

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA**



**Inducción de brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa *Fragaria ananassa* var. *Camarosa* utilizando diferentes combinaciones de Ácido naftalenacético y 6- Bencilaminopurina**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTADO POR:**

Bach. BARBARA ESTEFANY LOPEZ RIVERA  
Bach. JHORDAN WALDIR VILLANUEVA ALVAREZ

**ASESOR:**

Blgo.Mblgo Eterio Amaranto Alva Muñoz

**NUEVO CHIMBOTE – PERÚ**

**2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA”**  
**“FACULTAD DE CIENCIAS”**  
**“ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA”**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Inducción de brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa *Fragaria ananassa*  
var. *Camarosa* utilizando diferentes combinaciones de Ácido naftalenacético y  
6- Bencilaminopurina**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTADO POR:**

Bach. BARBARA ESTEFANY LOPEZ RIVERA  
Bach. JHORDAN WALDIR VILLANUEVA ALVAREZ

Revisado y Aprobado por el Asesor

---

**Blgo Mblgo. ALVA MUÑOZ ETERIO**  
**ASESOR**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA**



**Inducción de brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa *Fragaria ananassa* var. *Camarosa* utilizando diferentes combinaciones de Ácido naftalenacético y 6- Bencilaminopurina**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTADO POR:**

Bach. BARBARA ESTEFANY LOPEZ RIVERA  
Bach. JHORDAN WALDIR VILLANUEVA ALVAREZ

Dr. Carlos Azañero Diaz

PRESIDENTE

Blgo. Mblgo Eterio Alva Muñoz

INTEGRANTE

Mag. Ana Garcia Pinto

INTEGRANTE

## **ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS (VIRTUAL)**

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, a través del WhatsApp y de manera remota, siendo las 19:00 horas del día SABADO 26 DE JUNIO DEL 2021, dando cumplimiento a la Resolución Decanatural N° 158-2021-UNS-PC Virtual, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. CARLOS AZAÑERO DÍAZ, teniendo como miembros a Mg. ANA GARCÍA PINO (secretario) (a), y Bigo. Mbligo. ETERIO ALVA MUÑOZ (Integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA, realizado por el, (la), (los) testista (as) BARBARA ESTEFANY LÓPEZ RIVERA (Cód. 0201023029), y JHORDAN WALDIR VILLANUEVA ALVAREZ (Cód. 0201123005), de la Escuela Profesional de Biotecnología, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: "Inducción de brotes *In vitro* a partir de estolones de fresa *Fragaria ananassa* var. Camarosa utilizando diferentes combinaciones de ácido naftalenacético y 6-Bencilaminopurina".

Terminada la sustentación, el (la), (los) testista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **SOBRESALIENTE** asignándole un calificativo de **19 puntos**. (Art. 24° Inc. a, b, c, d, e, f – Directiva N° 003-2020-UNS-VRAC: ADECUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE GRADOS ACADÉMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES MEDIANTE TRABAJO NO PRESENCIAL VIRTUAL EN LA UNS).

Siendo las 20:30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: CARLOS AZAÑERO DÍAZ  
Presidente



Nombre: ANA GARCÍA PINO  
Secretario



Nombre: ETERIO ALVA MUÑOZ  
Integrante

## **DEDICATORIA**

A Dios, por brindarme sabiduría en los momentos de tomar las decisiones y luz a los caminos que tuve que dirigirme.

A mis Padres y hermanos que gracias a su esfuerzo y apoyo incondicional brindado me han ayudado durante mi vida personal y profesional a ser cada día mejor

*Barbara Estefany López Rivera*

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser el amigo confidencial en  
toda mi formación profesional

A todas las personas en mi formación  
profesional en especial a mis padres por  
todo su apoyo y estar siempre conmigo.

*Jhordan Waldir Villanueva Álvarez*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por todas las oportunidades que nos da cada día.

A nuestro asesor Blgo.Mblgo. Eterlo Alva Muñoz por habernos apoyado en todo el proceso de la elaboración de nuestra tesis para obtener nuestro título profesional.

A los técnicos de laboratorio de Biología y Biotecnología, Lidia y André por habernos apoyado en el laboratorio para ejecutar nuestra tesis.

A nuestros padres, hermanos y familiares por todo su apoyo durante nuestra carrera profesional.

Agradezco a nuestros profesores que estuvieron en nuestra formación profesional por sus consejos y enseñanzas.

*Los autores*

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO .....	iii
INDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo General.....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
III. VARIABLES .....	4
IV. HIPÓTESIS .....	4
V. MARCO TEORICO: .....	5
5.1. MATERIA PRIMA.....	5
5.1.1. ORIGEN DE LA FRESA.....	5
5.1.2. DESCRIPCION TAXONOMICA.....	5
5.1.3. DESCRIPCIÓN BOTANICA .....	5
5.1.5. VARIEDAD DE FRESA.....	6
5.1.6. SITUACIÓN DEL CULTIVO DE FRESA .....	8
5.1.7. PLAGAS .....	8
5.1.8. ENFERMEDADES.....	11
5.2. REQUERIMIENTO PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	12
5.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO .....	14
5.3.1. AUXINAS .....	14
5.3.2. CITOQUININAS .....	15
5.4. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES .....	15
5.5. MICROPROPAGACION .....	16
5.6. VENTAJAS DE MICROPROPAGACION .....	16
VI. MATERIALES Y METODOS.....	17



6.1	<b>Materiales</b>	17
6.1.1.	<b>Material vegetal</b>	17
6.2.1.	<b>Preparación del medio de cultivo</b>	17
6.2.2.	<b>Selección del material vegetal</b>	18
6.2.3	<b>Desinfección del material vegetal</b>	18
6.2.4.	<b>Introducción <i>in vitro</i></b>	19
6.2.6.	<b>Evaluación de brotes <i>in vitro</i> de fresa "<i>Fragaria ananassa</i>"</b>	20
VII.	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	21
7.1.	<b>PORCENTAJE DE EXPLANTES SOBREVIVIENTES A CONTAMINACION U OXIDACION</b>	21
7.2.	<b>NUMERO DE BROTES</b>	24
7.2.1.	<b>Evaluación a los 30 días</b>	24
7.2.2.	<b>Evaluación a los 60 días</b>	28
7.3.	<b>NUMERO DE HOJAS POR BROTE</b>	33
7.3.1.	<b>Evaluación a los 30 días</b>	33
7.3.2.	<b>Evaluación a los 60 días</b>	36
7.4.	<b>TAMAÑO DEL BROTE</b>	39
7.4.1.	<b>Evaluación a los 30 días</b>	39
7.4.2.	<b>Evaluación a los 60 días</b>	42
7.5.	<b>NUMERO DE RAÍCES</b>	46
7.5.1.	<b>Evaluación a los 30 días</b>	46
7.5.2.	<b>Evaluación a los 60 días</b>	48
VIII.	<b>CONCLUSION</b>	53
X.	<b>RECOMENDACIONES</b>	54
IX.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	55
	<b>ANEXOS</b>	60
	<b>ANEXO 1 DESCRIPCIÓN Y PROCEDIMIENTO DEL EXPERIMENTO</b>	60
	<b>ANEXO 2: NUTRIENTES, REACTIVOS, PREPARACIÓN DEL MEDIO Y LUGAR DE INCUBACIÓN</b>	63
	<b>ANEXO 3: VISUALIZACION DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 60 DIAS</b>	64

