análisis permite afirmar que la representatividad núcleo. La efectividad de este método también ha sido demostrada en otras especies por Fundora *et al.* (2006), Castillo *et al.* (2008), Fernández (2009) y Barrios (2010) con excelentes resultados en la creación de colecciones núcleo para Cuba de maní, papa, maíz y *Capsicum* spp., respectivamente.

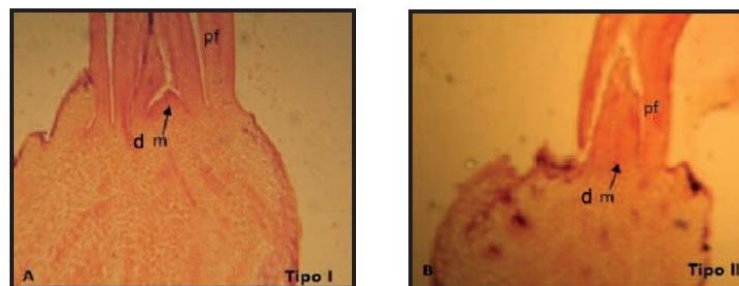
### 3.5.2. Crioconservación del germoplasma

En la Figura 19 se muestra el porcentaje de supervivencia ante la inmersión en nitrógeno líquido. Como se puede observar los ápices del tipo I tuvieron mayor tolerancia (Fig. 19A), con diferencias significativas con respecto a los ápices del tipo II (Fig. 19B). Además soportaron los niveles de deshidratación al PVS2 tres veces más y hasta los 30 min de exposición.



**Figura 19.** Supervivencia del ápice ante la inmersión en nitrógeno líquido (A) y posterior a la inmersión en nitrógeno líquido (B).

Cuando se realizó la observación al microscopio óptico también se evidenciaron diferencias entre los tipos de ápices utilizados. La Figura 20 muestra la sección longitudinal de los dos tipos de ápices, como se puede observar el ápice tipo I (Fig. 20A), consta de tres a cuatro primordios foliares, que garantizan cierto grado de protección al meristemo. En la del ápice tipo II (Fig. 20B) estaba compuesto por uno o dos primordios foliares, lo que hace que el meristemo quede prácticamente descubierto, razón por la cual resultaron ser más susceptibles a los tratamientos de deshidratación.



A: ápice tipo I con primordios foliares en desarrollo que le sirven de protección al meristemo apical  
B: ápice tipo II desprovisto de primordios foliares

**Figura 20.** Vista general del material vegetal utilizado en los experimentos de crioconservación.

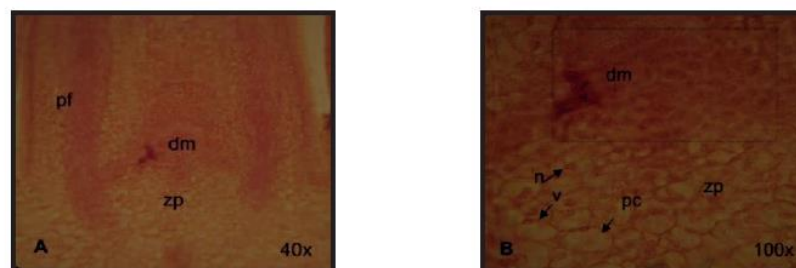
Diversos autores aceptan, que para una crioconservación exitosa de los ápices, éstos deben consistir en un domo meristemático más uno o dos primordios foliares con un tamaño de 0,5-2



mm de longitud, dependiendo de las especies (Panis, 2008). Sin embargo, se recomienda, que es necesaria una selección apropiada del tamaño y el estado de desarrollo del material inicial como factor esencial para alcanzar altas tasas de recuperación después del calentamiento (de los Ángeles *et al.*, 2011). Por lo anterior, se seleccionaron los ápices de tipo I para continuar en la estrategia criogénica en los siguientes experimentos.

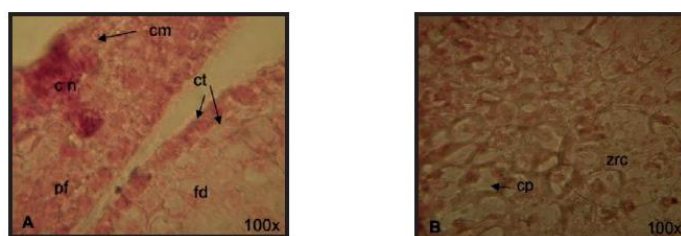
En contraste con los resultados de tolerancia obtenidos anteriormente solo se observó un 5,3% de supervivencia para los ápices del tipo I cuando a los 25 min se deshidrataron por la solución vitrificadora PVS2 y se enfriaron en nitrógeno líquido. Al realizar la evaluación de la coloración del tejido se observó que en la totalidad de los casos si éstos se mantenían verde intenso, podían recrecer a los 45 días de evaluación. Sin embargo, si cambiaban de coloración verde hacia amarilla-pálida no podían crecer, y por lo tanto morían.

Por otro lado, y para comparar el comportamiento de los ápices seleccionados en las Figuras 21 y 22 se muestra la histología realizada a ápices de tipo I sin tratamientos crioprotectores (tiempo 0) antes Fig. 21A y B) y después (Fig. 22A y B) de la inmersión en nitrógeno líquido. Los explantes estuvieron formados por el domo meristemático o meristemo apical (Fig. 21A y 22A) y una zona subapical de células parenquimáticas (Fig. 21B y 22B).



A. primordio foliar (pf), domo meristemático (dm) y zona parenquimática subapical (zp). B. ampliación de la zona parenquimática con células grandes vacuoladas (v), paredes celulares ligeramente engrosadas (pc) y núcleos más o menos céntricos (n)

**Figura 21.** Microfotografías de los ápices del brote en la variedad MD2 sin tratamientos crioprotectores, antes de la inmersión en nitrógeno líquido.



A. Flanco del domo (fd) y primordio foliar (pf). Obsérvese células necróticas (cn), células meristemáticas con paredes celulares anormalmente engrosadas (cm) y muy vacuoladas y capas de la túnica multiseriada (ct). B. Zona parenquimática subapical donde se observan zonas de ruptura celular (zrc) con restos de paredes celulares y contenido nucleoplasmático disperso. Nótese la presencia de células parenquimáticas con paredes celulares muy engrosadas y núcleo adosado (cp).

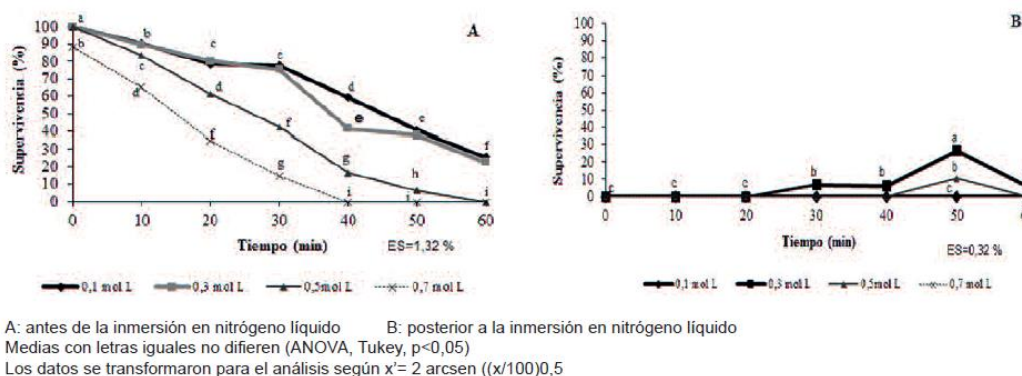
**Figura 22.** Microfotografía en ápices vegetativos de la variedad MD2 sin tratamientos crioprotectores, después de la inmersión en nitrógeno líquido.

La histología de los ápices sin tratamientos crioprotectores antes de la inmersión en nitrógeno líquido mostró que las células de la zona subapical o células parenquimáticas (Fig. 22B), se presentan más grandes con paredes celulares más o menos engrosadas, vacuolas más grandes en comparación con la zona meristemática. No existe una clara definición en cuanto a la formación del meristemo en fila (*rib meristem*) como se observa claramente en plantas adultas desarrolladas *ex vitro*. Por su parte, en la histología de los ápices sin tratamientos crioprotectores después de la inmersión en nitrógeno líquido, se observó que en la zona apical (Fig. 22A) existió heterogeneidad celular, donde algunas células conservaron sus características meristemáticas, en el caso de los estratos celulares correspondiente a las células más jóvenes del domo

meristemático, se observaron células necróticas, células meristemáticas con paredes celulares anormalmente engrosadas y con pequeñas vacuolas o espacios eriplamáticos, además las capas de la túnica se mostraron multiseriadas. Mientras que en la zona parenquimática subapical (Fig. 22B), las células estuvieron más vacuoladas, algunas fueron dañadas, mostrando zonas de ruptura celular, con restos de paredes celulares y contenido núcleo plasmático disperso. Nótese la presencia de células parenquimáticas con paredes celulares muy engrosadas y núcleo adosado. Finalmente se observó que existió un número de células con el citoplasma contraído en la pared celular.

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Turner *et al.* (2001) en meristemas de *Musa* spp., donde en los meristemático no enfriados las células mantenían forma más o menos regular y no se distinguían vacuolas en su citoplasma. Sin embargo, después de congelar las muestras por debajo de  $-30^{\circ}\text{C}$ , observaron que a medida que las células eran menos meristemáticas existía un incremento en número y tamaño de las vacuolas presentes en estas.

Como era esperado para una concentración de sacarosa de  $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$  se alcanzaron los mejores niveles de supervivencia para los ápices posterior a la inmersión en nitrógeno líquido y al calentamiento (Fig. 23B). Por lo tanto, esta concentración de sacarosa se seleccionó para continuar la experimentación. Los resultados de diferentes grupos de investigación son variados en el sentido de estandarizar concentraciones apropiadas de sacarosa durante la crioprotección. Para cada material a crioconservar debe encontrarse la concentración adecuada ya que esta varía según la especie o explante (Berjak *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2001).



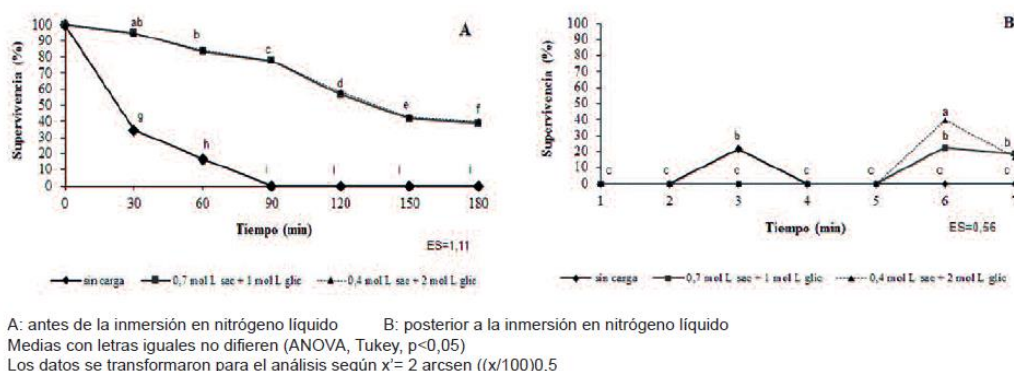
**Figura 23.** Efecto del tiempo de deshidratación en PVS2 en la supervivencia de los ápices (según el precultivo en sacarosa).

Cuando se emplea sacarosa se debe determinar la concentración adecuada que toleran las células antes de iniciar el proceso de crioconservación, basado en dos aspectos fundamentales, la deshidratación osmótica y la toxicidad a las células. Los resultados más importantes de este experimento fue la selección de la concentración de sacarosa de  $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$  para continuar la experimentación.

En la Figura 24 se observó que los niveles de tolerancia a la deshidratación por la solución PVS2 se incrementaron notablemente al emplear los tratamientos de la solución de carga hasta 180 min (Fig. 24A). Por su parte, los niveles de supervivencia a la crioconservación también se elevaron hasta un 40%, con diferencias significativas a los 150 min de deshidratación en PVS2 a favor de la mezcla crioprotectora de sacarosa  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$  y glicerol  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  (Fig. 24B), por lo que ésta última será la solución de carga que se empleará en los siguientes experimentos. Sin embargo, se evidenció que no fue posible obtener un incremento en la supervivencia de los ápices aunque se utilice un mayor tiempo de incubación. Lo anterior coincide con los resultados publicados con respecto a la utilización del tiempo de pre-tratamiento en las concentraciones de glicerol y sacarosa mediante los procedimientos de vitrificación (Raven y Havens, 2014;

Matsumoto *et al.*, 2015). Lo que indica que es el tiempo adecuado para que se activen los mecanismos necesarios involucrados en la tolerancia de las células a los diferentes momentos estresantes en una estrategia de crioconservación.

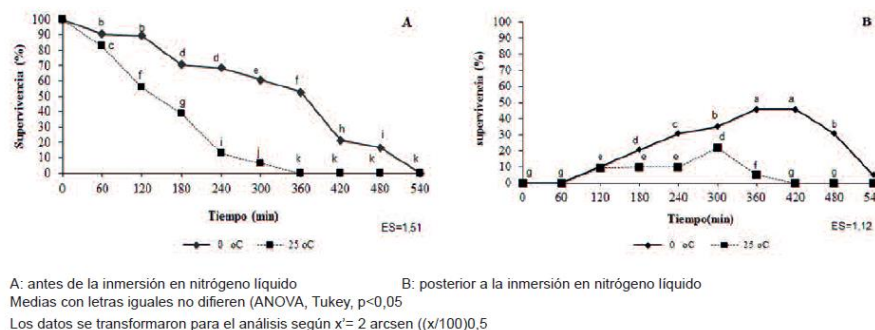
Cuando se determinó el número total de grupos OH por moléculas de las mezclas utilizadas (sacarosa + glicerol) para comparar los resultados de supervivencia con diferencias estadísticas obtenidos en la Figura 24. Para el caso de la mezcla 0,4 mol.L<sup>-1</sup> sacarosa + 2,0 mol.L<sup>-1</sup> glicerol rinde 55,40 x 1023 grupos OH total por moléculas mientras que la mezcla 0,75 mol.L<sup>-1</sup> sacarosa + 1,0 mol.L<sup>-1</sup> glicerol rinde 54,19 x 1023 grupos OH total por moléculas. De esta forma es evidente el porqué de las diferencias significativas.



**Figura 24.** Efecto del tiempo de deshidratación en PVS2 en la supervivencia de los ápices (según la aplicación de la solución de carga).

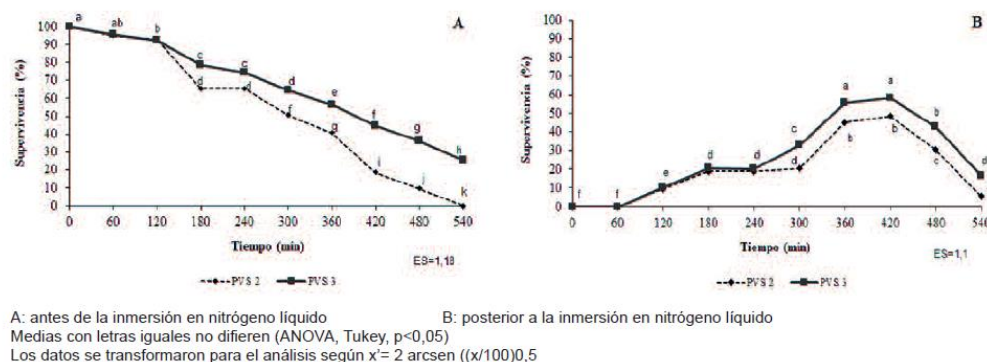
El reordenamiento de los grupos hidroxilo de las moléculas de diferentes azúcares y polialcoholes constituye un factor importante para una efectiva crioconservación. En la Figura 25 se muestran los resultados alcanzados al disminuir la temperatura de aplicación del PVS2. Se observó un aumento en el tiempo de tolerancia hasta los 480 min (Fig. 25A) y los máximos valores de supervivencia a la crioconservación se incrementaron hasta un 45% a los 420 min de exposición al PVS2 (Fig. 25B). Por lo tanto, en la continuación de la estrategia criogénica se disminuirá la temperatura hasta 0°C para aplicar el PVS2.

En la crioconservación de ápices de brotes de especies tropicales Takagi (2000) mejoró la supervivencia de *Dioscorea alata* a la crioconservación desde 47% hasta 91% al disminuir la temperatura desde 25°C hasta 0°C durante la deshidratación por PVS2). En la actualidad existen evidencias de estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido donde varios autores hipotetizan al respecto (González y Engelmann, 2015). Los autores plantean que el mecanismo de protección del PVS2 no solo está relacionado con la no formación de cristales de hielo, sino que además se basa en la restricción de la movilidad molecular y la desorganización de la estructura de los cristales de hielo.



**Figura 25.** Efecto del tiempo de deshidratación en PVS2 en la supervivencia de los ápices (según la temperatura de aplicación de la solución vitrificadora).

En la Figura 26 se observa que existieron claras evidencias estadísticas donde la solución vitrificadora PVS2 (Fig. 26A) es menos efectiva que la PVS3 (Fig. 26B) para el caso de los ápices de piña empleados. Esto se manifiesta en los mayores valores de supervivencia a partir de los 180 min de aplicadas las soluciones vitrificadoras durante la deshidratación de los ápices. En el caso, de la supervivencia de los ápices crioconservados también los máximos niveles se alcanzan con la solución vitrificadora PVS3. Lo anterior pudiera tener su explicación en que la solución PVS2 utiliza al compuesto químico dimetilsulfóxido que debe ser muy bien investigado su empleo porque tiene efectos fisiológicos y mutagénicos negativos para algunos materiales vegetales. Los resultados negativos de tolerancia coinciden con lo informado para otros sistemas biológicos y está asociado al alto grado de toxicidad del dimetilsulfóxido (Raven y Havens, 2014). En las accesiones, se puede apreciar que el material vegetal mantuvo un porcentaje de supervivencia entre 6,3 -65%.



**Figura 26.** Efecto del tiempo de deshidratación en la supervivencia de los ápices (según la solución vitrificadora empleada).

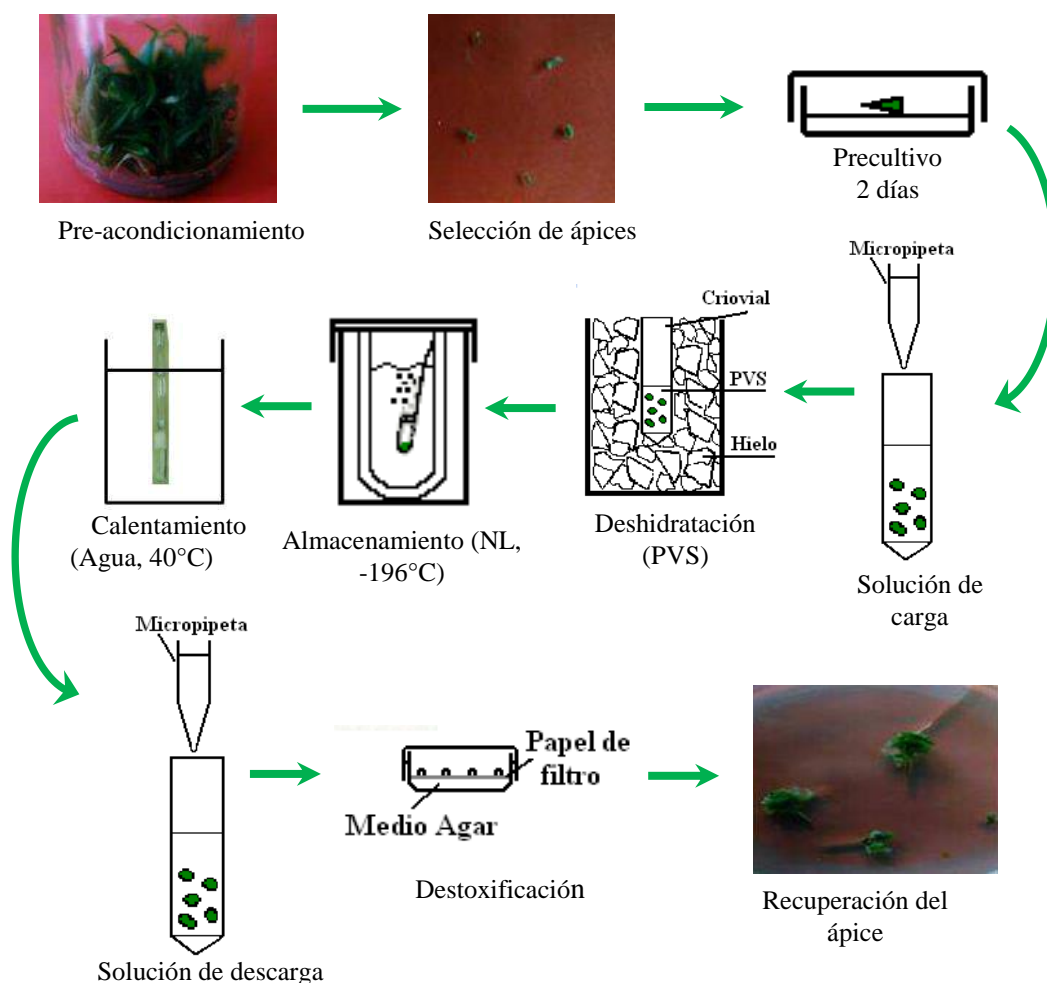
Con relación a lo anterior, en la Tabla 23 se puede apreciar la aplicación de la estrategia criogénica a nueve accesiones del banco de germoplasma *in vitro*, donde se pudo comprobar la respuesta variada de los diferentes genotipos en la supervivencia después de la crioconservación. El material vegetal durante el proceso de crioconservación puede sufrir varios estreses entre los que se encuentran cambios de pH, cambios mecánicos, deshidratación (daños osmóticos), daños en la rehidratación, estrés oxidativo y estrés por bajas temperaturas (Kaczmarczyk *et al.*, 2012). Los porcentajes de supervivencia alcanzados por los ápices de piña crioconservados pudrían estar influenciados por alguno de estos estreses.

**Tabla 23.** Porcentaje de supervivencia de nueve accesiones de piña al aplicar el procedimiento por vitrificación.

Cultivar	Supervivencia (%)	
	No Crioconservar	Crioconservado
Cabezona	61,5	27,9
Española Roja P3R5	53,1	20,0
Española Roja del Caney	45,5	12,1
Cayena lisa Serrana	50,3	25,3
MD2	80,1	60,2
Cayena de Puerto Rico	80,2	65,5
Perolera	49,9	33,8
Piña blanca	57,9	24,7
Piñuela Karata	33,1	6,3

Los resultados antes expuestos donde se ha aplicado la metodología de vitrificación (Fig. 27) para crioconservar el banco de germoplasma ha sido efectiva.





**Figura 27.** Protocolo de crioconservación para ápices de piña mediante un procedimiento de vitrificación. Donde, NL: nitrógeno líquido; PVS: del inglés “plant vitrification solution”.

### 3.5.1. Experimentos con la utilización de los biorreguladores en el medio de cultivo *in vitro* de los híbridos de piña.

En este acápite se relacionan un grupo de experimentos que se han puesto en marcha en función de disminuir la pérdida de diversidad genética a la que está sometida el germoplasma de piña en Cuba mediante la propagación *in vitro*.

#### 3.5.3.1. Pectimorf® en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido de piña CBCE-116

En la Tabla 24 se presentan los resultados de los caracteres evaluados en el híbrido CBCE-116, micropropagado con tres concentraciones de Pectimorf®. Como se puede apreciar los valores del número de brotes, el coeficiente de multiplicación, la altura de las plantas, el número de hojas y la masa fresca producida en los tratamientos con el oligopeptato fueron superiores o no mostraron diferencias significativas respecto al control, no así para el ancho de las hojas.

**Tabla 24.** Resultado de los tratamientos con Pectimorf en la fase de multiplicación *in vitro* del híbrido de piña CBCE-116.

Tratamientos	Número de brotes	Coefficiente Multipli-cación	Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Ancho de las hojas (cm)	Masa Fresca (g)	Masa Seca (g)
<b>Control</b>	8,50 b	4,13 bcd	3,33 bcd	4,25 d	<b>0,36 ab</b>	0,44 d	0,017 c
<b>T1</b>	<b>A 12,25 ab</b>	3,88 cd	<b>5,39 a</b>	<b>8,25 ab</b>	<b>0,39 ab</b>	0,59 bc	0,019 c
	<b>B 12,63 ab</b>	<b>4,38 abcd</b>	2,93 d	5,75 c	<b>0,45 a</b>	0,46 d	0,019 c
	<b>C 14,25 a</b>	<b>6,38 ab</b>	4,00 bcd	<b>9,50 a</b>	<b>0,41ab</b>	<b>0,61 abc</b>	0,023 c
<b>T2</b>	<b>A 14,25 a</b>	<b>4,88 abcd</b>	3,98 bcd	5,25 cd	<b>0,41 ab</b>	<b>0,70 a</b>	<b>0,032 abc</b>
	<b>B 14,13 a</b>	<b>5,88 abc</b>	3,99 bcd	5,00 cd	<b>0,39 ab</b>	0,42 d	0,026 bc
	<b>C 16,75 a</b>	<b>6,13 abc</b>	<b>4,43 abc</b>	<b>9,13 ab</b>	<b>0,34 b</b>	0,52 cd	0,017 c
<b>T3</b>	<b>A 17,25 a</b>	<b>5,50 abcd</b>	<b>4,49 abc</b>	<b>8,38 ab</b>	<b>0,39 ab</b>	<b>0,63 ab</b>	0,027 bc
	<b>B 14,88 a</b>	<b>6,63 a</b>	<b>4,80 ab</b>	<b>9,00 ab</b>	<b>0,39 ab</b>	<b>0,63 ab</b>	<b>0,033abc</b>
	<b>C 12,88 ab</b>	<b>5,00 abcd</b>	3,24cd	5,00 cd	<b>0,39 ab</b>	<b>0,62 abc</b>	0,022 c
<b>T4</b>	<b>A 8,75 b</b>	3,50 d	<b>4,59 ab</b>	8,13 b	0,35 b	<b>0,65 ab</b>	<b>0,042 ab</b>
	<b>C 11,75 ab</b>	<b>5,13 abcd</b>	3,55 bcd	<b>8,25 ab</b>	<b>0,38 ab</b>	0,59 bc	<b>0,044 a</b>
$\bar{Sx}$	0,05	0,03	0,10	0,03	0,006	0,01	0,001
CV(%)	15,23	13,70	25,5	13,34	16,20	19,37	50,41

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente para Tukey con  $p < 0.05$

Los valores alcanzados en la variable número de brotes por planta, 10 de los tratamientos tuvieron diferencias significativas con valores superiores a los 11 brotes, solo el control (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> + 6BAP 2,1 mg.L<sup>-1</sup>) y el T4A (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> + 6BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 1 mg.L<sup>-1</sup>), alcanzaron resultados por debajo. Es de destacar que los tratamientos T1 (A, B y C) con concentraciones de Pectimorf de 1; 5; y 10 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente y sin los reguladores del crecimiento 6BAP y ANA, tuvieron respuesta favorable, donde el T1C difiere significativamente del control y el resto supera al mismo, esto es un resultado positivo, ya que con solo el biorregulador se manifiesta un incremento de los brotes, lo que garantiza mayor número de individuos.

En el coeficiente de multiplicación el tratamiento T3B (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> + 6BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup>) mostró diferencias respecto al control, con el mayor valor (6,63), se deben resaltar los tratamientos T1 (A, B y C). Estos resultados corroboran el efecto positivo del biorregulador en la variable que, al igual que el anterior, es de importancia para la fase de multiplicación.

Los resultados alcanzados en el número de brotes por planta y coeficiente de multiplicación fueron similares a los obtenidos por Lara *et al* (2004) los cuales alcanzaron efecto positivo del oligopeptato sobre la propagación *in vitro* de los segmentos de escamas de lirio, donde la dosis de 10 mg.L<sup>-1</sup> favoreció la regeneración en plantas, al formar mayor número de bulbos y hojas. Los altos valores en el incremento del número de brotes coinciden con los obtenidos por Izquierdo *et al*. (1996), quienes lograron incremento del número de yemas de ajo al emplear el biorregulador suplementado con ANA.

En la altura de las plantas, solo el tratamiento T1A (Pectimorf a 1 mg.L<sup>-1</sup>) mostró diferencias significativas del control, y seis de los restantes tratamientos tuvieron altura superior a los 4,0 cm. En este caso, las variantes con Pectimorf solo en el medio de cultivo se comportaron poco uniformes donde: T1A con mejor valor (5,39 cm), T1B (solo Pectimorf a 5 mg.L<sup>-1</sup>) el más bajo (2,93 cm) y T3C (Pectimorf a 10 mg.L<sup>-1</sup>) similar al resto (4,0 cm).



En el número de hojas, seis tratamientos superaron al control con valores por encima de las ocho hojas, y difirieron significativamente del resto de los tratamientos, donde se destacó el T1C (10 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf). También se pudo apreciar la favorable respuesta de las plantas *in vitro* en el medio de cultivo sin los reguladores del crecimiento y con solo Pectimorf a concentraciones de 1 y 5 mg.L<sup>-1</sup> (T1 A y B) los cuales superaron al control. Sin embargo, en el ancho de las hojas, ningún tratamiento difirió del control, aunque el T1B (5 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf) presentó el mayor valor para este carácter (0,45 cm), así como también las demás variantes solo con Pectimorf estuvieron por encima del control.

La masa fresca fue superior al control en diez tratamientos, donde se destacó con 0,7 g el T2A (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup>+ 6BAP 2,1 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup>). En la masa seca los tratamientos T4 A y B (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup>+ 6BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 1 y 5 mg.L<sup>-1</sup>) fueron mayores respecto al control, no así para el resto. Solo cuatro tratamientos tuvieron valores por encima de los 0,03 g. Las variantes sin los reguladores del crecimiento no mostraron diferencias significativas respecto al control. El incremento de biomasa obtenida se corresponde con la de otros cultivos al utilizar este bioproducto en arroz, Anturium, mandarina y violeta africana por González y Ramírez (1999); Montes (2002); Hernández (2003); Suárez y González (2004), respectivamente.

Es de resaltar que al utilizar solo Pectimorf a concentraciones de 1; 5 y 10 mg.L<sup>-1</sup> (T1 A; B y C) en el medio de cultivo para la fase de multiplicación las plantas *in vitro* tuvieron una respuesta diferencial en casi todas las variables evaluadas, con valores superiores al control. En los caracteres estudiados el tratamiento T3B (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup>+ 6BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup>) fue el que mejor comportamiento tuvo.

Los resultados aquí expuestos se corresponden con los obtenidos por diferentes autores en otros cultivos de interés económico: en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) González *et al.* (2002a), en plátano (*Musa* sp.) González *et al.* (2002b) y en papa (*Solanum tuberosum* L.) Hidrobo, (2002), plantearon el efecto positivo del Pectimorf sobre la morfogénesis *in vitro* con la sustitución de reguladores del crecimiento por biorreguladores, como por ejemplo para el número de brotes y coeficiente de multiplicación.

El aumento experimentado en las dimensiones de la plántulas y de las hojas, en el número de brotes y el coeficiente de multiplicación, con el empleo del oligopectato como sustituto de citoquininas, también lo han observado Moré y González (2001) quienes plantearon que esto podría deberse a la movilización de las citoquininas endógenas producidas por el biorregulador. Por otra parte González *et al* (2002c), informaron que el efecto del Pectimorf puede considerarse de tipo citoquinina, lo que sugiere su utilidad en la fase de multiplicación, la cual se caracteriza por incrementar el número de hojas.

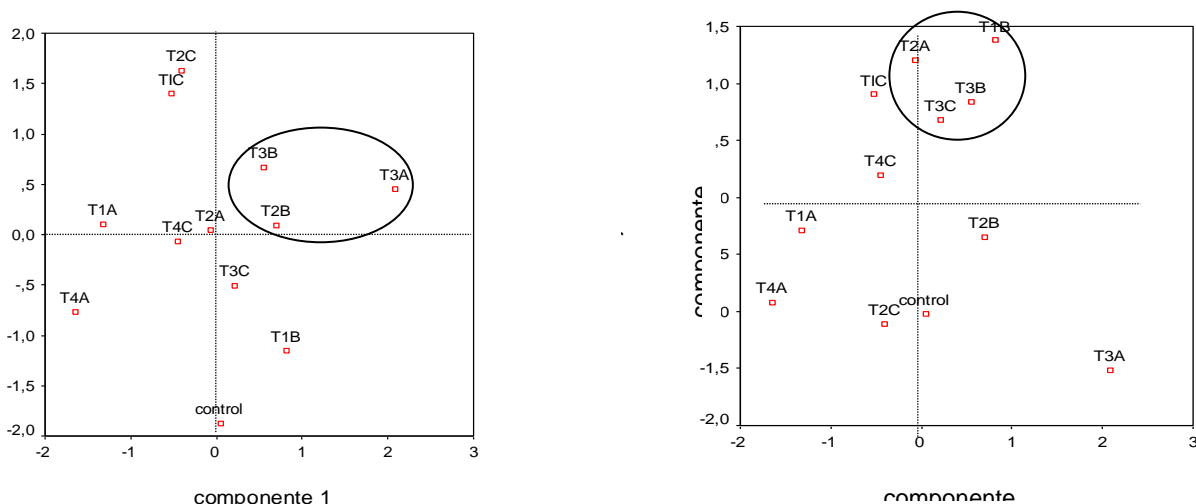
Las diferentes concentraciones del Pectimorf provocaron un efecto positivo sobre los caracteres morfológicos del híbrido de piña. Resultado similar al de Cabrera *et al.* (2000) quienes obtuvieron buenos resultados en la fase de multiplicación en caña de azúcar al sustituir hasta el 75% de las concentraciones de 6-BAP por el oligopectato.

En el ACP con los datos de la fase de multiplicación del híbrido de piña CBCE-116 (Tabla 25), se aprecia que las tres componentes principales permitieron extraer el 75,67% de la variabilidad total. La primera componente extrajo el 35,01%, la segunda componente el 24,8% y la tercera componente el 15,78%. Los caracteres que más aportaron a la variabilidad fueron el número de brotes, el coeficiente de multiplicación, el número y ancho de las hojas y la altura de la planta.

**Tabla 25.** Resultados del análisis de componentes principales para las variables evaluadas en la fase de multiplicación del híbrido de piña CBCE- 116.

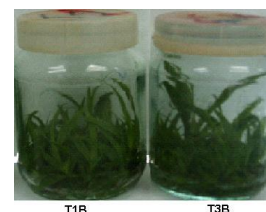
COMPONENTES PRINCIPALES		CI	CII	CIII
Valor propio del vector		2,451	1,741	1,105
% de varianza		35,02	24,87	15,78
% de varianza acumulada		35,02	59,89	75,68
VARIABLES	Número de brotes	0,554	<b>0,788</b>	0,038
	Coeficiente de multiplicación	0,425	<b>0,764</b>	0,171
	Altura de la planta	<b>-0,723</b>	0,441	-0,229
	Número de hojas	<b>-0,721</b>	0,510	-0,025
	Ancho hojas	0,394	-0,106	<b>0,763</b>
	Masa fresca	-0,578	0,222	0,465
	Masa seca	<b>0,658</b>	0,145	-0,471

En la representación gráfica del análisis de componentes principales efectuado con los componentes I y II y los componentes II y III respectivamente (Fig. 28.), también se puede apreciar que los tratamientos T1B (Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup> y sin los reguladores del crecimiento) y T3B (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> + 6BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup>), mostraron diferencias importantes con respecto al control sobre todo el T3B que se destacó en todas las variables.



**Figura 28.** Representación gráfica del ACP de la fase de multiplicación del híbrido CBCE-116.

Al considerar de conjunto los resultados del experimento se recomienda utilizar los tratamientos T1B (Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup> y sin los reguladores del crecimiento) y T3B (ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> + 6BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> + Pectimorf 5 mg.L<sup>-1</sup>) los cuales tuvieron efecto positivo en los indicadores morfofisiológicos de las plantas *in vitro* lo que permitirá ventajas económicas y químicas.



En la Tabla 26 se puede observar los valores superiores o iguales al control que tuvieron los tratamientos con Pectimorf respecto al control en las diferentes variables estudiadas en la fase de enraizamiento. Como se puede apreciar excepto en la altura de la planta el control tuvo valores inferiores a los alcanzados en la mayoría de los tratamientos.