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Visualización de los tratamientos con sus respectivas concentraciones de hormonas.....	18
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de sobrevivencia de fresa in vitro a los 30 días de inoculación .....	23
<b>Tabla 3.</b> ANOVA sobre el número de sobrevivientes a los 30 días por efecto de los diferentes tratamientos. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Número de brotes de cada explante de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra. ....	26
<b>Tabla 5.</b> ANOVA sobre el número de brotes en los tratamientos a los 30 días de siembra..	27
<b>Tabla 6.</b> Prueba Tukey para encontrar el tratamiento sobre el número de brotes a los 30 días de siembra. ....	27
<b>Tabla 7.</b> Número de brotes de cada explante de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra .....	30
<b>Tabla 8.</b> ANOVA sobre el número de brotes en los tratamientos a los 60 días de siembra..	31
<b>Tabla 9.</b> Prueba Tukey sobre el número de brotes a los 60 días de siembra.....	32
<b>Tabla 10.</b> Número de hojas por brotes de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra.....	34
<b>Tabla 11.</b> ANOVA sobre el número de hojas en los tratamientos a los 30 días de siembra .	35
<b>Tabla 12.</b> Prueba Tukey sobre el número de hojas a los 30 días de siembra .....	35
<b>Tabla 13.</b> Número de hojas por brotes de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra.....	37
<b>Tabla 14.</b> ANOVA sobre el número de hojas en los tratamientos a los 60 días de siembra .	38
<b>Tabla 15.</b> Prueba Tukey sobre el número de hojas a los 60 días de siembra .....	38
<b>Tabla 16.</b> Tamaño del brote de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra..	40
<b>Tabla 17.</b> ANOVA sobre el tamaño del brote en los tratamientos a los 30 días de siembra	41
<b>Tabla 18.</b> Prueba Tukey sobre el tamaño del brote a los 30 días de siembra.....	41
<b>Tabla 19.</b> Tamaño del brote de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra..	44
<b>Tabla 20.</b> ANOVA sobre el tamaño del brote en los tratamientos a los 60 días de siembra .	45
<b>Tabla 21.</b> Prueba Tukey sobre el tamaño del brote a los 60 días de siembra.....	45
<b>Tabla 22.</b> Numero de raíces de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra .	46
<b>Tabla 23.</b> ANOVA sobre el número de raíces en los tratamientos a los 30 días de siembra .	47
<b>Tabla 24.</b> Prueba Tukey sobre el número de raíces a los 30 días de siembra.....	47
<b>Tabla 25.</b> Numero de raíces de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra .	49
<b>Tabla 26.</b> ANOVA sobre el número de raíces en los tratamientos a los 60 días de siembra	50
<b>Tabla 27.</b> Prueba Tukey sobre el número de raíces a los 60 días de siembra.....	51
<b>Tabla 28.</b> Composición del medio MS .....	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Promedio de número de brotes por tratamiento. ....	311
<b>Figura 2.</b> Promedio de número de hojas por tratamiento.....	36
<b>Figura 3.</b> Promedio de tamaño de brotes por tratamiento. ....	43
<b>Figura 4.</b> Promedio de número de raíces. ....	50
<b>Figura 5.</b> tratamiento 4 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2 mg/l) a los 60 días de su siembra. ....	52
<b>Figura 6.</b> A) Visualización tratamiento 4, B) Visualización de las raíces., C) Visualización de tamaño de brotes.....	52
<b>Figura 7.</b> Plantas de fresa variedad Camarosa de vinzos. ....	60
<b>Figura 8.</b> Preparación del medio de cultivo A) Pesado de componentes del medio, B) Adicción de las hormonas., C) Lectura del ph. D) Adición de agar y calentamiento del medio. E) Vertimiento del medio a los viales. ....	60
<b>Figura 9.</b> Desinfección del material. A) Selección de material vegetal, B) Material vegetal en fungicida, C) Desinfección con etanol 70% y D) Desinfección de hipoclorito 1.5%. ....	62
<b>Figura 10.</b> Introducción in vitro. A) Selección de material vegetal, B) Cortes al material vegetal, C) Introducción a los viales. D) Viales sembrados. ....	62
<b>Figura 11.</b> Reactivos y nutrientes para preparación de medio MS.....	63
<b>Figura 12.</b> Lugar de incubación del medio sembrado a diferentes concentraciones de ANA y BAP.....	63
<b>Figura 13.</b> A) Brotes del tratamiento 1 que contiene solo Ms a los 60 días de su siembra B) yema contaminada con hongo. ....	64
<b>Figura 14.</b> A) Brotes del tratamiento 2 que contiene ANA 0.1, BAP 0.5 a los 60 días de su siembra. B) yema contaminada con hongo.....	64
<b>Figura 15.</b> A) Brotes del tratamiento 3 que contiene ANA 0.1, BAP 1.5 al a los 60 días de su siembra. (B) yema contaminada con hongo .....	644
<b>Figura 16.</b> Brotes del tratamiento 4 que contiene ANA 0.1, BAP 2 a los 60 días de su siembra. ....	655
<b>Figura 17.</b> Brotes del tratamiento 5 que contiene ANA 0.25, BAP 0.5 a los 60 días de su siembra. ....	65
<b>Figura 18.</b> Brotes del tratamiento 6 que contiene ANA 0.25, BAP 1.5 a los 60 días de su siembra. ....	655
<b>Figura 19.</b> A) Brotes del tratamiento 7 que contiene ANA 0.25, BAP 2 a los 60 días mes de su siembra. B) yema contaminada con bacteria y fenolizada. ....	666
<b>Figura 20.</b> A) Brotes del tratamiento 8 que contiene ANA 0.5, BAP 0.5 a los 60 días de su siembra. (B) yema contaminada con bacteria y fenolizada.....	666
<b>Figura 21.</b> Brotes del tratamiento 10 que contiene ANA 0.5, BAP 2 a los 60 días de su siembra. ....	66

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo Inducir brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa *Fragaria ananassa* var. *Camarosa* utilizando diferentes combinaciones de ANA y BAP con la finalidad de determinar un protocolo adecuado para la obtención de plántulas de fresa con un mayor número de brotes, uniformes, libres de plagas y enfermedades. Segmentos nodales de fresa se esterilizaron en condiciones asépticas y se sembraron en medio de cultivo Murashigue & Skoog (MS) con diferentes combinaciones de hormona ANA en concentraciones de (0.1, 0.25, 0.5 mg/l) y BAP en concentraciones de (0.5, 1.5, 2 mg/l). Se empleó un diseño experimental completamente al azar, con combinaciones de tres niveles de BAP y de ANA con un control que consta de solo un medio básico (MS), teniendo un total de 10 tratamientos, 3 repeticiones y 30 unidades experimentales. Lo que se evaluó fue número y tamaño de brote, número de hojas y numero raíces por explante a los 30 y 60 días. Se determinó que el mejor tratamiento de esta investigación fue el T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 2 mg/l) brindándonos un mayor número y tamaño de brote, número de hojas y raíces a comparación de los demás tratamientos con una diferencia significativa. Se concluyó que el T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 2 mg/l) dio mejores resultados a las variables evaluadas.

**Palabras clave:** *Camarosa, fresa, cultivo, in vitro, protocolo.*

## ABSTRACT

The present research work aims to induce in vitro outbreaks from strawberry stolons *Fragaria ananassa* var. *camarose* using different combinations of ANA and BAP. For the purpose of determining a suitable protocol for obtaining strawberry seedlings with a greater number of outbreaks, uniform, free of pests and diseases, Strawberry nodal segments were sterilized under aseptic conditions and seeded in Murashige & Skoog (MS) culture medium with different combinations of ANA hormone at concentrations of (0.1, 0.25, 0.5 mg/l) and BAP at concentrations of (0.5, 1.5, 2 mg/l). A completely randomized experimental design was used, with combinations of three levels of BAP and ANA with a control consisting of only one basic medium (MS), having a total of 10 treatments, 3 repetitions and 30 experimental units. What was evaluated was number and size of bud, number of leaves and number of roots per explant at 30 and 60 days. It was determined that the best treatment in this study was T4 (ANA 0.1mg / l, BAP 2 mg / l) giving us a larger number and size of bud, number of leaves and roots compared to the other treatments with a significant difference. It was concluded that T4 (ANA 0.1mg / l, BAP 2 mg / l) gave better results to the evaluated variables.

**Keywords:** *Camarosa, strawberry, culture, in vitro, protocol*

## I. INTRODUCCIÓN

La fresa proviene del género *fragraria* palabra que se origina del latín fragancia, perteneciente a la familia rosaceae y esta recae en la subfamilia rosoideas. Estudios revelan que a partir del siglo XVI fueron distribuidos a otros continentes, siendo la fresa un híbrido entre la *F. virginiana* y *F. Chilensis* de origen americano, y estas pueden desarrollarse de manera silvestre en zonas frías como cálidas, y pueden ser cultivadas siendo estas adaptadas a diferentes climas y lugares, valorándolas por sus características de sabor y aroma (Toledo, 2003)

En comparación con otras frutas, la fresa es muy valorada a nivel mundial por su forma, textura, color, sabor, aroma y valor nutritivo, ya que posee una alta cantidad de vitamina C, A, B1 y B2, y otros oligoelementos con propiedades diuréticas, antirreumática y anticancerígenas, que contribuyen al bienestar de la salud (MINAG, 2009)

A nivel mundial, la fresa se ha industrializado ya que tiene diversas y complejas maneras de uso, produciendo un desarrollo insólito en las diferentes áreas productivas, esto gracias a su morfología y fisiología que ayudan a manipularla en ambientes controlados. En ese sentido, la fresa es un fruto muy apetecido en la industria por su alta demanda, tanto para el consumo directo o sus derivados (Bethancourt, 2006).

A nivel nacional, la producción anual de la fresa fue de 22,620 TM, lo cual es producida en la sierra de Cusco, Ayacucho, Ancash y Lima, siendo el primer productor de cultivo de fresa la ciudad de Huaral con 11,522 TM, caracterizándose por producir variedades de “aroma” y “*camarosa*” por su alto rendimiento y sobrevivencia, la cual es demanda para la exportación por su calibre grande y alto grado brix (MINAG, 2011). En ese sentido, el Perú ha distribuido el producto a diversos países del mundo, como Estados Unidos, Europa, entre otros; dentro de los cuales están las variedades de *Chandler*, *Tajo*, *Sern*, *Aromas* y *Camarosa* (AREX, 2013). Así como, en el año 2014

nuestro país ha generado 22 millones de dólares americanos, distribuyéndolo en los mercados americanos, canadienses y brasileños (AGAP, 2014).

Uno de los métodos más eficaces para la optimización de la fresa es el cultivo *in vitro*, que permite el fortalecimiento y rendimiento de esta, basándose en reproducirlo de una parte de la planta, dando como resultados productos homogéneos, libre de enfermedades, en grandes cantidades y en cualquier estación del año (Castillo, 2004)

Para el proceso de selección y desinfección los explantes utilizados para el cultivo de la fresa provienen de la corona y/o estolones, siendo esta última la más recomendada para el proceso. Así mismo, existen algunas desventajas de la siembra en cultivo *in vitro*, una de ellas es la pubescencia de los tejidos que ocasionan contaminación a la planta (Sánchez y Salevarria, 2004). Para contrarrestar estas dificultades se han realizado experimentos *in vitro* de diferentes variedades cuyo objetivo fue controlar la contaminación, usando fungicidas y antibióticos en la planta madre y en el medio de cultivo.

Según Olivera (2003), la *Fragaria annanassa* var. *camarosa* suele ser muy precoz, con un elevado rendimiento durante todo su crecimiento, el cual siempre produce grandes frutos de intenso y brillante color rojo, con un buen sabor y firmeza de modo que, por sus mejores características viene reemplazando a la *Chandler* en Estados Unidos. Esta variedad sensible a dos plagas *Mildeo polvoso* y *Antracnosis* (Flores y Mora, 2010).

Se han realizado investigaciones de cultivo *in vitro* de fresa utilizando diferentes combinaciones de citoquininas solas o conjuntamente con otras hormonas para la obtención de brotes de fresa. Sakila et al. (2007) utilizó la hormona KIN que ayuda tanto a la estimulación de crecimiento y multiplicación de brotes, con ayuda del BAP donde se valoraron el efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal en la respuesta *in vitro* de explantes de *Fragaria ananassa* Duch obteniendo mejores

resultados: KIN (0.5 mg/l) y BAP (1.5 mg/l) con un 88% de inducción de múltiples brotes.

En el trabajo de Mir et al. (2010), introdujeron segmentos nodales de tres variedades de fresa, *Chandler*, *Camarosa* y *Oso Grande in vitro*, utilizando combinaciones de BAP en niveles de 1, 1.5, 2, 2.5, 3.0, 3.5 mg/l conjuntamente con ANA en concentraciones de 0.5, 0.1 mg/l, donde se obtuvo buena multiplicación en variedad *Camarosa* en medio MS con 2 mg/l BAP + 0.5 mg/L ANA, obteniendo un número de brotes (7.2) seguido del medio MS con 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA, obteniendo un número de 2.8 brotes.

El Ministerio de Agricultura (2008), refirió que la fresa constituye un producto rentable, que permite generar empleo continuo ya que puede ser procesada o de manera directa para el consumo local, nacional e internacional, esto debido a las nuevas variedades que han llegado al Perú que pueden ser trabajadas durante todo el año.

Los diversos estudios realizados afirman que la fresa proveniente del cultivo *in vitro* rinde mayor obtención de estolones a comparación de los métodos tradicionales de siembra, ya que su producción es mejor en forma, sobrevivencia, vigor y rendimiento de frutos (Swarts y Lindstrom,1986). Por lo tanto, el desarrollo de una técnica *in vitro* eficaz para la propagación de la fresa es de gran importancia.

Con respecto a lo descrito planteamos el siguiente problema ¿Cuál es efecto en la Inducción de brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa "*Fragaria ananassa* var.*Camarosa* utilizando diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (0.1, 0.25 y 0.5 mg/l) y 6- bencilaminopurina (0.5, 1 y 1.5 mg/l)?



## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Inducir brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa "*Fragaria ananassa* var. *Camarosa* utilizando diferentes combinaciones de ácido naftalenacético" (0.1, 0.25 y 0.5 mg/l) y 6- bencilaminopurina (0.5, 1 y 2 mg/l).

### 2.2. Objetivos Específicos

Determinar el tratamiento que induzca mayor número de brotes *in vitro* a partir de estolones de fresa "*Fragaria ananassa* var. *Camarosa* utilizando combinaciones de ácido naftalenacético y 6- bencilaminopurina."

Evaluar el efecto de las diferentes combinaciones de ácido naftalenacético y 6- bencilaminopurina en longitud del brote, número de hojas y número de raíces a partir de estolones de fresa.

## III. VARIABLES

- **Variable dependiente**

Obtención de brotes a partir de estolones de fresa.

- **Variable independiente**

Diferentes combinaciones de ácido naftalenacético y 6- bencilaminopurina

## IV. HIPÓTESIS

Se obtendrá mayor inducción de brotes de estolones de fresa "*Fragaria ananassa* var. *Camarosa* utilizando las combinaciones de ácido naftalenacético" (0.1 mg/l) y 6- bencilaminopurina (2 mg/l).

## V. MARCO TEORICO:

### 5.1. MATERIA PRIMA

#### 5.1.1. ORIGEN DE LA FRESA

El origen de la fresa proviene de Europa, el nombre procede del latín “fragans” fragante, es reconocida y apreciada desde la antigüedad (Nunes, 2007).

#### 5.1.2. DESCRIPCION TAXONOMICA

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Rosales
- **Familia:** Rosáceas
- **Género:** *Fragaria*
- **Especie:** *Fragaria ananassa*
- **Nombre Científico:** *Fragaria ananassa*
- **Nombres Común:** Fresa

#### 5.1.3. DESCRIPCIÓN BOTANICA

Planta herbácea, perteneciente a la familia de las rosaceae, de unos 15 a 45 cm. de altura, de follaje verde brillante, que nace del cuello de la planta y las hojas alternadas tienen un pecíolo de cada una, con distinta longitud y emergen del pedúnculo principal a diferente nivel (Sánchez, 2006).

Alvarado (2001) refiere que el tallo este compuesto por un eje corto llamado corona, donde se visualiza varias escamas foliares. Así mismo, las hojas son de forma de rosetas sobre la corona, con peciolos largos, limbo dividido en tres folíolos de bordes aserrados y en el envés se encuentran cubiertas de vellosidades.

Las flores se dan en racimos, partiendo de las axilas de las hojas, sus pétalos son de color blanco y se tarda entre 20 a 30 días para formación del fruto y estos se encuentran pegados al receptáculo.

Su sistema radicular está compuesto de raíces y raicillas; sufriendo procesos de renovación fisiológico, algunas veces influenciado por factores ambientales, patógenos de suelo, su profundidad es variable, logrando alcanzar entre 2 a 3 m (Villagrán ,1994).

#### **5.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y USOS DE LA FRESA**

Moreiras et al. (1992) refiere que la fresa posee el 89.6% de agua, 7% de hidratos de carbono, 0,5% de lípidos y 2,2% de fibra, esto en contenido en un 35Kcal/100g por fresa. Así mismo, posee 2.6% de glucosa, 2,3% de fructuosa y 1,3% de sacarosa, en relación a los minerales presenta potasio en su mayor proporción en comparación al fosforo, calcio y magnesio; manifestando que la fresa posee en mayor porcentaje la vitamina C.

En ese sentido, Almenar (2005) refiere que la fresa tiene diferentes propiedades para el beneficio del cuerpo, ya que su composición es del 85% de agua y posee propiedades diuréticas que sirven para perder peso y ayudan a las personas que padecen de cálculos renales. Por su parte, el Ministerio de Agricultura (2009) manifiesta que las fresas poseen grandes cantidades de Vitamina C, A. B1 y B2.

#### **5.1.5. VARIEDAD DE FRESA**

En el mundo existen diversas variedades de fresas como: Chandler, Tajo, Sem, Aromas y Camarosa (MINAG, 2008). En nuestro país, se produce cultivos de día corto entre los meses de abril a mayo, a comparación del día neutro que se cultivan durante el año.

### 5.1.5.1. VARIEDADES DE DÍA CORTÓ

Estas variedades se trasplantan en los meses de abril y mayo, su floración se obtiene en fotoperiodo corto de 12 horas luz y a temperatura fluctúa entre 14 y 18 °C.