**Tabla 26.** Resultado de los tratamientos con Pectimorf en la fase de enraizamiento *in vitro* del híbrido de piña CBCE-116.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Longitud de hojas (cm)	Ancho de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
<b>Control</b>	<b>11,2 ab</b>	16,6 c	9,90 bc	0,74 bc	1,00 c	1,0 b	1,70 bc	0,16 c
<b>T1</b>	<b>A 13,0 a</b>	<b>18,4 ab</b>	<b>11,70 a</b>	<b>0,88 a</b>	<b>2,20 a</b>	<b>1,7 a</b>	<b>3,02 a</b>	<b>0,27 a</b>
	<b>B 10,2 bc</b>	<b>20,8 ab</b>	9,18 bcd	0,68 cd	1,53 b	<b>1,7 a</b>	1,90 bc	0,16 c
	<b>C 10,1 bcd</b>	<b>22,2 a</b>	9,20 bcd	0,74bcd	<b>1,76 ab</b>	<b>1,2 ab</b>	<b>2,40 abc</b>	0,19 bc
<b>T2</b>	<b>A 11,6 ab</b>	<b>18,8 ab</b>	<b>10,50 ab</b>	<b>0,82 ab</b>	1,57 b	<b>1,3 ab</b>	<b>3,26 a</b>	0,22 b
	<b>B 9,2 cd</b>	<b>21,0 ab</b>	8,60 cd	0,65 d	1,53 b	<b>1,7 a</b>	1,60 c	0,17 c
	<b>C 8,1 d</b>	<b>19,4 ab</b>	7,60 d	0,66 cd	1,00 c	1,0 b	2,00 bc	0,17 c
$\bar{Sx}$	0,29	0,068	0,24	0,016	0,07	0,16	0,12	0,006
CV(%)	16,80	9,19	14,94	12,97	30,00	38,00	30,00	20,00

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente para Tukey con  $p < 0.05$

En la variable altura de las plantas, excepto los tratamientos T1A (1 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf sin 6BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>) y el T2A (1 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> 6BAP y sin GA<sub>3</sub>) el resto mostró valores inferiores al control (11,2 cm). Esto demuestra que el Pectimorf, en combinación con uno de los reguladores del crecimiento, favorece el crecimiento de las plantas. Iguales tratamientos tuvieron para la longitud y ancho de las hojas diferencias significativas respecto al control y al resto de los tratamientos.

Es interesante destacar la influencia del oligopeptato en la variable número de raíces, cinco de los seis tratamientos superaron al control, pero el T1A (1 mg.L<sup>-1</sup> de Pectimorf + 1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y sin 6 BAP) fue el único que tuvo diferencias significativas respecto al control y al resto de los tratamientos. Sin embargo, en cuanto a la longitud de las raíces hubo uniformidad entre los tratamientos, solo el control y el tratamiento T2A (0,5 mg.L<sup>-1</sup> 6 BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf y sin GA<sub>3</sub>) tuvieron valores inferiores al resto (1,2 cm).

En la masa fresca los tratamientos T1A (1 mg.L<sup>-1</sup> de Pectimorf + 1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y sin 6 BAP) y T2A (0,5 mg.L<sup>-1</sup> 6 BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf y sin GA<sub>3</sub>) presentaron diferencias significativas, estos valores casi duplican al mismo y al resto de los tratamientos. En la masa seca solo el tratamiento T1A volvió a tener diferencias significativas con respecto al control y a los restantes tratamientos, y al igual que en la masa fresca llegó casi a duplicar sus valores.

Al analizar integralmente las variables evaluadas se destacaron los tratamientos T1A y T2A, sobretudo el primero. La buena respuesta de las plantas a estos tratamientos garantizó, en gran medida, su adecuada aclimatización y la disminución de la mortalidad. El efecto positivo obtenido por el Pectimorf en la fase de enraizamiento también ha sido demostrado en diferentes cultivos tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En la micropropagación de plátano Rodríguez (1999) y Pinzón (2004) han utilizado el oligopeptato solo o combinado con el regulador del crecimiento tradicional AIA con resultados positivos; así como en ajo (*Allium sativum* L.) por Izquierdo *et al.* (2002). En la propagación *ex vitro* han obtenido buenos resultados Ramírez *et al.* (2002) en

esquejes de guayaba (*P. guajava*) y Domini y Benítez (2002) y Vázquez (2004) en plantas de ficus (*Ficus benjamina* L.).

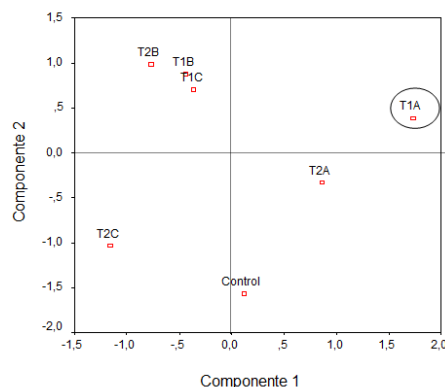
La capacidad del Pectimorf para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos, catalizar la degradación celular de los callos cuando se desea obtener suspensiones celulares e incrementar de forma notable el desarrollo, vigor y los índices de supervivencia de las plantas *in vitro* de los diferentes cultivos lo validan según Hernández (2003) y González *et al.* (2004) como una alternativa promisoría en la biotecnología vegetal cubana. Esto se pudo apreciar en los resultados de la fase de enraizamiento del híbrido de piña CBCE-116, donde exceptuando la altura de la planta, en el resto de las variables los tratamientos superaron al control.

En la Tabla 27 se muestran los resultados del ACP donde se aprecia que las dos primeras componentes permitieron explicar el 89,82% de la variabilidad total presente en los tratamientos estudiados. La componente I extrajo el 67,68% de la variabilidad y la componente dos el 22,14%. Las variables que más aportaron a la variabilidad fueron la altura de la planta, la longitud y el ancho de las hojas y la longitud de las raíces.

**Tabla 27.** Resultados del análisis de componentes principales para las variables evaluadas en la fase de enraizamiento del híbrido de piña CBCE- 116.

Componentes principales		CI	CII
Valor propio del vector		4,74	1,55
% de varianza		67,70	22,12
% de varianza acumulada		67,70	89,82
Variables	Altura de la planta	<b>0,970</b>	0,016
	Número de hojas	-0,777	0,390
	Longitud hojas	<b>0,987</b>	0,049
	Ancho de las hojas	<b>0,931</b>	-0,258
	Número de raíces	0,710	0,623
	Longitud raíces	0,346	<b>0,912</b>
	Masa fresca	<b>0,853</b>	-0,328

En la representación gráfica (Fig. 29) del ACP efectuado con las componentes I y II, se corroboran los resultados obtenidos donde el tratamiento T1A (1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 1 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf sin 6 BAP) fue el que mostró mejores resultados respecto al control y al resto de los tratamientos.



**Figura 29.** Representación gráfica del ACP de los tratamientos en la fase de enraizamiento del híbrido CBCE-116.

Al considerar de conjunto los resultados del experimento se pudo apreciar que el Pectimorf a una concentración de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  sin 6 BAP y con  $1 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$  (tratamiento T1A) tuvo efecto positivo en los indicadores morfofisiológicos de la fase de enraizamiento *in vitro*.



T1A

### 3.5.3.1. Utilización del Biobras-16 en la fase de multiplicación del híbrido CBCE-74

En la Tabla 28 se muestran los resultados del comportamiento de las variables estudiadas al aplicar BB-16 en la fase de multiplicación del híbrido CBCE-74. Como se puede apreciar excepto el tratamiento T3B y en la variable número de brotes la mayoría de los tratamientos a las concentraciones de BB-16 ( $0,01$  y  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) como complemento de los reguladores ANA y 6BAP, superaron al control.

**Tabla 28.** Comportamiento de las variables evaluadas en los tratamientos con BB-16 en la fase de multiplicación *in vitro* del híbrido de piña CBCE-74.

TRATAMIENTOS		Número de brotes	Coefficiente Multipli-cación	Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Ancho de las hojas (cm)	Masa fresca (cm)	Masa seca (cm)
CONTROL		12,75 abc	6,13 c	2,34 g	7,88 de	0,36 bcde	0,44 ef	0,017de
T1	A	16,50 ab	11,00ab	4,25 cd	12,25 a	0,45 a	0,45 dfe	0,017 de
	B	16,75 a	8,88 b	4,0 cd	9,38 bcd	0,41 abc	0,74 bc	0,026 cd
T2	A	14,88 abc	8,88 b	3,88 cd	9,5 abcd	0,45 a	0,38 e	0,015 e
	B	14,38 abc	10,25 ab	2,81fg	7,25 de	0,34 cde	0,97 a	0,05 a
T3	A	17,88 a	10,88 ab	4,13 cd	9,63 abcd	0,4 abcd	0,47 dfe	0,016 de
	B	9,88 c	5,13 c	2,24 g	6,88 e	0,3 e	0,43 ef	0,015 e
T4	A	15,88 ab	10,13 ab	5,66 b	11,13 abc	0,43 ab	0,61 cd	0,019 de
	B	15,88 ab	9,88 b	3,81 cde	8,13 de	0,39 abcd	0,57 de	0,034 bc
T5	A	16,00 ab	9,38 b	3,44 def	11,5 ab	0,39 abcd	0,58 cde	0,022 de
	B	14,5 abc	10,75 ab	4,45 c	8,5 cde	0,33 de	0,88 ab	0,043 ab
T6	A	11,0 bc	8,88 b	5,74 b	9,75 abcd	0,36 bcde	0,95 a	0,045 a
	B	14,38 abc	11,08 ab	6,79 a	11,75 ab	0,46 a	0,97 a	0,048 a
S $\bar{x}$		0,04	0,03	0,12	0,03	0,006	0,02	0,001
CV (%)		12,56	11,08	31,47	10,76	16,79	36,6	40,09

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente para Tukey con  $p < 0.05$

En la variable número de brotes, los tratamientos no mostraron diferencias significativas del control. Los tratamientos T3B y T6A fueron los únicos con diferencias significativas respecto a otros tratamientos y los que tuvieron valores muy inferiores al resto.

En el coeficiente de multiplicación seis tratamientos difieren significativamente del control, sus valores lo llegan casi a duplicar. Las variantes con solo BB-16 en los medios se comportaron por encima del control, lo que muestra la acción de este análogo de brasinoesteroide como biorregulador. Estas variables, según plantean Escalona *et al.* (1999) son características que nunca se pueden combinar en los procedimientos clásicos del cultivo en medio líquido, en nuestra variante experimental se obtuvieron excelentes resultados número de brotes.

En la altura de la planta, el tratamiento T6B ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  BB-16) fue el mejor este mostró no solo diferencias significativas respecto al control sino que también superó al resto de los tratamientos. Por otra parte es importante resaltar que en este carácter resulta interesante el comportamiento de las plantas a la aplicación del BB-16 a  $0,01$  y  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ , en ambas tuvieron los mejores valores de altura. El efecto favorable obtenido con la aplicación del BB-16 en la fase de multiplicación, fue similar a los observados por Soto *et al.* (1997) en plántulas de cafeto, los cuales lograron un incremento en su altura, al utilizar dos momentos de aplicación del

brasinoesteroide. También es de destacar que siete tratamientos alcanzaron alturas en las plantas superiores a los 4,0 cm, resultado que se corresponde con lo informado por Daquinta (1998) quien plantea que en el cultivo *in vitro* de piña las plantas que alcanzan esta alturas son las aptas para pasar a la fase de enraizamiento.

En el número de hojas solo cuatro tratamientos tuvieron diferencias significativas respecto al control. En esta variable se destacó el T1A ( $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  6BAP +  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  BB-16) y al igual que en la anterior variable los tratamientos que solo tenían BB-16 mostraron una respuesta superior al control. En esta fase el número de hojas es muy importante ya que permite la formación de nuevos brotes, según Daquinta (1998) por cada hoja generalmente hay una yema axilar lo que favorece su multiplicación. Visto de este modo se puede afirmar que para el caso de la piña el BB-16 establece un sinergismo con la citoquinina 6BAP, que ha hecho posible obtener buenos resultados en esta variable y se muestran los mejores valores, con la concentración de  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  del biorregulador.

En el ancho de la hoja, tres tratamientos alcanzaron valores superiores a los 0,45 cm, destacándose T6B (BB-16 a  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Como se puede apreciar, al igual que en la variable anterior, los tratamientos que contenían BB-16 a una concentración de  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  presentaron resultados favorables.

En la masa fresca y seca no todos los tratamientos superaron al control, los mejores tratamientos fueron T2A, T5B y T6 A y B y de estos sobresalieron los que tenían BB-16 a  $0,01$  y  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  y sin reguladores del crecimiento. La estimulación en el incremento de la biomasa con el uso de brasinólidos se comportó de igual forma que en cafeto, donde Soto *et al.* (1997) lograron incremento en la masa seca total.

De forma general el tratamiento T6B ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  BB-16) y sin los reguladores del crecimiento mostró un efecto positivo en casi todos los indicadores. También en algunas variables evaluadas, las plantas *in vitro* de piña en los medios suplementados con BB-16 a  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  respondieron de forma favorable.

Estos resultados concuerdan con lo informado con Roque (2005) quien planteó que este comportamiento se debe a la acción biorreguladora de la sustancia bioactiva en los procesos de división celular para la formación de órganos, al actuar por sí sola o sinérgicamente con los reguladores del crecimiento endógenos. También podría deberse a la posible acción estimuladora para su síntesis, al regular a su vez enzimas y proteínas, que están relacionadas con la síntesis de reguladores del crecimiento endógenos.

Las diferencias significativas entre los tratamientos podrían estar dadas por los mecanismos de acción de estos compuestos, los cuales no están del todo esclarecidos, pero los resultados obtenidos en diferentes cultivos, han demostrado según García *et al.* (2005) un efecto estimulador de los brasinoesteroides a concentraciones muy bajas.

Los resultados satisfactorios obtenidos en los indicadores morfofisiológicos del híbrido de piña por las modificaciones en el medio de cultivo de las concentraciones de los reguladores del crecimiento, concuerdan con los obtenidos en la morfogénesis *in vitro* de cultivos de interés con el uso del BB-6 en el plátano por Núñez (1996), en ajo por Izquierdo *et al.* (1996) y en caña de azúcar por Benítez (1998).

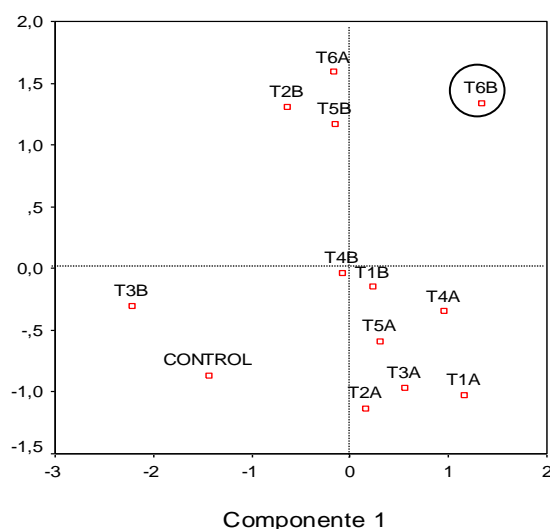
En la Tabla 29 se pueden apreciar los resultados del ACP para la fase de multiplicación con el uso del BB-16. La variabilidad total se explicó con 79,22% en dos componentes, la primera extrajo 45,37% de la variabilidad y la segunda 33,85%. Los caracteres que más aportaron a la variabilidad fueron el número y ancho de las hojas, el coeficiente de multiplicación y la masa fresca y seca.



**Tabla 29.** Resultados del análisis de componentes principales para las variables evaluadas en la fase de multiplicación del híbrido de piña CBCE-74.

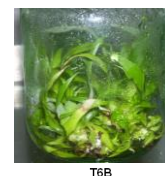
Componentes principales		CI	CII
Valor propio del vector		4,74	1,55
% de varianza		67,70	22,12
% de varianza acumulada		67,70	89,82
VARIABLES	Coefficiente de multiplicación	<b>0,814</b>	0,188
	Número de brotes	0,722	-0,386
	Altura de la planta	0,703	0,446
	Número de hojas	<b>0,867</b>	-0,147
	Ancho hojas	<b>0,848</b>	-0,318
	Masa fresca	0,152	<b>0,963</b>
	Masa seca	0,066	<b>0,967</b>

En la representación gráfica (Fig. 30.) del ACP efectuado con las componentes I y II el tratamiento T6B (BB-16 a 0,05 mg.L<sup>-1</sup>) mostró los mejores resultados.



**Figura 30.** Representación gráfica del ACP de los tratamientos de la fase de multiplicación del híbrido CBCE-74.

Al considerar de conjunto los resultados del experimento se pudo apreciar que 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BB –16 sin los reguladores del crecimiento (T6B) tuvo efecto positivo en los indicadores morfofisiológicos de la fase de multiplicación del híbrido CBCE-74.



### 3.5.3.2. Biobras-16 en las fases de multiplicación y enraizamiento del híbrido de piña CBCE-74

En la Tabla 30 se puede observar el comportamiento de las variables evaluadas, donde los tratamientos con el análogo de brasinoesteroide BB-16 en el medio, no superan al control y en su mayoría difieren por defecto al mismo.

**Tabla 30.** Comportamiento de las variables evaluadas en los tratamientos con BB-16 en la fase de enraizamiento *in vitro* del híbrido de piña CBCE-74.

Tratamientos		Altura de la planta (cm)	Número de hojas (cm)	Longitud de las hojas (cm)	Ancho de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Masa fresca (cm)	Masa seca (cm)
Control		13,08 a	5,05	11,66 a	0,88 a	5 a	1,86 a	3,23 a	0,27 a
T1	A	11,42 b	4,98	9,62 c	0,74 bc	3,6 b	0,88 bc	2,7 ab	0,19 bc
	B	10,52 c	4,67	9,44 c	0,68 c	1 d	0,0 c	1,85 c	0,16 c
T2	A	11,96 b	4,87	10,22 b	0,82 ab	2,4 c	1,76 bc	3,65 a	0,22 b
	B	9,96 c	4,67	9,22 c	0,62 c	1 d	0,0 c	1,51 c	0,17 c
$S\bar{x}$		0,23	N.S	0,18	0,02	0,11	0,18	0,19	0,008
CV (%)		10,14	7,05	9,33	15,00	34,7	16,91	37,64	21,07

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente para Tukey con  $p < 0.05$

En las variables altura de la planta, longitud de la hoja, número y longitud de las raíces y masa seca, el control fue el que mostró diferencias significativas con respecto a los tratamientos. Solo dos tratamientos tuvieron diferencias significativas pero entre tratamiento, no así con respecto al control, en las variables ancho de la hoja (T2A) y masa fresca (T1A y T2A). En el número de hojas no hubo diferencias significativas, los valores obtenidos para este carácter fueron similares muy similares.

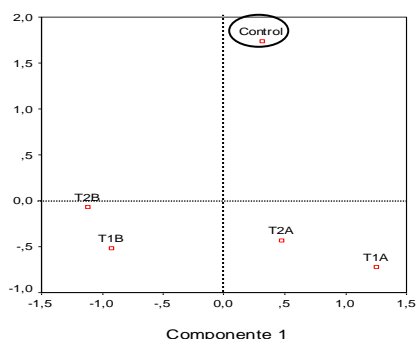
Se demuestran los resultados negativos del BB-16 en el híbrido de piña. Sobre esta temática se han formulado y demostrado diversidad de criterios por ejemplo Rodic (1994) asegura que existen evidencias que los brasinoesteroides si estimulan el crecimiento de raíces, sin embargo reconoce que se han obtenido resultados negativos en posturas de trigo, frijol, maíz y tomate. Por su parte Núñez (1996) afirma que las respuestas de la formación de las raíces son diversas y fisiológicamente diferentes a las de los tallos, por lo que deben ser cuidadosamente considerados aspectos tales como la formulación, la aplicación y el tiempo necesario de exposición. Sin embargo, en plántulas de arroz, García *et al.* (2005) al tratarlas con el brasinoesteroide MH-5 disminuyó de forma significativa el número de raíces, pero en cambio a las concentraciones estudiadas incrementó la masa seca y la longitud del sistema radical.

En la Tabla 31 se muestran los resultados del ACP donde se aprecia que las dos primeras componentes permitieron explicar el 97,14% de la variabilidad total presente en los tratamientos estudiados. La componente I extrajo el 82,40% de la variabilidad y la componente dos el 14,14%. Las variables evaluadas tuvieron una gran contribución en la primera componente.

**Tabla 31.** Resultados del análisis de componentes principales para las variables evaluadas en la fase de enraizamiento del híbrido de piña CBCE- 74.

Componentes principales		CI	CII
Valor propio del vector		4,94	0,884
% de varianza		82,40	14,74
% de varianza acumulada		82,40	97,14
VARIABLES	Altura de la planta	0,981	-0,177
	Longitud de las hojas	0,878	-0,410
	Ancho de las hojas	0,964	-0,230
	Numero de hojas	0,864	0,501
	Número de raíces	0,802	0,595
	Longitud de raíces	0,945	-0,164

En la representación gráfica (Fig. 31.) del ACP efectuado con las componentes I y II se puede observar que el control fue el que mostró los mejores resultados. .



**Figura 31.** Representación gráfica del ACP de los tratamientos de la fase de enraizamiento del híbrido CBCE-74.

Al considerar en conjunto los resultados del experimento puede plantearse que BB-16 no tuvo efecto positivo en los indicadores morfofisiológicos en la fase de enraizamiento, el control superó a los tratamientos.



### 3.4.4. Respuesta del híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización

#### 3.5.4.1. Tipos de sustratos en la fase de aclimatización

La fase de aclimatización es la etapa de mayores pérdidas en el cultivo de tejido, su éxito permite la entrega la mayor cantidad de material a los campesinos lo cual permite la recuperación de parte de la diversidad. En los resultados que se muestran a continuación se logra una alternativa que garantiza mayor supervivencia en esta etapa.

En la Tabla 32 se muestran los resultados del porcentaje de la supervivencia del híbrido CBCE-116, ante la utilización de diferentes sustratos. Los tratamientos Humus de lombriz 100%, Cachaza 100% y Humus de lombriz 25% + Cachaza 50% + Zeolita 25% tuvieron el 100% de supervivencia en la primera evaluación y siete días después del trasplante, seguido del tratamiento Cachaza 75% + Zeolita 25% con 98% de supervivencia, estos cuatro tratamientos no mostraron diferencias significativas. El único tratamiento que mantuvo elevado porcentaje de supervivencia durante el periodo evaluado de la etapa de aclimatización fue Cachaza 100% y el tratamiento de menor supervivencia Humus de lombriz 25% + Cachaza 50% + Zeolita 25

**Tabla 32.** Porcentaje de supervivencia de plantas propagadas *in vitro* del híbrido CBCE-116 días después del trasplante en distintos sustratos.

Tratamientos	Porcentaje de supervivencia días después del transplante													
	7 d		21 d		35 d		49 d		63 d		77 d		92 d	
	DT	DR	DT	DR	DT	DR	DT	DR	DT	DR	DT	DR	DT	DR
Humus de lombriz 100%	2,50	100 a	2,52	94 a	2,55	84 b	2,56	82 b	2,57	80 c	2,57	80 c	2,58	76 d
Cachaza 100%	2,50	100 a	2,52	94 a	2,53	92 a	2,53	90 a	2,53	90 a	2,53	90 a	2,54	88 a
Cachaza 75% + Zeolita 25%	2,51	98 a	2,55	86 b	2,55	84 b	2,55	84 b	2,55	84 b	2,55	84 b	2,55	84 b
Cachaza 50% + Zeolita 50%	2,54	88 b	2,56	82 c	2,58	78 c	2,58	78 c	2,58	78 d	2,58	78 d	2,58	78 c
Humus de lombriz 25%+Cachaza 50%+Zeolita 25%	2,50	100 a	2,56	82 c	2,98	30 d	2,98	30 d	2,97	28 e	2,97	28 e	2,97	28 e
CV:%	1,06		1,71		6,83		6,76		6,68		6,68		6,62	
Error standar	0,01		0,01		0,04		0,04		0,04		0,04		0,04	

Leyenda: DT: Datos transformados, DR: Datos Reales sin transformar

Como se puede apreciar el porcentaje de supervivencia fue disminuyendo al paso de los días, aunque los primeros 35 días fue la etapa de mayor mortalidad. Este resultado se corresponde con Martínez *et al.* (1990) quienes plantearon que la mayor mortalidad de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* se presenta entre los 14-21 días posterior a la fecha de plantación, con valores muy elevados. En esta etapa las plantas de piña poseen la cutícula muy fina, el tejido acuífero formado por una sola capa de células y los tricomas poco desarrollados, lo que disminuye su adaptabilidad al ambiente, además de proceder de un medio con óptimas condiciones.

Otro elemento a resaltar es el bajo porcentaje de supervivencia en los tratamientos con humus de lombriz. Si se tiene en cuenta que el acumulado de las precipitaciones durante el desarrollo del experimento fue de 685 mm, nos alerta que en períodos lluviosos utilizar este sustrato orgánico es riesgoso pues puede influir negativamente en los resultados esperados. El uso de un sustrato con buenas propiedades físicas y mantener un régimen de riego adecuado, son elementos importantes a tener en cuenta en la aclimatización de la piña.

Los resultados obtenidos no se corresponden con los de Barroso (2007) el cual utilizó iguales sustratos en la aclimatización de piña y obtuvo que los mejores tratamientos fueron los de Humus de Lombriz 100% y Cachaza 50% + Zeolita 50%, lo que podría estar asociado al porcentaje de humedad ya que durante el desarrollo de experimento hubo mejor distribución y cantidad de precipitaciones.

El tratamiento Humus de lombriz 25% + Cachaza 50% + Zeolita 25% manifestó una disminución del porcentaje de supervivencia a partir de los 35 días por lo que no se incluyó en la evaluación del comportamiento de la parte aérea y sistema radical.

En el primer muestreo se observó que el mayor número de hojas correspondió a los tratamientos Cachaza 75% + Zeolita 25% y el de Cachaza 100% sin diferencias significativas entre sí y con diferencias con la mayoría de los restantes tratamientos. A partir de las precipitaciones ocurridas después del trasplante (Tabla 33), comenzó a manifestarse la aparición de *Spodoptera* sp., lo que ocasionó las pérdidas de gran número de hojas en los tratamientos. Los tratamientos que manifestaron mejor comportamiento frente a esta plaga entre los 35 hasta los 77 días fueron: Humus de Lombriz 100% y Cachaza 100% (aunque este último no de forma sistemática) con mayor número de hojas y diferencias significativas con los restantes tratamientos.

**Tabla 33.** Comportamiento del número de hojas activas con diferentes tipos de sustratos en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116.

TRATAMIENTOS	NÚMERO DE HOJAS ACTIVAS						
	7 d	21 d	35 d	49 d	63 d	77 d	92 d
	DT	DT	DT	DT	DT	DT	DT
Humus de lombriz 100%	2,56 c	<b>2,99 ab</b>	<b>2,56 a</b>	<b>2,91 a</b>	<b>3,24 a</b>	<b>3,34 a</b>	3,15 c
Cachaza 100%	<b>2,75 ab</b>	<b>2,91 ab</b>	2,42 b	2,81 b	3,14 b	<b>3,45 a</b>	<b>3,71 a</b>
Cachaza 75% + Zeolita 25%	<b>2,81 a</b>	2,89 c	2,12 c	2,55 c	2,85 c	3,18 b	3,48 b
Cachaza 50% + Zeolita 50%	2,68 b	<b>3,03 a</b>	2,02 c	2,43 d	2,79 c	3,11 b	3,40 b
CV	7,04	6,50	13,16	9,92	8,82	6,89	9,16
Error standar	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03

\*Medias con letras diferentes en columnas difieren significativamente,  $p < 0.05$ .

Leyenda: DT: Datos transformados

A los 92 días, el tratamiento Cachaza 100% alcanzó el mayor número de hojas, lo que demuestra que en tiempos lluviosos este sustrato influye positivamente en mantener un equilibrio hídrico adecuado en la planta al permitir un buen drenaje, no ocurriendo de igual manera con el

tratamiento Humus de Lombriz 100% que al existir un incremento en las precipitaciones a los 84 días (Tabla 33) se vio afectado esta variable.

En cuanto a la hoja D a los 92 días el único tratamiento que difirió de forma significativa de los restantes fue Cachaza 100%. Este mostró los mayores valores de las variables evaluadas (Tabla 34). Al comparar los resultados con los obtenidos por Barroso, (2007), con iguales tratamientos e híbrido fueron estos superiores, cuya autor obtuvo 7,14 a 9,86 cm de longitud de la hoja, 0,84 y 1,02 cm de diámetro del tallo, lo que denota la posible influencia de las precipitaciones. También se diferencian de los resultados obtenidos por Villa (2001) al evaluar plantas *in vitro* del cv. Cayena lisa quienes no obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 34.** Variables evaluadas del híbrido CBCE-116 a los 92 días en la fase de aclimatación en diferentes tipos de sustratos.

TRATAMIENTOS	Hoja D		Diámetro del tallo (cm)	Masa (g)	
	Longitud (cm)	Ancho (cm)		Fresca	Seca
Humus de lombriz 100%	13,98 d	2,2 b	1,10 b	11, 27 c	0,88 c
Cachaza 100 %	<b>27,62 a</b>	<b>2,5 a</b>	<b>1,38 a</b>	<b>25,83 a</b>	<b>2,61 a</b>
Cachaza 75 % + Zeolita 25 %	20,1 b	2,2 b	1,22 b	16,29 b	1,33 b
Cachaza 50 % + Zeolita 50 %	16,79 c	2,3 b	1,18 b	15,14 bc	1,31 b
CV:%	18,5	10,8	14,00	17,4	14,4
Error standar	0,88	0,039	0,03	1,01	0,10

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $p < 0.05$ .

En el sistema radical (Tabla 35) los mayores valores del largo máximo y medio, número de raíces y masa seca y fresca, con diferencias significativas del resto de los tratamientos, fue Cachaza 100%, aunque en el largo máximo y medio de la raíz. Cachaza 75%+ Zeolita 25% no mostró diferencias significativas de Cachaza 100%. Estos resultados pueden ser explicado mediante lo planteado por Hepton (2002) el cual plantea que el drenaje y la eliminación del agua son necesarios para el crecimiento de la piña, ya que el sistema radical es intolerante a los suelos mal aireados, y que los suelos ideales deben tener alto contenido de materia orgánica con excelente drenaje interno y alto contenido de aire para proveer cantidades óptimas de agua, nutrientes y oxígeno a las raíces de las plantas. La baja permeabilidad y escasa aireación de los sustratos orgánicos para el crecimiento del sistema radical según Ortiz *et al.* (1998), son características indeseables, que contribuyen a incrementar el porcentaje de mortalidad.

**Tabla 35.** Comportamiento las variables evaluadas a los 92 días en la fase de aclimatación de plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116 en diferentes tipos de sustratos.

TRATAMIENTOS	Longitud (cm)		Número raíces	Masa (g)	
	Máxima	Media		Fresca	Seca
Humus de lombriz 100%	13,19 c	6,04 c	12,2 c	0,62 c	0,07 b
Cachaza 100%	<b>16,57 a</b>	<b>8,76 a</b>	<b>18,7 a</b>	<b>2,30 a</b>	<b>0,32 a</b>
Cachaza 75% + Zeolita 25%	<b>15,99 a</b>	<b>7,91ab</b>	14,9 b	1,52 b	0,09 b
Cachaza 50% + Zeolita 50%	14,55 b	<b>7,2 abc</b>	14,3 b	1,51 b	0,11 b
CV:%	21,9	21,7	16,8	17,7	15,2
Error Estandar	0,52	0,25	0,12	0,11	0,018

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $p < 0.05$ .

#### 4.3. Determinación de la norma y momento de riego en la fase de aclimatación

##### A. Sustrato: Humus de lombriz 100%

En la Tabla 36 se muestran los resultados del porcentaje de supervivencia de las plantas con las diferentes normas y momentos de riego. Como se puede apreciar excepto T2, T3, T4 los

tratamientos tuvieron porcentajes de supervivencia elevados. Sin embargo a medida que pasaron los días solo los tratamientos T1 y T6 mantuvieron elevados porcentajes de supervivencia por encima de 98%.

**Tabla 36.** Comportamiento del porcentaje de supervivencia con la interacción entre diferentes normas y dos momentos de riego en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116.

TRATAMIENTOS	Días					
	15	30	45	60	75	90
<b>T1</b> 15 mL md	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>
<b>T2</b> 15 mL mda	94,0 b	86,0 d	86,0 d	80,0 e	78,0 e	78,0 e
<b>T3</b> 10 mL m + 5 mL td	80,0 c	76,0 e	76,0 e	76,0 f	74,0 f	74,0 f
<b>T4</b> 10 mL m + 5 mL tda	78,0 d	76,0 e	76,0 e	70,0 g	70,0 g	68,0 g
<b>T5</b> 5 mL m + 10 mL td	<b>96,0 ab</b>	94,0 bc	94,0 bc	92,0 c	92,0 b	90,0 bc
<b>T6</b> 5 mL m + 10 mL tda	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>96,0 ab</b>	<b>96,0 ab</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>
<b>T7</b> 20 mL md	<b>96,0 ab</b>	92,0 c	92,0 c	90,0 d	90,0 bc	90,0 bc
<b>T8</b> 20 mL mda	<b>100,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	92,0 cd	92,0 b	92,0 b
<b>T9</b> 10 mL m + 10 mL td	<b>98,0 a</b>	<b>96,0 ab</b>	94,0 bc	90,0 d	90,0 bc	90,0 bc
<b>T10</b> 10 mL m + 10 mL tda	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	88,0 cd	88,0 cd
<b>T11</b> 15 mL m + 5 mL td	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	94,0 bc	90,0 bc	86,0 d
<b>T12</b> 15 mL m + 5 mL tda	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>96,0 ab</b>	92,0 b	90,0 bc
<b>T13</b> 5 mL m + 15 mL td	<b>100,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	94,0 bc	74,0 f	74,0 f
<b>T14</b> 5 mL m + 15 mL tda	<b>100,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	94,0 bc	74,0 f	74,0 f
CV:%	4,47	6,18	6,32	6,96	7,82	7,82
Error Estándar	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $p < 0.05$ .

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

Los valores de supervivencia superiores a 90% también son buenos, autores como Agramonte *et al.* (1998) y Yokota *et al.* (2007) consideran estos valores elevados en esta etapa tan compleja. Los tratamientos T3 y T4 fueron los más afectados por *Spodoptera* sp desde las primeras evaluaciones, sin embargo los tratamientos T13 y T14 tuvieron buen comportamiento hasta los 60 días, a partir de esa fecha también se afectaron.

En general se observó que la norma de 15 mL tanto en T1 como la fraccionada T6 mostró mejores respuestas. Estos resultados no se corresponden con los alcanzados por Bauta (2004) que al evaluar los efectos de diferentes normas de riego en plantas *in vitro* de banano (*Musa* spp. cv. FHIA-18) obtuvo el mejor porcentaje de supervivencia al aplicar como norma de riego 20 mL fraccionada (10 mL por la mañana + 10 mL por la tarde).

Cuando las plantas *in vitro* son trasladadas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, aunque estas últimas estén controladas, este cambio les provoca una rápida pérdida de agua que afecta su contenido hídrico y con ello otros mecanismos bioquímicos y fisiológicos que inciden directamente en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Esta pérdida puede ser a través de los estomas o por la cutícula. Más del 95% de las pérdidas de agua que ocurren en las plántulas, solo en la primera hora de su salida al exterior, es mediante la vía cuticular, desbalance hídrico que provoca la muerte prematura de las mismas (Preece y Sutter, 1991).

En cuanto al número de hojas activas (Tabla 37), a partir de los 45 días el momento de riego alterno en la mayoría de los tratamientos fue el mejor, independientemente de las normas



evaluadas, y que estas fueran únicas o fraccionadas, aspecto que se mantuvo hasta los 90 días en que presentó diferencias significativas con los tratamientos con riegos diarios., lo que concuerda con la poca exigencias al agua de este cultivo según Peña y Rodríguez (1999), por sus características de tener hojas con formas acanaladas, que incrementa su rigidez en relación con otras plantas con el mismo espesor. Esto le permite según Py (1969) y Mederos (1988), aprovechar las pequeñas cantidades de agua provenientes de lloviznas o del propio rocío, pues esta se desplaza hasta ponerse en contacto con las raíces situadas en las axilas de las hojas viejas y las ubicadas en el suelo.

**Tabla 37.** Comportamiento del número de hojas activas al aplicar diferentes normas y momentos de riego en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116.

TRATAMIENTOS		Días					
		15	30	45	60	75	90
<b>T1</b>	15 mL md	4,33 n.s	3,08 bc	4,94 ab	5,1 b	5,24 b	5,49 b
<b>T2</b>	15 mL mda	4,55 n.s	<b>4,42 a</b>	<b>5,83 a</b>	<b>6,02 a</b>	<b>6,62 a</b>	<b>7,12 a</b>
<b>T3</b>	10 mL m + 5 mL td	4,08 n.s	3,79 abc	3,51 c	4,12 bc	5,53 b	5,94 b
<b>T4</b>	10 mL m + 5 mL tda	4,27 n.s	<b>4,04 a</b>	<b>5,49 a</b>	<b>5,83 a</b>	<b>6,29 a</b>	<b>6,87 a</b>
<b>T5</b>	5 mL m + 10 mL td	4,52 n.s	3,01 bc	4,01 b	4,81 bc	5,08 b	5,53 b
<b>T6</b>	5 mL m + 10 mL tda	4,71 n.s	<b>4,05 a</b>	<b>5,54 a</b>	<b>6,03 a</b>	<b>6,52 a</b>	<b>7,01 a</b>
<b>T7</b>	20 mL md	4,62 n.s	<b>4,03 a</b>	4,23 bc	5,03 b	5,53 b	5,93 b
<b>T8</b>	20 mL mda	4,44 n.s	<b>4,04 a</b>	<b>5,64 a</b>	<b>6,17 a</b>	<b>6,57 a</b>	<b>7,92 a</b>
<b>T9</b>	10 mL m + 10 mL td	4,07 n.s	2,94 c	3,44 c	4,14 bc	4,34 c	4,60 c
<b>T10</b>	10 mL m + 10 mL tda	4,48 n.s	<b>4,08 a</b>	<b>5,13 a</b>	5,57 ab	<b>6,01 a</b>	6,47 ab
<b>T11</b>	15 mL m + 5 mL td	4,35 n.s	3,78 abc	4,36 bc	5,62 ab	5,82 b	5,98 b
<b>T12</b>	15 mL m + 5 mL tda	4,41 n.s	<b>4,09 a</b>	<b>5,25 a</b>	5,72 ab	<b>6,18 a</b>	<b>7,94 a</b>
<b>T13</b>	5 mL m + 15 mL td	4,68 n.s	3,78 abc	4,23 bc	5,48 b	5,93 b	6,06 b
<b>T14</b>	5 mL m + 15 mL tda	4,96 n.s	<b>4,64 a</b>	<b>5,99 a</b>	<b>6,79 a</b>	<b>7,52 a</b>	<b>7,99 a</b>
CV:%		9,41	13,3	13,4	10,5	7,50	8,79
Error Estándar		0,07	0,15	0,15	0,10	0,06	0,08

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$ .