En Perú las más producidas son:

- “*Chandler*”, conocida como “Cañetana”. es una variedad originaria de la Universidad de California, con una buena aceptación en el mercado de consumo en fresco sus frutos son de forma cónica alargada de color rojo intenso y de tamaño grande. Tiene un elevado rendimiento con una ventaja de tener una producción continua desde agosto hasta fines de enero solo en condiciones de costa y teniendo una tolerancia al transporte.
- “*Tajo*”, es conocida también como “Holandesa” y “Cresta de gallo”. Posee unos frutos grandes con una coloración rojo anaranjada, de forma ligeramente redondeada poco achatada con esta variedad se obtiene un elevado rendimiento y siendo tolerante al transporte.
- “*Pájaro*”, también procede de la Universidad de California, pero es más tardío. Con un menor rendimiento que las anteriores.
- “*Camarosa*”: es una variedad que al igual que las otras variedades obtenida por la Universidad de California, tiende a ser precoz, dando un elevado rendimiento durante toda la cosecha, presentando frutos grandes con un color rojo intenso y brillante en la parte externa, forma cónica y achatada, con buen sabor y firmeza. Por obtener mejores características lo reemplaza a la “*Chandler*” en Estados Unidos”, MINAG, (2008).

### 5.1.5.2. VARIEDADES DE DÍA NEUTRO

En el caso del fotoperiodo, la temperatura o la acumulación de horas frío no está involucrado en la floración. Tienen la ventaja de producir en contraestación. Entre las más reconocidas en el país tenemos;

- “*Sern*”, es conocida como “Sancho”, que es obtenido por la Universidad de California. con unos frutos de forma cónica oblonga, con una tendencia a ser

achatados de color rojo anaranjado brillante, calibre normal y de dureza bastante consistente, la pulpa muy consistente con corazón lleno. Se puede cosechar en cualquier época del año, pero no tiene floración continua, por lo que no se usa en cultivos intensivos.

- “*Aromas*” con una alta productividad, esta planta es de hábito erecto, dando frutos de buen color y un calibre muy consistente. Teniendo un amplio espectro de tolerancia a diferentes cambios de temperatura del medio ambiente.

### **5.1.6. SITUACIÓN DEL CULTIVO DE FRESA**

A nivel mundial el cultivo de la fresa se ha vuelto el boom ya que es una actividad productiva con amplias ganancias, en el Perú existen la región Lima y La Libertad son los principales productores de este fruto. Observando un elevado crecimiento en producción y comercialización de la fresa, ya sea para consumo en fresco o en diversos productos procesados; logrando que dentro del sector agropecuario brinde oportunidades laborales y alternativos en el acceso a nuevos mercados todo esto aprovechando la globalización y los tratados de libre comercio (MINAG, 2008).

### **5.1.7. PLAGAS**

#### **5.1.7.1. Afidos (*Pentatrichopus fragaefolii*)**

Dentro de las plagas que pueden causar daño en la producción tenemos el pulgón de fresa (*Pentatrichopus fragaefolii*), que según Attra (2006), el clima seco ayuda al desarrollo de nuevas poblaciones de pulgones que causa daño por medio de succión de la savia, esto detiene el crecimiento de las plantas transmitiendo virosis; ante esta situación los insecticidas sistémicos y de contacto pueden controlar dicha plaga.

### **5.1.7.2. Arañitas (*Tetranychus urticae* y *Cinnabarinus*)**

Este tipo de plaga se visualiza según Villigrán (1994) por que están protegidas por una gran telaraña fina que cubre el producto, una forma de dar solución es por intermedio de la depuración de los árboles secos que se encuentran alrededor, también el retiro de los residuos de cosechas anteriores y podas; por otro lado, se debe evitar la conexión de caminos secos y polvorientos, tener un control biológico como la liberación de fitoseidos predadores como el *Amblyseius* spp, control químico como el abamectina, lambdacialotrina, diafenturion, clofentezin, flufenxuron, etoxazole acompañados por un ovicida como el tetradifon y la rotación de moléculas.

### **5.1.7.3. Thrips (*Frankliniella occidentalis*)**

Estudios refieren que los trips constituye uno de los grupos de artrópodos más dañinos en el cultivo, siendo las flores el sitio en el cual se debe basar un umbral de acción siendo este el nacimiento a la fruta y que al inicio es más susceptible al daño y por ende a la pérdida de la producción (Steiner y Goodwin, 2005).

En ese sentido, Albendín, García y Molina (2021) refieren en el estadio ninfa y adulto van a perforar y succionar las células de las hojas, provocando manchas oscuras siendo los daños en las flores y frutos de la fresa.

Por su parte, Flórez y Mora (2010) también refieren que los trips causan daños en los frutos de la fresa volviéndolo sus frutos bronceados, opacos y deformados, para lo cual deben tener cuidado en el monitoreo de esta plaga, realizar fumigaciones con hidrolato de ajo, la no exterminación de los enemigos naturales como *Orius* spp, *Chrysoperla* spp., *Amblyseius* spp., y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, y un buen control químico con fipromil, triociclanhidrogenoxalato, lambdacialotrina y spinosad contribuirá a eliminar esta plaga.

#### **5.1.7.4. Gusanos cortadores**

Los destrozadores y cortadores (*Spodoptera spp*), “pueden ocasionar daños en el punto de crecimiento de la corona, siendo las larvas más pequeñas causar el deterioro de los frutos, se debe tomar un seguimiento por medio de control biológico como *Bacillus thuringiensis* y liberación de *Trichogramma spp* para control de huevos y control químico por medio de la utilización de clorpirifos y lambda cialotrina (Flórez & Mora, 2010).”

#### **5.1.7.5. Ácaro del Cyclamen (*Steneotarsomenus pallidus*)**

Las plagas más mortales es el acaro que provoca a la planta tener hojas rizadas, abullonadas, rugosas y de color parduzco, a las vez una fuerte disminución en el crecimiento y enanismo, obteniendo frutos secos y ásperos secos, pequeños con los aquenios sobresalientes el manejo, para eliminar esta plaga se utilizan plantas certificadas, con plantas establecidas de cultivos nuevos aislados de plantas viejas gracias al manejo químico en fresa para poder controlar el acaro debe de rocearse con los insecticidas ya sea; abamectina, lambda cialotrina, diafenturion, clofentezin, flufenxuron, etoxazole acompañados de un ovicida (tetradifon) y haciendo rotación de moléculas (Flórez & Mora, 2010).

#### **5.1.7.6. Gastropodos**

Según Flórez & Mora (2010), indica que las babosas (*Deroceras spp.*) a su paso botan un rastro de baba brillante que deja agujeros profundos en los frutos, para su debido control se debe preparar el terreno triturando las babosas y exponiéndolas posteriormente a la deshidratación y a aves predatoras, con respecto al control químico debe de hacerse con cebos tóxicos a base de metaldehído que no entren en contacto con los frutos.

## **5.1.8. ENFERMEDADES**

### **5.1.8.1. *Rhizoctoniasis (Rhizoctonia fragariae)***

Las coronas con esta enfermedad aparecen lesiones en la zona cortical café obscuro a necróticas, en las raíz se producen lesiones, las raicillas afectadas se mueren y provocando pudrición en la parte de la punta de los frutos verdes, para su posterior control de la enfermedad se debe tener en cuenta no sembrar donde hayan sembrado papa, tomate, pimentón, se debe garantizar un buen drenaje del suelo y su control químico puede realizarse por la desinfección de plantas antes de su siembra por inmersión en solución de fungicidas con benomil o tiofanato (Flórez & Mora, 2010).

### **5.1.8.2. *Verticilosis (Verticillium alboatrum)***

Esta enfermedad es producida por un hongo que ataca a la corona y a las raíces, presentando oscurecimiento en las hojas adultas, esto se ve afectado por los cambios climáticos ya que las temperaturas cambian bruscamente; para prevenir se recomienda no sembrar en el mismo campo, seleccionar adecuadamente el material y una vez que presenten síntomas de dicha enfermedad debe utilizarse fungicidas a fase de fosetil aluminio o fosfito de potasio (Olivera, 2003)

### **5.1.8.3. *Moho gris (Botrytis cinérea)***

Llamada también pudrición gris, su propagación se da a través de esporas, el viento y el agua contribuyen a esta enfermedad (Olivera, 2003), afectando las flores, los botones y frutos, a este último este hongo le produce ablandamiento y cuando es severo se observa completamente con vello gris y pueden contagiar a los frutos sanos a través de las esporas infectadas (Flórez y Mora, 2010). Para prevenir esta plaga se debe tener control del riego y eliminar los frutos contaminados (Olivera, 2003). Así mismo, Flórez y Moran (2010) refieren que para prevenir se debe utilizar densidades



de siembra no muy altas que permitan aireación, evitar fertilizaciones nitrogenadas excesivas, control con moléculas químicas con rotación fungicidas a base de piraclostrobin+ metiram o piraclostrobin+ epoxiconazol.

#### **5.1.8.4. Mildew polvoso (*Sphaerotheca macularis*)**

Esta enfermedad aparece en el envés de la hoja y luego se propaga en ambas caras y al enrollarse las hojas hacia arriba se observa un polvillo gris y al avanzar la enfermedad presentan muchas manchas purpuras sobre toda la hoja, afectando también los pétalos de las flores adquiriendo una coloración rosada (Flórez y Moran, 2010). Inicialmente se puede controlar con fungicidas de azufre en polvo o micronizado, la densidad de la siembra no se debe altas, ni fertilizaciones nitrogenadas excesivas y, por otro lado, si los ataques de la enfermedad son severos se debe utilizar un control químico como: penconazol, myclobutani, fenarimol, triadimefon y kresoxin-menti (Olivera, 2003)

## **5.2. REQUERIMIENTO PARA CULTIVO *IN VITRO***

Las plantas necesitan de varios nutrientes el cual son esenciales para el crecimiento y desarrollo de una planta, de modo que sin agua y nutrientes minerales no podrán subsistir *in vitro* ni in vivo, al igual se deben añadir azúcares al medio de cultivo, porque las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas al desarrollarse en estas condiciones (Aceves & Hernández, 1997).

Componentes necesarios para un medio de cultivo: cómo actúan en el crecimiento del explante:

- ✓ Agua destilada; con un 95% del medio nutriente.
- ✓ Fuente de carbono (sacarosa); es necesario porque las plantas no son completamente autótrofas, y por ende no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que puedan realizar in vitro. (Murashige, T. & F. Skoog, 1962).

- ✓ Sustancias inorgánicas (macroelementos); Mg, magnesio primer componente de la molécula de clorofila, que da el color verde a las hojas y es importante en el proceso, N, nitrógeno da el color verde intenso a las hojas, incrementando los niveles de proteína y favoreciendo el crecimiento vegetativo, K, potasio relación con 4 N para el crecimiento, desarrollo y calidad de la planta, se encarga de elaborar los azúcares y almidón, con la intervención en los tejidos protegiéndolos de enfermedades, Ca, calcio está involucrado en el equilibrio de acidez y alcalinidad, P, fósforo interviene en los diferentes procesos bioquímicos a nivel celular, asumiendo un papel importante en el desarrollo del sistema radicular, formando el tejido leñoso y la maduración de frutos, semillas, S, azufre importante en el metabolismo N y P, interviene en la formación de clorofila, importante en la síntesis de proteínas y vitaminas (Murashige, T. & F. Skoog, 1962).
- ✓ Sustancias inorgánicas (microelementos); B, boro de suma importancia en la actividad meristematica, división celular, transformación de azúcares y almidón, Mn, manganeso importante para la reducción de nitratos, para la respiración actúa como catalizador en algunos procesos metabólicos, interviene en el metabolismo P-N, aumenta P-Ca, ayuda en la síntesis de clorofila, cumple un papel directo en la fotosíntesis, Zn, zinc actúa en el proceso de crecimiento de las plantas y tiene como participación directa en la formación AIA (ácido indol-3 acético), y en la síntesis del triptófano precursor de las auxinas, Cu, cobre es un catalizador para la respiración ,que van a necesita las plantas de cobre para el término de su ciclo de vida y producir semillas viables, Fe, hierro es muy esencial para la clorofila aunque no es parte de ella, Mo, molibdeno participa en la bioquímica de la absorción, transporte y fijación de nitrógeno, Cl, cloro participación de la forolisis del agua (Murashige, T. & F. Skoog. 1962).
- ✓ Vitaminas; glicina, pilares estructurales de la clorofila y citocromo, favorece la formación de nuevos brotes, formación de tejido foliar, Acido nicotínico, forma parte de las coenzimas, ejerce una acción inhibitoria en el desarrollo de yemas axilares, Tiamina, importante para que las células vivas puedan realizar sus funciones vitales, esencial para el crecimiento de células vegetales e intervienen en la síntesis de citocininas, Piridoxina, precursor del AIN (indol-3-acetonitrilo), va a favorecer en

la formación de raíces, Myo-inositol, es un azúcar alcohol, un efecto en la proliferación de tejidos (Murashige, T. & F. Skoog, 1962).

### **5.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO**

La principal función de estas hormonas es ajustar el desarrollo de la planta químicamente. Las hormonas más utilizadas son las auxinas: ácido dicloro fenoxiacético (2,4- D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), las citoquininas: kinetina (KIN), benzilamino purina (BAP), zeatina (ZEA); y las giberelinas como el ácido giberélico (AG3).

Estas hormonas se utilizan individualmente o en combinaciones cumpliendo un balance entre estas, aplicándose hacia el objetivo de lo que se desee obtener del cultivo, así mismo se encuentran otros elementos que se pueden incluir en el medio de cultivo entre ellos se encuentran: extracto de levadura, agua de coco, extracto de tubérculos de papa, cisteína o glicina entre otros aminoácidos que se utilizan como fuente de nitrógeno (Roca y Mroginski, 1991).

#### **5.3.1. AUXINAS**

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol-ácético (AIA), la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Srivastava 2002). Las auxinas son hormonas; compuestos orgánicos producidos por cualquier tejido en activo crecimiento de las plantas y que en muy bajas concentraciones regulan procesos vegetales e inducen efectos fisiológicos definidos (Sívori et al., 1986). Tienen la función de regular el crecimiento, la división celular, la diferenciación de raíces en los cultivos in vitro, intervienen en el tropismo a la gravedad, luz, dominancia apical, ayuda en el crecimiento de todas las partes florales, tiene un mecanismo de acción en aumentar la plasticidad de la pared celular que permite la expansión de la célula, las hormonas más usadas son el AIA ( ácido indol-3-acético), ANA( ácido alfa-naftalenacético), el 2,4 D( ácido diclorofenoxiacético), el

AIB (*ácido indolbutírico*), y son sintetizados en los ápices meristemáticos y menor cantidad en las raíces.

### **5.3.2. CITOQUININAS**

Esta hormona proviene por su estructura de adeninas o purinas, dentro de estas se encuentran la bencilaminopurina, kinetina y zeatina, estos reguladores de crecimiento son los encargados de la división celular generando inducción y desarrollo de brotes axilares, la germinación de semillas y la diferenciación celular (Klee y Estelle, 1991). La incorporación de esta hormona en el medio de cultivo cumple como principal función la activación de la división celular, para la obtención de brotes y diferenciación de estos a callos y órganos (Bhojwani, 2013).

### **5.4. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

Jiménez (1998), Comenta que el inicio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se remonta a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el inicio de la totipotencia celular que es la base teórica sobre la que se sustentan todos los técnicos de cultivo *in vitro*.

El cultivo de tejidos se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Levitus et al., 2010). Al respecto, Hartmann (1994) nos indica que el cultivo de tejidos vegetales está enfocado respectivamente a la obtención de plantas libres de patógenos, enfermedades y la propagación masiva de algunas especies de interés económico y biológico.

## 5.5. MICROPROPAGACION

Roca y Mroginski (1991), indican que la micropropagación de cualquier tipo de plantas se define como un procedimiento aséptico que comprende la manipulación de: tejidos, tejidos o células vegetales y órganos que van a producir poblaciones de plántulas el cual permite el desvío, en el proceso sexual normal y la propagación vegetativa no aséptica que se experimenta convencionalmente. La micropropagación es la propagación clonal que se desarrolla en condiciones asépticas, esta técnica se trabaja en su mayor aplicación en la multiplicación rápida de variedades nuevas o introducidas recientemente y en la reproducción de semilla en especies de reproducción agámica con bajos coeficientes de reproducción (Darías, 1993).

Aerts (1979) citado por Boxus (1984), Comenta que las plantas de fresa propagadas mediante métodos tradicionales (estolones) provoca una disminución de 20 a 80% de la producción de frutos y se da una reducción de un 50% el número de estolones en la variedad Gorella provocando la difusión de patógenos cuyo control es imposible en condiciones de campo. Por el contrario, en la variedad Fresno obtuvo un gran incremento en la producción de frutos (15 a 24%) al utilizar plantas provenientes de cultivo *in vitro*.”