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

El menor número de hojas activas fue el tratamiento T9, sin diferencias significativas con algunos tratamientos en los muestreos realizados a los 30, 45 y 60 días en la norma diaria, pero a partir de los 75 días, mostró diferencias significativas con los restantes tratamientos en estudio. Estos resultados se corresponden con los de Bauta (2004) quien al evaluar diferentes normas de riego en plantas *in vitro* de banano (*Musa* spp cv. FHIA – 18) obtuvo la mejor respuesta en el número de hojas al aplicar 20 mL de riego fraccionado (10 mL por la mañana + 10 mL por la tarde).

En la Tabla 38 se muestran los resultados de las variables evaluadas en la hoja. Como se puede apreciar los mejores tratamientos para la longitud de la hoja D fueron la mayoría de los tratamientos con riego en días alternos, a excepción de los tratamientos T5 y T6 con la norma de 15 mL que no difirieron entre sí; y el tratamiento T9 fue el de menor valor. No se observó respuesta en los tratamientos con respecto el ancho de esta hoja. Los mejores valores en la masa de la hoja D en su mayoría se corresponden con los de las hojas de mayor longitud.

**Tabla 38.** Variables evaluadas a los 90 días en la fase de aclimatización de las plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116 en diferentes normas y dos momentos de riego

TRATAMIENTOS		Hoja D		Masa (g)	Diámetro del tallo (cm)	Masa (g)	
		Longitud (cm)	Ancho (cm)			Fresca	Seca
<b>T1</b>	15 mL md	11,21 c	2,60 n.s	0,99 bc	1,23 bc	9,43 c	0,84 c
<b>T2</b>	15 mL mda	<b>13,85 a</b>	2,54 n.s	<b>1,84 a</b>	1,32 abc	<b>14,85 a</b>	<b>1,26 a</b>
<b>T3</b>	10 mL m + 5 mL td	11,33 bc	2,23 n.s	1,01 b	1,14 c	9,41 c	0,95 c
<b>T4</b>	10 mL m + 5 mL tda	<b>14,11 a</b>	2,38 n.s	<b>1,94 a</b>	<b>1,46 a</b>	<b>14,34 a</b>	<b>1,38 a</b>
<b>T5</b>	5 mL m + 10 mL td	13,02 ab	2,32 n.s	1,26 ab	1,27 abc	12,75 b	1,13 b
<b>T6</b>	5 mL m + 10 mL tda	<b>14,27 a</b>	2,35 n.s	<b>1,98 a</b>	1,32 abc	12,27 b	1,13 b
<b>T7</b>	20 mL md	11,44 b	2,20 n.s	1,03 b	1,24 abc	9,41 c	0,89 c
<b>T8</b>	20 mL mda	<b>13,97 a</b>	2,66 n.s	<b>1,71 a</b>	1,34 abc	11,93 b	1,07 b
<b>T9</b>	10 mL m + 10 mL td	10,73 d	2,10 n.s	0,17 c	1,39 ab	7,44 d	0,73 d
<b>T10</b>	10 mL m + 10 mL tda	11,77 b	2,37 n.s	1,08 ab	1,27 abc	12,31b	1,12 b
<b>T11</b>	15 mL m + 5 mL td	12,57 b	2,33 n.s	1,18 ab	1,27 abc	5,35 e	1,14 b
<b>T12</b>	15 mL m + 5 mL tda	<b>14,88 a</b>	2,35 n.s	<b>1,99 a</b>	1,25 abc	10,57 c	0,90 c
<b>T13</b>	5 mL m + 15 mL td	12,02 b	2,34 n.s	1,06 b	1,17 bc	10,31 c	1,02 b
<b>T14</b>	5 mL m + 15 mL tda	<b>15,02 a</b>	2,45 n.s	<b>1,97 a</b>	1,26 abc	<b>16,33 a</b>	0,92 c
CV:%		11,28	9,94	12,00	11,90	16,27	16,90
Error Estándar		1,88	0,05	0,06	0,02	0,96	0,07

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente, P < 0.05.

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

En el diámetro del tallo prácticamente no se observó diferencias significativas entre los tratamientos. El único tratamiento que difirió significativamente en los momentos de riego fue el T4. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bauta (2004) quien al evaluar diferentes normas de riego en plantas *in vitro* de banano (*Musa* spp cv. FHIA – 18) obtuvo la mejor respuesta al aplicar 20 mL de norma de riego fraccionada (10 mL por la mañana + 10 mL por la tarde).

Los tratamientos con mayores valores de la masa seca y fresca de las hojas fueron T2, T4 y T14; y T2 y T4, respectivamente, con diferencias significativas con sus homólogos diarios. Es de destacar que, en los restantes tratamientos, la mayoría mostraron entre los momentos alternos diferencias significativas respecto a sus riegos diarios.

En la Tabla 39 se muestran los resultados de las variables evaluadas del sistema radical. Como se puede observar para la longitud máxima y media de las raíces la mayoría de los tratamientos con riegos en días alternos tuvieron los mejores valores, a excepción del T8 en la longitud máxima. En cuanto al número de raíces no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Bauta (2004) quien al evaluar diferentes normas de riego en plantas *in vitro* de banano (*Musa* spp. cv. FHIA – 18) en la fase de aclimatización, la mejor respuesta en cuanto el largo medio y número de raíces, obtuvo diferencias significativas al resto de los tratamientos cuando aplicó la norma de 20 mL fraccionada (10 mL por la mañana + 10 mL por la tarde). Si se tiene en cuenta según Pérez (1998) el sistema radical de las plantas *in vitro* en los primeros 15 días posteriores al trasplante, no se encuentran suficientemente desarrollada como para garantizar su normal funcionamiento, ya que no presenta pelos radicales, dan respuesta a los resultados obtenidos.

**Tabla 39.** Comportamiento de las variables del sistema radical evaluadas con diferentes normas y dos momentos de riego en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116 a los 90 días en la fase de aclimatización.

TRATAMIENTOS		Longitud (cm)		Número raíces	Masa (g)	
		Máxima (cm)	Mínima (cm)		Fresca	Seca
<b>T1</b>	15 mL md	12,84 b	4,33 b	10,1 n.s	0,31 b	0,08 b
<b>T2</b>	15 mL mda	<b>14,98 a</b>	<b>6,27 a</b>	10,7 n.s	<b>0,46 a</b>	<b>0,10 a</b>
<b>T3</b>	10 mL m + 5 mL td	12,62 b	4,00 c	10,9 n.s	0,25 c	0,09 ab
<b>T4</b>	10 mL m + 5 mL tda	<b>13,26 a</b>	<b>6,36 a</b>	11,4 n.s	<b>0,51 a</b>	<b>0,10 a</b>
<b>T5</b>	5 mL m + 10 mL td	10,46 c	4,83 b	10,5 n.s	0,35 ab	0,08 b
<b>T6</b>	5 mL m + 10 mL tda	<b>13,25 a</b>	<b>5,95 a</b>	10,0 n.s	<b>0,41 a</b>	0,09 ab
<b>T7</b>	20 mL md	10,17 c	4,32 b	10,5 n.s	0,23 c	0,08 b
<b>T8</b>	20 mL mda	12,67 b	<b>5,73 a</b>	10,4 n.s	0,35 ab	0,08 b
<b>T9</b>	10 mL m + 10 mL td	10,62 c	4,06 c	10,4 n.s	0,27 ab	0,08 b
<b>T10</b>	10 mL m + 10 mL tda	<b>13,12 a</b>	<b>5,77 a</b>	11,3 n.s	<b>0,39 a</b>	0,09 ab
<b>T11</b>	15 mL m + 5 mL td	11,67 b	4,54 b	12,2 n.s	0,34 ab	0,07c
<b>T12</b>	15 mL m + 5 mL tda	<b>13,65 a</b>	<b>5,17 a</b>	10,6 n.s	<b>0,40 a</b>	<b>0,11a</b>
<b>T13</b>	5 mL m + 15 mL td	11,24 b	4,79 b	10,1 n.s	0,33 ab	<b>0,10 a</b>
<b>T14</b>	5 mL m + 15 mL tda	<b>13,10 a</b>	<b>5,20 a</b>	10,9 n.s	0,31 ab	0,09 ab
CV:%		18,13	12,71	9,22	16,56	19,94
Error Estándar		1,93	1,24	0,08	0,01	0,03

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$ .

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

En la masa fresca de las raíces las normas de 20 mL fraccionadas no presentaron diferencias significativas entre los dos momentos de riego. Las normas de riego de 15 mL difirieron entre los momentos, con mejores respuestas en los días alternos, a excepción de la norma del T5 que no difirieron entre sí. Los menores valores de masa fresca, se obtuvieron en la mayoría de los tratamientos T7 y T3 con aplicación del riego diario. En la masa seca, las respuestas a los momentos no son muy marcadas sino que depende de las normas, donde los tratamientos T12 y T13 fueron los de mayores valores con diferencias significativas del resto. Durante el desarrollo del experimento no pudo manifestarse lo planteado por Pérez (1998) sobre la resistencia de la planta de piña a la falta de humedad y el déficit hídrico prolongado sobre el desarrollo de la planta, ya que las normas evaluadas cubrían las necesidades de agua de la planta. De manera inversa, los excesos de agua tienen resultados negativos en el cultivo, pues las raíces son muy sensibles a la asfixia por falta de agua, los momentos de riego más adecuados en general se manifestaron con los riegos alternos, corroborando los aspectos planteados en los dos experimentos de sustratos.

#### B. Sustrato: Cachaza 100%

En la Tabla 40 se muestran los resultados del porcentaje de supervivencia de las plantas con las diferentes normas y momentos de riego. Como se puede apreciar los tratamientos, excepto el tratamiento T11 y T12, tuvieron valores superiores al 98% altamente significativos a los 15 días de plantadas las vitroplantas. Sin embargo a los 90 días los tratamientos T5, T6, T7, T8 y T9 fueron los que mostraron diferencias significativas respecto al resto, con valores superiores al 98%. Los resultados obtenidos demuestran que el uso de Cachaza 100% con esas normas de riego fue superior a las alcanzadas con el sustrato anterior (Humus de lombriz 100%)

**Tabla 40.** Comportamiento del porcentaje de supervivencia con la interacción entre diferentes normas y dos momentos de riego en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116.

TRATAMIENTOS		Días					
		15	30	45	60	75	90
<b>T1</b>	15 mL md	<b>100,0 a</b>	94,0 bc	90,0 c	90,0 bc	90,0 bc	90,0 bc
<b>T2</b>	15 mL mda	<b>100,0 a</b>	92,0 cd	80,0 e	80,0 e	80,0 e	80,0 e
<b>T3</b>	10 mL m + 5 mL td	<b>100,0 a</b>	80,0 e	80,0 e	80,0 e	80,0 e	80,0 e
<b>T4</b>	10 mL m + 5 mL tda	<b>100,0 a</b>	96,0 b	94,0 b	92,0 b	92,0 b	92,0 b
<b>T5</b>	5 mL m + 10 mL td	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>
<b>T6</b>	5 mL m + 10 mL tda	<b>100,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>
<b>T7</b>	20 mL md	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>
<b>T8</b>	20 mL mda	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>	<b>98,0 a</b>
<b>T9</b>	10 mL m + 10 mL td	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>
<b>T10</b>	10 mL m + 10 mL tda	<b>100,0 a</b>	96,0 b	88,0 cd	88,0 cd	88,0 cd	88,0 cd
<b>T11</b>	15 mL m + 5 mL td	96,0 b	94,0 bc	92,0 bc	92,0 b	92,0 b	92,0 b
<b>T12</b>	15 mL m + 5 mL tda	94,0 c	94,0 bc	92,0 bc	92,0 b	92,0 b	92,0 b
<b>T13</b>	5 mL m + 15 mL td	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	92,0 bc	92,0 b	92,0 b	92,0 b
<b>T14</b>	5 mL m + 15 mL tda	<b>100,0 a</b>	<b>100,0 a</b>	92,0 bc	92,0 b	92,0 b	92,0 b
CV:%		4,47	5,18	5,32	5,96	6,82	6,82
Error Estándar		0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $p < 0.05$ .

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

La aclimatización gradual, de acuerdo con Pospisilova *et al.* (1999), es un procedimiento que permite que una planta micropropagada tenga altos porcentajes de sobrevivencia en la etapa *ex vitro*, y es donde se corrigen las "anormalidades", tales como la producción insuficiente de cera cuticular, la presencia de estomas dañados, pobre actividad fotosintética, pobre conexión vascular y deshidratación e infección por agentes patógenos

En cuanto a la parte aérea (Tabla 41) el número de hojas activas fue significativamente mejor en los tratamientos con riegos alternos, independientemente de la norma de riego, desde los 15 días hasta los 90. Estos resultados pueden ser debido a los cambios que sufren estas plantas al pasar de la fase *in vitro* a la *ex vitro*. Las cuales, los primeros 15 días después del trasplante aún se encuentran en la fase de reorganización fisiológica, y a medida que van creando su propio sistema radical, dan respuestas satisfactorias o no a sus nuevas necesidades fisiológicas.

**Tabla 41.** Comportamiento del número de hojas activas al aplicar diferentes normas y momentos de riego en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116.

TRATAMIENTOS		Días					
		15	30	45	60	75	90
<b>T1</b>	15 mL md	4,51 b	5,98 b	6,04 b	6,69 b	7,34 b	8,79 b
<b>T2</b>	15 mL mda	<b>5,96 a</b>	<b>6,42 a</b>	<b>6,83 a</b>	<b>7,22 a</b>	<b>8,62 a</b>	<b>9,02 a</b>
<b>T3</b>	10 mL m + 5 mL td	4,94 b	4,93 b	5,11 b	5,92 b	6,53 c	7,94 b
<b>T4</b>	10 mL m + 5 mL tda	<b>5,46 a</b>	<b>6,94 a</b>	<b>7,41 a</b>	<b>8,83 a</b>	<b>9,29 a</b>	<b>10,77 a</b>
<b>T5</b>	5 mL m + 10 mL td	4,31 b	5,01 b	5,31 b	5,81 b	6,28 c	7,73 b
<b>T6</b>	5 mL m + 10 mL tda	<b>5,56 a</b>	<b>6,05 a</b>	<b>7,54 a</b>	<b>8,03 a</b>	<b>9,52 a</b>	<b>9,92 a</b>
<b>T7</b>	20 mL md	4,53 b	5,03 b	6,53 b	6,93 b	8,53 b	8,93 b
<b>T8</b>	20 mL mda	<b>5,69 a</b>	<b>6,14 a</b>	<b>7,64 a</b>	<b>8,07 a</b>	<b>9,57 a</b>	<b>10,02 a</b>
<b>T9</b>	10 mL m + 10 mL td	4,15 b	5,64 b	6,14 b	6,64 b	7,14 b	8,64 b
<b>T10</b>	10 mL m + 10 mL tda	<b>5,25 a</b>	<b>6,68 a</b>	<b>7,13 a</b>	<b>8,57 a</b>	<b>9,01 a</b>	<b>10,47 a</b>
<b>T11</b>	15 mL m + 5 mL td	4,01 b	4,98 b	5,16 b	6,62 b	7,12 b	8,58 b
<b>T12</b>	15 mL m + 5 mL tda	<b>5,32 a</b>	<b>6,79 a</b>	<b>7,25 a</b>	<b>8,72 a</b>	<b>9,18 a</b>	<b>10,64 a</b>
<b>T13</b>	5 mL m + 15 mL td	4,11 b	4,98 b	5,03 b	6,48 b	7,93 b	8,36 b
<b>T14</b>	5 mL m + 15 mL tda	<b>5,36 a</b>	<b>6,84 a</b>	<b>7,30 a</b>	<b>8,73 a</b>	<b>9,22 a</b>	<b>10,69 a</b>
CV: %		7,36	7,67	7,79	7,89	7,98	8,19
Error Estándar		0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$ .

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

En la Tabla 42 se muestran los resultados de las variables de la hoja evaluadas. Como se puede apreciar los mejores tratamientos fueron T4 y T6 con la norma de 15 mL. El comportamiento del resto de los tratamientos fue inferior en la mayoría de los casos.

**Tabla 42.** Variables evaluadas a los 90 días en la fase de aclimatización de las plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116 en diferentes normas y dos momentos de riego

TRATAMIENTOS		Hoja D		Masa (g)	Diámetro del tallo (cm)	Masa (g)	
		Longitud (cm)	Ancho (cm)			Fresca	Seca
<b>T1</b>	15 mL md	18,2 bc	2,38 bc	2,07 bc	<b>1,58 a</b>	20,68 bcde	2,01 ab
<b>T2</b>	15 mL mda	16,52 c	2,28 c	2,69 ab	1,40 abc	18,36 cde	1,85 b
<b>T3</b>	10 mL m + 5 mL td	17,25 bc	2,34 bc	1,62 c	1,34 bc	16,33 e	0,16 d
<b>T4</b>	10 mL m + 5 mL tda	<b>22,40 a</b>	<b>2,80 a</b>	<b>2,74 a</b>	1,51 ab	25,44 ab	<b>2,15 a</b>
<b>T5</b>	5 mL m + 10 mL td	19,35 b	2,47 b	2,16 b	1,45 abc	21,55 abc	1,95 b
<b>T6</b>	5 mL m + 10 mL tda	<b>23,50 a</b>	2,62 ab	<b>2,80 a</b>	<b>1,57 a</b>	<b>27,15 a</b>	<b>2,21 a</b>
<b>T7</b>	20 mL md	19,8 b	2,46 b	2,27 b	1,51 ab	23,5 abc	<b>2,24 a</b>
<b>T8</b>	20 mL mda	20,11 ab	<b>2,63 a</b>	2,69 ab	1,45 abc	22,8 abcd	2,07 ab
<b>T9</b>	10 mL m + 10 mL td	17,01 c	1,27 d	1,83 c	1,31 c	17,7 de	1,78 b
<b>T10</b>	10 mL m + 10 mL tda	18,31 bc	<b>2,75 a</b>	<b>2,90 a</b>	1,34 bc	18,9 cde	1,76 b
<b>T11</b>	15 mL m + 5 mL td	19,51 b	2,37 bc	2,2 b	1,42 abc	20,99 bcde	2,01 ab
<b>T12</b>	15 mL m + 5 mL tda	<b>22,8 a</b>	2,56 ab	2,49 b	1,41 abc	23,37 abc	<b>2,16 a</b>
<b>T13</b>	5 mL m + 15 mL td	17,14 c	2,32 bc	1,61 c	1,30 c	16,9 e	1,50 c
<b>T14</b>	5 mL m + 15 mL tda	21,10 ab	<b>2,70 a</b>	2,60 ab	1,48 ab	24,9 ab	<b>2,12 a</b>
CV: %		9,93	6,95	17,29	8,54	17,09	16,31
Error Estándar		0,74	0,07	0,13	0,01	0,96	0,07

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente,  $P < 0.05$ .

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)

En cuanto a la longitud de la hoja D los tratamientos que presentaron mejores respuestas fueron los momentos de riego alternos con la norma de 15 mL (T4 y T6) y con la norma de 20 mL (T12). Los mejores resultados en el ancho de la hoja D en la mayoría de los tratamientos correspondieron a los riegos alternos, aunque sin diferencias significativas con los riegos diarios. Los tratamientos con la norma única de 15 mL días alternos y diarios no presentaron diferencias significativas entre sí.

Los mejores tratamientos para la masa de la hoja D fueron en su gran mayoría con los momentos de riego alternos independientemente de su norma de riego. Solamente no difirieron entre si las normas únicas y las normas de 15 mL por la mañana + 5 mL por la tarde. En el diámetro del tallo prácticamente no se manifestó diferencias entre los momentos, a excepción de los tratamientos T1 y T6 en los que se observó mejor respuesta en los riegos alternos.

La masa fresca de las hojas mostró pocas diferencias significativas entre los momentos y el mejor tratamiento de la norma fue el T6. Este tratamiento no tuvo diferencias significativas con su homólogo diario. En cuanto la variable masa seca de las hojas, las normas únicas de 15 y 20 mL no presentaron diferencias entre los momentos. Las normas de 15 mL fraccionadas presentaron diferencias significativas entre sí en los momentos. La norma de 20 mL fraccionada solo presentó diferencias entre los momentos la de 5 mL por la mañana + 15 mL por la tarde, con la mejor respuesta en el riego alterno.

En la Tabla 43 se muestran los resultados de las variables evaluadas del sistema radical. Como se puede observar la mayoría de los tratamientos tuvieron valores inferiores a los mejores tratamientos por variable.

**Tabla 43.** Comportamiento de las variables del sistema radical evaluadas con diferentes normas y dos momentos de riego en plantas *in vitro* de piña híbrido CBCE-116 a los 90 días en la fase de aclimatización.

TRATAMIENTOS	Longitud (cm)		Número raíces	Masa (g)	
	Máxima (cm)	Mínima (cm)		Fresca	Seca
<b>T1</b> 15 mL md	18,2d efg	8,47 cde	15,5 cdef	1,54 ab	<b>0,28 a</b>
<b>T2</b> 15 mL mda	16,52 g	6,4 de	18,4 ef	1,33 ab	0,24 ab
<b>T3</b> 10 mL m + 5 mL td	17,25 efg	5,88 cde	17,7 f	1,19 bc	0,27 ab
<b>T4</b> 10 mL m + 5 mL tda	22,4 abc	<b>6,15 a</b>	20,9 ab	<b>2,49 a</b>	0,32 a
<b>T5</b> 5 mL m + 10 mL td	19,35 defg	5,82 bcde	20,8 abc	1,66 ab	0,24 ab
<b>T6</b> 5 mL m + 10 mL tda	<b>23,5 a</b>	5,88 bcd	<b>22,5 a</b>	<b>2,71 a</b>	<b>0,30 a</b>
<b>T7</b> 20 mL md	19,8 bcdef	6,50 bcde	19,3 bcd	1,16 bc	0,24 ab
<b>T8</b> 20 mL mda	20,11 bcde	5,40 bcd	20,3 abc	1,49 ab	0,24 ab
<b>T9</b> 10 mL m + 10 mL td	17,01 fg	5,13 de	16,8 def	0,83 c	0,10 c
<b>T10</b> 10 mL m + 10 mL tda	18,31 defg	5,34 e	19,8 def	1,00 bc	0,20 ab
<b>T11</b> 15 mL m + 5 mL td	19,51 cdef	5,62 cde	19,1 bcde	1,37ab	0,21 ab
<b>T12</b> 15 mL m + 5 mL tda	22,5 ab	5,45 abc	19,1 bcd	1,13 bc	0,22 ab
<b>T13</b> 5 mL m + 15 mL td	17,14 efg	5,59 cde	17,31 f	0,92 bc	0,19 b
<b>T14</b> 5 mL m + 15 mL tda	21,1 abcd	5,82 ab	19,4 bc	1,47ab	0,27 ab
CV:%	9,93	6,95	17,29	15,14	16,29
Error Estándar	0,74	0,07	0,13	0,26	0,01

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente, P < 0.05.

Leyenda: md (mañana diario), mda (mañana días alternos), td (tarde diario), tda (tarde días alternos)



La mayor longitud máxima de raíz fue el tratamiento T6 con norma de 15 mL con riegos alternos y los restantes tratamientos no difirieron entre los diferentes momentos. La mejor longitud mínima de la raíz fue T4 sin diferir de las normas con riegos alternos. El mejor número de raíces fue T6, los restantes tratamientos no difieren entre sí en los momentos.

La masa fresca de la raíz mostró poca diferencias entre los momentos, manifestándolo solo entre la norma de 10 mL por la mañana + 5 mL por la tarde con los diferentes momentos, con mejores respuesta en el riego alterno. La masa seca no mostró prácticamente diferencias entre las diferentes normas y momentos, sólo se observó diferencias con el T1 y el T6.

En este experimento los mejores tratamientos fueron con las normas y momentos de riego en días alternos en las variables fisiológicas: hojas activas, largo y ancho de la hoja D. El diámetro del tallo no presentó respuestas entre normas y momentos de riego. Al comparar los dos experimentos de normas y momentos de riego con diferentes tipos de sustratos se observó que con el sustrato Cachaza 100% se obtuvo mejores resultados en las variables fisiológicas evaluadas y en los porcentajes de supervivencia.

#### IV. CONCLUSIONES

1. La diversidad del germoplasma de piña presente en Cuba es insuficiente para la conservación y el mejoramiento de la especie.
2. Los patrones de diversidad morfoagronómicos y moleculares establecidos permiten diferenciar los distintos cultivares lo que favorece el manejo de los RFG de la especie.
3. El Listado de Descriptores Mínimos permite la caracterización morfoagronómica y la evaluación más eficiente de la colección de piña y corrobora la clasificación de los cultivares según su grupo horticultural.
4. Los nuevos cebadores SSR diseñados de *A. bracteatus* y *A. comosus* determinan la distancia genética de los cultivares de piña.
5. Se identifican las amenazas de pérdida de diversidad genética del germoplasma de piña conservado *in situ* y *ex situ* lo que permite diseñar acciones para minimizar las mismas.
6. La colección núcleo con las accesiones de mayor variabilidad facilita el trabajo de mejora y conservación del germoplasma.
7. La crioconservación y cultivo de tejidos incrementa la protección de los RFG de piña en Cuba y el número de individuos a entregar a productores.

#### V. RECOMENDACIONES

1. Aplicar el Listado de los Descriptores Mínimos en la caracterización y evaluación del germoplasma que sea incorporado a la colección de piña nacional.
2. Introducir, con la correspondiente aprobación fitosanitaria, accesiones de germoplasma de otros países, que contengan genes no presentes en la colección cubana, a fin de ampliar la diversidad genética disponible en la colección nacional.
3. Implementar otras acciones sugeridas para minimizar la erosión del germoplasma de piña.
4. Propiciar la retroalimentación con los actores locales de las acciones para minimizar las amenazas de erosión genética del germoplasma de piña a través de talleres.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agramonte, D.; Jiménez, F. 1998. Aclimatización. En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Santa Clara: IBP, 1998, p. 193-206.
2. AOAC. 2000. Method 967.21. Ascorbic Acid in Vitamin preparations and Juices 45.1.14. Official method of analysis. 17th Ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
3. Barrios, O. 2010. Los recursos genéticos de ajíes y pimientos (*Capsicum* spp.) en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba, 104pp.
4. Barroso, M. 2007. Comportamiento de plantas in vitro de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en la fase de aclimatización. Trabajo de Diploma en opción a Ingeniero Agrónomo. Universidad de las Tunas, 55pp.
5. Bartholomew, D.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Ching-Cheng, C. 2010. Pineapple. Hortscience 45(5): 740-742.
6. Bartholomew, D.; Paull, R.; Rohrbach, K. 2002. The pineapple, Botany, production and uses. University of Hawaii at Manoa, Honolulu, USA, 300pp.
7. Benega, R.; Cisneros, A.; Hidalgo, M.; Ramos, J.; Martínez, J.; Pérez, G.; Arias, E.; Isidró, M. (1999). Hybridization in pineapple results and strategies to save time for obtaining and releasing new hybrid varieties for growers. Pineapple New 6: 12-14.
8. Benítez, A. 1998. Actividad biológica del Pectimorf sobre el desarrollo de callos de *Saccharum officinarum* L., de la variedad C-8751. Trabajo de Diploma (en opción al título de licenciado en Biología). Universidad de La Habana. 60 pp.
9. Berjak, P.; Bartels, P.; Benson, E. E.; Harding, K.; Mycock, D. J.; Pammenter, N. W.; Sershen y Wesley-Smith, J. 2010. "Cryoconservation of South African plant genetic diversity". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1, 26): 65-81, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-010-9317-4.
10. Blanc, J. 2003. Developpement de marqueurs microsatellites pour l'identification d'hybrides et l'analyse de la diversite chez l'ananas. Thesis Department of Amelioration des Plantes, Institut National d'Horticulture (INH), Angers, France.
11. Burhoo, K.; Ranghoo-Sanmukhiya, V.M. 2012. Evaluation of Different Pineapple (*Ananas comosus* Merr L.) Varieties Using Morphological and Genetic Markers in Mauritius. Biotechnology 11: 272-279.
12. Cabrera, J.C. 2000. Obtención de una mezcla de oligogalacturonidos bioactivos a partir de un grupo de subproductos de la industria citrícola. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. CINC. La Habana. 98p
13. Castiñeiras, L.; Cristóbal, R.; Pinedo, R.; Collado, L.; Arias, L. 2009. Redes de abastecimiento de semillas y limitaciones que enfrenta el sistema informal. En: Hermann, M.; Karen, A.; Latournerie, L.; Castiñeiras, L. (eds.). ¿Cómo conservan los agricultores sus semillas en el trópico húmedo de Cuba, México y Perú?. Bioversity International. IDRC. Roma, Italia, 186 pp.
14. Castiñeiras, L.; Fundora, Z.; Shagarodsky, T.; Fuentes, V.; Barrios, O.; Moreno, V.; Sánchez, P.; González, V.; Martínez, A.; García, M.; Martínez, A. 2000. La conservación *in situ* de la variabilidad de plantas de cultivo en dos localidades de Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional 21 (1): 25-45.
15. Ciampi, A.Y.; Azevedo, V.C.; Gaiotto, F.A.; Ramos, A.C. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. Mol. Ecol. Resour. 8: 1074-1077.
16. Clement, C.; De Cristo-Araújo, M.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Alves, A.; Picanco-Rodríguez, D. 2010. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. Diversity 2(1): 72-106.

17. Collado, L.; Pinedo, R.R.; Chávez, J.L.; Sevilla, R. 2004. Diversidad genética de maíz en el Amazonas Central peruano. En: Barrandiarán-Gamarra, M.; Chávez-Cabrera, A.; Sevilla-Panizo, R.; Narro-León, T. (eds.). XX Reunión Latinoamericana de Maíz, 11-14 octubre 2004, Lima, Perú, 584-590.
18. Collins, J. 1960. The pineapple: botany, cultivation and utilization. London, L. Hill; New York, 294pp.
19. Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Duval, M.F. 1995. Bases genéticas para definir una estrategia del mejoramiento de la piña. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 21: 95-118.
20. Coppens d'Eeckenbrugge; Leal, F. 2003. Morphology, Anatomy and taxonomy. En: Bartholomew, D.; Paull, R.; Rohrbach, K. (eds.). The Pineapple: Botany, production and uses. CABI Publishing, Oxon, UK, 13-22.
21. Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Cabral, J.; Matos, A.; Carlier, J.; Leitão, J.; Duval, M.F.; Noyer, J.; Ferreira, F.; Leal, F.; Maggioni, L.; Suárez, Z. 2005. Main Results from the EU-funded project "Evaluation and utilization of Pineapple Genetic Resources from the Amazon to Breed Resistant varieties". Acta Hort. 666: 77-83.
22. Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Leal, F.; Duval, M.F. 1997. Germplasm Resources of Pineapple. Hortic. Rev. 21: 133-175.
23. Cota, L.G.; Moreira, P.A.; Menezes, E.V.; Gomes, A.S.; Ericsson, A.R.O.; Oliveira, D.A.; Melo, A.F. 2012. Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). Genet. Mol. Res. 11 (4): 4609-4616.
24. Cubero, J.L. 2013. Introducción a la mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi – Prensa, España, 569pp.
25. Daquinta, M. 1998. Propagación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas). Universidad de Ciego de Ávila. Centro de Bioplasmas. p. 4-13.
26. de los Ángeles, T. M.; Román, M. I.; González, C.; Manzano, A. R. y Mayor, Z. F. 2011. "Evaluación fenotípica y bioquímica de plantas regeneradas de meristemas proliferantes criopreservados de plátano (*Musa* spp.)" *Agrotecnia de Cuba*, 35(1): 1–11, ISSN 2079-3472, 0568-3114.
27. Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. Ecology 26: 297-302.
28. Domini, M.E. y Benítez, B. 2003. Uso de biopreparados como promotores de enraizamientos en margullos de *Picus* (*Ficus benjamina*). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Abstracts of the 48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Octubre 7-11. Tegucigalpa, Honduras.
29. Dujardin, M. 1991. Cytogenetique de l'ananas. Fruits 46: 376-379.
30. Duval, M.F.; Coppens d'Eeckenbrugge, G. 1993. Genetic variability in the genus *Ananas*. Acta Hort. 334: 27-37.
31. Duval, M.F.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Ferreira, F.; Cabral, J.; Bianchetti, B. 1996. First results from joint EMBRAPA–CIRAD *Ananas* germplasm collecting in Brazil and French Guyana. Acta Hort. 160-172.
32. Duval, M.F.; Noyer, J.; Perrier, X.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Hamon, P. 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 102: 83-90.
33. Elazreg, H.; Ghariani, S.; Chtourou-Ghorbel, N.; Chakroun, M. 2011. SSRs transferability and genetic diversity of Tunisian *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. Biochem. Syst. Ecol. 39: 79-87.
34. Engelmann, F. 2010. "Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1,3): 5-16, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.

35. Escalona, M; Lorenzo, J.C; González, B; Daquinta, M; González, J.L y C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) micropropagation in Temporary Immersion Systems. Pineapple News. 6: 18.
36. Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. ARLEQUÍN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf.* Online 1: 47-50.
37. FAO. 1996. Global plan of action for the conservation and sustainable utilization of plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma.
38. FAO. 2008. *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*. edit. Food & Agriculture Organization, 208 p., ISBN 978-92-5-105480-2.
39. FAO. 2011. Ahorrar para crecer. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Rome, Italy. 102pp. Disponible en: <http://www.fao.org/aq/agp>. (Consultado: 10 septiembre 2013).
40. Fernández, L.; Crossa, J.; Fundora, Z.; Gálvez, G.; Acuña, G.; Guevara, C. 2011. Presencia de la variabilidad *ex situ* e *in situ* en el germoplasma cubano de maíz (*Zea mays* L.). Importancia de la complementación de ambos enfoques de conservación. *Cultivos Tropicales* 32(4): 21-34.
41. Ferreira, F.; Cabral, J. 1993. Pineapple germplasm in Brasil. *Acta Hort.* 334: 23-26.
42. Fournier, P.; Soler, A.; Marie-Alphonsine, P.A. 2007. Growth Characteristics of the Pineapple Cultivars 'MD2' and 'Flhoran 41' Compared With 'Smooth Cayenne'. *Pineapple News* 14: 18-20.
43. Fowler, C.; Hodgkin, T. 2004. Plant genetic resources for food and agriculture: Assessing global availability. *Ann. Rev. Environ. Res.* 29: 143-79.
44. Franco, J.; Crossa, J.; Taba, S.; Shands, H. 2005. A sampling strategy for conserving diversity when forming core subsets. *Crop. Sci.* 45: 1035-1044.
45. Franco, J.; Crossa, J.; Warburton, M.; Taba, S. 2006. Diversity When Forming Core Subsets Using Genetic Markers *Crop Sci* 46: 854-864.
46. Fundora, Z.; Rodríguez, A.; Torres, M.A.; Castiñeiras, L.; Barrios, O.; Shagarodsky, T.; Cristóbal, R.; Puldón, V.; Alonso, Y.; Pérez, M. F. 2006. Establecimiento de colecciones "núcleo" en especies de hortalizas, granos básicos y oleaginosas. Informe Final. Proyecto Programa Nacional Científico-Técnico de Mejoramiento Vegetal y Recursos Fitogenéticos. PNCT: 01500072. La Habana, Cuba, 122-148.
47. Fundora, Z.; Vera, R.; Yaber, E.; Barrios, O. 1992. La estadística multivariada en la sanidad vegetal. Instituto de Sanidad Vegetal. MINAGRI. Ciudad de La Habana, 47pp.
48. Galindo, L.; Acosta, E.; Peña, P. y Barranco, A. 2004. Informe final Proyecto Alternativas en la fase de aclimatización. CULT.
49. García, A.; Rodríguez, T.; Héctor, E. y M. Núñez. 2005. Efecto del análogo de brasinoesteroide MH-5 en el crecimiento *in vitro* del arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de déficit hídrico. *Cultivos Tropicales* 26 (1): 89-93.
50. González, A. M. T. y Engelmann, F. 2013. *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. edit. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, C.R., 204 p., ISBN 978-92-9248-446-0.
51. González, L. M. y Ramírez, R. 1999. Respiración, relaciones hídricas y concentración de pigmentos en plántulas de arroz cultivadas en condiciones salinas. *Cultivos Tropicales* 20. (1): 35-37.
52. González, O; A. Falcón; M. Hernández; R. Iglesias; JJ. Silvia; M. López, JE, Rodríguez; L. Arias; JC. Cabrera y E. Oliva. 2004. Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de boniato clon CEMSA 78- 354. *Biotecnología Vegetal* 4, (2):115-119.
53. González, S. y E. Gainza. 1997. Efecto del brasinosteroide sintético DAA-6 sobre el desarrollo "*in vitro*" de brotes de caña de azúcar. *Revista Biología* 11: 53-60.