## 5.6. VENTAJAS DE MICROPROPAGACION

Jiménez (1998), describe que las principales ventajas para realizar este sistema de propagación se pueden resumir en:

- Posee altos coeficientes de multiplicación el cual permitirán la manipulación de elevados volúmenes de plantas, en un corto tiempo.
- Se puede realizar una rápida introducción de nuevas variedades o clones.
- Con una producción independiente de las condiciones ambientales.
- Se da un gran incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Posee una uniformidad en las diferentes variedades de las plantas producidas.

## **VI. MATERIALES Y METODOS**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, en el distrito de Nuevo Chimbote, departamento de Ancash, Perú.

### **6.1 Materiales**

#### **6.1.1. Material vegetal**

El material vegetal utilizado en este trabajo de investigación, fueron estolones de fresa "*Fragaria ananassa* var. *Camarosa*" recolectadas de los sembríos de Vinzos en pampa alta s/n. Se seleccionaron estolones de fresa teniendo en cuenta yemas juveniles, color verdusco y apariencia sana. Una vez seleccionado el material vegetal se colocaron en depósitos y fueron llevados al laboratorio.

### **6.2. Métodos**

#### **6.2.1. Preparación del medio de cultivo**

El medio de cultivo se preparó según Murashige y Skoog (1962), con la adicción de 20 gr/l sacarosa, 8 gr/l de agar bacteriológico, constituyentes orgánicos y reguladores de crecimiento, ácido naftalenacético en concentraciones de (0.1, 0.25 y 0.5 mg/l) y 6- bencilaminopurina (0.5, 1 y 2 mg/l) para 1 litro de medio, luego fueron vertidos en viales de vidrio de aproximadamente 5 cm. En la Tabla 28 ubicado en anexos esta detallado el contenido del Ms. Se prepararon 100 ml de medio de cultivo para cada tratamiento, en un agitador magnético se puso un beaker previamente esterilizado, se añadió el medio Murashige y Skoog (MS) con los reguladores de crecimiento descritos en la Tabla 1. Con ayuda del pH metro se ajustó el pH del medio con gotas de NaOH hasta 5.6, una vez establecido el pH se añadió el agar y se llevó a la cocina por 9 minutos, con ayuda de la varilla se homogenizo el medio y vació en

15 viales de vidrio de cada tratamiento rotulados para ser llevados a su esterilización en la autoclave durante 30 minutos temperatura de 121 °C.

**Tabla 1.** Visualización de los tratamientos con sus respectivas concentraciones de hormonas.

Medio de cultivo	Tratamientos	Combinación de hormonas	
		ANA (mg/l)	BAP (mg/l)
MS	T1*	0	0
	T2	0.1	0.5
	T3	0.1	1.5
	T4	0.1	2
	T5	0.25	0.5
	T6	0.25	1.5
	T7	0.25	2
	T8	0.5	0.5
	T9	0.5	1.5
	T10	0.5	2

\*Tratamiento tomado como control.

MS= Murashige y Skoog

ANA= Ácido naftalenacético.

BAP= Bencialaminopurina.

### 6.2.2. Selección del material vegetal

Los explantes seleccionados fueron estolones de fresa juveniles con un color verdusco, sin presencia de decoloración. Se realizó cortes aproximadamente de 2 cm de estolones de fresa que contengan 1 yema.

### 6.2.3 Desinfección del material vegetal

Los estolones seleccionados se lavaron con detergente 3 veces durante 5 minutos y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril, luego el material

vegetal se puso en 1.5% de fungicida Kasumin (15 ml/l), por 15 min y fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril.

Los explantes se colocaron en un frasco de vidrio donde se sumergió en una solución de ácido cítrico al 1 % por 3 minutos dentro de la cámara, pasado esos minutos comenzamos el proceso de desinfección en etanol al 70% por 10 segundos y en hipoclorito al 1.05 % con 3 gotas de tween 20 en constante agitación por 20 minutos, terminado el tiempo se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril y posteriormente se realizó el proceso siembra.

#### **6.2.4. Introducción *in vitro***

Previo a la introducción *in vitro* el material necesario debe estar estéril (pinzas y bisturí), estas se pasaron por el mechero fijándose que la punta este bien quemada. Con la pinza estéril se sacó uno por uno los explantes y se colocó en una placa Petri. Se realizó los cortes con la pinza y bisturí bien estéril sacando las yemas de cada estolón, estos fueron introducidos en medio medio MS con los tratamientos. Una vez concluida la siembra los frascos se cerraron bien con papel aluminio y se rotularon de acuerdo a su código y se llevaron al cuarto de incubación donde se evaluarán semanalmente.

#### **6.2.5. Incubación**

El material vegetal sembrado de fresa se colocó en el cuarto de incubación lugar donde se mantuvo por un tiempo de 60 días una temperatura de 25° C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Se evaluó semanalmente la contaminación y proceso de desarrollo de los explantes de fresa sembrados *in vitro*.



### **6.2.6. Evaluación de brotes *in vitro* de fresa “*Fragaria ananassa*”**

- **Número de sobrevivientes**

Se evaluó la cantidad de explantes vivos y contaminados (hongos, bacterias o oxidados) a los 30 y 60 días.

- **Número de brotes *in vitro* de fresa**

Se evaluó la cantidad de brotes a los 30 días y 60 días, la cantidad de brotes que se obtuvo en la primera repetición debe tener una similitud a las repeticiones.

- **Tamaño del brote *in vitro* de fresa**

Se evaluó el tamaño del brote con una regla a los 30 días y 60 días el cual se tomó desde el tallo del explante hasta el término de la hoja, pero sin exponerlo fuera de su medio.

- **Número de hojas *in vitro* de fresa**

Se evaluó el número de hojas de cada brote, a los 30 días y 60 días contando las hojas de cada brote, ya sean pequeñas o grandes luego se promedió el total de hojas que se obtuvo entre la cantidad de brotes, finalmente colocamos la cantidad de hojas que se dio por el tratamiento.

- **Número de raíces *in vitro* de fresa**

Se evaluó el número de raíces, a los 30 días y 60 días contando las raíces de cada brote *in vitro*.

### **6.2.6. Diseño experimental**

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, para analizar el mejor resultado de las combinaciones de ambas hormonas en los tratamientos propuestos. Se realizó la prueba tukey con un nivel de significancia del 5% para determinar las diferencias de las combinaciones de estas hormonas, estos se realizarán a través del programa estadístico SPSS versión 23.0.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1. PORCENTAJE DE EXPLANTES SOBREVIVIENTES A CONTAMINACION U OXIDACION

El porcentaje de explantes sobrevivientes se evaluó durante los 30 días en incubación, obteniendo el 100% de sobrevivencia en los tratamientos T4 (ANA 0.1 mg/l + BAP 2 mg/l), T6 (ANA 0.25 mg/l + BAP 1.5 mg/l), T9 (ANA 0.5 mg/l + BAP 1.5 mg/l), y T10 (ANA 0.5 mg/l + BAP 2 mg/l). Los tratamientos que se obtuvo porcentaje de oxidación u contaminación al 20 % fueron: T2 (ANA 0.1 mg/l + BAP 0.5 mg/l), T3 (ANA 0.1 mg/l + BAP 1.5 mg/l) y T7 (ANA 0.25 mg/l + BAP 2 mg/l), los tratamientos restantes como el T1 control, T5 (ANA 0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l) y T8 (ANA 0.5 mg/l + BAP 0.5 mg/l) presentaron contaminación u oxidación al 13% como muestra la Tabla 2 de manera detallada.

Investigaciones toman en cuenta muchos factores para que el explante no se muera por las cantidades de desinfectantes que se usara antes de la siembra *in vitro*. Según Sánchez y Salaverry (2004), utilizaron en su investigación yemas provenientes de estolones los menores porcentajes de contaminación se obtuvieron con 20 y 30% de cloro durante 20 y 30 min. En el tratamiento con 30% de cloro y 30 minutos de inmersión, a pesar de no haber habido contaminación, la sobrevivencia fue de tan solo el 50%, lo que indica que este tratamiento fue tóxico para los explantes. Según esta investigación, con respecto a la inmersión en una solución de cloro 20 % durante 20 minutos es el recomendado obteniendo un 90% de sobrevivencia, este resultado concuerda con nuestra investigación donde obtuvimos bajos porcentajes de oxidación y contaminación de los explantes utilizando el 20% de hipoclorito de sodio (1.05% NaClO) durante 20 minutos de inmersión.

El origen del material vegetal es importante para su establecimiento y propagación *in vitro* por la alta susceptibilidad a la presencia de contaminantes. La investigación de Sánchez (2005), como resultado de la introducción de dos tipos de

explantes de fresa a condiciones *in vitro* muestra que cuando utilizó yemas provenientes de estolones el 100% de los explantes no presentaron contaminación y presentaban 0% de oxidación, esto debido a que los explantes fueron sumergidos en ácido cítrico al 1% antes de la desinfección y posteriormente se desinfectó por 13 minutos en (NaClO al 0.8%). En esa investigación se utilizó dos tipos de explantes de fresa por yemas de coronas y yemas de estolones, donde resultó que las yemas de estolones no presentaron contaminación y fue el material vegetal más adecuado para el establecimiento *in vitro* de fresa. Esto asume el hecho de que las yemas de corona se encuentran en contacto directo con el suelo, la misma que ayuda que el tejido se encuentre más expuesto a agentes contaminantes dificultando la eliminación total de los microorganismos por el desinfectante.

Otro factor importante es tener en cuenta la pubescencia del tejido ya que, si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol 70% durante 30 segundos para que se pueda romper la tensión superficial y hacer la superficie más accesible a la acción de los agentes desinfectantes, Villalobos y Pérez (1979). En nuestra investigación utilizamos como material vegetal yemas de estolones juveniles, de color verdusco y que no muestren daños, de lo cual no fue tan afectada por la presencia de contaminantes como hongos y bacterias, donde su presencia impiden el desarrollo de los explantes debido a que usamos un método de desinfección que consistió en un prelavado con detergente, fungicida al 1.5% y ácido cítrico al 1%, luego en la cámara de flujo laminar se realizó la desinfección al 1.05 % de hipoclorito de sodio y etanol al 70 % por 10 segundos obteniendo el 90% de sobrevivencia. En el estudio de Jami (2018) se evaluó el efecto de fungicidas y bactericidas con la finalidad de controlar la contaminación y oxidación, su resultado fue que la menor oxidación se obtuvo al tratar los estolones con Kasumin obteniendo un 35 % de oxidación, con respecto a nuestra investigación usando el mismo fungicida obtuvimos menos porcentaje de oxidación esto puede ser debido a que los explantes antes de la desinfección fueron lavados con ácido cítrico al 1% antes de llevarlo a la cámara para realizar el proceso de desinfección, siendo esta práctica utilizada para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica de los explantes (Jiménez, 1999) .

En la tabla 2 se presentan de manera detallada los resultados de los explantes con oxidación u contaminación, así como el porcentaje de sobrevivencia.

**Tabla 2.** *Porcentaje de sobrevivencia de fresa in vitro a los 30 días de inoculación*

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>ANA (mg/l)</b>	<b>BAP (mg/l)</b>	<b>N° de explantes introducidos</b>	<b>N° de explantes oxidados</b>	<b>N° de explantes contaminados</b>	<b>N° de explantes vivos</b>	<b>% sobrevivencia</b>
<b>1</b>	0	0	15	1	1	13	87
<b>2</b>	0.1	0.5	15	2	1	12	80
<b>3</b>	0.1	1.5	15	1	2	12	80
<b>4</b>	0.1	2	15	0	0	15	100
<b>5</b>	0.25	0.5	15	2	1	13	87
<b>6</b>	0.25	1.5	15	0	0	15	100
<b>7</b>	0.25	2	15	2	1	12	80
<b>8</b>	0.5	0.5	15	1	1	13	87
<b>9</b>	0.5	1.5	15	0	0	15	100
<b>10</b>	0.5	2	15	0	0	15	100

**Tabla 3.** ANOVA sobre el número de sobrevivientes a los 30 días por efecto de los diferentes tratamientos.

<b>Origen</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>de GI</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Tratamiento combinado</b>	22,000	9	244,444	2,037	,089
<b>Error experimental</b>	24,000	20	120,000		
<b>Total</b>	46,000	29			

En la Tabla 3 se aprecia el valor de  $F = 2,037$  y la significancia  $p = 0,089$ . Al ser la significancia  $p > 0,05$  los tratamientos no han generado diferencia promedio significativa de sobrevivencia a la contaminación u oxidación de yemas de fresa. Debido a que sólo se usó un método de desinfección y una sola concentración para evitar la oxidación que consistió en 1 % de ácido cítrico, resultando que todos los tratamientos fueron similares en lo que respecta a la sobrevivencia.

## **7.2. NUMERO DE BROTES**

### **7.2.1. Evaluación a los 30 días**

La inducción de brotes se evaluó después de los 30 días de ser transferidos los explantes a sus respectivos tratamientos, los resultados que se obtuvieron un mayor número de brotes fueron: tratamiento 4 (ANA 0.1mg/l + BAP 2 mg/l) con 3.7 brotes, Tratamiento 10 (ANA 0.5 mg/l + BAP 2 mg/l) con 3.4 brotes y tratamiento 7 (ANA 0.25 mg/l + BAP 2 mg/l) con 2.6 brotes, estos tratamientos consistían con la citoquinina BAP a altas concentraciones. La incorporación de citoquininas en medios de cultivo es principalmente para activar la división celular, y para inducir la obtención de brotes. (Bhojwani, 2013).

Investigaciones han demostrado los resultados convenientes del uso de BAP conjuntamente con otras citoquininas o auxinas en la obtención de brotes *in vitro* de fresa, las cuales coinciden con Mir et al. (2010) que obtuvo buenos resultados en los medios que contenían su mayor concentración de BAP 2 mg/l, donde hubo una mayor obtención de brotes en los explantes introducidos de fresa.

Por el contrario a los 30 días de inoculación nuestros resultados de los tratamientos que contenían bajas concentración de BAP se obtuvieron menor cantidad de brotes como son los casos de los tratamientos: Tratamiento 1 (control) que contenía solo MS sin la adición de hormonas, tratamiento 2 (ANA 0.1 mg/l + BAP 0.5 mg/l), tratamiento 5 (ANA 0.25 mg/l, BAP 0.5 mg/l) y el tratamiento 8 (ANA 0.5 mg/l + BAP 0.5 mg/l).

En la Tabla 4, nos muestra detalladamente los tratamientos con los números de brotes obtenidos en cada uno de ellos a los 30 días, resultando que el mayor número de brotes obtenido fue el tratamiento 4 (ANA 0.1mg/l +BAP 2 mg/l) con 3.7 brotes.

En la Tabla 5 se aprecia el valor de  $F = 193,880$  y la significancia  $p = ,000$ . Al ser la significancia  $p > 0,05$  nos indica que hay evidencia suficiente para decir que las diferencias de media del número de brotes en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina es significativo en la obtención de brotes a los 30 días de inoculación. Por lo tanto, las diferencias se muestran en la siguiente Tabla 6.

**Tabla 4.** Número de brotes de cada explante de fresa *in vitro* en los tratamientos a los 30 días de siembra.

TRATAMIENTOS	CC		BROTOS EN CADA NUMERO DE EXPLANTES															TOTAL	PROMEDIO
	HORMONAS		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	0	1	1	0	1	0	9	0.6
<b>T2</b>	0.1	0.5	1	1	0	2	0	1	1	0	1	1	1	0	2	1	1	13	0.9
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	3	3	0	3	3	0	2	3	3	3	2	2	2	2	31	2.1
<b>T4</b>	0.1	2	4	3	4	3	4	3	4	4	4	4	3	4	4	3	4	55	3.7
<b>T5</b>	0.25	0.5	1	1	2	0	2	1	1	0	2	2	1	2	1	2	1	19	1.3
<b>T6</b>	0.25	1.5	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	29	1.9
<b>T7</b>	0.25	2	3	0	3	3	4	0	3	3	3	4	0	3	3	3	4	39	2.6
<b>T8</b>	0.5	0.5	1	0	1	1	1	2	0	1	1	1	1	2	1	0	1	14	0.9
<b>T9</b>	0.5	1.5	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3	2	3	2	2	34	2.3
<b>T10</b>	0.5	2	3	3	3	4	4	3	3	3	4	4	3	4	3	4	3	51	3.4

**Tabla 5.** ANOVA sobre el número de brotes en los tratamientos a los 30 días de siembra.

Origen	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento combinado	30,245	9	3,361	193,880	,000
Error experimental	,347	20	,017		
Total	30,592	29			

**Tabla 6.** Prueba Tukey para encontrar el tratamiento sobre el número de brotes a los 30 días de siembra.

**HSD Tukey**

TRATAMIENTO	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
COMBINADO						
1	3	,600 a				
2	3	,867 a				
8	3	,933 a	,933 a			
5	3		1,27 b			
6	3			1,93 c		
3	3			2,07 c		
9	3			2,27 c	2,27 c	
7	3				2,60 d	
10	3					3,40 e
4	3					3,67 e
Sig.		,118	,118	,118	,118	,334

Con el análisis estadístico Tukey que muestra la Tabla 6, podemos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado los tratamientos T4 (ANA 0.1 mg/l +BAP 2 mg/l) con 3.67 brotes y el T10 ((ANA 0.5 mg/l +BAP 2 mg/l) con 3.40 brotes a los 30 días de inoculación.