54. González, S.; Álvarez, Y.; Garbey, P. y Cabrera; J.C. 2002a. Eventos morfogénéticos y enzimáticos asociados a la actividad biológica de la oligosacarina HM. *Revista Jardín Botánico Nacional* 23(1):137-146.
55. González, S.; Cabrera, J. C.; Nato, A. 2002b. Efecto del Pectimorf sobre la morfogénesis *in vitro* en tabaco. Resúmenes. Simposio Subregional "Biodiversidad, Biotecnología y Bioseguridad: Un enfoque hacia mesoamérica y el caribe". [en línea] julio 2002. Costa Rica. Disponible en: <http://www.catie.ac.cr/posgrado/cursos/Biodiversidad/ponencia20.htm>
56. González, S.; Garbey, P.; Alvarez, Y.; Benítez, D.; Cabrera, J.C. 2000. Actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar tratados con un oligopectato. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 21: (1): 89-93.
57. González, S.; Karin, A. G.; Cabrera, J. C y Haicour, R. 2002c. Empleo del Pectimorf sobre la morfogénesis *in vitro* en Plátano. Resúmenes. Simposio Subregional "Biodiversidad, Biotecnología y Bioseguridad: Un enfoque hacia mesoamérica y el caribe". [en línea] julio 2002. Costa Rica. Disponible en: <http://www.Simposio%20Biodiversidad,%20Biotecnología%20Bioseguridad.htm>
58. Gonzalez-Arnan, M. T.; Marquez, R. M.; Villavicencio, C. U.; Martinez, M. M. E. y Engelmann, F. 2000. "Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification" [en línea]. En: eds. Engelmann F. y Takagi H., *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*, (ser. JIRCAS International Agriculture Series, no. ser. 8), edit. IPGRI, Rome, pp. 390-392, ISBN 978-92-9043-428-3, Centre IRD de Bondy, [Consultado: 1 de febrero de 2016], Disponible en: <<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010023396>>.
59. Gutiérrez, M.; Rincón, C. 2011. Characterization of genetic variability using RAPDs markers, in a group of native and commercial genotypes of bean in Venezuela. *Agron. Trop.* 61(1): 73-83.
60. Guzmán, F.A. 2005. Protocolo de los AFLP. Laboratorio de la Unidad de Biotecnología del CIAT, Colombia, 35-40
61. Hammer, O.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1): 9.
62. Hepton, A. 2002. Culture System. p. 109-142. In: *The pineapple: botany, production and uses* (D. P. Bartholomew, R. Paull and K. G. Rohrbach, eds.). CABI Publishing, Wallingford.
63. Hernández, R. M. 2003. Estudio del efecto de Biorreguladores cubanos sobre embriogénesis somática y la variabilidad genética en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*. Hort ex. Tan.) Tesis presentada en opción al grado de maestría. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 120pp.
64. Herrera, J.A. 1974. Study of phosphorus application methods in pineapples. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Nitra, Checoslovaquia, 151pp.
65. Hidrobo, J. 2002. Caracterización morfo-histológica y bioquímica del proceso de Embriogénesis Somática en Papa (*Solanum tuberosum*). Utilización de biopreparados cubanos de producción comercial. Tesis. Universidad Agraria de La Habana. 65p
66. Hoogendijk, M.; Williams, D. 2002. Characterization the genetic diversity of home garden crops: some examples from the Americas. En: Watson, J.W. y Eyzaguirre, P.B. (eds.). *Home gardens and in situ conservation of plant genetic resources in farming systems*. Proceedings of the Second International Home Gardens Workshop, 17-19 July 2001, Witzenhausen, Federal Republic of Germany. ISBN 92-9043-517-8: 34-40.
67. Hormaza, J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using Simple Sequence Repeat. *Theor. Appl. Genet.* 104: 321-328.



68. IBPGR.1991. Descriptors for pineapple. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy, 40pp.
69. Izquierdo, H.; Cabrera, J.C.; Capote, J. y Pedroso, D. 1996. Estudio preliminar sobre la influencia de un oligopectato en la multiplicación *in vitro* del ajo (*Allium sativum*) En: Seminario Científico (10: 1996) La Habana. INCA, p. 138.
70. Izquierdo, H; Núñez, M; Quiñones, Y; Disotuar, R; Pedroso, P; Cabrera. J. C. 2002. Biobras-6 y Pectimorf, dos nuevos biorreguladores cubanos del crecimiento vegetal. Su influencia en la micropropagación y rendimiento de *Allium sativum* L.'. Abstracts of the 48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticultura Octubre 7-11, Tegucigalpa, Honduras.
71. Kaczmarczyk, A.; Menon, A.; Al-Hanbali, A.; Funnekotter, B.; Bunn, E.; Phang, P. Y. y Mancera, R. L. 2012. *Current Issues in Plant Cryopreservation*. edit. INTECH Open Access Publisher, ISBN 978-953-51-0191-8.
72. Kato, C.; Nagai, C.; Moore, P.; Zee, F.; Kim, M.; Steiger, D.; Ming, R. 2004. Intra-specific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) assessed by AFLP markers. Genet. Res. Crop Evol. 51(8): 815- 825.
73. Kinjo, K. 1993. Inheritance of leaf margin spine in pineapple. Acta Horticulturae 334: 59-66.
74. Kinsuat, M.; Kumar, V. 2007. Polymorphic microsatellite and cyptic simple repeat sequence markers in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). Mol. Ecol. Not. 7(6): 1032-1035.
75. Kumar, S.V.; Ong, W.D.; Yew, C.W.; Yusuf, N.H.M. 2003. Development of expressed sequence tags for gene discovery, mapping and distribution during fruit ripening in pineapples. Acta Hort. 430: 127-132.
76. Leal, F. 1990. Complemento a la clave para la identificación de las variedades comerciales de piña *Ananas comosus* L. Merrill. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 16(1): 1-11.
77. Leal, F.; Antoni, M.G. 1981. Descripción y clave de las variedades de piña cultivadas en Venezuela. Rev. Fac. Agron. (Maracay), Alcance 29:51-79.
78. Leal, F.; García, M.; Cabot, M. 1986. Prospección y recolección de *Ananas* y sus congéneres en Venezuela. Plant Genet. Resour. Newsl 66: 16-19.
79. Lobo, M.; Medina, C.I. 2009. Conservación de recursos genéticos de la agrobiodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria 10(1): 33-42.
80. Londoño, G. C; Lavalett, L.; Galindo, P.; Afanador, L. 2007. Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 60(1): 3671-3690.
81. Manrique, A.; Cruzalegui, G. 2006. CONAPO: concertación para la agricultura orgánica en el Perú. Revista de Agroecología. LEISA 21(4): 21-23.
82. Markov, A.A. 1971. Extension of the limit theorems of probability theory to a sum of variables connected in a chain. Dynamic Probabilistic Systems. Markov Chains. John Wiley and Sons..
83. Martín, C.; Herrero, M.; Hormaza, J.I. 201. Molecular Characterization of Apricot Germplasm from an Old Stone Collection. PLoS ONE 6(8): e23979. doi:10.1371/journal.pone.0023979.
84. Matsumoto, T.; Yamamoto, S.; Fukui, K.; Rafique, T.; Engelmann, F. y Niino, T. 2015. Cryopreservation of Persimmon Shoot Tips from Dormant Buds Using the D Cryo-plate Technique. *The Horticulture Journal*, vol. Advance Publication, ISSN 2189-0110, 2189-0102, DOI 10.2503/hortj.MI-043.
85. Mederos, E. 1988. Fruticultura Tropical. Ed. Pueblo y Educación, 123 p.

86. Mirabal, A. 2006. La capacitación de los actores locales y el desarrollo local. En: Guzón, A. Desarrollo local en Cuba: Retos y perspectivas. La Habana, Editorial Academia.
87. Montes, E. 2008. Propagación clonal *in vitro* de hijos de la corona de piña de azucarón (*Ananas comosus*). Revista Virtual de la Universidad Católica de Occidente Santa Ana, El Salvador, 46pp. Disponible en: <http://www.catolica.edu.sv/investiga/frames/revista42008/coronopina.pdf>. (Consulta: 20 Febrero de 2012).
88. Montes, S; López, M; Morales, C y Bell, E. 2002. Morfogénesis y regeneración del *Anthurium cubense* y del helecho *Nephrolepis exaltata* var. Teddy Junior mediante el uso del Pectimorf, nuevo biorregulador del crecimiento. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba. Abstracts of the 48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Octubre 7-11. Tegucigalpa, Honduras.
89. Montinola, L.R. 1991. Piña. Amon Foundation, Manila, Filipinas, 232pp.
90. Moré, H. O y Gonzáles, M. E. 2001. Empleo del oligopeptato Pectimorf sobre el desarrollo de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum*, L.). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana, Cuba. [en línea]. 2004. Disponible en: <http://www.redepapa.org/index.html>.
91. Morton, J. 1987. Pineapple. En: Morton, J. Fruits of warm climates. Miami, USA, 18-28.
92. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A resived medium for rspid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473:497.
93. Navarro, J.M.; Casas, G.M.; González, E. 2010. Principal component and regression analysis for categorical data. Application to arterial hypertension. *Revista de Matemática: Teoría y Aplicaciones* 17(2): 205–235.
94. Nei, M. y Li, W. 1979. Mathematical-model fir studying genetic-variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269-5273.
95. Noyer, J.; Launad, G.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Duval, M.F. 1997. RFLP study on rDNA in *Ananas* genus. *Acta Hort.* 425: 153-160.
96. Núñez, C. A.; Rodríguez, J. E.; Nieto, R.; Barrientos, A. F. 2004. Construcción de dendrogramas de taxonomía numérica mediante el coeficiente de distancia  $\chi^2$ : una revisión. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10(2): 229-237.
97. Núñez, C.A.; Escobedo, D. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana* 22(2):415-427.
98. Núñez, M. 2002. Influencia de la aplicación del Pectimorf en algunos indicadores del crecimiento de las plantas jóvenes de tomate variedad Amalia. Programa y resúmenes XII Seminario científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. p. 63-72.
99. Núñez, M. Reseña bibliográfica. 1999. Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Cultivos Tropicales*. vol. 20, (3): 63-72.
100. Núñez, M. V. 1996. Los brasinoesteroides y su actividad biológica. La Habana: INCA. p. 35.
101. Núñez, M. V. 1997. Los Brasinoesteroides y su relación con la tolerancia de las plantas a los estreses ambientales. Conferencia. Taller Abiotic-97. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 25-26 de sept.
102. Núñez, M. y C. Robaina. 2000. Brasinoesteroides. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal en amplias perspectivas para la agricultura. IAC. Campiñas. 83p.
103. Núñez, M. y L. M. Mazorra. 2001. Los Brasinoesteroides y la respuesta de las plantas al estrés. *Cultivos Tropicales*. 22 (3): 19-26.
104. Núñez, M.; Mazorra, L.M.; Martínez, L.; Robaina, C. 2006a. Los análogos de brasinoesteroides revierten parcialmente el impacto del estrés salino en el

- crecimiento de las plántulas de dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). XV Congreso Científico del INCA. (nov. 7-10.). ISBN 959-7023-36-9.
105. Núñez, M.; López, V; Rodríguez, H.; Ricardo, S.; Coll, F. 2006b. Evaluación de los productos bioactivos BB-16 y MI-1 del grupo de Brasinoesteroides en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), en la CPA "17 de mayo" de Velesco, Gibara, Holguín. XV Congreso Científico del INCA. (nov. 7-10.) ISBN 959-7023-36-9.
  106. Núñez, M.; Torres, W. y F Coll. 1995 Efectividad de un análogo de brasinoesteroides sobre el rendimiento de plantas de papa y tomate. Cultivos Tropicales. vol 16(1):26-27.
  107. Núñez, M.; Torres, W.; Echevarría, I. 1996. Influencia de un análogo de brasinoesteroides en el crecimiento y la actividad metabólica de las plantas jóvenes de tomate. Cultivos Tropicales 17(3):p. 26-30.
  108. Núñez, M; Siquiera, W.J; Hernández, M; Zullo, M:A.T; Robaina, C y F. Coll. 2004. Efecto del Biobras - 6 y el MH-5 en la inducción de callos y brotes en la lechuga (*Lactuca sativa* L.).Cultivos Tropicales. vol. 25(4): 5-8.
  109. Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genet. Mol. Biol. 29: 294-307.
  110. Orellana, A.; Guerra, R.; Dávila, J.A. 2004. Sondeo agrosocioeconómico y recolección de cultivares de muta (*Bromelia* sp.) en el oriente de Guatemala. Revista de Agroecología. LEISA 21(4): 11-15.
  111. Ortiz, C., de la Fé, C. y Lara, D. 1998. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. I. Sustrato más eficiente para la adaptación de plantas *in vitro*. Cultivos tropicales, 19 (2): 45-49.
  112. Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Mol. Ecol. 4: 347-354.
  113. Panis, B. 2008. Cryopreservation of Monocots [en línea]. En: ed. Reed B. M., *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, edit. Springer New York, pp. 241-280, ISBN 978-0-387-72275-7, DOI: 10.1007/978-0-387-72276-4\_11, [Consultado: 1 de febrero de 2016], Disponible en: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72276-4\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72276-4_11).
  114. Pérez, E. 2008. Caracterización de germoplasma de judía y localización de caracteres cuantitativos en el mapa genético de la especie. Tesis Doctoral. León, España, 132pp.
  115. Pérez, G. 2003. Obtención de nuevos genotipos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) a partir de la variación somaclonal. Tesis presentada en opción al grado académico de Master en Ciencias. Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, 60 pp.
  116. Pérez, M.G. 1990. Investigación-Acción aplicaciones al campo social y educativo. Editorial Dykinson, 279pp.
  117. Pérez, P.J. 1998. Propagación y mejora Genética de plantas por Biotecnología. p. 151-178.
  118. Pinzón, F. E. 2004. Influencia del Oligopeptato Pectimorf y el análogo de Brasinoesteroides Biobrás-6 en la propagación *in vitro* del clon de banano FHIA-18 (*Musa* sp. AAAB). Trabajo de Diploma (en opción al título de Ingeniero Agrónomo). Universidad Agraria de La Habana. Cuba. 72 pp.
  119. Preece, J. E. y Sutter, G. E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. Micropropagations technology and application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 571.
  120. Py, C. 1969. La Piña. Edición Revolucionaria. Instituto del Libro. La Habana. 267 p.
  121. Py, C.; Lacoëuilhe, J.; Teisson, C. 1987. The pineapple: Cultivation and Uses. G.P. Maisonneuve et Larose, París, 568pp
  122. Ramírez, A.; Cruz, N.; Franchialfaro, O. 2002. Uso de bioestimuladores en la reproducción de guayaba (*Psidium guajaba* L.) mediante el enraizamiento de

- esquejes. Abstracts of the 48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticultura. Octubre 7-11, Tegucigalpa, Honduras.
123. Raven, P. y Havens, K. 2014. *Ex Situ* Plant Conservation and Cryopreservation: Breakthroughs in Tropical Plant Conservation. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1): 1-2, ISSN 1058-5893, DOI 10.1086/674030.
  124. Rodríguez, D.; Díaz, A.; Ruiz, L.; Ramis, C.; Páez, M. 2007. Genetic characterization of the pineapples collection of the National Center of Conservation of the Genetic Resources, Venezuela. *Rev. Fav. Agron.* 24 Supl. 1: 20-26.
  125. Rodríguez, N.N.; Fermín, G.A.; Valdés-Infante, J.; Velásquez, B.; Rivero, D.; Martínez, F.; Rodríguez, J.; Rohde, W. 2010. Illustrated descriptors for guava (*Psidium guajava* L.). Proceedings of the Second International Guava Symposium, Mexico, *Acta Hort.* 849: 103-113.
  126. Rohlf, F. J. 2001. NTSYS-PC, numerical taxonomy and multivariate análisis system. Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York. Disponible en: <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc.html>. (Consultado: 30 junio de 2010).
  127. Ronning, C.M.; Schnell, R.J.; Gazit, S. 1995. Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers to Identify *Annona* Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(5): 726-729.
  128. Roque, A. 2005. Obtención de posturas de Papaya (*Carica papaya* L.) cv. Maradol Rojo por cultivo *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas). Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 100p.
  129. Ruas, C.; Ruas, P.; Cabral, J. 2001. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers. *Euphytica* 119(3): 245-252.
  130. Sandoval, E.N.; Flores, M.; Martínez, A. 2004. Bromelias útiles de México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 49: 100-115.
  131. Santos, A. H.; Díaz, F.; Lautín, I. 2011. La Investigación Acción Participativa: posibilidades de aplicación en el contexto actual de Cuba. *Revista Electrónica. Luz*, Año 10(2): 20-23.
  132. Santos, J.R.; Ferreira, F.R. 1999. Characterization and Evaluation of Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) Germplasm. *Pineapple News* 6: 17.
  133. Santos, J.R.; Matos, A.; 211. Reinhardt, A. 2003. 'Imperial' a New Pineapple Variety from EMBRAPA. *Pineapple News* 10: 6.
  134. Santos, M.D.; Buso, G.C.; 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.
  135. Shagarodsky, T. ; Castineiras, L.; Barrios, O.; León, N; Fernández, L.; Fundora, Z.; Moreno, V.; García, M.; Giraudy, C.; González, V.; Fernández, F.; Cristóbal, R. 2009. Ferias de agrobiodiversidad en dos Reservas de la Biosfera de Cuba. VII Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Palacio de las Convenciones. 6-10/Julio/2009. ISBN: 978-959-304-003-7. La Habana, Cuba.
  136. Shoda, M.; Urasaki, N.; Sakiyama, S.; Terakami, S.; Hosaka, F.; Shigeta, N.; Nishitani, C.; Yamamoto, T. 2012. DNA profiling of pineapple cultivars in Japan discriminated by SSR markers. *Breeding Science* 62: 352-359.
  137. Souza, E.H.; Souza, F.V.D.; Carvalho, M.A.P.; Costa, D.S.; Santos-Serejo, J.A.; Amorim, E.P.; Silva, C.A. 2012. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 59: 1357-1376.
  138. SPSS. 2002. *Tablas™* 11.5, ISBN 1-56827-923-X.
  139. Sripaoraya, S.; Blackhall, N.; Marchant, R.; Power, J.; Lowe, K.; Davey, M. 2001. Relationships in pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Breed.* 120(3): 265-267.

140. Statgraphics Plus. 2002. Version 5.1. Paquete estadístico.
141. Steve, R.; Helen J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds.). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Mol. Biol. Hum. Press, Totowa, 365-386. Tapia *et al.* (2005b)
142. Suárez, L. y González. 2004. Evaluación de estadios tempranos de un grupo de mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones salinas, utilizando marcadores morfoagronómicos. Cultivos Tropicales, 25 (1): 27-35.
143. Takagi, H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. En: *Proceedings of an international workshop*, edit. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Tsukuba, Japan, pp. 178-193, ISBN 92-9043-428-7, CABDirect2, JIRCAS International Agriculture Series No.8.
144. Tapia, E.; Gutiérrez, A.; Guillén, H.; Warbourton, M.; Uriza, D.; Rebolledo, A. 2005. Characterization of Pineapple Germplasm (*Ananas* spp.) by mean AFLPs. Acta Hort. 666: 109-111.
145. Turner, S. R.; Senaratna, T.; Bunn, E.; Tan, B.; Dixon, K. W. y Touchell, D. H. 2001. Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany*, 87(3): 371-378, ISSN 1095-8290, 0305-7364.
146. Valdés-Infante, J.; Rodríguez, N.; Becker, D.; Velasquez, B.; Sourd, D.; Espinosa, G.; Ritter, E.; Risterucci, A.; Billote, N.; Rohde, W. 2007. Microsatellites characterization of guava (*Psidium guajava* L.) Germoplasm collection in Cuba. J. Genet. Breed. 58: 70-90.
147. Valdés-Infante, J.; Rodríguez, N.N.; Bautista, M.; Ortiz, M.M.; Quiroz, A.; Sánchez, L.F.; Risterucci, A.M.; Rohde, W. 2009. Amplificación cruzada de secuencias simples repetidas de guayabo (*Psidium guajava* L.) en otros representantes de Myrtaceae. Revista CITRIFRUT. 26(1):15-21.
148. van de Peer, Y.; De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comp. Appl. Biosci. 10: 569-570.
149. Wagner, H.W.; Sefc, K.M. 1999. IDENTITY 1.0. Institute for General Physics, TU Vienna, Centre for Applied Genetics. BOKU, Vienna.
150. Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugenics 15: 323-354.
151. Wunsch, A.; Hormaza J.I. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica 125: 59-67.
152. Yanes, E.; Gil, K.; Rebolledo, L.; Rebolledo, A.; Uriza, D.; Martínez, O.; Isidró, M.; Simpson, J. (2005). AFLP characterization of the Mexican pineapple germplasm collection. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130: 575-579.
153. Yeh, F.; Young, R.; Timothy, B.; Boyle, T.; Ye, Z.; Mao, J. 1997. POPGENE, The User-Friendly Shareware for population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta, Canada.
154. Zain, S.M.; Shafie, M.; Shafie; Shah, R.M. 2009. Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaris* (Wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia. World Appl. Sci. J. 6 (7): 976-986.
155. Zar, J. H. 1999. biostatistical Analysis, 4<sup>ta</sup> edición. Prentice Hall, Nueva Jersey, 601pp.

## VII. ANEXOS

**Anexo 1.** Formulario de evaluación con los principales datos pasaporte, botánicos, geográficos, edafológicos de las accesiones recolectadas.

### ESTADO DE LA COLECCIÓN

COLECTA No. \_\_\_\_\_ SILVESTRE \_\_\_\_\_ PATIO OJARDÍN  
FECHA: \_\_\_\_\_ FINCA \_\_\_\_\_ INSTITUCIÓN  
ESPECIE: \_\_\_\_\_ ÁREA CUL. \_\_\_\_\_ MERCADO  
NOMBRE LOCAL: \_\_\_\_\_ MALEZA \_\_\_\_\_ MATERIAL MEJORADO  
\_\_\_\_\_ CERCA \_\_\_\_\_ OTRO

COLECTOR: \_\_\_\_\_ **PROPÁGULOS COLECTADOS:** \_\_\_\_\_  
UBICACIÓN: \_\_\_\_\_ PLANTA (1) \_\_\_\_\_ HIJO BASAL (2) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ HAPPA (3) \_\_\_\_\_ CRIOLLO (4) \_\_\_\_\_  
MUNICIPIO: \_\_\_\_\_ CLAVEL (5) \_\_\_\_\_ CORONA (6) \_\_\_\_\_  
PROVINCIA: \_\_\_\_\_  
NOMBRE DEL DONANTE: \_\_\_\_\_

### DATOS BOTÁNICOS

PLANTA: \_\_\_\_\_  
ALTURA: \_\_\_\_\_ DIÁMETRO: \_\_\_\_\_  
LATITUD: \_\_\_\_\_ LONGITUD: \_\_\_\_\_ HOJA D: LARGO \_\_\_\_\_ ANCHO: \_\_\_\_\_  
ALTURA msnm: \_\_\_\_\_ COLOR <sup>1</sup> HOJA ADULTA: \_\_\_\_\_  
ESPINOSIDAD<sup>2</sup>: \_\_\_\_\_  
TIPOS DE HIJOS: \_\_\_\_\_

### TOPOGRAFÍA: FRUTO:

PANTANO \_\_\_\_\_ COLINA \_\_\_\_\_ FORMA<sup>3</sup> \_\_\_\_\_ COLOR<sup>4</sup> \_\_\_\_\_  
LLANURA \_\_\_\_\_ ONDULADO \_\_\_\_\_ SABOR \_\_\_\_\_ LARGO \_\_\_\_\_  
OTRO \_\_\_\_\_  
**ÍNDICE DE CILINDRICIDAD** \_\_\_\_\_

- Diam superior \_\_\_\_\_
- Diam. Inferior \_\_\_\_\_

### PEDREGOSIDAD: NÚMERO DE ESPIRALES LARGAS \_\_\_\_\_

NULA \_\_\_\_\_ BAJA \_\_\_\_\_ PRESENCIA DE SEMILLAS \_\_\_\_\_  
MEDIA \_\_\_\_\_ ALTA \_\_\_\_\_

### TEXTURA DEL SUELOOJOS

ARENOSO \_\_\_\_\_ FRANCO \_\_\_\_\_ FORMA \_\_\_\_\_ PERFIL \_\_\_\_\_  
ARCILLOSO \_\_\_\_\_ ORGÁNICO \_\_\_\_\_ ORIENTACIÓN DE LOS OJOS \_\_\_\_\_  
OJOS EN LA ESP. + LARGA \_\_\_\_\_

### DRENAJECORONA

POBRE \_\_\_\_\_ MODERADO \_\_\_\_\_ ÚNICA \_\_\_\_\_ DOBLE \_\_\_\_\_ FASIADA \_\_\_\_\_  
BUENO \_\_\_\_\_ EXCESIVO \_\_\_\_\_ LONGITUD \_\_\_\_\_  
RELACIÓN CORONA/FRUTO \_\_\_\_\_  
FOTOGRAFIADO \_\_\_\_\_

### **OBSERVACIONES:**

<sup>1</sup>**Color de hojas:** 1-Verde intenso; 2-V. claro; 3-V. con tintes rojos; 4-V. morado; 5-V. gris; 6-V. olivo; 6-V. intenso con tinte rojizo; 9-V. intenso c/manchas rojas; 10-V. azul intenso; 11-Rojo verdoso; 12-Morado rojizo; 13-Morado verde; 14-Marrón.

<sup>2</sup>**Espinosidad:** 1-Piping; 2-Cayena; 3-Irregular; 4-Regular.

<sup>3</sup>**Forma del Fruto:** 1-Cilíndrico; 2-Barril; 3-Pirámide; 4-Bloque.

<sup>4</sup>**Color fruto:** 1-Verde intenso; 2-V. amarillo; 3-Amarillo intenso; 4-Amarillo; 5-Amarillo naranja; 6-Naranja rojizo; 7-Naranja intenso; 8-Naranja; 9-Rojo; 10-Rojo a morado; 11-Morado; 12-Morado vino tinto.



**Anexo 2.** Cebadores RAPDs utilizados para la amplificación de los genotipos de piña.

Iniciador	Secuencia (5'- 3')	Iniciador	Secuencia (5'- 3')	Iniciador	Secuencia (5'- 3')
OPA – 01	CAGGCCCTTC	OPC – 01	TTCGAGCCAG	OPH – 12	ACGCGCATGT
OPA – 02	TGCCGAGCTG	OPC – 02	GTGAGGCGTC	OPH – 13	GACGCCACAC
OPA – 03	AGTCAGCCAC	OPC – 03	GGGGGTCTTT	OPH – 14	ACCAGGTTGG
OPA – 04	AATCGGGCTG	OPC – 04	CCGCATCTAC	OPH – 15	AATGGCGCAG
OPA – 05	AGGGGTCTTG	OPC – 05	GATGACCGCC	OPH – 16	TCTCAGCTGG
OPA – 06	GGTCCCTGAC	OPC – 06	GAACGGACTC	OPH – 17	CACTCTCCTC
OPA – 07	GAAACGGGTG	OPC – 07	GTCCCCGACGA	OPH – 18	GAATCGGCCA
OPA – 08	GTGACGTAGG	OPC – 08	TGGACCGGTG	OPH – 19	CTGACCAGCC
OPA – 09	GGGTAACGCC	OPC – 09	CTCACCCTCC	OPH – 20	GGGAGACATC
OPA – 10	GTGATCGCAG	OPC – 10	TGTCTGGGTG	CS – 12	GCGACGCCTA
OPA – 11	CAATCGCCGT	OPC – 11	AAAGCTGCGG	CS – 14	GTCACCCGGA
OPA – 12	TCGGCGATAG	OPC – 12	TGTCATCCCC	CS – 15	AACACATGCC
OPA – 13	CAGCACCCAC	OPC – 13	AAGCCTCGTC	CS – 16	CGTTGGATGC
OPA – 14	TCTGTGCTGG	OPC – 14	TGCGTGCTTG	CS – 19	TACGCTGGC
OPA – 15	TTCCGAACCC	OPC – 15	GACGGATCAG	CS – 22	CGTCGTGGAA
OPA – 16	AGCCAGCGAA	OPC – 16	CACACTCCAG	CS – 24	GCGGCATTGT
OPA – 17	GACCGCTTGT	OPC – 17	TTCCCCCAG	CS – 27	AGTGGTCGCG
OPA – 18	AGGTGACCGT	OPC – 18	TGAGTGGGTG	CS – 29	CCAGACAAGC
OPA – 19	CAAACGTCGG	OPC – 19	GTTGCCAGCC	CS – 30	GCGTAGAGAC
OPA – 20	GTTGCGATCC	OPC – 20	ACTTCGCCAC	CS – 31	CTCGACACTG
OPD – 02	GGACCCAACC	OPH – 01	GGTCGGAGAA	CS – 36	GATAGCCGAC
OPD – 03	GTCGCCGTCA	OPH – 02	TCGGACGTGA	CS – 42	CCCAGAACAC
OPD – 07	TTGGCACGGG	OPH – 03	AGACGTCCAC	CS – 43	CGTACGCGTT
OPD – 08	GTGTGCCCCA	OPH – 04	GGAAGTCGCC	OPF – 06	GGGAATTCCG
OPD – 13	GGGGTGACGA	OPH – 05	AGTCGTCCCC	OPF – 12	ACGGTACCAG
OPL – 05	ACGCAGGCAC	OPH – 06	ACGCATCGCA	OPF – 13	GGCTGCAGAA
OPL – 07	AGGCGGGAAC	OPH – 07	CTGCATCGTG	OPF – 15	CCAGTACTCC
OPL – 08	AGCAGGTGGA	OPH – 08	GAAACACCCC	OPF – 16	GGAGTACTGG
OPL – 10	TGGGAGATGG	OPH – 09	TGTAGCTGGG	OPF – 20	GGTCTAGAGG
OPL – 12	GGGCGGTACT	OPH – 10	CCTACGTCAG	OPK – 04	CCGCCCAAAC
OPJ – 04	CCGAACACGG	OPH – 11	CTTCCGCAGT	OPK – 12	TGGCCCTCAC

**Anexo 3.** Microsatélites modificados y correctos del artículo y desarrollados a partir de *A. bracteatus* para la identificación de genotipos de piña.

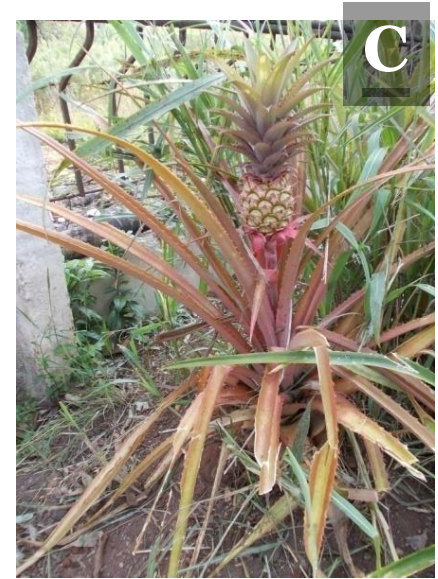
Locus	Motivo Repetido	Secuencia (5'-3')	No. Banco de genes
ACLR179BMa	(GTA) <sub>4</sub>	F: CCTTTGTTTTGTACTTTTTAT R: CCAGTTATTTTAGTAAAGTCC	DQ019851
ACLR179BMb	(TAA) <sub>4</sub>	F: GGACTTTACTAAAAATAACTGG R: ATACTAACACACCTCTTTCAC	DQ019851
ACPCT124BM	(CCT) <sub>8</sub>	F: GTAGCAACAGCTATGAAAAC R: GATACAACGACAAGTACTACG	DQ356280
ACPCT138AM	(CTT) <sub>4</sub> (CG) <sub>3</sub> (AAG) <sub>3</sub>	F: GACGAGGACCGTACTCACGA R: ATGGCATGATCTCGTCCACT	DQ356284
ACPCT651BM	(GAA) <sub>13</sub>	F: GATACATAACAGTGTATTGGAG R: TAACTACTCTATGTTGTGACCA	DQ381768
ACPCT136B	(GAC) <sub>7</sub>	F: GGGTCCGAGTGGAGAGATTG R: TCGTGCAAGTGTTCGCTTAG	DQ356283
ACLR749	(AG) <sub>2</sub> (GA) <sub>2</sub> (G) <sub>2</sub>	F: TTGAGAGCCAGAGGGTTTTG R: ACGGTCCGATGTAATAATTCG	AY551306
ANBR34	(CT) <sub>30</sub>	F: TTAATCAAGTTCCTTAAAGGTT R: GAGAGAACTAGACTGAAAGAAA	AJ845034
ANBR36	(CT) <sub>14</sub>	F: TACTTCTTTGTGCATGTTAT R: AGTGGACATTTTACATAGTTTT	AJ845036
ANBR48	(GA) <sub>19</sub>	F: ACAATAATTGATACAGTCCAGT R: AAGTTGTGTAGAGAACAAATTAC	AJ845048
ANBR58	(CT) <sub>21</sub> (CA) <sub>21</sub>	F: ATATGATAGGACTTACTTTTGG R: AAGGCTACAGATAGTTAAAGAG	AJ845058
ANBR60	(GA) <sub>17</sub>	F: TGTAGACGCCTTATATATTGTA R: CACTATTATCCTAACCAGACAT	AJ845060
ANBR72	(GA) <sub>27</sub>	F: TGCACCTTCTTACTTCTATAAT R: ACAACTAGCAAAACTTTGTATC	AJ845072
ANBR73	(CT) <sub>17</sub>	F: CATTAGATTAGTTCACAAACAA R: AGAATATTATGGAAAAATTGAG	AJ845073
ANBR75	(GA) <sub>30</sub>	F: ATGATCTCCTAAAAATCATAAG R: CTTAATTAGGGTTTTATTTGTC	AJ845075
ANBR80	(GA) <sub>8</sub>	F: GTTTAAGCAATAATTCCTAGAG R: TATAATCATGATGGAACATCTA	AJ845080
ANBR81	(CT) <sub>21</sub>	F: TTAATCAAGTTCCTTAAAGGTT R: CTAGTAAAGTCTCTTCCATTG	AJ845081

**Anexo 4.** Características morfológicas de la planta y del fruto de los diferentes grupos hortícolas de piña A) Cayena, B) Pernambuco y C) Española.





**Anexo 5.** Características morfológicas de la planta y del fruto de las especies alejadas de la familia *Bromeliaceae* A) *Cryptanthus acaulis*, B) Curujey (*T. fasciculata*), C) Branco (*A. bracteatus*), D) *B. pinguin* y E) *B. karatas*.



**AVALES**

Avales de conformidad de las <b>INSTITUCIONES PARTICIPANTES</b>	<b>5</b>
Avales <b>INTERNACIONALES</b>	<b>5</b>
Avales <b>PRODUCTIVOS</b> y de <b>PROSPECCIONES</b>	<b>19</b>
Avales de <b>INSTITUCIONES</b> y <b>PERSONALIDADES</b>	<b>9</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>15</b>
<b>LIBROS</b>	<b>4</b>
<b>TRABAJOS DE DIPLOMA</b>	<b>6</b>
<b>TESIS DE MAESTRÍA</b>	<b>5</b>
<b>TESIS DOCTORADO</b>	<b>1</b>
<b>PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS</b>	<b>6</b>





UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA  
"FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ"  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

Mayabeque, 13 de junio de 2017  
"Año 59 de la Revolución"

AVAL INSTITUCIONAL Y DEL CONSEJO CIENTÍFICO

El Consejo Científico de la Facultad de Agronomía de la UNAH, por medio de la presente AVALA el resultado "*Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [Ananas comosus (L.) Merrill] y especies afines*", de Los autores principales Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Fátima Isidró Pérez y Marcos Edel Martínez Montero, por poseer novedad científica e importancia práctica, por lo que reúne los requisitos para optar por el **PREMIO DE LA ACADECMIA DE CIENCIAS DE CUBA**. Para la adopción de esta decisión se consideraron los elementos siguientes:

La temática que aborda el trabajo es actual y novedosa, recogiendo los resultados de las prospecciones desarrolladas en las tres regiones de Cuba y el municipio especial con las que se pudo detectar el estado de los RFG de piña en el país y capacitar a los productores sobre el manejo fitotécnico del cultivo; la propuesta de acciones para minimizar la pérdida de diversidad detectada a través del cultivo *in vitro*, la crioconservación y otras acciones que han permitido recuperar el genoplasma y reintroducir en los productores diversidad genética con la entrega de híbridos y cultivares.

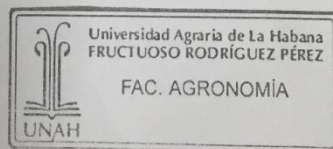
La caracterización morfológica y molecular de las accesiones de piña, permitió establecer un Listado de Descriptores Mínimos, para facilitar el trabajo de caracterización y una colección núcleo para una mejor preservación y manejo de la especie.

Se aporta el diseño de nuevos cebadores SSR que ya han sido utilizados por la comunidad científica internacional; el protocolo de multiplicación *in vitro* con la sustitución parcial de los reguladores del crecimiento por bioproductos de producción nacional y los requerimientos del cultivo en la fase de aclimatación; el protocolo para la crioconservación de ápices de piña y los cambios estructurales ocurridos a nivel histológico.

Los resultados que forman parte de esta investigación han contribuido a la formación graduada y posgraduada, ya que entre las salidas se presentan Trabajos de Diploma, Tesis de Maestría y una tesis Doctoral que fue Mejor Tesis de las Ciencias Agropecuarias del año 2015. Han sido publicados en revistas internacionales de impacto (7) como Crop Breeding and Applied Biotechnology, Scientia Horticulturae, Biocell, Cryoletters, Fitotecnia Mexicana, Agropalca y Pineapple News; y en las revistas nacionales (10) como Cultivos Tropicales y Agrotecnia de Cuba. Fue Premio CITMA Mayabeque y Premio MINAGRI.

Para que así conste firmamos la presente.

Dr. C. Tania Pérez Castro  
Decana y Presidenta del Consejo Científico  
Facultad de Agronomía  
UNAH



*Dr. C. Tania Pérez Castro Decana Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana*  
Teléfono: 47-860148 correo electrónico: [tania@unah.edu.cu](mailto:tania@unah.edu.cu)



Cuba, Ciego de Ávila, 5 septiembre de 2017

A: Quien pueda interesar

**ASUNTO: CERTIFICO**

Estimado(a) colega,

En este sentido, estamos de acuerdo que los Investigadores **Dr. Marcos Edel Martínez Montero** (como autores principales, 15%), y el **MSc. Emis Yanes Paz** (como otros autores, 8%) y la Especialista **MSc. Julia Martínez Rodríguez** (como colaboradores) participen en el resultado científico titulado: "Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines", el cual tiene la calidad requerida y fue concebido con un alto rigor científico.

Por lo que consideramos que este resultado reúne los requisitos para optar por el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba 2017.

Sin otro asunto que tratar me despido de Ud.

Atentamente,

Dra.C. Janet Quiñones Galvez  
Directora General.  
Centro de Biopantas.  
Universidad de Ciego de Ávila.  
CUBA

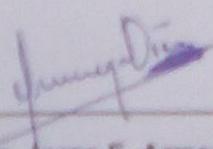


Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carta de conformidad:

Por la presente carta hago contar la conformidad de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Ciego de Ávila sobre la participación en conjunto con la Universidad Agraria de la Habana del profesor MSc. Ariel Villalobos Olivera con un 5 % en el premio nacional de la academia de Cuba Conservación del cultivo de la piña en Cuba.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge E. Armengol Díaz  
Decano de la Facultad de  
Ciencias Agropecuarias





Las Tunas, 28 agosto 2017

CERTIFICADO

Que la Dr. C. Lilia Esther Galindo Meréndez (E N): sobre el tema relacionado con la aclimatación de los híbridos de pino y la entrega a productores del híbrido. Es autor y coautor de las publicaciones y presentaciones en eventos. Ha dirigido Trabajos de Diploma y tesis de maestría relacionados con la temática y la MSc. Neus Pérez Fernández (E N): realizó las experimentos de la fase de aclimatación de la pila, le da continuidad a los híbridos entregados a los productores. Es autor y coautor de las publicaciones y presentaciones en eventos. Ha dirigido Trabajos de Diploma, ambos sobre los resultados científicos titulado: "Multiplicación de híbridos cubanos de pino (4 líneas comerciales (L. Meril)) en varias provincias del país. Fase introductorio y registro varietal", el cual tiene calidad requemado y alta rigor científico.

Por lo que consideramos que este resultado reúne los requisitos para optar por el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba 2017.

Para que así consta firmo la presente.

  
Dr. C. Tomás Villegas Barba, Secretario  
Vicepresidente Primero



1/016

Santiago de las Vegas, 6 de septiembre de 2017

"Año 59 de la Revolución"

CERTIFICO

Que la institución de acuerdo en que la DraC. Odalys Barrios Govín y la DraC. Zoila Margarita Fundora Mayor participen ambas en un 3% en el resultado científico titulado ***Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [Ananas comosus (L.) Merrill] y especies afines***, por considerar que tiene la calidad requerida y fue concebido con un alto rigor científico.

Este resultado, presentado por la Universidad Agraria de La Habana, reúne los requisitos para optar por el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba 2016.

Para que así conste firma la presente,



MSc. Yanisbell Sánchez Rodríguez  
Directora General INIFAT





# Avales INTERNACIONALES



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ESCUELA T.S. DE INGENIEROS AGRÓNOMOS Y DE MONTES  
EDIFICIO MENDEL, CAMPUS DE RABANALES  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
14080 CÓRDOBA. ESPAÑA

## A QUIEN CORRESPONDA:

Informe elaborado sobre el Proyecto titulado CONSERVACIÓN Y MANEJO DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS DE PIÑA [*Ananas comosus* (L.) Merrill] Y ESPECIES AFINES, teniendo a la Universidad Agraria de La Habana y Centro de Bioplasmas como entidad ejecutora principal y siendo sus autores principales Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Fátima Isidró Pérez y Marcos Edel Martínez Montero.

El proyecto presentado me ha parecido totalmente positivo desde todos los puntos de vista. Resalto, en primer lugar, su necesidad y su oportunidad. La primera por cuanto la piña es un cultivo de extraordinaria importancia en el mundo, con la peculiaridad de que su cultivo natural sólo es posible en zonas tropicales o subtropicales, y justamente Cuba está situada en un lugar idóneo para ello. En cuanto a la necesidad, los redactores del Proyecto indican claramente el empobrecimiento en la base genética de los tres grupos de cultivares existentes en la Isla, con claro predominio de uno en detrimento de los otros dos a pesar de su excelente calidad. Tal empobrecimiento, que no es privativo de la piña en Cuba sino que se detecta en numerosos cultivos en todo el mundo, se debe tanto a la mayor popularidad de un cierto grupo de variedades (a veces simplemente por su más fácil manejo) como al desconocimiento por muchos agricultores de las prácticas correctas. Ambas circunstancias han sido detectadas por los autores en el presente trabajo, siendo adecuadas las soluciones que proponen, esto es, recogida de germoplasma por una parte y divulgación a dos niveles (agricultor y educación).

La recogida se completa con datos de pasaporte y la descripción de caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares. Han elaborado un Listado de Descriptores Mínimos, algo obligado pero al parecer inexistente hasta ahora, de utilidad en Cuba y en cualquier otra parte. La utilización de marcadores tipo RAPD y AFLP, conveniente en una primera fase, deja paso a los más fiables SSR, de los que han diseñado nuevos marcadores tras haber utilizado los publicados para otra especie cercana (*A. bracteatus*).

Juzgo encomiable esas aportaciones, de interés tanto científico como práctico, y el rigor con el que se han hecho.

Córdoba (España), 17 de septiembre de 2017

Fdo.:

José Ignacio Cubero  
Catedrático Emérito de Genética  
Universidad de Córdoba (España)



Silao de la Victoria, Gto., a 3 de agosto de 2017

**A QUIEN PUEDA INTERESAR:**

La que suscribe, Dra. Lisset Herrera Isidró, Profesora Titular de la Academia de Biología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Campus Guanajuato, perteneciente al Instituto Politécnico Nacional de México, deseo expresar que conozco el trabajo que se viene desarrollando acerca la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines, por parte del grupo de investigadores de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), con quienes hemos venido manteniendo una colaboración estrecha y fructífera a través de diversas acciones docentes y científico-técnicas.

El trabajo desarrollado se ha realizado desde hace varios años con el objetivo de desarrollar prospecciones y recolectas de germoplasma de piña y de especies afines en Cuba, así como de realizar una valoración del estado actual de la diversidad de este importante recurso fitogenético. Este trabajo es realmente meritorio y ha requerido sin dudas un gran esfuerzo y dedicación de su colectivo para lograr los resultados que se aprecian en este trabajo, el cual tiene gran relevancia en el rescate y enriquecimiento del germoplasma de esa especie.

Se destacan los resultados logrados en la determinación de la diversidad del germoplasma de piña mediante marcadores morfológicos y moleculares y el establecimiento del Listado de Descriptores Mínimos. Este último aspecto no se había definido con anterioridad para la especie, lo que representa un importante aporte para los trabajos de mejoramiento y estudios de recursos fitogenéticos.

Por otra parte, los análisis que abordan los tres marcadores moleculares (RAPD, AFLP y SRR) para la caracterización del germoplasma de piña, permiten por primera vez acometer nuevos trabajos de mejoramiento con mayor seguridad y eficiencia.

El trabajo realizado es muy relevante además en el área de la conservación del germoplasma de piña, ya que se proponen acciones específicas para disminuir la pérdida de diversidad genética. Se desarrolló también una metodología para la crioconservación de accesiones del banco de germoplasma. Es de gran importancia la sustitución parcial de los reguladores del crecimiento tradicionales y usualmente costosos por Bioproductos producidos en Cuba para multiplicar *in vitro* las accesiones de la especie, así como el establecer aspectos que contribuyen a una mejor adaptación de las plantas multiplicadas.

Av. Mineral de Valenciana No. 200 Fracc. Industrial Puerto Interior, Silao de Victoria, Guanajuato, C.P. 36275

Tel.: (55) 57 29 60 00 ext. 81301, fax.: 81450. (472) 7 48 46 38

www.upiig.ipn.mx

En la investigación que han desarrollado se aprecian aportes en cuanto a la identificación de las amenazas de pérdida de diversidad *in situ* y *ex situ*, así como se realiza una propuesta de acciones que las minimicen, lo que sin duda contribuirá a la mejor conservación de los recursos genéticos de piña en Cuba.

Por todo ello, emito este aval por considerar muy meritorio y valioso para la ciencia el trabajo de referencia.

Atentamente,

LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA



**DRA. LISSET HERRERA ISIDRÓN**

Academia de Biología

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Campus Guanajuato del

Instituto Politécnico Nacional (UPIIG IPN)

México

UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO



*2017. «Año del Centenario de la Promulgación de la  
Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos»*

*«2017. Centenario de la Constitución de Guanajuato»*

DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

Irapuato, Guanajuato,  
18 de Agosto de 2017.

### **AVAL SOBRE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe, Dr. Héctor G. Núñez Palenius SNI I, profesor del Departamento de Agronomía de la División Ciencias de la Vida (DICTIVA) Campus Irapuato- Salamanca de la Universidad de Guanajuato, México, me resulta grato poder avalar el trabajo que ha desarrollado en favor de la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines, por parte del grupo de profesores de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), con quienes hemos venido manteniendo una colaboración estable en diferentes acciones docentes y de investigación, durante varios años, la cual se mantiene de forma satisfactoria.

En la actualidad, dirijo el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de DICTIVA, dedicado fundamentalmente a la conservación y propagación de diferentes especies de agave, que pertenecen a la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, única en México con reconocimiento de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Por ello, como especialista en conservación valoro altamente el trabajo que se viene desarrollando acerca la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines, por parte del grupo de investigadores de la Universidad Agraria de la Habana.

Se aprecia que desde hace varios años se han realizado prospecciones y recolectas de germoplasma de piña y especies afines en Cuba, lo que resulta muy importante para la valoración del estado de la diversidad de los recursos fitogenéticos de interés en la alimentación, el cual considero realmente meritorio y representa un factor de gran importancia en el rescate y enriquecimiento del germoplasma de esa especie.

**CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA**

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao,  
C.P. 36824 A.P. 313, Irapuato, Gto., México.  
Tel. y Fax: 01 4621 624 18 89.



UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO



El lograr la determinación de la diversidad del germoplasma mediante marcadores morfológicos y moleculares, y el establecimiento del Listado de Descriptores Mínimos es un importante aporte al estudio de la especie en trabajos de mejoramiento y estudios de recursos fitogenéticos, así como los estudios de diversidad con el empleo de marcadores moleculares para la caracterización del germoplasma estudiado, siendo de mucha utilidad futura para ese país.

En la investigación que han desarrollado los profesores de la Universidad Agraria de La Habana, se aprecian importantes aportes en cuanto a la identificación de amenazas de pérdida de diversidad *in situ* y *ex situ*, así como propuestas de acciones para reducir su incidencia.

Por todo lo anteriormente descrito, me resulta por ello muy satisfactorio, reconocer los méritos del trabajo: **"Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines"**, para su conveniente reconocimiento.

"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

DR. HÉCTOR GORDON NÚÑEZ PALENIUS

Departamento de Agronomía

División de Ciencias de la Vida

Campus Irapuato-Salamanca

Universidad de Guanajuato

C.c.p. Consecutivo

Málaga, España, a 22 de septiembre de 2014

Re: "Conservación y Manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill y especies afines de interés para la producción en Cuba". Autores: Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Fátima Isidró Pérez y Marcos Edel Martínez Montero.

Desde el Instituto de Hortofruticultura Subtropical la Mayora (IHSM—CSIC—UMA), perteneciente al Consejo Superior de Científicas (CSIC) de España, se considera que el trabajo de referencia supone un avance significativo en la caracterización de germoplasma de piña mediante una aproximación, multidisciplinar combinando la utilización de marcadores morfológicos y moleculares. En el caso de los marcadores morfológicos se han optimizado los descriptores desarrollados previamente y se han validado para la gestión de colecciones de germoplasma. En el caso de los marcadores moleculares se desarrollaron nuevos marcadores microsatélite diseñados a partir de secuencias tanto de *A. comosus* como de *A. bracteatus* con gran utilidad para estudios de caracterización vegetal y diversidad genética.

El análisis de los marcadores microsatélite se complementó con el análisis de marcadores tipo RAPDs, lo que permitió llevar a cabo un estudio más exhaustivo del material vegetal de piña tropical conservado en distintas colecciones de germoplasma.

La aproximación utilizada en este trabajo permitió obtener agrupamientos moleculares

que tenían una clara relación con la caracterización fenotípica validando la actual clasificación de los diferentes tipos de piña tropical existentes.

El trabajo llevado a cabo es de gran utilidad para optimizar la gestión de los recursos genéticos de piña tropical no solamente en Cuba sino en el resto de los países que tienen colecciones de germoplasma de esta especie.

Atentamente,



Iñaki Hormaza

Profesor de Investigación y Jefe del Departamento de Fruticultura Subtropical del IHSM "La Mayora"

Valle de Guerra, a 10 de septiembre de 2017

#### AVAL

Por la presente deseo fundamentar que el trabajo de los autores principales Daymara Rodríguez-Alfonso, Miriam Isidró Pérez y Marcos Martínez Montero titulado: "Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines", resulta de gran interés para los mejoradores del sector piñero. Los resultados alcanzados en el trabajo han permitido detectar la limitada diversidad morfológica y molecular de la especie en Cuba, los problemas en el manejo fitotécnico del cultivo y de manejo.

Los nuevos cebadores SSR diseñados de *A. bracteatus* y el Listado de Descriptores Mínimos propuestos en la investigación han sido utilizados en la caracterización morfológica y molecular de la colección. Por otra parte es de resaltar el trabajo que ha realizado el colectivo de trabajo en las prospecciones desarrolladas a lo largo de la Isla, situación que en los países de mayor ingreso se dificulta por lo que creemos que vos merecéis que se destaque.

Además se ha estrechado, aún más, los lazos existentes entre la Facultad de Agronomía de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez" y nuestro Instituto, relación que esperamos se vea incrementada en el futuro.

Para que conste, a los efectos oportunos, firmo la presente en Valle de Guerra, La Laguna, a diez de septiembre de dos mil diecisiete.



Fdo. Manuel Caballero Ruano.  
Director Científico del ICIA



# PRODUCTORES Y PROSPECCIONES

## AVAL

### A solicitud de los interesados:

Esta Delegación de la Agricultura desea informar que la Dra. C. Miriam Isidró Pérez, la Dra. C. Daymara Rodríguez Alfonso y otros especialistas realizaron en los años 2000 y 2008, en la provincia de Pinar del Río prospecciones para recolectar materiales de piña y evaluar la diversidad de la especie en el área.

Los municipios visitados fueron:

#### ➤ **Municipio Candelaria:**

Se visitó solo un área de interés en la Finca de Cosme Hdez. de 1,5 ha, el que planteó como dato curioso que en el año 1985 cosechó una fruta de más de 10 lbs. El material de esta región proviene de la casa del italiano Vitali, un famoso productor antes de la revolución, el cultivar recolectado fue española roja.

#### ➤ **Municipio San Cristóbal:**

En este municipio hay tres campesinos que siembran piña. Se visitó la finca "LA MAJAGUA" de Israel Pérez. El cultivar que se encontró fue española roja. Este productor no tenía gran experiencia en el cultivo, por lo que el intercambio favoreció al mismo ya que se le entregó un folleto sobre las labores que necesita la piña.

#### ➤ **Municipio La Palma (Sierra del Rosario):**

Se visitó una UBPC, de difícil acceso, en una primera colecta en el año 2000 había incremento de la plantación de piña, por estar muy cerca de Cayo Laevisa y Viñales polos turísticos de importancia y en una segunda visita la situación era otra. Los materiales colectados fueron de Española roja tipo camagüeyana, con mucha espinosidad en las hojas y gran rusticidad. Esta visita permitió detectar problemas en la cosecha, ya que amontonaban la fruta y la colocaban en el suelo, lo cual provocó en el centro de Acopio en Viñales, una situación crítica por presentar gran cantidad de frutas dañadas al parecer por "Pudrición blanda" típica de *Chalara paradoxa* (*Thielaviopsis paradoxa*). Por esta razón los investigadores desarrollaron una capacitación sobre el manejo de la fruta, las labores del cultivo y los marcos de plantación, para evitar la erosión por las características topográficas del área sobre.

#### ➤ **Municipio Viñales:**

En esta área también, en una topografía muy ondulada (cerca de Mogotes), se visitaron productores que siembran a curva de nivel por tener pendientes superiores a 45 ° en algunos campos. Hacen como aporques para proteger las plantas, lo que hace que se "entierren" un poco las plantas y tengan los pedúnculos a solo 30 cm las frutas. Se encontraron 5 plantas de Piña blanca, siendo la única finca donde vimos este genotipo en la provincia, por lo que se trabajó sobre la necesidad de multiplicarlo y fomentar su intercambio. Además se recolectaron materiales en zonas llanas del Rosario (Puerto Esperanza) donde se intercalaba el cultivo de la piña con juveniles de plantas maderable como la Caoba.

El presente trabajo tiene gran validez importancia ya que el mismo permitió determinar el estado de diversidad de la zona, la conservación del fondo genético y el intercambio de los de cultivares de piña. Además permitió el encuentro con los productores mediante el cual se les orientó sobre sus dificultades en el manejo del cultivo y se fomentó la conciencia de conservación.

Y para que así conste. Fecha:

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized name or set of initials.

Delegación de la Agricultura.  
Provincia Pinar del Río.



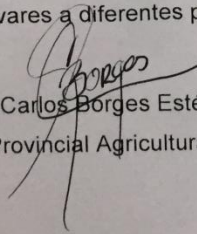
ADMINISTRACIÓN PROVINCIAL  
Dirección Provincial Agricultura  
MAYABEQUE

Mayabeque, 25 de Septiembre de 2017.  
"Año 59 de la Revolución"

AVAL

El presente trabajo "Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines" posee gran importancia, ya que ha rescatado genotipos de piña que los productores han ido abandonando su cultivo. La actual provincia de Mayabeque ha sido prospectada por las Dra.C. Miriam Isidró Pérez y Dra.C. Daymara Rodríguez Alfonso y desde 1997. En cuyas prospecciones han demostrado la pérdida de diversidad de la especie y la disminución de las áreas de producción del cultivo sobre todo en San Antonio, Güira de Melena y Alquizar pertenecientes antes a la antigua provincia La Habana.

La zona de Bainoa-Catalina, área de mayor superficie dedicada al cultivo de la piña en la provincia, ha sido prospectada en varias ocasiones por el colectivo de profesores. Debido al interés y compromiso de los productores con el cultivo y a partir de los resultados obtenidos en la presente investigación se ha desarrollado, en la CSS "Nelson Fernández", Finca "La Guajira", del productor Armando Falcón un programa de mejora genética mediante cruzamiento, con el objetivo de obtener híbridos con características productivas de buena calidad y mejor adaptados. En esta finca también se está desarrollando una réplica del Banco de Germoplasma para reservar los RFG de piña en Cuba. Además ha sido entregado plantas de otros cultivares a diferentes productores de estas áreas.

  
Ing. Juan Carlos Borges Estévez  
Director Provincial Agricultura



MINISTERIO DE LA AGRICULTURA  
UEB Semillas Varias  
LAS TUNAS

Las Tunas, 3 de Noviembre 2011  
"Año 53 de la Revolución."


**AVAL**

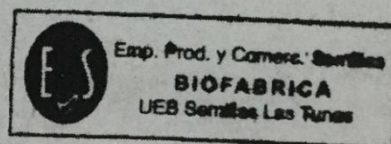
Por medio del presente se hace firme la conformidad e interés en que se desarrolle el cultivo del Híbrido de Piña en toda la provincia.

Teniendo en cuenta que se comporta de manera favorable en condiciones asépticas, con un coeficiente de multiplicación de 12-13, así como se adaptó perfectamente a diferentes medios de cultivos no idóneos para el

Por la importancia que representa en la producción de alimento y el desarrollo de los frutales del territorio, se brindará el apoyo necesario para la adecuada ejecución, prestando especial atención a las acciones que garanticen la sostenibilidad del proyecto y un impacto positivo de sus resultados.

Sin otro asunto,

Odenia Ramirez   
Directora de la Biofabrica Las tunas





MINISTERIO DE LA AGRICULTURA  
COOPERATIVA DE CREDITO Y SERVICIOS  
COMUNIDAD DE VILLANUEVA  
LAS TUNAS

Comunidad Villanueva, Las Tunas, 15 Septiembre del 2008  
"Año del 50 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal", dirigido por la Universidad Agraria de La Habana, se encuentran ejecutando la tarea de adaptar y distribuir el nuevo híbrido de piña CBCE-116 en el territorio, el Grupo de Biotecnología del Centro Universitario de Las Tunas, para su posible explotación en el mismo y lograr su registro varietal. Nuestra entidad cuenta con 60 plantas *in vitro* de este híbrido, y desde su entrega se le ha dado todas las condiciones que exige el mismo y hasta el momento todas las plantas han mostrado un buen comportamiento y desarrollo.

Presidente CCS

Cooperativa de Crédito y Servicios

Villanueva

Las Tunas

"Año 53 Aniversario de la Revolución"

Aval

Con la presente hago constar que a nuestra CCS ubicada en la localidad de pesués se fueron donados por la Universidad de las Tunas 60 plantas de piña híbrido del Ubiol CBCE-116 los mismos gozan de buena salud y crecen normal mantienen buena coloración y no están plagados.

Yobanis López Quiro  
López Quiro

Universidad Las Tunas  
"Vladimir I. Lenin"

Las Tunas, 12 de septiembre de 2011  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que nuestra Universidad de Las Tunas le entregó al Jardín Botánico de esta provincia 120 plantas *in vitro* de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de dicho centro.

Hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor.

Raúl Verdecia  
Director



*[Signature]*

Estación Experimental de Pastos y Forrajes  
MINAGRI  
LAS TUNAS

Las Tunas, 12 septiembre del 2011  
"Año 53 de la Revolución"

AVAL

Hago constar que a nuestra Estación Experimental ubicada en el km 10, carretera Tunas-Bayamo les fueron donadas 60 plantas *in vitro* de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país. El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de la Universidad de Las Tunas.

Las plantas desde que se plantaron presentan buen comportamiento y vigor, mostrando buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de nuestra Estación Experimental.



*[Signature]*  
MSc Jorge Luis Rivero Moreno  
Director Estación de Pastos y Forrajes



COOPERATIVA DE CREDITO Y SERVICIOS  
MINAGRI  
LAS TUNAS

Cornito, Las Tunas, 10 octubre del 2008  
"Año del 50 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Hago constar que a nuestra CCS ubicada en la comunidad San Antonio del Cornito, en La Tunas les fueron entregadas 60 plantas in vitro de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología del Centro Universitario de Las Tunas.  
Las plantas donadas hasta el momento presentan buen vigor, comportamiento y libre de plagas y enfermedades, lo que consideramos que están adaptadas a las condiciones de nuestra CCS.

Presidente CCS

*Gerardo González*

Universidad Las Tunas

"Vladimir I. Lenin"

Las Tunas, 20 de septiembre de 2011  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que nuestra Universidad de La Tunas le entregó a José Laguna pequeño productor del municipio Jobabo la cantidad de 100 plantas in vitro de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de dicho centro.

Hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor.



Productor

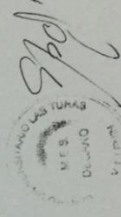
Universidad Las Tunas  
" Vladimir I. Lenin "

Las Tunas, 14 de septiembre de 2011  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que nuestra Universidad de La Tunas le entregó a Eriberto Ricardo Labrada, pequeño productor de Majibacoa, de la finca El Bleo, del municipio Tunas la cantidad de 70 plantas *in vitro* de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de dicho centro.

Hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor.



  
Productor

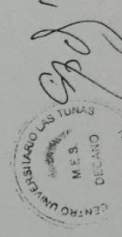
Universidad Las Tunas  
" Vladimir I. Lenin "

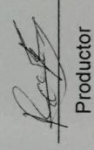
Las Tunas, 14 de septiembre de 2011  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que nuestra Universidad de La Tunas le entregó a Roberto Fidel Reyero pequeño productor de Manatí, la cantidad de 70 plantas *in vitro* de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de dicho centro.

Hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor.



  
Productor

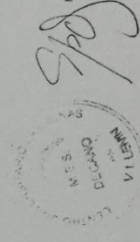
Universidad Las Tunas  
"Vladimir I. Lenin "

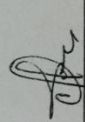
Las Tunas, 12 de septiembre de 2011  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que nuestra Universidad de La Tunas le entregó a la CCS José Méndez Licea, Veguita, municipio Tunas a Roger González León, pequeño productor la cantidad de 60 plantas *in vitro* de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de dicho centro.

Hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor.



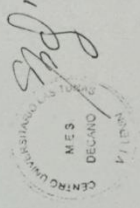
  
Productor

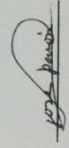
Universidad Las Tunas  
"Vladimir I. Lenin "

Las Tunas, 20 de diciembre de 2010  
"Año del 52 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que nuestra Universidad de La Tunas le entregó a Alberto Pavón Rodríguez pequeño productor de la CCS Manuel Concepción la cantidad de 50 plantas *in vitro* de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de dicho centro.



  
Productor



Universidad Las Tunas  
"Vladimir I. Lenin"

Las Tunas, 24 octubre de 2011  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que en la visita realizada al productor Leonardo González González situado en la comunidad de san Antonio del cornito del municipio Tunas de las 60 plantas *in vitro* entregadas de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de la Universidad de Las Tunas, hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor, se han obtenido dos cosecha con frutos de buena calidad, más del 80 % de las plantas fructificaron y los frutos promediaron un peso de 4 libras, de color anaranjado verdoso, con textura suave, dulce y poca acidez. El riego lo realiza entre 10 y 15 días como promedio, lo que concuerda con las exigencias del cultivo, aunque no dispone de sistemas de riego.



MSc. Neysis Pérez Fernández

Leonardo González González  
\* Productor

Universidad Las Tunas  
"Vladimir I. Lenin"

Las Tunas, 13 marzo de 2009  
"Año del 53 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Por este medio hago constar que en la visita realizada al productor Alfredo Montenegro Maríné ubicado en la comunidad de Becerra del municipio La Tunas, perteneciente a la UBPC "Francisco Peña" de las 60 plantas *in vitro* de piña entregadas se gozaron 16 plantas del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". El cual está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología de la Universidad de Las Tunas, hasta el momento todas las plantas gozan de buena salud y libre de plagas y enfermedades, así como buen vigor, se han obtenido dos cosecha con frutos de buena calidad, más del 80 % de las plantas fructificaron y los frutos promediaron un peso de 2.5 libras, de color anaranjado, con textura suave, dulce y poca acidez. No dispone de sistemas de riego.



MSc. Neysis Pérez Fernández

productor


MINISTERIO DE LA AGRICULTURA  
UBPC FRANCISCO PEÑA  
LAS TUNAS

Becerra, Las Tunas 15 octubre del 2008  
"Año del 50 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Hago constar que a nuestra UBPC "Francisco Peña" ubicada en Becerra, Las Tunas les fue entregada 90 plantas in vitro de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". Este Proyecto está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología del Centro Universitario de Las Tunas.

Todas las plantas donadas a esta entidad presentan buen desarrollo y con buen vigor, así como libres de plagas y enfermedades.

  
Alfredo Montenegro Marín  
Presidente UBPC "Francisco Peña"

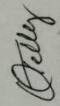
COOPERATIVA DE CREDITO Y SERVICIOS  
MINAGRI MAJIBACOA  
LAS TUNAS

Majibacoa, Las Tunas, 14 octubre del 2008  
"Año del 50 Aniversario de la Revolución"

AVAL

Nuestra CCS "Las Estancias" ubicada en el Municipio de Majibacoa, en La Tunas les fueron entregadas 60 plantas in vitro de piña del nuevo híbrido CBCE-116 del Proyecto Nacional "Multiplicación de híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en varias provincias del país: Fase introducción y Registro varietal". Este Proyecto está dirigido por la Universidad Agraria de La Habana y ejecutado en el territorio por el Grupo de Biotecnología del Centro Universitario de Las Tunas.

Las plantas desde que se plantaron han mostrado un buen comportamiento y desarrollo, lo que indica que se han adaptado a nuestras condiciones edafoclimáticas.

  
Presidente CCS "Las Estancias"  
"José Lirio Rodríguez"





Available Online at ESCI Journals

**Journal of Plant Breeding and Genetics**

ISSN: 2305-297X (Online), 2308-123X (Print)  
http://www.escijournals.net/JPBG

OPTIMIZING GENOMIC DNA ISOLATION IN PINEAPPLE (*ANANAS COMOSUS* L.)

ADJIE Oladjo A. Charlotte\*, Achigan-Dako E. Ghénatio, Agbangla Clément

\* Horticulture and Genetics Unit, Faculty of Agronomic Sciences (FSA), University of Abomey-Calavi, Cotonou, Republic of Benin.  
 \* Laboratory of Genetics and Biotechnology, Faculty of Science and Technology (FAST), University of Abomey-Calavi, Cotonou, Republic of Benin.

## ABSTRACT

The isolation of high molecular mass genomic DNA (Deoxyribonucleic acid) is crucial for applications in molecular biology. To this end many protocols were developed for the extraction of plant DNA. However, for pineapple (*Ananas comosus*), standard protocols are scarce and not always efficient when resources are limited. In this study, we developed a new protocol for nuclear DNA extraction in pineapple. Four existing protocols were tested but none has provided high quality DNA extract. The original laboratory standard protocol based on the use of CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) was successfully modified to optimize the quality of the DNA extract using eighteen pineapple young leaf samples including three parts: the leaf apex, the mid blade, and the leaf base of two cultivars (i.e. Sugarloaf and Smooth Cayenne). The successful extraction of DNA in a sister species, *Ananas bracteatus*, gave evidence that the protocol can be used for others Bromeliaceae. The new protocol yielded 51.76 µg/ml DNA, which is higher than that obtained with previous protocols. The DNA extract was efficiently PCR (Polymerase Chain Reaction) amplified using simple sequence repeat primers. We proposed henceforth the use of this protocol for further DNA isolation in pineapple particularly under limited resources condition when using CTAB.

**Keywords:** *Ananas bracteatus*, *Ananas comosus*, Bromeliaceae, CTAB, genomic DNA extraction, MATAB.

## INTRODUCTION

Application of genomic techniques, for instance in crop improvement or phylogenetic studies, requires efficient and reliable DNA extraction procedures (Allen et al., 2006; Gaweł and Jarret, 1991). DNA extraction and purification are the first steps in molecular genetics and for PCR amplification. Several methods are available for DNA extraction from plant material (Michiels et al., 2003). However, the extraction of pure and sufficient DNA, adequate enough for genomic analyses, has for the last decades been a concern (Chabi Sila et al., 2015; Gaweł and Jarret, 1991; Ghosh et al., 2009; Murray and Thompson, 1980). Some of those extraction methods are found lengthy; others are expensive commercial kits though available; and others use very hazardous chemicals (Chabi Sila et al., 2015).

DNA purity is important to assure reproducibility of genomic studies (Stewart and Villa, 1993). Using RAPD, AFLP, SSR) to analyse genetic diversity (Duval et al., 2003; Duval et al., 2001; Kato et al., 2004; Machado et al., 2011) or linkage mapping (Carlier et al., 2004) in

pineapple, only a few of them proposed clear DNA extraction protocols for this genetically variable crop. Moreover, several published DNA extraction protocols tested in pineapple were not successful when applied to our samples. Besides, none of them gave indication on which parts of the pineapple leaf yielded sufficient DNA amount for PCR amplification. The choice of a particular protocol may depend to a large degree on the plant species used (Dellaporta et al., 1983) but also on the leaf part used and this might be true for pineapple.

In this study we compared four DNA extraction protocols on different pineapple leaf parts to suggest an optimized CTAB protocol that consistently yields high-quality amplifiable DNA for genomic studies in the species.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material:** Six samples of young leaves (three samples of Sugarloaf and three of Smooth Cayenne) collected from the pineapple live collection of the Faculty of Agronomic Sciences of the University of Abomey-Calavi in Sèkou (South Benin) and two samples of manhot (as check) were used in this study. Each pineapple leaf sample was divided into leaf base, mid blade and leaf apex resulting in 18 sub-samples. These samples were washed with tap water and cleaned before DNA extraction. Six samples of ornamental pineapple (*Ananas bracteatus* (Lindl.) Schult. & Schult.)

**DNA quantification:** The DNA yield was estimated using a spectrophotometer at UV-VIS 230, 260 and 280 nm. The purity of the DNA was determined by calculating the ratio A260/A280 nm to assess the protein contamination and A260/230 to assess polysaccharide contamination (Wilson and Walker, 2010). The DNA concentration was calculated with the following formula:

[DNA] = A<sub>260</sub> × DF × 50 µg/ml,  
 where [DNA] is the DNA concentration, A<sub>260</sub> is the Absorbance at 260 nm, DF = Dilution Factor; 50 µg/ml is the Concentration of DNA when A<sub>260</sub> = 1.

**PCR amplification:** PCR amplification was carried out to check the quality of the DNA. Three samples of DNA and

were tested to ascertain the usability of the optimized protocol for Bromeliaceae.

**DNA isolation protocol:** The extraction buffer used for initial homogenization was made up of 500 mM Tris, 5 mM EDTA and 1.3 M NaCl. The buffer used for the membranes lysis was autoclaved; 0.1% β mercaptoethanol (BME) was added immediately before used. For each protocol the concentrations of CTAB or MATAB, NaCl, Tris, EDTA and BME used are detailed in Table 1. We took 0.6 g of fresh young leaf that was cut into pieces of approximately 1 mm size. We used mortar and pestle to grind leaf samples added with 2 ml of initial buffer extraction, which was centrifuged for 10 min at 10000 rpm and 4°C. The supernatant was transferred and added with 750 µl of the lysis solution for 90 min incubation at 65°C. We added the mix of chloroform isoamyl 24:1 after incubation; the mixture was centrifuged at 10000 rpm for 15 min at 4°C. The aqueous phase was transferred to another tube and the DNA was precipitated by adding ice-cold isopropanol and stored at -20°C for 30 min to 1 h. This was further centrifuged at 10000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was removed carefully and the pellet washed with ethanol (70%) twice and dried at 37°C. The pellet was finally dissolved using 100 µl of TE buffer. The extract was run on ethidium bromide stained agarose gel (1%).

Table 1. Buffer solutions for membrane lysis and incubation times in five protocols used for pineapple DNA isolation.

Protocol	Tested (1994)	Gaweł and Jarret (1991)	Vaniljalva (2011)	Agbangla et al. (2002)	New protocol
CTAB (%)	1	2	1	-	2
MATAB (%)	-	-	-	4	-
Tris (mM), pH=8	100	100	50	100	500
NaCl (M)	0.7	1.4	0.7	1.4	1.3
EDTA (mM)	10	20	10	20	5
βmercapto ethanol (%)	1	0.1	0.1	-	0.1
Incubation (min) (65°C)	30	30	30	90	90

four single sequence repeat (SSR) markers of *Ananas comosus* (Table 2) were used to amplify the genome as described by Kinsat and Kumar (2007) and Rodríguez et al. (2013). The PCR was performed in the thermal cycler; the volume of the mixture was 25 µl containing 3 µl of genomic DNA. The mixture was subjected to the following PCR program: an initial step of 1 min at 94°C followed by 35 cycles of 30s denaturing step at 94°C, 30s annealing at 55°C and 1 min extension at 72°C, and a final step of 5 min final extension at 72°C. The amplification products were resolved electrophoretically on a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized using UV light.





INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
EN FRUTICULTURA TROPICAL



NC-ISO 9001:2001  
Registro No. 082-2006

## UNIDAD CIENTIFICO TECNOLOGICA DE BASE ALQUIZAR

Alquízar, 12 de noviembre del 2009  
"Año del 50 Aniversario del Triunfo de la Revolución"

A: MCs. Daimara Rodríguez Alonso.

De: MSc. Marta R. Hernandez Zaldivar  
Directora (UCTB) Alquízar

Estimada compañera:

Por la presente le hacemos llegar nuestro más sincero agradecimiento, por su contribución y aporte en la colecta del material solicitado al centro de bioplasmas de Ciego de Ávila, así como el sacrificio que esta actividad le representó, para el establecimiento en nuestra estación del banco de germoplasma, el que será establecido y conservado con todas las normativas correspondientes. Esperamos poder contribuir al desarrollo de esta colaboración entre nuestras instituciones.

Saludos

MSc. Marta R. Hernandez Zaldivar  
Directora (UCTB) Alquízar



# Personalidades e Instituciones



REPÚBLICA DE CUBA  
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

Dirección de Semillas y Recursos Fitogenéticos

Ordinario  
Ejemplar No. ....

La Habana 25 de septiembre de 2017.  
"Año 59 de la Revolución".

## AVAL

El trabajo titulado: " Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines" de los autores principales: Daymara Rodríguez Alfonso, Miniam Fátima Isidró Pérez y Marcos Edel Martínez Montero de la Universidad Agraria de La Habana y el Centro de Bioplasmas como entidades ejecutoras principales, constituye un aporte valioso a la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña en Cuba. La dirección de semilla apoya y resalta la importancia que tiene la presente investigación, la cual está en correspondencia con una de las políticas del país sobre el rescate de los Recursos Fitogenéticos.

Las prospecciones que han realizado el equipo de trabajo, han demostrado los problemas de manejo y el estado actual de diversidad de los RFG de piña en Cuba. Desde antes del año 1995 la Universidad Agraria de La Habana y el Centro de Bioplasmas vienen desarrollando un importante esfuerzo por coleccionar mediante prospecciones nacionales los diferentes genotipos del cultivo, por caracterizar *in situ* y *ex situ* su diversidad y por fomentar su conservación para así evitar la pérdida de erosión de algunos cultivares como 'Piña blanca' o también conocido como 'Cubana' y 'Barón de Rothschild' materiales valiosos para desarrollar futuros programas de mejora de la piña.

Por otra parte proponen un grupo de acciones para la conservación *in situ* y *ex situ* con las que se han logrado y se puede seguir incrementando la disponibilidad de material a propagar y a conservar. Establecieron un Listado de Descriptores Mínimos que ha simplificado/rá los estudios de caracterización morfoagronómica.

Por todo ello consideramos que el trabajo aporta tanto desde el punto biológico como para preservación de la biodiversidad de la especie, además de permitir contar con valiosos materiales para trabajos de Mejora genética del cultivo de la piña.

Saludos,

Dra. Elizabeth Peña Turruellas  
Directora de Semillas

Rs: 151/17

Ejecutor: Dirección de Semillas y Recursos Fitogenéticos



Ministerio de la Agricultura  
Conil y Esq Avenida Independencia, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba  
Teléfono: 78847176  
Correo: dsemillas@oc.minag.gob.cu

Santa Clara, 2 de Octubre de 2017  
"Año 59 de la Revolución"

## AVAL

Titulo del Trabajo: **Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [Ananas comosus (L.) Merrill y especies afines]**


Autores principales: Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Isidró Pérez y Marcos Martínez Montero

Entidades ejecutoras principales del resultado: Universidad Agraria de La Habana y Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila

En la presente investigación se utiliza por primera vez en las fases de multiplicación y enraizamiento de la piña los bioproductos nacionales BB-16 y Pectimorf® como sustitutos parciales y totales de los reguladores del crecimiento, lo que permite disminuir el uso de estas sustancias tan costosas sobretodo en la producción a escala mayor. Por otra parte se demuestra en el trabajo realizado, por el colectivo de autores, en la conservación y recuperación del germoplasma *in situ* y *ex situ* y los riesgos de erosión genética, como el empleo de técnicas de crioconservación y el establecimiento de una colección núcleo que permiten preservar el material genético disponible. Se propone un listado de 15 Descriptores Mínimos efectivos para los trabajo de caracterización.

Los resultados presentados constituyen un aporte al conocimiento y a la conservación de los recursos fitogenéticos de piña en Cuba. Se demuestra, mediante la caracterización morfo-agronómica y molecular que la diversidad genética del germoplasma es escasa. Se establecen en la fase de aclimatización los requerimientos de riego y sustrato. Además de la crioconservación a partir de ápices de accesiones de la colección. Por primera vez en piña: se diseñan nuevos cebadores SSR a partir de secuencias publicadas de *A. bracteatus* en el mundo. Se realiza la caracterización molecular del banco de germoplasma nacional; se identifican los riesgos de erosión genética y se proponen acciones para minimizarlos. Junto a esto se establece una colección núcleo donde se recoge la mayor variabilidad. Todo lo anterior está avalado por 4 publicaciones científicas en revistas de la *web of Science* en los últimos 5 años, tres tesis de Maestría y una de Doctorado en Ciencias Agrícolas.

Por cuanto consideramos que el trabajo referido reúne los requisitos para ser considerado como propuesta de Premio de la Academia de Ciencias de Cuba.

  
Dr. Rafael Gómez Kosky  
Miembro de la ACC  
Investigador Titular





UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO BIOLOGÍA VEGETAL


**AVAL**


Desde hace años seguimos el trabajo que vienen realizando los autores: **Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Isidró Pérez y Marcos Martínez Montero** en la "Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill y especies afines" con el objetivo de apoyar los procesos productivos de esta especie y futuros programas de mejora.

Este arduo trabajo, ha permitido describir los genotipos conservados tanto *in situ* y *ex situ* y los riesgos de erosión genética de algunos materiales como 'Piña blanca'. Además utilizaron 27 descriptores establecidos por el IBPGR en la caracterización morfoagronómica del germoplasma, lo que representa una valiosa información para futuros trabajos de mejora en piña. Además definen 15 Descriptores Mínimos que son efectivos para la evaluación de la diversidad, lo que redundará en ahorro de tiempo y esfuerzo en los trabajos de caracterización, facilitan el trabajo de los mejoradores y curadores del cultivo en el país y hasta de otros países del área que cultivan la piña ya que pueden ser ajustados a la especie en otras condiciones.

Es de destacar el diseño de nuevos cebadores SSR para estudios de diversidad genética, ya que con los cebadores informados en la literatura internacional no fue posible obtener resultados. El artículo "Polymorphic microsatellite markers in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merrill]", SCIENTIA HORTICULTURAE, publicado a partir de los resultados de la presente investigación le demuestra a la comunidad científica la ineficiencia de los cebadores establecidos para piña, hasta la fecha.

La rigurosidad de los resultados obtenidos por este colectivo de investigación me permite avalar el trabajo presentado y apoyar su propuesta a premio.

  
Dra Marilyn Valdés de la Cruz  
Departamento Biología Vegetal  
Facultad de Biología  
Universidad de la Habana





## INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. C. P. 32700

Dirección de Extensión y Producción

Tel. / Fax: (53) (47) 86 3867

c. electrónico: [juanc@inca.edu.cu](mailto:juanc@inca.edu.cu)

### AVAL

A quien pueda interesar:


El resultado del trabajo titulado: **"Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines"**, de los autores principales: Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Isidró Pérez y Marcos Martínez Montero, presenta un alto valor científico y utilidad práctica, por cuanto, además de caracterizar desde de punto de vista morfológico la diversidad existente del germoplasma cubano de piña, propone un Listado de Descriptores Mínimos para el cultivo, que facilita desde el 2014 el trabajo de caracterización de nuevos materiales.

Se destaca, en esta investigación, la ardua labor de los autores para llevar a cabo las prospecciones, que le permitieron recolectar al menos un ejemplar de cada área geográfica visitada. Se trabajó además en la introducción al Banco de Germoplasma nacional y algunos de las accesiones han sido crioconservadas.

Importante destacar la caracterización tanto morfoagronómica como molecularmente realizada a la colección *ex situ*, que permite una mejor utilización de la misma a nivel nacional e internacional. Las acciones desarrolladas en este trabajo permitieron determinar la escasa variabilidad presente en el germoplasma, las causas que han incidido en ello y proponer y ejecutar acciones para minimizar estas afectaciones. Estos resultados son el comienzo de cualquier estrategia de conservación de los recursos fitogenéticos de piña que se desee desarrollar y el primer reporte en el país de caracterización morfoagronómica y molecular lo que permite ofrecer a los

productores una ficha más completa sobre las características de los cultivares. Por otra parte el listado de 15 descriptores mínimos propuestos ahorra tiempo y esfuerzos en los trabajos de caracterización de la especie y facilita el manejo con eficiencia de los recursos fitogenéticos de piña en el país.

Para que así conste se firma la presente a los 25 días de septiembre de 2017

  
Dr. C. Juan G. Castillo Hernández  
Director de Extensión y Producción  
Jefe de la Unidad de Recursos Fitogenéticos  
INCA





La Habana, 28 de septiembre de 2017  
"Año 59 de la Revolución"

## AVAL

Título del trabajo: "Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines".

El tema abordado es de gran actualidad, tomando en consideración que los principales resultados obtenidos están encaminados a caracterizar el germoplasma *in situ* y *ex situ* de piña en Cuba como aspecto fundamental para el conocimiento de la diversidad genética existente, la cual servirá de base para elevar la eficiencia del programa de mejoramiento de la especie en el país. Actualmente, es incompleta la caracterización de los bancos de germoplasma de este frutal a nivel internacional y en Cuba y el programa de mejoramiento en los países donde se cultiva se ha centrado en unos pocos cultivares sin hacer un uso apropiado de la diversidad genética disponible en cada uno.

En este sentido, la valoración del estado actual de la diversidad de los recursos genéticos de piña, el establecimiento de descriptores mínimos, la evaluación de la diversidad genética mediante marcadores morfoagronómicos y moleculares, el establecimiento de una colección núcleo y una sintética que contribuyan a hacer un uso más eficiente de este germoplasma, la identificación de las amenazas que pueden provocar erosión genética en el cultivo y posibles acciones para minimizarla; así como las alternativas en la propagación *in vitro* de híbridos nacionales mediante la sustitución parcial o total de los reguladores del crecimiento por los bioproductos nacionales BB-16 y Pectimorf®, en la fase de aclimatación del sustrato a utilizar y en las normas de riego y un procedimiento de vitrificación de piña *in vitro* para el establecimiento a largo plazo de un criobanco en el germoplasma, constituyen los principales aportes del trabajo realizado.

Las investigaciones que se lleva a cabo resultan novedosas, teniendo en cuenta que la caracterización morfoagronómica y molecular por RAPD y SSR; así como la determinación de los descriptores mínimos y el establecimiento de la colección núcleo y la sintética se realizan por primera vez en Cuba. Los resultados obtenidos permitirán la conservación, el manejo adecuado y el uso eficiente de los recursos genéticos de este frutal para su posterior utilización en el programa de mejora de la especie en el país, lo cual constituye un aporte valioso de tipo económico, práctico y social, e incluso para la ciencia, pues permite orientar las investigaciones futuras a



NC-ISO 9001:2008  
Registro No. 054-2014

realizar en este sentido y recomendar una metodología a seguir en estudios de este tipo.

Estos resultados, además, están avalados por un conjunto de publicaciones tanto en revistas cubanas certificadas por el CITMA como en revistas internacionales de impacto y capítulos de libros, así como trabajos presentados en diferentes eventos, tesis de Diploma, Maestría y de Doctorado, reconocimientos y premios a diferentes niveles (CITMA, MINAG, FORUM, BTJ), lo que constituye un reflejo de su alto rigor científico.

Dr.C. Guillermo Rafael Almenares Garlobo  
Director General  
Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

La Habana, 22 de septiembre del 2017.  
"Año 59 de la Revolución".

## AVAL

Por medio de la presente hago constar que el trabajo titulado: "Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines" que se presenta como Premio Academia de los autores principales: Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Fátima Ildrón Pérez y Marcos Edel Martínez Montero de la Universidad Agraria de La Habana y del Centro de Bioplantas, resulta de interés para el Grupo Empresarial, por cuanto se trata de rescatar, conservar, determinar la diversidad genética y morfológica de las variedades de piña que se encuentran dispersas en el país.

La conservación de los recursos fitogenéticos ha adquirido relevancia en las últimas décadas, no solo por la erosión que están sufriendo estos, lo que conlleva a la pérdida o disminución de la diversidad genética, sino también por el valor potencial que poseen los RFG. Cuando se habla de preservación de germoplasma, hay que destacar que el objetivo es conservar con la mayor integridad posible la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas.

Los resultados obtenidos de su estudio permitieron valorar las características morfoagronómicas y la similitud genética mediante marcadores moleculares de los cultivares conservados *in situ* y *ex situ*, e incentivar el trabajo de los productores en la conservación y el intercambio de los cultivares ya que la tendencia actual en esta especie predomina el cultivar 'Española roja', también, en menor medida, con el cultivar 'MD2' de reciente incorporación. Aunque Cuba no es centro de origen, se puede apreciar la baja diversidad de esta especie y los riesgos de pérdida de materiales como 'Barón de Rothschild', 'Cabezona' y 'Piña blanca', que apenas se localizan en determinadas zonas del país y en muy pequeña cuantía. Por su parte la propuesta por para el cultivo de un listado de descriptores mínimos permitirá una efectiva evaluación de la diversidad, lo que redundará en ahorro de tiempo y esfuerzo en futuros trabajos de caracterización de germoplasma.

La caracterización molecular de la diversidad genética del germoplasma sirve de complemento a la caracterización morfológica y la evaluación agronómica y para ayudar al mejorador en la selección de los progenitores en programas de cruzamiento.

Debe considerarse que el trabajo realizado por el colectivo de autores es de gran trascendencia y más en los momentos actuales en los que la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos han recobrado la atención ya que constituyen la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible para las futuras generaciones.



Emilio Farrés Armenteros  
Director de División Tecnológica de Frutales  
GAG.





Por medio de la presente queremos resaltar el trabajo realizado por los autores: **Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Fátima Isidró n Pérez y Marcos E del Martínez Montero** en la Conservación y manejo de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill y especies afines. Dicha investigación ha permitido describir los materiales genéticos conservados tanto *in situ* y *ex situ* y los riesgos de erosión genética de algunos de estos como el cv. 'Piña blanca'. La caracterización morfoagronómica realizada representa una valiosa información para futuros trabajos a desarrollar en piña y a partir de esta se definieron 15 Descriptores Mínimos que son efectivos para la evaluación de la diversidad, lo que redundará en ahorro de tiempo y esfuerzo en los trabajos de caracterización de germoplasma, facilita el trabajo de los mejoradores y curadores del cultivo en el país y posiblemente de otros países del área que cultivan la piña.

Es de resaltar que por primera vez se utiliza el marcador molecular del tipo SSR en la caracterización de la colección nacional, la cual permitió obtener interesantes resultados y reafirmar los grupos hortícolas que se han establecido para piña y que han sido fuertemente criticado. Además, esta generó una publicación en la revista Scientia Horticulturae (de alto factor de impacto) con gran valor internacional, ya que propone el uso de nuevos cebadores SSR diseñados por los autores para la determinación de la diversidad genética del germoplasma de piña, lo que facilitará a futuros trabajos de caracterización y eliminar una de las limitantes de esta técnica (el uso de cebadores específicos a partir de secuencias conocidas).

Deseo expresar por ello que avalo el trabajo presentado y considero merecedor de premios científico-técnicos.

Dr. Gil A. Enriquez Obregón  
División de Plantas,  
CIGB

## AVAL

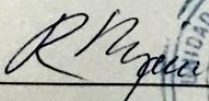
El trabajo titulado: "Determinación de los patrones de diversidad de los recursos fitogenéticos de piña [*Ananas comosus* (L.) Merrill] y especies afines de interés para la producción en Cuba" de los autores: Daymara Rodríguez-Alfonso, Miriam Isidró, José Ignacio Hormaza, María José Grajal, Sandra Petitt, Pedro Villar, Odalys Barrios, Dubiel Alfonso, Zoila Margarita Fundora; de la Universidad Agraria de La Habana como entidad ejecutora principal, aborda un tema de vital importancia en la presente y futura agricultura sostenible como aspira nuestra sociedad: la disminución de la biodiversidad agrícola dada la simplificación de la diversidad en los agroecosistemas. El cultivo de la piña no ha escapado de esta situación y el presente trabajo constituye un valioso aporte a la caracterización de los recursos fitogenéticos para el cultivo de esta planta en el país; para ello es necesario la correcta caracterización morfológica y molecular para determinar la diversidad genética de esta especie que permitirá emprender programas de mejoramiento genético de la misma.

El trabajo presentado alcanza estos objetivos, por, es el resultado de años de esfuerzo por parte del colectivo de la Universidad Agraria de La Habana y el Centro de Bioplasmas materializado en la tesis de doctorado de la primera autora y por su calidad está propuesto como mejor tesis en el tema de las Ciencias Agrícolas

Los resultados alcanzados en el presente trabajo además permitieron proponer un grupo de acciones para la conservación *in situ* y *ex situ* que minimizarán la erosión genética de este cultivo, ya que la conservación *in situ* está en manos de los productores y la *ex situ* es mediante el banco de germoplasma.

Se expresa la prioridad en los cultivos del oriente del país, para potenciar la región donde existe la mayor diversidad de germoplasma conservado en Cuba.

Por todo ello considero que este trabajo es un valioso aporte al desarrollo de los cultivos de piña en el país y posee las condiciones para recibir un aval favorable al premio a que aspira.

  
Dra. Rosalina Berazaín Iturralde  
Profesor Consultante  
Jardín Botánico Nacional  
Universidad de la Habana





# **PUBLICACIONES**



## DIVERSITY OF PINEAPPLE GENETIC RESOURCES IN CUBA: THREATS AND ACTIONS FOR MINIMIZING LOSSES

### DIVERSIDAD DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS DE PIÑA EN CUBA: AMENAZAS Y ACCIONES PARA MINIMIZAR SU PERDIDA

Daymara Rodríguez-Alfonso<sup>1</sup>, Miriam Isidró-Pérez<sup>1</sup>, Dubiel Alfonso-González<sup>1</sup>,  
Maria J. Grajal-Martin<sup>2</sup>, José I. Hormaza-Uroz<sup>3</sup> and Lisset Herrera-Isidró<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Agraria de La Habana, km 23 ½ Autopista Nacional, 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. <sup>2</sup>Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apartado 60, 38200, La Laguna, S/T Tenerife, España. <sup>3</sup>Instituto de Fruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IIISM La Mayora CSIC UMA), 29750 Algarrobo Costa, Málaga, España. <sup>4</sup>Campus Guanajuato, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Instituto Politécnico Nacional, Av. Mineral de Valenciana No. 200, 36275, Col. Frasco Industrial Puerto Interior, Silao de la Victoria, Guanajuato, México.

\*Autor para correspondencia (lherrera@ipn.mx)

#### SUMMARY

Conservation of plant genetic resources (PGR) is essential to preserve diversity and to provide genes for plant breeding. This paper assesses the current status of pineapple PGR diversity in Cuba and actions are proposed to minimize the loss of diversity. *In situ* diversity was evaluated through field trips to different locations across the country, evidence was found that pineapple germplasm diversity is low. Only three (Spanish, Cayenne and Pernambuco) out of the five horticultural groups of this crop are presently planted at Cuba. Red Spanish is the predominant cultivar, and White Pineapple is an endangered one. The highest diversity was found at the Eastern region, where it was possible to find at least two different cultivars from each of these three groups. The *ex situ* pineapple collection contains 56 accessions, 45 % belong to the Spanish group, 20 % to Cayenne and 14 % to Pernambuco, while the rest are hybrids, improved cultivars and other related species. Threats of diversity loss were identified by the Research-Action-Participation method. Farmers and experts agreed that growing of the most common cultivars is being abandoned and consequently, there is high risk of loss of *in situ* diversity. Results document the low diversity of pineapple genetic resources in the country and the need to use *in situ* and *ex situ* conservation approaches as complementary strategies for germplasm preservation for future generations.

**Index words:** *Ananas comosus*, *ex situ* conservation, germplasm, *in situ* conservation.

#### RESUMEN

La conservación de los recursos fitogenéticos (RFG) es esencial para preservar la diversidad y proporcionar genes para el mejoramiento de plantas. Este trabajo evalúa el estado actual de la diversidad de RFG de piña en Cuba y propone acciones para minimizar su pérdida. La diversidad *in situ* se evaluó a través de prospecciones en diferentes lugares del país, lo que evidenció que la diversidad del germoplasma de la piña es baja. Sólo tres (Español, Cayena y Pernambuco) de los cinco grupos hortícolas de este cultivo se cultivan en la isla. Española Roja es el cultivar predominante y Piña Blanca está en peligro de extinción. La diversidad fue mayor en la región oriental, donde fue posible encontrar al menos dos cultivares diferentes de cada uno de estos tres

coincidieron en que se abandona el cultivo de los cultivares más comunes y, por consiguiente, existe un alto riesgo de pérdida de diversidad *in situ*. Los resultados documentan la baja diversidad de recursos genéticos de piña en el país y la necesidad de utilizar enfoques de conservación tanto *in situ* como *ex situ* como estrategias complementarias para la preservación del germoplasma para las generaciones futuras.

**Palabras clave:** *Ananas comosus*, conservación *ex situ*, germoplasma, conservación *in situ*.

#### INTRODUCTION

Conservation and sustainable management of plant genetic resources for food and agriculture (PGRFA) are necessary to guarantee food security for future generations. In the PGRFA context, genetic resource conservation can be performed both *in situ* and *ex situ*, and both are complementary approaches. *In situ* conservation refers to the preservation of natural ecosystems and habitats to guarantee continuity of evolutionary processes is guaranteed; this could include the preservation of traditional cultivars ("on farm" conservation), and associated traditional agricultural methods and knowledge of local farmers. Local producers have played a key role in the creation, maintenance and promotion of genetic diversity, and they have developed skills to meet their specific needs like quality, resistance to pests and pathogens, and adaptation to different soils, water availability and varying climate (Vernooij and Halewood, 2015). *Ex situ* conservation refers to the storage of genetic material in germplasm collections (e.g. vegetative field collections, seeds or *in vitro* culture banks).

Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill.  $2n = 2x = 50$ ) is a

## ARTICLE

### Genetic diversity of Cuban pineapple germplasm assessed by AFLP Markers

Ernis Yanes Paz<sup>1\*</sup>, Katia Gil<sup>2</sup>, Laureano Rebolledo<sup>3</sup>, Andrés Rebolledo<sup>3</sup>, Daniel Uriza<sup>3</sup>, Octavio Martínez<sup>3</sup>, Miriam Isidró<sup>1</sup>, Leyanes Díaz<sup>4</sup>, José Carlos Lorenzo<sup>1</sup> and June Simpson<sup>2</sup>

Received 15 February 2011

Accepted 30 June 2011

**Abstract** - The Cuban pineapple germplasm collection represents the genetic diversity of pineapple cultivated in that country and includes other important genotypes obtained from the germplasm collections in Brazil and Martinique. The collection has previously been characterized with morphological descriptors but a molecular characterization has been lacking. With this aim, 56 six genotypes of *A. comosus* and one of *Bromelia pinguin* were analyzed with a total of 191 AFLP markers. A dendrogram that represents the genetic relationships between these samples based on the AFLP results showed a low level of diversity in the Cuban pineapple collection. All *Ananas comosus* accessions, being the majority obtained from farmers in different regions in Cuba, are grouped at distances lower than 0.20. Molecular characterization was in line with morphological characterization. These results are useful for breeding and conservation purposes.

**Key words:** molecular markers, accessions, *Ananas*.

## INTRODUCTION

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) is an important crop for many countries in Central and South America as well as in the Asia-Pacific region. Most of the pineapple production is based on a few leading cultivars, such as Smooth Cayenne and MD2. In Cuba, Spanish cultivars are predominant.

Pineapple germplasm is maintained in several collections around the world. The most important are the collections maintained by EMBRAPA/CNPMP, in Cruz das Almas, Brazil, by CIRAD-FLHOR, in Martinique, and the USDA collection, in Hawaii. These collections have been partially characterized with morphological descriptors (Leal et al. 1986, Duval and Coppens d'Eeckenbrugge 1993, Ferreira and Cabral 1993, Duval et al. 1996). Cuba maintains a small but still important collection, since it represents the genetic diversity of the cultivated pineapple in that country. Most of the genotypes in the Cuban pineapple germplasm collection at the Bioplants Center (Ciego de Ávila, Cuba) have been obtained from farmers or through exchanges with other collections (Isidró et al. 2003).

Aradhya et al. (1994) and De Wald et al. (1992) have previously used isozyme polymorphism in the genus *Ananas* to clarify taxonomical aspects. However, the scope of these studies is limited due to the low number of markers. Later, Duval et al. (2001) and Duval et al. (2003) used RFLP markers and chloroplast genotypes or genoma to study genetic diversity in *Ananas*. Three hundred and one accessions including all *Ananas* species and the related species *Pseudoananas saganarius* were tested. This technique revealed a higher level of polymorphism since 41 % of the probes were polymorphic. Based on these studies, Coppens d'Eeckenbrugge and Leal (2002) have proposed a simplification for the pineapple classification. In this new classification, the seven *Ananas* species proposed by Smith and Downs (1979) are downgraded to the level of five botanical varieties of *A. comosus*.

AFLP markers (Vos et al. 1995) have also been widely used to study diversity in several species such as *Arabidopsis* (Breyne et al. 1999), coffee (Coulialy et al. 2003), *Rubus* (Marulanda et al. 2007) and *Jatropha curcas* (Santos et al. 2010). The technique has also been employed to identify varieties in pineapple (Leal et al.

<sup>1</sup> Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplantas, Carretera a Morón, km 2, CP 669450, Ciego de Ávila, Cuba. \*E-mail: [eyanes@bioplantas.cu](mailto:eyanes@bioplantas.cu)



# Polymorphic microsatellite markers in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill)



D. Rodríguez<sup>a</sup>, M.J. Grajal-Martín<sup>b</sup>, M. Isidró<sup>a</sup>, S. Petit<sup>b</sup>, J.I. Hormaza<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Plant Biotechnology Laboratory, Agrarian University of Havana, National Highway Km 23 V, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32700, Cuba

<sup>b</sup> Casvarius Institute of Agrarian Research, Apartado 60, 38200 La Laguna, S/T Tenerife, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-La Mayora CSIC-UMA), 29750 Algeciras-Costa, Málaga, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 February 2013

Received in revised form 21 March 2013

Accepted 22 March 2013

### Keywords:

*Ananas bracteatus*

*Ananas comosus*

SSRs

Molecular markers

Germplasm

## ABSTRACT

Simple Sequence Repeats (SSRs), also known as microsatellites, have not been used extensively to study the genetic diversity of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). In this work the performance of existing pineapple-specific microsatellite primers and of primers based on microsatellite sequence information from *Ananas bracteatus* (L.) Merrill are evaluated for the molecular characterization of pineapple genotypes. Of the 20 microsatellite primer pairs specifically developed for pineapple previously reported in the literature, only six were useful in this study; two could be used directly and four could be used after redesign of the primers. In addition, 10 additional new primer pairs were designed based on *A. bracteatus* (L.) Merrill sequences deposited in Genbank, in order to study their transferability to pineapple. A total of 10 SSRs were finally selected that allowed the detection of 26 polymorphic alleles in 6 different pineapple genotypes, representing the main groups of varieties of this crop, averaging 2.6 alleles/locus. Average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.56, and average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.47.  $H_o$  was lower than  $H_e$  for over half of the studied loci. According to Wright's fixation index ( $F$ ) there is a heterozygote deficit in six loci (60%). Average genetic similarity between the studied genotypes was 0.75. The use of the SSR markers described in this work will allow the optimization of pineapple cultivar fingerprinting and diversity studies in germplasm collections.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill,  $2n=2x=50$ ) is the most widely known species of the cultivated members of the Bromeliaceae. Although native from South America, it is currently grown in tropical, subtropical and mild climate regions worldwide due to its adaptability, resistance to drought and easiness of propagation protocols (Smith and Downs, 1979; Coppens d'Eeckenbrugge and Leal, 2003). Exhibiting a delicate taste, this tropical fruit enjoys widespread consumer acceptance whether fresh or processed and has, in addition, found some medicinal applications (Sanewski, 2007). Total world production in 2010 has reached close to 20 million tons with Brazil, Thailand, Philippines Costa Rica and China producing about 50% of the world production making pineapple the third tropical fruit crop in production after bananas and citrus (FAOSTAT, 2012).

Recently, Coppens d'Eeckenbrugge and Leal (2003) have revised pineapple taxonomy, proposing one genus, *Ananas*, with two species *A. comosus* (L.) Merr. (diploid,  $2n=2x=50$ ) and *A.*

*macrodon* Morren (tetraploid,  $2n=4x=100$ ). *A. comosus* would include five botanical varieties: *comosus*, *ananasoides*, *paraguayensis*, *arctifolius*, and *bracteatus*. The cultivated pineapple varieties are included in var. *comosus* and they are usually classified in five phenotypic groups (Py et al., 1987; Pauli and Duarte, 2011): Spanish, Queen, Abacaxi or Pernambuco, Cayenne and Maipure or Perolera. A number of different morphological, biochemical and nucleic acid-based markers have been employed to characterize pineapple germplasm. Morphological markers have, for instance, been extensively applied to analyze the diversity of important pineapple collections, including those of EMBRAPA in Cruz das Almas, Brazil, with over 700 accessions, USDA in Hawaii and CIRAD-FLHOR in Martinique with 600 accessions (Leal et al., 1986; Ferreira and Cabral, 1993; Duval et al., 1997; Coppens d'Eeckenbrugge et al., 2000). Although biochemical markers such as isozymes have also been used to identify pineapple varieties and resolve taxonomic ambiguities, only a handful of isoenzymatic systems are capable of delivering acceptable performance in this species, and even those are not sufficiently polymorphic (DeWald et al., 1992; Aradhya et al., 1994).

Nucleic acid-based markers have, on the other hand, enjoyed much greater success in the field of pineapple genetics (Carlier et al., 2007). For instance, AFLP markers have been used in the

\* Corresponding author. Tel.: +34 952548990; fax: +34 952552677.  
E-mail address: [hormaza@bioin.uma.es](mailto:hormaza@bioin.uma.es) (J.I. Hormaza).



# II. CRYOPRESERVATION OF PLANT GERMLASM: THE CUBAN EXPERIENCE

Martinez-Montero ME.

University of Ciego de Avila, Bioplasmas Centre, 69450 Ciego de Avila, Cuba. E-mail: [marcosm@bioplasmas.cu](mailto:marcosm@bioplasmas.cu)

Cryopreservation is currently the only safe and cost-effective method for long-term storage of plant germplasm. In Cuba, the research on cryopreservation began in 1994 at the Bioplasmas Centre University of Ciego de Avila with the general objective to evaluate and develop feasible cryopreservation techniques for crops of great commercial importance of the province. In this sense, sugarcane and pineapple are considered examples. It has been possible by the scientific and financial support from the International Plant Genetic Resources Institute and the International Foundation for Science. In the case of sugarcane, a cryopreservation methodology for embryogenic calluses using a simplified procedure of slow cooling was established. The effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes and the field performance of plants both derived from cryopreserved sugarcane calluses has been studied. Recently, a droplet-vitrification procedure applicable to sugarcane somatic embryos clusters was developed too. In the case of pineapple, a vitrification procedure was used to cryopreserve apices sampled from in vitro plantlets and ovule excised from ovary of inflorescence, and simplified freezing process was applied to calluses. Moreover, the application of cryopreservation methodology for different accessions and related species has been tested successfully for pineapple apices.



Laboratorio de Investigaciones en Criobiología (LIC)  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario  
Suipacha 570 (S2002LRK) Rosario  
Argentina

Conferences and Abstracts from the

## 2<sup>ND</sup> WORKSHOP IN CRYOBIOLOGY OF MEDICAL SCIENCES



**Application of cryopreservation techniques of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) germplasm for long-term storage.** Martinez-Montero, ME<sup>1</sup>, Gonzalez-Arnan, MT<sup>2</sup>, Benega, R<sup>1</sup>, Martinez, J<sup>1</sup> and Engelmann, F<sup>3</sup>. <sup>1</sup>*Centro de Bioplasmas, UNICA, Car Moron km9, CP 69450, Ciego de Avila, Cuba;* <sup>2</sup>*Universidad de la Habana, Fac de Biología, Calle 25 e/ I y J, Vedado, La Habana, Cuba;* <sup>3</sup>*IPGRI, Via delle Sette Chiese 142, 00145 Rome, Italy.*

The application of cryopreservation techniques to pineapple germplasm could help to overcome various problems for this crop. Storage at ultralow-temperature of pineapple apices constitutes an alternative for this crop since its germplasm is normally stored in field genebanks that are prone to disease, or damage through natural disaster and need very high maintenance. Long-term storage in liquid nitrogen of pineapple ovules would facilitate crossing of plants grown at different places and/or with different flowering periods. It would also reduce contamination risks resulting from exchange of

---

plants between breeders nationally and internationally. Moreover, cryopreservation of pineapple calluses could provide a means of effective source of material when *in vitro* screening of germplasm for fusaric disease would be attempted. The aim of the current presentation is to report the suitability of application cryopreservation protocols for pineapple apices, ovules and embryogenic calluses. Vitrification procedure was used successfully to storage apices sampled from *in vitro* plantlets and ovules excised from ovary of inflorescence, and simplified freezing process was applied to calluses of pineapple. With apices, optimal conditions included a 2-d preculture on solid medium supplemented with 0.3M sucrose, loading for 25min at 25°C in liquid medium with 0.4M sucrose + 2M glycerol, treatment with PVS3 vitrification solution at 0°C for 7h before rapid immersion in liquid nitrogen. Fully developed plantlets could be obtained from cryopreserved apices. With ovules the protocol included a 12h preculture in liquid medium with 0.3M sucrose, loading treatment for 25min at 25°C in medium with 0.4M sucrose + 2M glycerol, treatment with PVS3 at 0°C for 90min before direct



## ESTRATEGIA CRIOGÉNICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE PIÑA (*Ananas comosus* var. *Comosus*)

Cryogenic strategy for the establishment of a germplasm bank of pineapple (*Ananas comosus* var. *Comosus*)

Ariel Villalobos Olivera<sup>1</sup>, Roberto Méndez Pelegrín<sup>1</sup>,  
Lelurlys Nápoles Borrero<sup>2</sup>, Justo González Olmedo<sup>2</sup>,  
Alitza Iglesias Alfonso<sup>2</sup>, Julia Martínez Rodríguez<sup>2</sup>,  
René C. Rodríguez Escriba<sup>2</sup>, Gustavo Y. Lorente González<sup>2</sup>,  
Nicolás Quintana Bernabé<sup>1</sup>, Romelio Rodríguez Sánchez<sup>2</sup>,  
Fernanda Vidigal Duarte Souza<sup>3</sup> y Marcos E. Martínez Montero<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** In pineapple have been used cryopreservation protocols based on a vitrification procedure. However, the influence of some technical factors is still unknown to achieve a strategy cryogenic routine application to a wide range of genotypes. Furthermore, there has been no histological analysis to display any structural changes during a process of cryopreservation. In the present investigation different technical aspects of a cryogenic strategy are determined to increase survival levels from the apexes to immersion in liquid nitrogen. These were: type of apex, consisting of 3-4 leaf primordia with an approximate size of 2,5-3mm; preculture 0,3 mol L<sup>-1</sup> sucrose; application of the loading solution 0,4 mol L<sup>-1</sup>+2 0,4 mol L<sup>-1</sup> mol glycerol; application temperature of the vitrification solution PVS2 at 0 °C for 420 min. The analysis of the display of structural changes in the cryopreserved apices revealed that the meristematic cells in the apical dome and leaf primordia in formation, suffered few cellular alterations and kept almost intact its morpho-physiological characteristics in the best conditions of survival. The method of vitrification was applied successfully for 9 accessions of the *in vitro* genebank of Bioplant center. This is an important step for the establishment of a gene bank for long-term cultivation of pineapple.

**RESUMEN.** En la piña se han utilizado protocolos de crioconservación basados en un procedimiento de vitrificación. Sin embargo, se desconoce aún la influencia de algunos factores técnicos para lograr una estrategia criogénica con una aplicación de rutina a un amplio número de genotipos. Además hasta la fecha, no se han realizado ningún análisis histológico para visualizar cambios estructurales durante un procedimiento de crioconservación. En la presente investigación se determinaron diferentes aspectos técnicos de una estrategia criogénica para aumentar los niveles de supervivencia de los ápices a la inmersión en nitrógeno líquido. Estos fueron: tipo de ápice, compuesto por 3-4 primordios foliares con un tamaño aproximado de 2,5-3mm; precultivo en 0,3 mol L<sup>-1</sup> de sacarosa; aplicación de la solución de carga 0,4 mol L<sup>-1</sup>+2 0,4 mol L<sup>-1</sup> glicerol; temperatura de aplicación de la solución vitrificadora PVS2 a 0 °C durante 420 min. El análisis de la visualización de los cambios estructurales ocurridos en los ápices crioconservados reveló que las células meristemática presentes en el domo apical y los primordios foliares en formación, sufrieron pocas alteraciones celulares y mantuvieron casi intacta sus características morfo-fisiológica en las mejores condiciones de supervivencia. Se aplicó de manera exitosa un procedimiento de vitrificación para nueve accesiones del banco de germoplasma *in vitro* del centro de Bioplantas. Lo anterior constituye una importante etapa para el establecimiento de

# CARACTERIZACIÓN DEL GERMOPLASMA DE PIÑA COLECTADO EN CUBA MEDIANTE PROSPECCIÓN NACIONAL: I. LOCALIZACIÓN, DIVERSIDAD GENÉTICA Y SITUACIÓN ACTUAL

Miriam Isidró<sup>\*</sup>, Yamila Rosales, A. Pifferrer, A. Cisneros, R. Benega y Carol Carvajal

**ABSTRACT.** An important effort to collect pineapple genotypes in Cuba and rescue the biggest species genetic diversity, by means of national prospecting, has been made during the latest years. A number of 59 accessions were collected, many of them recognized and described for the first time in Cuba. In general terms, the collected accessions could be divided into three main groups: Cayenne, Red Spanish and Pernambuco, the Red Spanish being the predominant variety. The white pineapple or Cuban pineapple is restricted to a few farmers, that is why its perpetuity could be in danger. Some types of Cayenne were collected. "Cabezona" or Puerto Rico pineapple is only grown in Holguín and in some local farms of Guantánamo. The main pineapple-growing area belongs to the state sector, mainly in Ciego de Ávila. Even though it is possible to find farmers with much training on pineapple crop, there is not a great tradition in areas of the middle and the west parts of Cuba. Some difficulties as to plantation management and plant disease control are still detected. Farmers treasure up the biggest part of the cultivated pineapple diversity in the country. The accessions placed in the pineapple active germplasm bank will be preserved for its study and use on future genetic breeding works.

**Key words:** genetic resources, *Ananas comosus*, plant collections, *ex situ* conservation

## INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria mundial, y contribuyen al sustento de todas las personas en la Tierra. Estos recursos son la materia

**RESUMEN.** Un importante esfuerzo por coleccionar, mediante prospecciones nacionales, los genotipos de piña presentes en el país y rescatar la mayor diversidad genética posible de la especie, se ha venido desarrollando en los últimos años. Se logró la colecta de 59 accesiones en el territorio nacional, muchas de las cuales se recogen y describen por primera vez en Cuba. De forma general, las accesiones colectadas pueden incluirse en tres grupos fundamentales: Cayena, Española roja y Pernambuco. La variedad predominante es la Española roja. La Piña blanca o Piña de Cuba está circunscrita a unos pocos productores, por lo que puede peligrar su perpetuidad. Se colectaron individuos de distintos tipos de Cayena lisa. El cultivar Cabezona o Puerto Rico solo se cultiva en Holguín y en algunas localidades de Guantánamo. La mayor área de producción de piña corresponde al sector estatal, principalmente en Ciego de Ávila. Aunque hay algunos agricultores con conocimientos del cultivo de piña, en muchas localidades de las zonas centrales y occidentales no hay una gran tradición de su cultivo. Existen problemas en cuanto a las atenciones culturales y fitosanitarias del cultivo. Los campesinos atesoran la parte de la diversidad de las piñas cultivadas en el país. La siembra de estas accesiones en el banco de germoplasma activo de piña del Centro de Bioplasmas permite su conservación para su estudio y utilización en futuros trabajos de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** recursos genéticos, *Ananas comosus*, colecciones de material genético, conservación del germoplasma

prima más importante de los fitomejoradores y el aporte más imprescindible para los agricultores (1).

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es uno de los principales frutales del mundo. Es cultivada con el fin de satisfacer necesidades alimentarias de la población y constituye además un importante renglón para las economías locales (2).

Las bases genéticas con que cuenta el país en este género son insuficientes. Cuba no se encuentra en las regiones de origen de esta especie; sin embargo, el cultivo de la piña se remonta desde finales del siglo XIX con la entrada de inmigrantes del Caribe y otras partes de América, los cuales tuvieron asentamientos en algunas

Dra.C. Miriam Isidró, Profesora Titular; A. Cisneros, Investigador; Dr.C. R. Benega, Investigador Auxiliar; Carol Carvajal, Especialista del Departamento de Genética, Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). Carretera a Morón km 9, Ciego de Ávila. CP 69450. Yamila Rosales y Ma.C. A. Pifferrer, Investigadores Agregados del Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal, Gaveta Postal 41, Holguín CP 80100.

<sup>\*</sup> misidron@biotec.isch.edu.cu

# ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE LA COLECCIÓN NÚCLEO DEL GERMOPLASMA CUBANO DE PIÑA (*ANANAS COMOSUS* L.) Y ESPECIES AFINES

Daymara Rodríguez Alfonso<sup>1</sup>, Miriam Isidró Pérez<sup>1</sup>, Odalys Barrios Govín<sup>2</sup>, Lucy Andraca Collazo<sup>1</sup> y Zoila Fundora Mayor<sup>2</sup>

## RESUMEN

Las colecciones núcleo juegan un importante papel en el manejo y conservación de los recursos genéticos. Se establece una colección núcleo para el germoplasma cultivado de piña en Cuba, partiendo de los resultados obtenidos de la caracterización morfoagronómica de 48 accesiones de la colección base. Se realizó un Análisis de Conglomerados a partir de los descriptores seleccionados, siguiendo el criterio de agrupamiento de Ward y se efectuó una selección estratificada de las accesiones. Para validar la colección se comprobó que la diversidad molecular seleccionada fue adecuada. La representatividad de la variabilidad de los atributos cuantitativos y cualitativos se verificó a través del coeficiente de Dhiwan y de la correlación de Spearman, respectivamente. El patrón de variabilidad de la colección evidenció tres clases, correspondientes a los grupos hortícolas reportados. El ACP demostró la baja variabilidad genética presente en el germoplasma de piña. Se seleccionaron 16 accesiones para conformar el núcleo, donde se maximizó la distancia genética, especialmente expresada por los SSR. El criterio del curador y la distribución geográfica permitieron una selección adecuada de los materiales, en su gran mayoría proceden de la región Oriental. Los valores de la variabilidad tanto cuantitativa (Dhiwan no modificado 87 % y Dhiwan modificado 112 %) como cualitativa ( $R_s=0,980^{**}$ ) demostraron la certeza en la selección. La colección núcleo incluyó, además de las accesiones cultivadas, tres especies afines, que representó el 33,3 % de la colección base correspondiente.

**Palabras claves:** *Ananas comosus*, colección núcleo, germoplasma de piña

Establishment and validation of core collection from Cuban germplasm of pineapple (*Ananas comosus* L.) and related species

## ABSTRACT

Core collections are useful tools for management and preserving of genetic resources. A core collection for the cultivated germplasm of pineapple was established from the results obtained on the morphoagronomic characterization of 48 accessions of the base collection. A Cluster Analysis was carried out with the descriptors selected, following the criterion of Ward's cluster, and a stratified selection of the accessions was also performed.

M.Sc Daymara Rodríguez Alfonso, Profesora-Investigadora del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Calle 2, esquina a 1, Santiago de las Vegas, Boyeros, CP 17200, La Habana.

✉ maviak@umh.edu.cu



### Genetic Characterization of the Cuban Pineapple Collection by RAPD

Daymara Rodríguez<sup>1\*</sup>, Miriam Isidoro<sup>1</sup>, José I. Hormaza<sup>2</sup>, Sandra Petit<sup>2</sup>, Pedro Villar<sup>1</sup>, María José Gracia<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology laboratory, Agronomic Faculty, Agrarian University of Havana, Cuba \*E-mail:

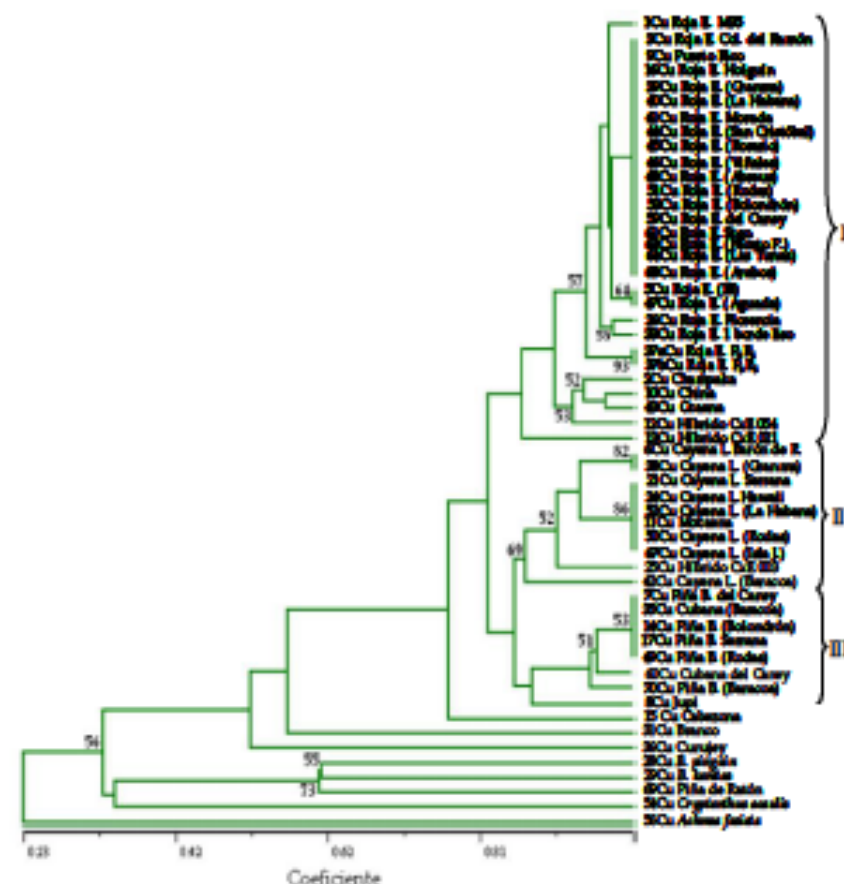
mailto:maytak@tsch.edu.cn

<sup>2</sup> E.E. "La Mayora"-CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga, 29750, Spain

<sup>2</sup> Canadian Institutes for Agronomic Researches, Spain.

In order to genetically characterize the Cuban pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) germplasm collection, some genomic experiments were developed at Agronomic Faculty in Agrarian University of Havana.

Cuba, in collaboration with Canarian Institute for Agronomic Researches and Experimental Station of "La Mayola" in Spain. We carried out the molecular characterization of this collection with RAPD markers, from 55 pineapple accessions and specimens from closely related species. In the present work, a molecular characterization of this bank was undertaken by RAPD, using seven decamer oligonucleotide primers to amplify the collection. A total of 57 polymorphic RAPD bands were generated with probed combinations. All primers yielded polymorphic bands in numbers ranging from 5 to 14. Primer OPA-16 produced the highest number of polymorphisms, followed by OPF-06 and CS-12. When different pineapple genotypes were compared, their genetic similarity indexes exhibited an average of 0.76, ranging from 0.11 to 0.98. Most cultivars clustered into three horticultural groups: Spanish, Cayenne and Pernambuco, although some isolated cases fell outside these clusters. We conclude that the genetic diversity of the collection is low; a problem that may be solved by incorporating accessions carrying genes conferring resistance to the main biotic and abiotic factors that affect crop yields from other centers of origin.



**Figure 1.** Dendrogram showing diversity of Cuban pineapple germplasm collection by RAPD marker (Simple Matching coefficient and UPGMA).



Evaluación del comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en la fase de aclimatización. Valuation of pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.) hybrid CBCE-116 *in vitro* plants with different types of substrates in the acclimatization phase.

Ing. Neysis Pérez-Fernández  
Dr. C. Lydia Galindo-Menéndez.  
Ing. Miriam Peláez-Peláez  
Téc. Eblis Rodríguez-Obrador

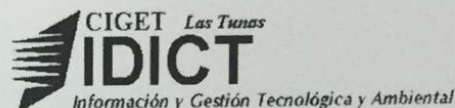
#### RESUMEN

El trabajo se desarrolló en la fase de aclimatización de la Universidad de Las Tunas, en el período comprendido desde el 21 de junio hasta el 20 de septiembre del 2007, con el objetivo de evaluar el comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.), en el híbrido CBCE-116 con diferentes combinaciones de sustratos orgánicos. Los sustratos utilizados fueron: Humus de Lombriz, Cachaza y Zeolita con diferentes proporciones. Se evaluaron cinco tratamientos. Las variables fisiológicas evaluadas fueron: porcentaje de supervivencia, número de hojas activas, ancho y largo de hoja D, diámetro del tallo, longitud máxima, media y número de raíces, peso fresco, seco de las hojas y raíces. Los resultados fundamentales obtenidos demuestran que el mejor tratamiento fue cachaza 100 % en porcentaje de supervivencia, en la mayoría de las variables fisiológicas estudiadas y valoración económica.

Palabras claves: aclimatización, *Ananas comosus*, cachaza, humus de lombriz, plantas *in vitro*.

#### ABSTRACT

This work was developed in the acclimatization phase of the University Center of Las Tunas, in the period from June 21 to September 30 of 2007, with the objective to evaluate the behaviour of plants *in vitro* of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) hybrid CBCE-116 with different kinds and combination of organic substrate. These substrate used were: casting of worms, filter cake and zeolite in different proportions. There were evaluated five treatments. The physiological evaluated variables were: percentage of survival, number of active leaves, length and wide leaf "D", fresh and dry weight of leaves and roots, diameter of the pseudostem, maximum length, medial length, root number, weight, dry leaves and roots. The treatment with sugarcane residuals or filter cake had a 100 % effectiveness in economic valuation and most of the physiological variables studied.



## CERTIFICACIÓN

Se certifica que el artículo técnico:

Evaluación del comportamiento de plantas in Vitro de piña (Ananas comosus (L) Merrill) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en la fase de aclimatización.

De la autora:


Ing. Neysis Pérez Fernández

Ha sido publicado en la Revista Electrónica "Innovación Tecnológica" del Centro de Información y Gestión Tecnológica y Ambiental del CITMA de Las Tunas.

Vol. 17 No. 4 Diciembre 2011

ISSN-1025-6504  
RNPS-1813  
SCPSCT-0406306

Y para constancia, se expide el presente documento en Las Tunas, a los 11 días del mes de enero del 2012. "Año 54 de la Revolución"

  
Lic. María de Jesús Lozano Ávila  
Directora

Tomo 004 No. 227  
<http://innovacion.ciget.lastunas.cu>  
<http://www.latindex.org/larga.php?opcion=1&folio=4348>  
EBSCO. FUENTE ACADÉMICA.  
REDALYC. Innovaci%F3n%20Tecnol%F3gica/

Bajada de La Virgen de Las Nieves 2010. Santa Cruz de La Palma

## Protejamos nuestros montes como seña de identidad



**922 42 92 92**  
**CECOPIN 24 Horas**



## Cultivos SUBTROPICALES

Bajada de La Virgen de Las Nieves 2010. Santa Cruz de La Palma.

# La piña, caracterización morfológica y molecular



La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es originaria de Sudamérica y pertenece a la familia Bromeliaceae. Entre los frutos tropicales destaca por su gran aceptación entre los consumidores.

Su importancia se debe a sus elevados valores nutritivos, como es, el alto contenido de vitamina C, su agradable sabor, sus posibilidades de industrialización, así como a su belleza para la comercialización como fruto fresco. Desde el punto de vista económico, su interés es debido a los altos precios que alcanza en el mercado tanto en fresco como en producto procesado.

Para las variedades comerciales Pyretrol (1987) establecieron cinco grupos hortícolas: Cayena, Española, Majur, Queen y Abacaxi, atendiendo fundamentalmente a caracteres morfológicos tales como hojas con o sin espinas, brácteas florales, tamaño y forma del fruto (sincarpio).

Dentro de los cultivos comerciales destaca Cayena Lisa por su agradable sabor, consistencia, elevado contenido de azúcares totales (brix), alto potencial de rendimiento y buenas características organolépticas, tanto para el consumo fresco como para el procesado de conservas. Así como también el cultivar MD<sub>2</sub>, que en estos momentos ha ido desplazando del mercado a los distritos cultivares, con un considerable incremento en las áreas destinadas a la producción piñera.

En Canarias, la mayor parte de las superficies cultivadas de piña se encuentran en la Isla del Hierro y están constituidas por 'Raja Española', aunque en estos momentos se está aumentando la plantación del cultivar MD<sub>2</sub>.

En el caso de Cuba, hay una pequeña representación de los cultivares, donde destaca Raja Española, presente en la mayor parte del país, dada su gran rusticidad y adaptabilidad a las condiciones edafoclimáticas. En menor proporción cultivares de los grupos hortícolas Cayena y Abacaxi, hacia la zona oriental y central del país.

Se está desarrollando una Tesis de Máster con el objetivo de caracterizar morfológica y molecularmente las colecciones de los germoplasmas de piña tropical de Canarias y de Cuba, con las colaboraciones del Departamento de Fruticultura Tropical del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, la Estación Experimental "La Mayaza" y el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria de La Habana.

La caracterización morfológica se realiza atendiendo a los descriptores internacionales establecidos para esta especie (IPG CI<sub>9</sub>, 1991) que incluyen caracteres en la planta como altura, diámetro, color de las hojas, espinosidad, ancho, cámbrio y largo de la hoja D (la más joven de las hojas desarrolladas), ofrece mayor información del estado de la



planta), forma del fruto, color, número de ojos, Brix y acidez titulable entre otros.

Y en lo que respecta a los estudios moleculares, se trabaja con varios tipos de marcadores: los RAPD (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico) y microsatélites (SSR), ambos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para detectar el polimorfismo entre los genotipos.

Los resultados de esta investigación permitirán una mejor identificación de las accesiones del germoplasma canario y cubano, lo cual favorecerá la correcta identificación varietal, tanto mediante parámetros morfológicos como moleculares. Esta información podrá ser utilizada para un manejo mejor y más racional de las colecciones, que a su vez permitirá la selección adecuada de progenitores en estrategias de mejoramiento genético para la obtención de nuevos cultivares, la eliminación de duplicaciones, poder construir colecciones nucleares y poner al alcance de los productores genotipos y variedades correctamente identificados.

**Daymaria Rodríguez Alfonso**

Laboratorio de Biotecnología - Facultad de Agronomía  
Universidad Agraria de La Habana - Cuba

### Bibliografía

- Lopeschitz, J. and Tesson, C. 1987. The pineapple: Cultivation and uses. CIP Monograph 4. La Haya, París, p. 568.
- IPG CI<sub>9</sub> (1991). Descriptors for Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). London: CAB International.



## News From Cuba

### ***Cryogenic Strategy For The Establishment Of Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill) Germplasm Bank At Bioplantas Centre (Cuba)***

Martínez-Montero M.E.\*, Méndez-Pelegrín R. & Martínez J.

Bioplantas Centre, Carretera a Morón Km 9 CP 69450. University of Ciego de Ávila, Ciego de Ávila. Cuba. Teléf: (53-33)224016/225768. Fax: (53-33)266340. \*e-mail for correspondence: [marcosem@bioplantass.cu](mailto:marcosem@bioplantass.cu)

Cryopreservation of pineapple tissue has been based on protocols using the vitrification procedure. However, further research is necessary to identify the different technical factors required to obtain the appropriate cryogenic strategy for routine application to a wide number of genotypes. Moreover, the visualization of structural changes during the development of a cryopreservation procedure for pineapple has not been accomplished until now. For the above reasons in the present research different key technical issues were determined during the establishment of a cryogenic strategy to induce dehydration tolerance to a highly concentrated vitrification solution to improve the survival rates for *in vitro* grown shoot tips of pineapple after immersion in liquid nitrogen (LN). The best established conditions were: type of shoot tip (consisted in meristematic dome area and 3-4 primordial leaves 2.5 – 3 mm in size); 2 days of preculture in 0.3 mol L<sup>-1</sup> sucrose; application of the loading solution (0.4 mol L<sup>-1</sup> sucrose + 2 mol L<sup>-1</sup> glycerol) for 25 min at 25°C; 7 hours of dehydration at 0°C with plant vitrification solution number three (PVS3: 50% w/v glycerol + 50% w/v sucrose). With these best conditions, histological analysis of the structural changes of cryopreserved pineapple shoot tips revealed that only cells localized in the meristematic area and in young leaf primordia had a few cellular alterations while their morpho-physiological characteristics remained almost intact. Moreover, the vitrification procedure was successfully applied to nine accessions of the *in vitro* collection at Bioplantass Centre. These results constitute a very important step in the

## **Session II Crop Management**

### **Some sustainable practices in pineapple cultivation in Cuba**

Isidró Miriam (1), Rodríguez Daymara (1), Valera Evelyn (1), Roque Ariannys (1), Isaac Elizabeth (2), Hinds D (3)

(1) Universidad Agraria de La Habana, Autopista Nacional km 23, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba, (2) Centro de Magnetismo, Universidad de Oriente, Cuba, (3) Organic Pineapple Working Group (OPWG-ISHS), Guadalajara, México, [biotec@isch.edu.cu](mailto:biotec@isch.edu.cu)

Pineapple cultivation has been a tradition of Cuban farmers since 1850 or even before that; stories counted by old farmers said that it was one of a well appreciated food for Cuban fighters, in the liberation war developed two centuries ago. The main cultivar used is cv. Red Spanish. There are two main clones of Red Spanish: "Pinareña type" and "Camagüeyana type", both with reddish green leaves and oval fruit shape, deep "eyes", but different in spine distribution on leaf margins (more regular and curved in "Camagüeyana") and more vigorous plants in the same type. Soils used on pineapple farms in Cuba are very diverse: sandy soils, loam, red or black clay soils, someones over limestone rocks or other different ones. Propagation materials are mainly slips, collected three-five months after fruit harvest. Chemical fertilization is not a common practice, but organic products are used such as humus, "cachaza" (a by-product from sugar cane waste). Weed control and moisture conservation is favoured by mulching with squashed sugar cane stems placed between pineapple plants rows. Some biological control practices of pests are rather frequent, as for example: *Trichoderma viridis* for control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, the main fungal disease in Cuban pineapple plantations. Other serious diseases such as *Penicillium* sp or *Fusarium subglutinans* have not been detected in Cuba. Some insects from Simphyliia class and the fruit borer *Strymon megarus* have also not been seen so far. Some types of Scarabidae family (*Phylophaga*, *Ciclosephala* and *Anomala*) are well represented, being named as named "Gallegos" by the farmers, who use simple light traps to catch the adults of these pests at night, with very good results. The biological control with *Beauveria bassiana* is also sometimes used. Some other practices are related to intercropping with banana, plantain, other fruit plants (mango, avocado, annonaceae) or tropical tubers (cassava, sweet potatoes or yam), mostly done under family agriculture conditions on farms called "conucos". These are often located on hilly lands, where level curves are used to avoid soil erosion. Some of these practices have helped farmers to produce pineapple at lower costs and under more sustainable conditions.

### **'Red Spanish' Continues to be "the Queen" of Pineapples Cultivated in Cuba**

Miriam Isidró Pérez 1, Aroldo Cisneros Peña 2, Yamila Rosales Simonnot3, Argelio Pi Ferrer Escalona3 .

1. Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana, Cuba. biotec@isch.edu.cu
2. Centro de Bioplantías, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
3. Jardín Botánico, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Holguín, Cuba.

In a national effort to identify the pineapple cultivars being grown in Cuba, prospecting was done throughout the country and 59 accessions were collected. The collecting expeditions were made between 1998 and 2005 in 13 of the 14 provinces in the country and included 24 municipalities. The sampling showed that 'Red Spanish' was the main cultivar present in the fields in the country. More than 92% of the prospected areas (including governmental enterprises, small or larger farms and small family yards) support their pineapple production growing 'Red Spanish'. There were two principal clones of 'Red Spanish' and both have reddish green leaves, an oval fruit shape, and deep eyes. The *Camagüeyana* type can be distinguished from the *Pinareña* type by the more regular and curved spine distribution on the leaf margins and the greater vigor shown by this clone. Some differences in crown forms were observed, particularly the presence of small crowns adjacent to the principal one, but there were no fasciation in any of the 'Red Spanish' accessions. Soils used in pineapple farms in Cuba are very diverse and include sandy, loam, and red and black clays. Some soils are over limestone rocks or other parent materials, but we always found well-developed 'Red Spanish' plants if there were no drainage problems, nutritional deficiencies or high pH conditions in the field. We found commercial plantings of 'Red Spanish' pineapple growing from sea level up to 1200 m, but better plants grow around 25 to 250 m. No chemical fertilization is frequently used by farmers, organic composts and mulches were used in some places, and irrigation practices are not usual. Some other pineapple cultivars were found in prospecting work including 'Smooth Cayenne', 'Cabezona', 'Piña Blanca' and 'Piña de Cuba', but none of the plantings were of commercial size. 'Piña de Cuba' is threatened because no more than 150 plants were encountered throughout the country, but that is a theme for another comment. All results indicated that 'Red Spanish' represents a very well adapted pineapple genotype in Cuba.

### **Estimating the Weight of Pineapple Fruits**

Ing. Lorenzo Donis García and Dr. Oscar Fernández García, Univercidad de Ciego de Ávila, Cuba. E-mail: pfa\_lorenzod@agronomia.unica.cu

#### **National Pineapple Germplasm Prospection in Cuban Republic**

Isidró M.<sup>1</sup>; Rosales Y.<sup>2</sup>; Cisneros A.<sup>3</sup>; Pi Ferrer A.<sup>3</sup>; Benega R.<sup>3</sup>; Carvajal C.<sup>3</sup>; Hidalgo M.<sup>3</sup>; Viera Y.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Bioplantías, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9, CP 069430, Ciego de Ávila Cuba. misidro@bioca.unica.cu

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología de Holguín.

Cuba is not placed in pineapple original area, but fruits were present before Spanish colonization, presumably from *La Española* or another near Caribbean lands. The collect was organized diving in three parts: west, central and east regions (one by year), during June - July (1999 -2001), in natural fruiting time. The aims were collecting by means of national prospecting the pineapple genotypes in our country and rescue the biggest part of genetic diversity in the specie. A number of 67 accessions were collected, many of them are described for the first time. Accessions collected could be included in three fundamental groups: Red Spanish, Cayenne and Pernambuco. The domain variety is Red Spanish c.v. "Pinareña" and "Camagüeyana", but differences in spiny leaves, fruit color and sucker presence are presents. The "Piña Blanca" or Cuban pineapple, a very sweet and soft genotype, but is enclosed to a few farmers, that is why its perpetuity could be in danger. Some types of Smooth Cayenne were collected, "Serrana" well adapted clone and "Cayena de Oriente" with radish leaves. "Cabezona" is only grown in Holguín and Guantánamo local farm. The biggest prospected areas belongs to farmers with very good tradition in pineapple culture and also we included wild areas for same purpose. The accessions placed in the National Pineapple Germplasm Bank, at the

Ananas, the importance of a geographic component of variation, and the existence of a higher genetic diversity in the North of South America. Pineapple taxonomy has been revised. Genetic mapping was based on isozyme, RAPD, AFLP and SSR markers and carried out on a hybrid progeny between *A. bracteatus* and *A. comosus*, following the pseudo-testcross approach. It resulted in a first map of 336 and 154 DNA markers distributed in 46 and 31 linkage groups for these two species. New sources of resistance to fusariosis have been identified, some of which show other interesting traits for the Brazilian producers. According to the first inheritance studies, this resistance seems monogenic and dominant, a result still to be confirmed. Self-progenies obtained from the cultivars Perolera, Primavera, and Roxo de Tefé, showed inbreeding depression, but normal segregation for major leaf traits (spininess, color).

#### **Variation for Main Quantitative Traits in the Seedling and Vegetative Cycles of Pineapple Hybrids**

J.R.S. Cabral<sup>1</sup>; Ö. Coppens d'Eeckenbrugge<sup>2</sup>; A.P. de Matos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal 007, 44380-000 Cruz-das-Almas, Bahia, Brazil.

<sup>2</sup>CIRAD-FLHOR/IGRI, c/o CIAT, A.A. 6713, Cali, Colombia.



[Go to AGRIS search](#)



Try it!

## Caracterización de piña tropical (*Ananas comosus* L. Merrill) y especies afines Rodríguez Alfonso, D.

<b>Corporate author</b>	Centre International de Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes, Zaragoza; Universitat de Lleida
<b>Publisher</b>	CIHEAM-IAMZ, Zaragoza (Spain)
<b>Date of publication</b>	2010
<b>AGRIIS Categories</b>	Plant genetics and breeding
<b>AGROVOC English terms</b>	Pineapples; <i>Ananas comosus</i> ; Bromeliaceae; Germplasm; Cuba; Canary Islands; Rapd; Microsatellites
<b>AGROVOC French terms</b>	Ananas (fruits); <i>Ananas comosus</i> ; Bromeliaceae; Germplasm; Cuba; Canaries (Iles); Rapd; Microsatellite
<b>AGROVOC Spanish terms</b>	Pina; <i>Ananas comosus</i> ; Bromeliaceae; Germoplasma; Cuba; Canarias; Rapd; Microsatellites
<b>Free keywords</b>	<i>Ananas bracteatus</i>
<b>Language</b>	Spanish
<b>Notes</b>	Master Thesis
<b>Type</b>	Bibliography
<b>Type</b>	Non-Conventional
<b>Type</b>	Summary
<b>Type</b>	Thesis or Dissertation
<b>Pagination</b>	155 p
<b>Abstract (English)</b>	

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) is a member of Bromeliaceae that originates from South America, although it is currently cultivated in all the continents. In this work, several germplasm collections of this species from Cuba and the Canary Islands have been characterised through morphological and molecular markers, such as Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPDs), and microsatellites (SSRs). The morphological descriptors include a group of qualitative and quantitative traits established by IBPGR for pineapple. Based on the interspecific transferability of SSR loci, the primers used in this work for microsatellite analysis were designed from *A. comosus* and *A. bracteatus* sequences. The molecular characterisation through SSR and RAPD markers of the plant material revealed the great usefulness of these markers in molecular identification and characterisation of pineapple genetic diversity. The groups obtained with the molecular analyses agreed with those obtained through phenotypic characterisation. RAPD markers were more sensitive than SSR markers when detecting genotype differences inside the main groups. The results obtained in this work indicate that it would be desirable to increase the genetic diversity of the collections studied through the inclusion of additional germplasm from other origins, and the use of additional SSR loci



CIHEAM  
Centro Internacional de Altos Estudios  
Agroalimentarios Mediterráneos  
Instituto Agroalimentario de Zaragoza



Universitat de Lleida

Master Internacional en  
Master International en  
International Master-on

# MEJORA GENÉTICA VEGETAL AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE VÉGÉTALE PLANT BREEDING

## TRABAJO MONOGRAFICO

Mejoramiento genético de la piña  
(*Ananas comosus* (L.) Merrill)

Daymara Rodríguez Alfonso

# LIBROS

## La biotecnología una herramienta en el mejoramiento de la piña

Autores: Miriam Isidró Pérez<sup>1</sup>, Daymara Rodríguez-Alfonso<sup>1</sup>, Guillermo Pérez García<sup>2</sup>, Marcos Martínez-Montero<sup>3</sup> y Lourdes Yabor Cabrera<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana

<sup>2</sup> Universidad de Ciego de Ávila

<sup>3</sup> Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila

La piña [*Ananas comosus* (L.) Merr] pertenece a la familia *Bromeliaceae*, esta es la más conocida de las 2 921 especies agrupadas en 56 géneros que comprenden a la familia (García y Serrano, 2005). Es el tercer frutal tropical con mayor importancia, después del banano y los cítricos. Su producción, a escala mundial en el año 2011 fue de 21 865 383 t, en el que destaca el continente asiático con 9 596 337 t (50% de la producción), seguido de América con 6 901 786 t, mientras que en Cuba fue de 70 920 t (FAOSTAT, 2013).

El cultivo de la piña se realiza con el fin de satisfacer necesidades alimentarias de la población, debido a que sus frutos son muy apreciados por su excelente sabor en el consumo fresco y procesado, así como por sus propiedades culinarias y medicinales. En la actualidad, en Cuba, su producción para fruta fresca ha ganado un importante mercado dentro de fronteras para la captación de divisas, y ya ha comenzado una modesta exportación de unas 500 t de fruta fresca hacia Europa (Italia y España), lo que podría ser la antesala de la recuperación de los índices de exportación, al igual que en la década del 50-60 del siglo XX.

Esta fruta, llamada inicialmente *Ananá* (en Guaraní), es originaria de las regiones tropicales de América del Sur, del centro y sureste de Brasil y noreste de Argentina y Paraguay. Debido a su adaptabilidad, tolerancia a la sequía y fácil manejo del material de propagación, se cultiva en las zonas tropicales y subtropicales de los cinco continentes (Leal y Antoni, 1981).

Es una Liliacea, monocotiledónea, herbácea y perenne. Presenta un tallo cubierto de hojas lanceoladas, las cuales son envolventes y están dispuestas en forma de espiral, que pueden estar provistas de espinas a lo largo de los márgenes, parcialmente distribuidas o estar ausentes (tipo *piping*) con márgenes involutos (Py *et al.*, 1987). Otra característica de las hojas es que son ligeramente cóncavas, lo que permite conducir el agua de lluvia hacia la roseta y ser almacenada la humedad en el tejido acuífero, para cederla a la planta cuando hay sequía (Bartholomew *et al.*, 2002).

# Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe



Editores  
María Teresa González-Arnao  
Florent Engelmann

10

## Desarrollo de la crioconservación de las plantas en Cuba

Marcos Edel Martínez Montero<sup>1</sup>,  
María Teresa González-Arnao<sup>2</sup>, María de los Ángeles  
Torres Mederos<sup>3</sup>, Leyanis García<sup>4</sup>, Zoila Fundora<sup>5</sup>

1. Centro de Biotecnología, Universidad "Máximo Gómez Báez" de Ciego de Avila, Ciego de Avila, Cuba, marcosm@bioplantas.cu, cubaplantas@gmail.com.
2. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana. Dirección actual: Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México, mrgonzal@hotm.com, tengonzal@cnic.mx.
3. Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Cuba, matorres@inifat.cu.
4. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, leyanis@ipm.cu.
5. Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Cuba, zfundora@inifad.sld.cu.



# Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm with Vegetative Propagation – Review of Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) Cases

Marcos Edel Martinez-Montero<sup>1</sup>, Maria Teresa Gonzalez Arnao<sup>2</sup> and Florent Engelmann<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>University of Ciego de Avila/Bioplantas Centre

<sup>2</sup>Universidad Veracruzana,

<sup>3</sup>IRD, UMR DIAPC

<sup>4</sup>Bioversity International

<sup>1</sup>Cuba

<sup>2</sup>Mexico

<sup>3</sup>France

<sup>4</sup>Italy

## 1. Introduction

Sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) is a crop of major importance, which is cultivated on a large scale in tropical and subtropical regions primarily for its high sucrose content. Cultivated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill, which is now called *Ananas comosus* var *comosus*) belongs to the family Bromeliaceae. It is economically the fourth most important crop worldwide in terms of tropical fruit production and follows banana, mangoes and citrus. One of the main drawbacks faced by sugarcane and pineapple agriculture worldwide is the vegetative (i.e. asexual) nature of its conventional propagation. The consequence is that plants in the field must be replaced at intervals ranging from 1 to 5 years, a process that is costly, tedious and time-consuming. Furthermore, if the planting material is of low quality, yields decrease and more tillage is needed. The crops are exposed to natural disasters, while the propagation system leads to systemic disease transmission, and natural selection and plagues also take their toll. Moreover, the industry is in dramatic need of planting material, which cannot be produced in sufficient quantities to meet the demand using classical macropropagation techniques.

*In vitro* culture techniques have been extensively developed and applied for several thousand plant species including sugarcane and pineapple. Their uses are of high interest for multiplication, conservation and transformation of plant germplasm. Indeed, they allow the multiplication of plant material with high multiplication rates in an aseptic environment, reduction of space requirements, genetic erosion is reduced under optimal storage conditions, and minimized of the expenses in labour costs. Moreover, tissue culture systems



UNIVERSIDAD DE CIEGO DE AVILA  
CENTRO DE BIOPLANTAS

ALGUNAS ORIENTACIONES TÉCNICAS ACERCA DEL ESTABLEIMIENTO Y  
ATENCIÓNES AL CULTIVO DE LA PIÑA.



# EVENTOS

**BioVeg 2017**

# Certificado

Por su participación como:

En la oncenava edición del Congreso Internacional **BioVeg 2017**, realizado del 22 al 26 de mayo, en la ciudad de Ciego de Avila, Cuba.



**PhD. Janet Quinones Gálvez**  
Presidente del Comité Organizador



bioveg@bioplantas.cu  
http://bioveg.bioplantas.cu  
Centro de Bioplantas Ciego de Avila, Cuba.



# VIII Simposio Mejoramiento y Conservación de Recursos Fitogenéticos




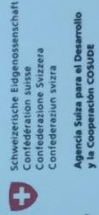
## CERTIFICADO

A: Daymara Rodríguez , Miriam Isidró, Odalys Barrios, Zoila Fundora, Dubiel Alfonso, Sandra Petit, José I. Hormaza, Armando Falcón y María José Grajal

Por su participación como PONENTE

Dado en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas,  
Mayabeque, Cuba, del 23 al 25 de noviembre de 2016

  
Dr.C. María del Carmen Páez Hernández  
PRESIDENTE  
Comité Organizador





## II Congreso Internacional de Agricultura Urbana, Suburbana y Familiar

13 al 16 de abril 2015. Palacio de las Convenciones. La Habana. Cuba.

# Certificado

Se otorga a:

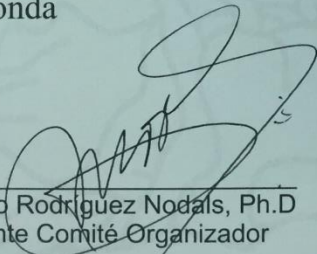
Daymara Rodríguez Alfonso, Mirian Isidró Pérez, Odalys Barrios Govín,  
Lucy Andraca Collazo, Zoila Margarita Fundora

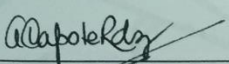
Tema:

Estado actual de la diversidad *in situ* de los recursos fitogenéticos de  
piña en Cuba.

En la modalidad de:

- |   |   |   |
|---|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Conferencia | <input type="checkbox"/> Presidente de Sala | <input type="checkbox"/> Expositor          |
| <input type="checkbox"/> Conferencia Magistral  | <input type="checkbox"/> Secretario de Sala | <input type="checkbox"/> Comité Organizador |
| <input type="checkbox"/> Vídeo                  | <input type="checkbox"/> Vocal de Sala      |   |
| <input type="checkbox"/> Poster                 |   |   |
| <input type="checkbox"/> Mesa Redonda           |   |   |

  
Dr. C Adolfo Rodríguez Nodals, Ph.D  
Presidente Comité Organizador

  
Dra. C Amelia Capote Rodríguez, Ph.D  
Presidente Comité Científico



INIFAT

MA MINAG



ACPA



OXFAM

CISP



ACTAF

PALACIO DE CONVENCIONES DE LA HABANA

cubatur





Universidad Agraria de La Habana  
"Fructuoso Rodríguez Pérez"  
**DIPLOMA**

A. Daymara Rodríguez Alfonso y Miriam Isidro Cruz.

Por su participación en el FORUM de Base de Ciencia y Técnica,  
en la que obtuvo la categoría de Ponente con la  
ponencia: Establecimiento de una colección núcleo de papa en el  
genoplasma cubano.

Dado en San José de las Lajas a los 24 días del mes de Abril del 2014  
"Año 56 de la Revolución"

Dra. C. Adiane Taboada Zamora.  
Vicerrectora UNAH



Universidad Agraria de La Habana  
"Fructuoso Rodríguez Pérez"  
**DIPLOMA**

A. Daymara Rodríguez Alfonso, Miriam Isidro Pérez y Zeila  
M. Fundora

Por su participación en el FORUM de Base de Ciencia y Técnica,  
en la que obtuvo la categoría de Belivante con la  
ponencia: Caracterización morfológica de la colección cubana de  
papa y establecimiento de un listado de descriptores

Dado en San José de las Lajas a los 24 días del mes de Abril del 2014  
"Año 56 de la Revolución"

Dra. C. Adiane Taboada Zamora.  
Vicerrectora UNAH



10<sup>mo</sup> Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal

Se le Otorga el Presente

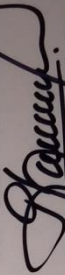
# Certificación

A: Rodríguez Alfonso, D.; Barrios, O.; Hormaza, L.; Grajal, M.J.;  
Fundora, Z.M.; Isidró M.

Por su participación como:

**Ponente**

En la Décima Edición del Congreso Internacional Bioveg 2015,  
Realizado del 11 al 15 de mayo, en la Ciudad de Ciego de Avila. Cuba

  
Dr. Oscar Concepción Laflitte  
Presidente del Comité Organizador

<http://www.bioplantas.cu>

<http://bioveg.bioplantas.cu>



*Universidad de Las Tunas*

*"Vladimir Ilich Lenin"*



## *Reconocimiento*



*A: MSc. Neysis Pérez Fernández*

*Dr.C. Lydia Galindo Menéndez*

*Por participar en el VI Congreso Nacional de Extensión  
Universitaria como ponente de la investigación:*

*Régimen de riego en plantas in vitro de piña (ananas comosus).*

*Registrado con el ISBN. 978 - 959 - 16 - 2248 - 8*

*Dado en las Tunas, a los 19 días del mes de febrero del 2014*

*"Año 56 de la Revolución"*

*Dra. Dagmaris Batista de los Ríos*

*Directora de Extensión Universitaria*

*MS c. Aurora del Carmen Ramos de las Heras*

*Rectora. ULT*

Universidad de Las Tunas  
RECTORÍA  
Ministerio de Educación Superior-CUBA



# no Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal

de  
Biotecnología  
Vegetal

Se le Otorga el Presente

## Certificación

A: Rodríguez, D.; Grajal-Martín, M.J.; Isidró, M.; Petit, S.;  
Hormaza, J.I.

Por su participación como:

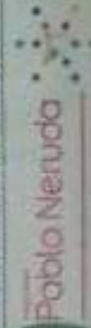
### Ponente

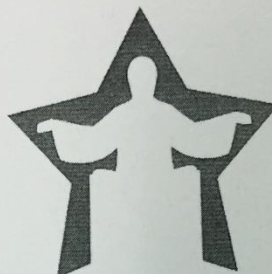
En la Novena Edición del Congreso Internacional Bioveg 2013,  
Realizado del 7 al 10 de mayo, en la Ciudad de Ciego de Ávila. Cuba

<http://www.bioplantas.cu>

<http://bioveg.bioplantas.cu>

Dr. Oscar V. Concepción Laflita  
Presidente del Comité Organizador





**Universidad 2012**  
8vo Congreso Internacional  
de Educación Superior

La universidad por el desarrollo sostenible

El Comité Organizador del Evento Provincial de:

**Universidad de Las Tunas**  
otorga el:

**CERTIFICADO**

A: *Neysis Pérez Fernández*

por su participación en calidad de: **Ponente**

en el Taller: *Responsabilidad social de las universidades*

*La Universidad por un nuevo saber ambiental hacia la sostenibilidad.*

Pdte/Comité Organizador  
Evento Provincial

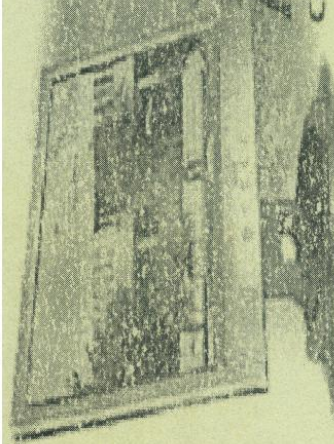
MsC. Marlene Del Toro Borrego

Coordinador del Taller  
Evento Provincial

Dr. C. Rolando Borrero Rivera

Universidad de Las Tunas  
RECTORÍA  
Ministerio de Educación Superior-CU A





# alc

## Agrociencias 2011

Congreso Internacional de Ciencias Agropecuarias

*“La ciencia como la vida ha de ponerse en lengua diaria”*

A:

Daymara Rodríguez, Miriam Isidró, José I.  
Homaza, Pedro Villar, Sandra Petit

Por la presentación del Trabajo :

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE RAPD DE LA COLECCIÓN CUBANA DE PIÑA

Presentado como: \_\_\_\_\_ Poster

ISBN: 978 - 959 - 15 -- 1367 - 7

Universidad Agraria de La Habana,

“Fructuoso Rodríguez Pérez”

19 - 21 de septiembre de 2011

*Dr. C. María Irene Balbín*  
Presidenta Comité Organizador  
Dr. C. María Irene Balbín Arias  
Rectora UNAH

# Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal

Se le Otorga el Presente

# Certificación

A: Rodríguez, D.; Isidró, M; Martínez-Montero, ME;  
Hormaza, J.I.; Grajal, M.J.

Por su participación como:

# Asistente Oral

En la Octava Edición del Congreso Internacional Bioveg 2011,  
Realizado del 2 al 6 de mayo, en la Ciudad de Ciego de Ávila. Cuba


<http://www.bioplantas.cu>

<http://bioveg.bioplantas.cu>



Pablo Neruda



  
Dr. Ramón Santos Bermúdez  
Presidente del Comité Organizador



El Comité Organizador del IX Simposio Internacional de  
Biotecnología Vegetal otorga el presente:

## CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

Pedro Enrique Villar Martínez, Miriam Isidró,  
A: Daymara Rodríguez

Estudio de algunos caracteres de germinación de paja (Anonias compositae L. Merr) y estudio de algunos caracteres de germinación de paja (Anonias compositae L. Merr) y estudio de algunos caracteres de germinación de paja (Anonias compositae L. Merr)

En calidad de: ☒ Conferencista

☐ Participante

Dado en la ciudad de Santa Clara a los 22 días de abril de 2010



Dr. C. Daniel Agramonte Panalvar  
Presidente del Comité Organizador



# INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

40º Aniversario

## Se otorga el presente Certificado a:

Neysis Pérez, Lydia Galindo, Eblis Rodríguez, Aida Fernández, P. Guntín, K. Acosta,  
F. Arana, Luritza Peña y E. Acosta

## Por su participación con la ponencia titulada:

COMPORTAMIENTO DE PLANTAS IN VITRO DE PIÑA (ANANAS COMOSUS (L.) MERR.) HÍBRIDO  
CBCE-11s EN LA FASE DE ACLIMATIZACIÓN

Dado en San José de Las Lajas, La Habana, Cuba, a los 26 días de Noviembre de 2010

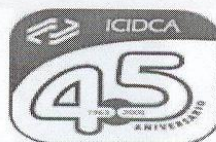
Dra. C. María del Carmen Pérez Hernández

Presidenta

Comité Organizador



**TALLER PROVINCIAL  
BIOPRODUCTOS Y ALIMENTO ANIMAL  
XVI FORUM DE BASE**



**II ETAPA.**

*Sustituir importaciones,  
Crear fondos exportables no tradicionales,  
Transferir tecnologías,  
Y generalizar los resultados alcanzados,  
Constituyen hoy una prioridad para el desarrollo  
De la economía cubana.*

**OTORGA EL**


**CERTIFICADO DE AUTOR**

A: *Marcia B. Moya*

Por la presentación del trabajo: *Comportamiento del Biobras-16* (nos parámetros del crecimiento de la piña durante la microp)  
de los autores:

*Miniam Isidró, Daynara Rguez, Daniel Cabeza, Lui*

Dado en Ciudad de la Habana, a los 3 días del mes de julio del 2008.

  
Ing. Ana Nelis San Juan  
Directora Cuba 10.



  
Dr. Amaury Alvarez  
Director Investigación ICIDCA.





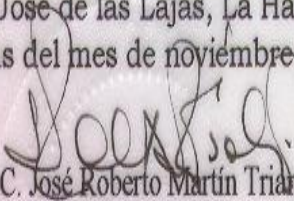
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

Se otorga el presente Certificado a:

*Marcia B. Moya, Miriam Isidrón,  
Daymara Rodríguez y Evelyn Valera*

**Por su participación en las actividades  
científicas como Ponente**

Dado en San José de las Lajas, La Habana, Cuba,  
a los 9 días del mes de noviembre de 2006

  
Dr. C. José Roberto Martín Triana

Presidente

Comité Organizador

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS



Se otorga el presente Certificado a:

*Daymara Rodríguez, Miriam Isidró, Marcia B. Moya,  
Evelyn Valera, Arlenys Cruz y Ariannys Roque*

Por su participación como Ponente  
en las actividades científicas

Dado en San José de las Lajas, La Habana, Cuba, a los 10 días del mes de noviembre del 2004

  
Dr. C. José Roberto Martín Triana  
Presidente  
Comité Organizador

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

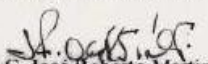


Se otorga el presente Certificado a:

*Miriam Isidró, R. Benegas, C. Carvajal, L. Godoy,  
D. Rodríguez, B. Díaz, E. Héctor y A. Torres*

Por su participación como Ponente  
en las actividades científicas

Dado en San José de las Lajas, La Habana, Cuba, a los 11 días del mes de noviembre del 2004

  
Dr. C. José Roberto Martín Triana  
Presidente  
Comité Organizador



IV Taller Internacional de Biotecnología Vegetal  
International Workshop on Plant Biotechnology  
**BioVeg 2003**

Se le Otorga el Presente


**CERTIFICADO**

A: **Daymara Rodríguez**


Por su Participación como:

**PRESENTADOR DE CARTEL**

En la Cuarta Edición del Taller Internacional  
BioVeg 2003, Realizado del 14 al 19 de Abril,  
en la Ciudad de Ciego de Ávila, Cuba

  
Dr. Samuel Clark Arxer  
Pdt. Academia de Ciencias de Cuba  
Presidente de Honor

  
Dr. Mario R. Aren Sánchez  
Rector, Universidad Ciego de Ávila  
Presidente de Honor

  
Dr. Ramón Santos Bermúdez  
Director del Centro de Bioplantas  
Presidente Comité Organizador



LA COMISION ORGANIZADORA DEL XV FORUM DE CIENCIA Y TECNICA

COMPLEJO CIENTIFICO DOCENTE

CEMA ★ CENSA ★ ICA ★ INCA ★ UNAH

OTORGA EL PRESENTE

# Diploma

A: Miriam Tejedor, R. Carrasco, R. Benayán, J. Ríos, A. P. Flores, B. Díaz  
POR SU PARTICIPACIÓN EN EL EVENTO COMO PONENTE

PONENCIA Contribuciones de los frutos de pino a las  
AUTORES, becarios de la Udelv, cursos de Postgrado, investigadores en la



Dado en San José de las Lajas

15 de julio del 2003

Presidente Comisión Organizadora



UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA

“Fructuoso Rodríguez Pérez”

Facultad de Agronomía

**DIPLOMA**

Miriam Isidró et al.

Se otorga a:

por su participación como

*Participante*

en el Evento Internacional de



celebrado del 8 al 11 de Abril del 2002.

*[Signature]*

Dr. Elio del Pozo Núñez  
Decano



Eduardo F. Héctor Ardisana  
Secretario Científico



# FOURTH INTERNATIONAL PINEAPPLE SYMPOSIUM

MEXICO


Veracruz city  
April 16-19



En Reconocimiento a:

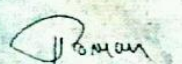
**Miriam Isidrón Perez Rosales**

Por su trabajo: "Aplicación de las técnicas biotecnológicas en el  
mejoramiento de la piña en Cuba."

  
Duane P. Bartholomew  
Chairman FWG-ISHS

  
Daniel Uribe A.  
Presidente

  
Andrés Rebolledo M.  
Secretario

  
Heriberto Román P.  
Tesorero

  
Laureano Rebolledo M.  
Coordinador Técnico

Comité Organizador Internacional, Cd. y Puerto de Veracruz, México



SECRETARÍA DE  
AGRICULTURA, GANADERÍA,  
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

**inifap**

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PISCICOLAS



BioVeg 2001

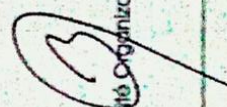
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

## CERTIFICADO

A: M. Lidón. R. Beniga. of. Benares

Por su participación como Participante en el  
Tercer Taller Internacional de Biotecnología Vegetal  
BIOVEG 2001

Dado en Ciego de Avila, Cuba  
del 16 al 20 de abril

  
Certif. Organizador



# XIV Forum de Ciencia y Técnica

Centro de Bioplasmas  
1ra Etapa

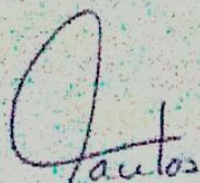
## CERTIFICADO

A: Elizian Isidro

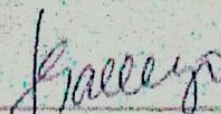
Ponencia: Colecta de germoplasma de pisa  
en la sala de la juventud.

"... lo que da al hombre el poder no es ese mero conocimiento que viene del uso de los sentidos, sino ese otro conocimiento más profundo que se llama Ciencia".

Ciego de Avila, 21 de Junio del 2001.



Director  
Centro de Bioplasmas



Presidente  
del tribunal



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

## XII SEMINARIO CIENTIFICO

*Se otorga el presente Certificado a:*

Miriam Isidró, A. Cisneros, Yamila Rosales y A. Piferrer

*Por su participación en las actividades científicas  
en calidad de Ponente*

Dado en San José de las Lajas, La Habana, Cuba, a los 17 días del mes de  
noviembre del 2000



Dr. C. José Roberto Martín Triana  
Presidente  
Comité Organizador





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

## XII SEMINARIO CIENTIFICO

*Se otorga el presente Certificado a:*

Miriam Isidró

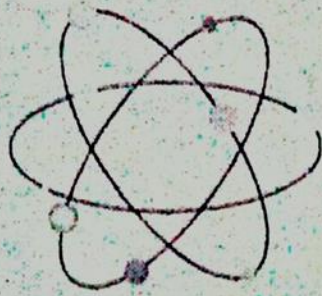
*Por su participación en las actividades científicas  
en calidad de Ponente en Mesa Redonda*

Dado en San José de las Lajas, La Habana, Cuba, a los 17 días del mes de  
noviembre del 2000



Dr. C. José Roberto Martín Triana  
Presidente  
Comité Organizador





# XIII FORUM DE CIENCIA Y TECNICA

## EVENTO DE BASE

### CENTRO DE BIOPLANTAS

## CERTIFICADO

A: MIRIAM LEBRON, QUIMICA ORGANICA

Ponencia: Selección y germinación de brotes de la especie  
Leucaena de Cuba

*Ciencia Técnica significa preparar un país, rear un j... no importa de donde partamos hoy, no importa las dificultades de hoy*

Fidel

Ciego de Avila, 12 de Julio del 2000

[Signature]

Director

Centro de Bioplantas

[Signature]

Presidente

Del Tribunal






**El Comité Organizador / The Organizing Committee  
XIII Seminario Científico del /XIII Scientific Seminar of the  
Centro Nacional de Investigaciones Científicas/  
National Center for Scientific Research  
Ciudad de La Habana, Cuba/ Havana, Cuba**

**Agradece la Participación/ Acknowledge the participation  
of:**

~~Miriam Isidró, Reinerio Benega, Elizabeth Arias, Aroldo Cisneros,  
Orlando Borrás, Yania Rodríguez, Ramón Santos Raúl Tapia  
Guillermo Pérez, Patricia Espinosa, José Carlos Lorenzo, Marcos  
Martínez, María Teresa González.~~  
**Con su trabajo/ With your work:**

~~Avances en el programa cubano de mejoramiento genético y la  
conservación de germoplasma de piña (*Ananas comosus* (L.) Mez) por la  
ayuda de los métodos biotecnológicos.~~

**En sus sesiones de trabajo del 27 al 30 de junio del 2000  
In its Working Sessions from June 27<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup>, 2000**

  
**Dr. Carlos Gutiérrez Calzado  
Presidente/ President**

**Comité Organizador/ Organizing Committee**



**XIII Forum de Ciencia y Técnica  
Ciego de Avila**

# Diploma

*Al trabajo:*

Colecta y Rescate de Genoplasmas de Piña  
en la Región Central

*De los autores:*

Miriam Piñero

Miguel Hidalgo

Carol Barvajal y Alfredo González

Por su participación en el Evento de Base del XIII Forum  
de Ciencia y Técnica.

Dado en el Centro de Bioplantitas a los 13 días del mes de  
Septiembre de 1999.

Japido  
Comisión de Base

Auto  
Director  
Centro de Bioplantitas



## CERTIFICADO

A: Miriam Isidoro Pérez, Benegas García Reinelito,  
Cisneros Peña A, Arias Valdés E, Páez García E.  
Lorenzo Feijó J.C. Espinosa Artiles P. Barro E.

Por participar en las actividades científicas del Taller Internacional de Biotecnología Vegetal celebrado del 19-23 de Abril de 1999, en el Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Avila, Cuba.

Tema: Application of biotechnological and traditional  
methods in Cuban pineapple breeding programme.

Dr. Hipólito Peralta Benítez  
Presidente del Comité Organizador



# XII Forum de Ciencia y Técnica

## MENCIÓN

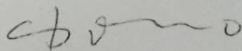
*Al Trabajo:*

Rescate de genotipos de púa y especies afines  
mediante Prospección de Genioplasmia para  
su conservación genética.

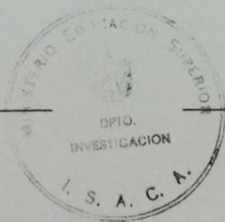
*De los Autores:*

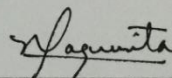
Minami Osidón; Arleto Cisneros; Yanila  
Rosales.

*Dado en Ciego de Avila a los 20 días del mes de Julio de*  
*1998.*



Director  
Centro de Bioplasmas





Presidente  
Del Tribunal



# **Trabajos de DIPLOMA**

*Universidad Agraria de la Habana  
Fructuoso Rodríguez Pérez  
Facultad de Agronomía*



# **Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo**

Título: *Estudio de algunos caracteres en accesiones de  
germoplasma de Piña (Ananas comosus L. Merr).  
Establecimiento de un banco de germoplasma.*

Autor: *Pedro Enrique Villar Martínez*

Tutora: *Dr.C. Miriam Isidró Cañizares*

Cotutora: *MsC. Daymara Rodríguez*

*Curso 2008-2009*

*"Año del 50 aniversario del triunfo de la Revolución"*

*Universidad Agraria de La Habana*

*"Fructuoso Rodríguez Pérez"*

*Facultad de Agronomía*



*Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo*

**Título:** *Establecimiento de un banco de germoplasma in vitro del cultivo de la piña (Ananas comosus L.)*

**Autor:** Jorge Ruíz Hernández

**Tutores:** Ms. C Daymara Rodríguez Alfonso  
Dr. C Miriam Isidró Pérez

La Habana, 2009

"Año del 50 Aniversario de la Revolución Cubana"

*Centro Universitario "Vladimir Ilich Lenin"*  
*LAS TUNAS*

*Facultad de Ciencias Agrícolas*



# *Trabajo de Diploma*

*Título: Efectos de diferentes tiempos de inmersión y formas de aplicación de fosforina en plantas in vitro de piña (Ananas comosus L. Merr.) híbrido CBCE- 116.*

*Autor: Julio César Hernández Corría*

*Tutores: Dra C. Lydía Galindo Menéndez.*

*Ing. Neysis Pérez Fernández*

**2008**

**"Año 50 de la Revolución"**



*Centro Universitario "Vladimir Ilich Lenin"*  
*LAS TUNAS*

*Facultad de Ciencias Agrícolas*



# *Trabajo de Diploma*

**Título: Comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de sustratos en la fase de aclimatización.**

**Autor: Madelin Barroso Martínez.**

Tutores: Dra.C. Lydia Galindo Menéndez.

Ing. Neysis Pérez Fernández

**Las Tunas, 2007**

**"Año 49 de la Revolución "**

*Centro Universitario "Vladimir Ilich Lenin"*  
*Las Tunas*

*Facultad de Ciencias Agrícolas*



# *Trabajo de Diploma*

*Título: Evaluación del comportamiento de plantas in vitro de piña  
(Ananas comosus (L) Merr.) híbrido CBCE-116 con diferentes tipos de  
sustratos en la fase de aclimatización.*

*Autor: Miriam Peláez Peláez*

*Tutores: Dra C. Lydia Galindo Menéndez.*

*Ing. Neysis Pérez Fernández*

**2008**

**"Año 50 de la Revolución"**

Universidad Agraria de La Habana  
"Fructuoso Rodríguez Pérez"

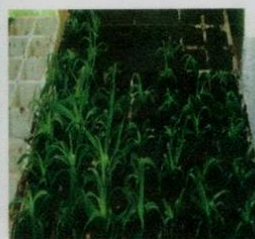


Facultad de Agronomía



**TRABAJO DE DIPLOMA**

**Efecto del Pectimorf y el Biobras – 16 en  
la micropropagación de la piña *Ananas  
comosus* (L.) Merrill.**



\* **Autora:** Marcia Beatriz Moya Fernández  
\* **Tutores:** DrC. Miriam Fátima Isidró Pérez  
Ing. Daymara Rodríguez Alfonso

La Habana, 2006

# **TESIS de Maestría**



**MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR**

**UNIVERSIDAD DE LAS TUNAS**

**“VLADIMIR ILICH LENIN”**



**MAESTRIA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**Título: Evaluación de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) híbrido CBCE-116 en la fase de aclimatización de la Universidad de Las Tunas.**

**Tesis en opción al título de Máster en Ciencias Agrícolas**

**Autora: Ing. Neysis Pérez Fernández**

**Tutora: Dra. C. Lydia Galindo Menéndez**

**2011**

**“Año 53 de la Revolución”**



CIHEAM



Universitat de Lleida

# Thèse / Thesis

requise pour  
l'obtention du titre

submitted  
for the Degree of

## Master of Science

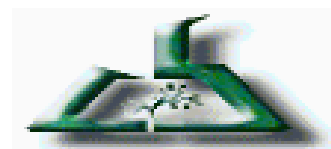
CARACTERIZACIÓN DE PIÑA TROPICAL  
(*Ananas comosus* L. Merrill)  
Y ESPECIES AFINES

Daymara RODRÍGUEZ ALFONSO

Zaragoza, Diciembre 2010

Institut Agronomique Méditerranéen de  
Mediterranean Agronomic Institut of  
Zaragoza

Université de Lleida  
University of Lleida



**UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA**

**CENTRO DE BIOPLANTAS**

**Estrategia criogénica para el establecimiento de un  
banco de germoplasma de piña.**

**Tesis presentada opción al grado académico de  
Master en Ciencias**

**Autor: Roberto Méndez Pelegrín**

**Tutor: Dr. Marcos E. Martínez Montero**

**Ciego de Ávila  
2009**

Universidad Agraria de La Habana

"Fructuoso Rodríguez Pérez"

Facultad de Agronomía



UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Tesis presentada en opción al Título de Maestro en Biología Vegetal, Mención  
Biotecnología Vegetal.

Título: Utilización de biorreguladores en las  
fases de multiplicación y enraizamiento *in*  
*vitro* de dos híbridos cubanos de piña  
(*Ananas comosus* (L.) Merrill).

Autora: Ing. Daymara Rodríguez Alfonso

Tutores: DrC. Miriam Isidró Pérez

DrC. Sergio González Suárez.

La Habana, 2008

"Año 50 de la Revolución"



**UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA**

**Centro de Bioplasmas**

**Caracterización molecular de las colecciones de germoplasma de piña de Cuba y México mediante AFLP**

**Tesis presentada en opción al Grado Académico de Master en Ciencias**

**Autor: Ing. Ermis Yanes Paz**

**Tutor: Dr. José Carlos Lorenzo Feijoo**

**Ciego de Ávila**

**2003**

# **TESIS Doctorado**



**UNIVERSIDAD AGRARIA DE  
LA HABANA**

**“Fructuoso Rodríguez Pérez”**

**Facultad de Agronomía**



Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

**Título: Diversidad de los recursos  
fitogenéticos de piña [*Ananas  
comosus* (L.) Merrill] y especies  
afines de Cuba y Canarias.**

**Autora: Ing. Daymara Rodríguez Alfonso MSc.**

**Mayabeque, 2014**



# **PREMIOS y RECONOCIMIENTOS**





REPÚBLICA DE CUBA

La Comisión Nacional de Grados Científicos

*en uso de las facultades que le han sido conferidas*

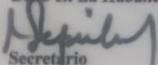
OTORGA A:


**DAYMARA RODRÍGUEZ ALFONSO**

**EL RECONOCIMIENTO ANUAL POR  
MEJOR TESIS DE DOCTORADO DE LAS  
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

*en consideración a que ha cumplido los requisitos preceptuados al efecto a partir del análisis de las tesis aprobadas en el período comprendido entre el 1ro de septiembre de 2014 y el 31 de julio de 2015, según se expresa en la Resolución No. 13 del 22 de diciembre de 2015.*

*Dado en La Habana, a los 15 días del mes de enero de 2016, "Año 58 de la Revolución"*

  
Secretario

  
Presidente

COMISIÓN NACIONAL DE GRADOS CIENTÍFICOS

*La Habana, 7 de diciembre de 2015  
"Año 57 de la Revolución"*

Dra. C. Adianez Taboada Zamora  
Rectora  
Universidad Agraria de La Habana

El Pleno de la Comisión Nacional de Grados Científicos tomó los acuerdos correspondientes a la selección de las mejores tesis de doctorado aprobadas entre septiembre de 2014 y julio 2015 por las distintas ramas del conocimiento.

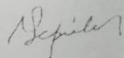
Le comunico que de la Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez", como institución autorizada de grados científicos, fueron seleccionados:

<b>Mejor Tesis de Ciencias Agropecuarias</b>	Daymara Rodríguez Alfonso (UNAH)
<b>Mención Mejor Tesis de Ciencias Agropecuarias</b>	Magaly Herrera Villafranca (ICA)

El acto de entrega de los reconocimientos, como parte de las actividades de carácter nacional por el Día de la Ciencia Cubana, se realizará el día 14 de enero de 2016, a las 11:00 horas, en el Aula Magna de la Universidad de La Habana.

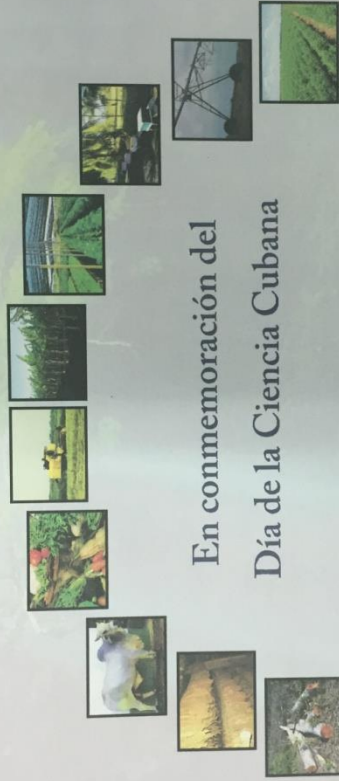
Adjuntamos el programa de actividades de ese día para los doctores y doctoras que recibirán estos reconocimientos. Al acto se le invita a usted, a otros directivos de esa institución y a los familiares y compañeros de estas doctoras que deseen participar.

Afectuosamente,



Dr. C. Roberto Sepúlveda Lima  
Secretario Comisión Nacional de Grados Científicos

# RECONOCIMIENTO

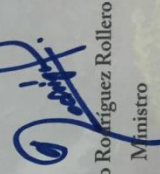


## En conmemoración del Día de la Ciencia Cubana

**Al Resultado:** Determinación de los patrones de diversidad de los recursos fitogenéticos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) especies afines de interés para la producción en Cuba.

**A: Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana  
"Fructuoso Rodríguez"**

Dado en La Habana, a los 10 días del mes de abril del 2015  
"Año 57 de la Revolución"

  
**Gustavo Rodríguez Rollero**  
Ministro

**El Consejo Técnico Asesor del  
Ministerio de la Agricultura**  
En uso de las atribuciones que le confiere  
la Resolución No. 556/2010 y con el propósito  
de reconocer los resultados de la Ciencia  
y la Innovación Tecnológica adoptó el siguiente

## ACUERDO

**PRIMERO:** Conceder uno de sus Premios Ramales del año 2014, al resultado denominado:

**Determinación de los patrones de diversidad de los recursos fitogenéticos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) especies afines de interés para la producción en Cuba.**

**Unidad Ejecutora Principal del Resultado:** "Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez"

**Otras entidades participantes:** <sup>2</sup>CSIC, Estación Experimental "La Mayora", Málaga España, <sup>3</sup>Instituto Canario de Investigaciones Agrícolas (ICIA), Tenerife, Isla Canarias España, <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt"

**SEGUNDO:** A todos los efectos de autoría del resultado premiado y acorde a la propuesta recibida reconocer a las personas que se relacionan

**Autores principales:** Daymara Rodríguez Alfonso<sup>1</sup> y Miriam Hicieron Pérez<sup>1</sup>

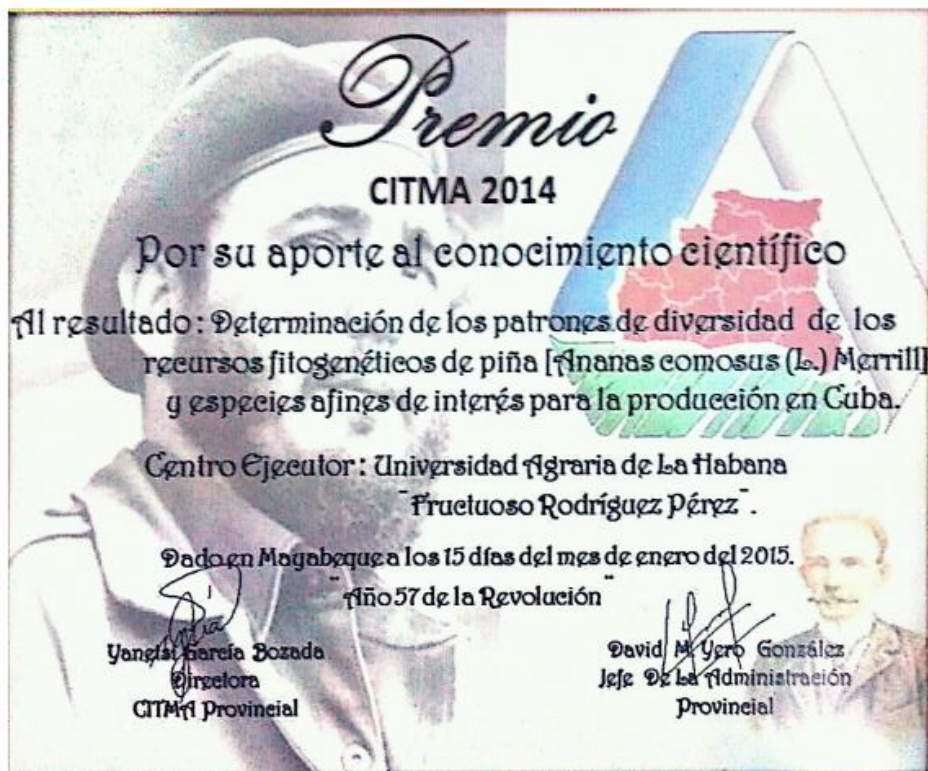
**Otros autores:** José Ignacio Homaza<sup>2</sup>, María José Gramal<sup>3</sup>, Sandra Petit<sup>3</sup>, Pedro Villar<sup>1</sup>, Odalys Barrios<sup>4</sup>, Dubiel Alfonso<sup>4</sup>, Zolia M. Fundora Mayor<sup>4</sup>.



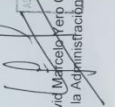
**TERCERO:** Otorgar en acto público el correspondiente diploma que certifica lo anterior a las autoridades de las entidades donde fue obtenido el resultado premiado y a través de sus autores a quienes entregamos este acuerdo.

Y para que así conste se emite el presente acuerdo el día 10 de abril del 2015 en conmemoración del Día de la Ciencia Cubana "Año 57 de la Revolución"



  
**Dra. C. Mariela Díaz Rodríguez**  
Secretaria



 Dirección CITMA de la Administración Provincial Ave 47 e/114 y 122 Reparto El Quinto, San José de las Lajas, Provincia Mayabeque	<p><b>CERTIFICADO</b></p> <p>El Consejo de Expertos del Consejo Asesor de Ciencia y Técnica de Mayabeque en su reunión efectuada el día 17 de octubre de 2014, valoró las propuestas a Premios de la Academia de Ciencias de Cuba y premios CITMA 2014. En su acuerdo No 31/14 aprueba otorgar el premio por el Aporte al Conocimiento Científico, el cual se concede en reconocimiento a los resultados investigativos en materia de Ciencia e Innovación Tecnológica en salud al Día de la Ciencia y atendiendo a su impacto científico, a favor de:</p> <p><b>Resultado:</b> Determinación de los patrones de diversidad de los recursos filogenéticos de piña [<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill] y especies afines de interés para la producción en Cuba</p> <p><b>Institución Ejecutora Principal:</b> Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez"</p> <p><b>Autores:</b> Daymara Rodríguez Alfonso y Miriam Isidón Pérez</p> <p><b>Otros autores:</b> José Ignacio Homaza Uroz, María José Grajal Martín, Sandra Pettit Mejías, Pedro Villar Martínez, Odalys Barrios Govin, Dubiel Alfonso González, Zoila Margarita Fundora</p> <p><b>Colaboradores:</b> Carlos Lezcano Neyra, María Elena Ruiz Pérez, Jorge Ruiz Hernández, Lucy Andraza Collazo, Remigio Zaragoza Cruz</p> <p>Notifíquese a los premiados</p> <p>Dado en Mayabeque, a los 15 días del mes de enero de 2015. "Año 57 de la Revolución"</p> <p> Lic. Yanet García Bozada Directora CITMA AP Mayabeque</p> <p> Lic. David Marcelo Yero González Jefe de la Administración Mayabeque</p>
---	---






Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente  
Delegación Provincial  
Las Tunas

# Reconocimiento

A: Resultado de la Investigación Científica

Régimen de riego en plantas in vitro de piña  
(*Ananas Comosus* (L) Merril) híbrido CBCE-116  
en la fase de aclimatización.

  
Ing. Elber Torres González  
Delegado

Las Tunas, 15 de enero de 2012  
"Año 54 de la Revolución"





MINISTERIO DE CIENCIA  
TECNOLOGIA Y MEDIO AMBIENTE

# Reconocimiento

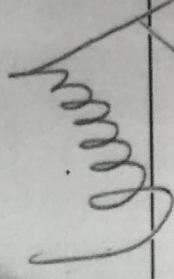
*A: Resultado de la Innovación Tecnológica*

*Comportamiento de plantas in Vitro de piña (ananas comosus (L.:)  
Merr) híbrido CBCE-116.*

*"El futuro de nuestra Patria tiene que ser necesariamente  
un futuro de hombres de ciencia, ..."*

*Fidel Castro*

*Las Tunas, 15 de enero de 2010  
'Año 52 de la Revolución'*

  
Ing. Elber Torres González  
Delegado



**MINISTERIO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIOAMBIENTE**  
**DELEGACIÓN PROVINCIAL**  
**LA HABANA**

**PREMIO CITMA 2007**  
*al Resultado Científico*

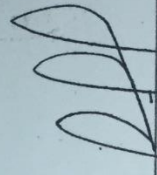
**Título:** Cultivo in vitro de especies vegetales con bioestimulantes cubanos del crecimiento y el desarrollo

**Autor Principal:** Eduardo F. Héctor Ardisana

**Institución:** Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez"

*Dado en La Habana, a los 15 días del mes de enero del 2008*

*DÍA DE LA CIENCIA CUBANA*

  
Lic. Tunia Alfonso González  
DELEGADA