### 7.2.2. Evaluación a los 60 días

Los resultados obtenidos del número de brotes en cada tratamiento a los 60 días de incubación se muestran detalladamente en la Tabla 7, en donde se observa que los tratamientos que indujo menor cantidad de número de brotes fueron los tratamientos: Tratamiento 1 (control) que contenía solo MS sin la adición de hormonas con 1.3 brotes, Tratamiento 2 (ANA 0.1 mg/l + BAP 0.5 mg/l) con 1.9 brotes, tratamiento 5 (ANA 0.25 mg/l, BAP 0.5 mg/l) con 2.7 brotes y el tratamiento 8 (ANA 0.5 mg/l + BAP 0.5 mg/l) con 2.1 brotes.

Los tratamientos que indujeron mayor número de brotes fueron los tratamientos: tratamiento 4 (ANA 0.1mg/l + BAP 2 mg/l) con 6.5 brotes, Tratamiento 10 (ANA 0.5 mg/l + BAP 2 mg/l) con 4.6 brotes y tratamiento 7 (ANA 0.25 mg/l + BAP 2 mg/l) con 4.5 brotes. El número de brotes aumentó a medida que al medio de cultivo se le aumentaba la concentración del regulador de crecimiento BAP (citoquinina). Saucedo et al., (2007) los brotes juveniles *in vitro* pueden sintetizar una pequeña cantidad de citoquininas, pero ésta es insuficiente para inducir el crecimiento y desarrollo de los brotes, por lo tanto, es necesario adicionar al medio este regulador de crecimiento a casi el 85% de medios de cultivo empleados para la micropropagación (Pérez, 1998).

Los autores AzcónBieto y Talon (2000), mencionan que la inducción de brotes es promovida por un balance auxina con citoquinina favorable a las citoquininas es decir, el control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas. La menor obtención de brotes en los tratamientos propuestos en nuestra investigación estaba compuesta por medios con bajas cantidades de la hormona BAP que es una citoquinina que ayuda a la formación masiva de brotes.

Se han realizado investigaciones utilizando diferentes combinaciones de citoquininas conjuntamente con otras hormonas para la obtención de brotes de fresa.

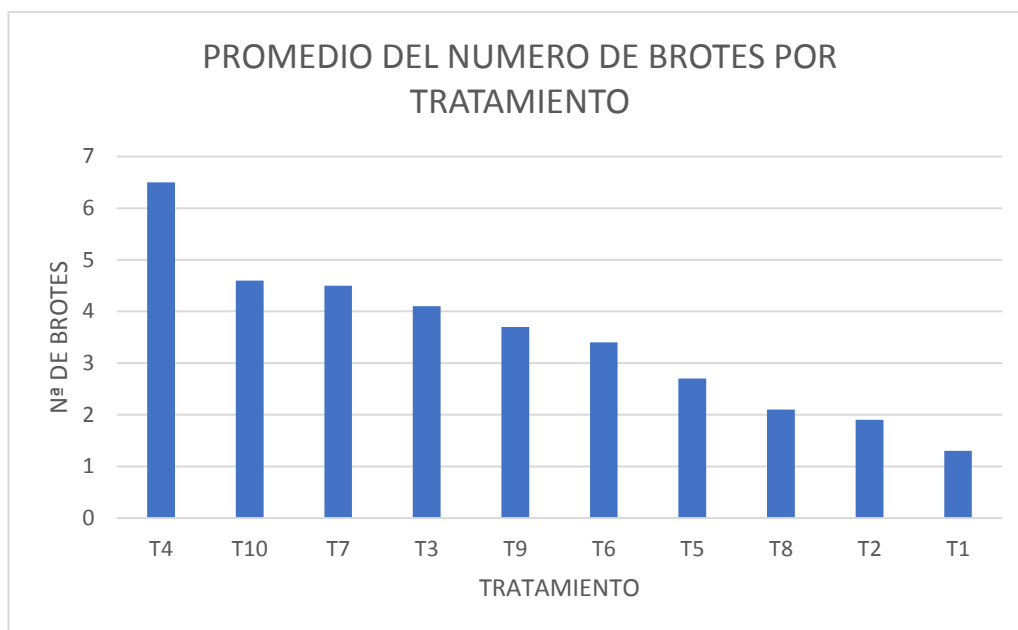
Los resultados de nuestra investigación concuerdan con los trabajos Sakila, et al (2007) utilizo la hormona KIN que ayuda tanto a la estimulación de crecimiento y multiplicación de brotes, con ayuda del BAP donde se valoraron el efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal en la respuesta *in vitro* de explantes de *Fragaria ananassa Duch* obteniendo mejores resultados: KIN 0.5 mg/l + BAP 1.5 mg/l con 10.1 brotes. Esta investigación al igual de la nuestra concuerdan que el uso de BAP es necesaria para la inducción de brotes *in vitro* en fresa

Para la variable brotes nuestro tratamiento que indujo mayor número de brotes fue MS con 2 mg/l BAP + 0.1 mg/L ANA con 6.5 brotes a los 60 días. Estos datos no coinciden con la investigación de Mir et al. (2010), que obtuvo una mayor obtención de brotes en variedad *Camarosa* en medio MS con 2 mg/l BAP + 0.5 mg/L ANA, obteniendo un número de 7.2 brotes, si bien es cierto la concentración de BAP tanto en la investigación de este autor y la nuestra es la adecuada, la relación auxina y citoquinina difiere.

En el Perú no se han realizado muchas investigaciones con esta variedad, pero en otros países como en la india que se realizó la investigación de este autor necesitaron más ANA (para obtener mejores resultados) puede ser debido a que las plantas necesitan más nutrientes por el drástico cambio de clima, en el caso de nuestro experimento el medio de cultivo ideal para fresa *var Camarosa* es MS+ ANA 0.1 mg/l + BAP 2mg/l con respecto al número de brotes con poca cantidad de auxina ANA y alto concentración de citoquinina BAP obtuvimos mejores resultados.

**Tabla 7.** Número de brotes de cada explante de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra

TRATAMIENTOS	CC		BROTOS EN CADA NUMERO DE EXPLANTES															TOTAL	PROMEDIO
	HORMONAS		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	2	1	2	1	0	2	1	2	1	2	2	1	2	1	20	1.33
<b>T2</b>	0.1	0.5	2	2	0	3	0	2	3	0	2	3	2	2	2	3	2	28	1.87
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	6	5	0	6	5	0	5	5	5	5	5	4	5	5	61	4.07
<b>T4</b>	0.1	2	6	6	7	7	6	7	7	6	6	7	7	6	7	7	6	98	6.53
<b>T5</b>	0.25	0.5	3	3	4	0	3	3	3	0	4	3	3	3	3	3	3	41	2.73
<b>T6</b>	0.25	1.5	3	4	3	4	3	4	3	3	4	3	4	3	3	3	4	51	3.40
<b>T7</b>	0.25	2	6	0	6	5	5	0	6	6	5	5	0	6	6	5	6	68	4.47
<b>T8</b>	0.5	0.5	2	0	2	3	2	3	0	2	2	3	3	3	2	2	2	31	2.07
<b>T9</b>	0.5	1.5	4	3	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	3	56	3.73
<b>T10</b>	0.5	2	4	5	4	5	5	4	5	5	5	4	4	5	4	5	5	69	4.60



**Figura 1.** Promedio de número de brotes por tratamiento.

**Tabla 8.** ANOVA sobre el número de brotes en los tratamientos a los 60 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Tratamiento combinado</b>	65,195	9	7,244	79.895	,000
<b>Error experimental</b>	1,813	20	,091		
<b>Total</b>	67,008	29			

En la Tabla 8 se aprecia el valor de  $F = 79,895$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del número de brotes en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6–bencilaminopurina son muy significativos en los 60 días de inoculación en la obtención de brotes *in vitro* de fresa var. *Camarosa*.

Por lo tanto, las diferencias se detallan en la Tabla 9, con el análisis estadístico Tukey se puede observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado el tratamiento 4 (ANA 0.1 mg/l + 2 mg/l BAP) que obtuvo un mayor número de brotes resultando un promedio de 6.53 brotes a los 60 días de inoculación.

**Tabla 9.** Prueba Tukey sobre el número de brotes a los 60 días de siembra

TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
1	3	1,33 a					
2	3	1,87 a	1,87 a				
8	3	2,07 a	2,07 a				
5	3		2,73 b	2,73 b			
6	3			3,40 c	3,40 c		
9	3				3,73 d	3,73 d	
3	3				4,07 d	4,07 d	
7	3					4,47 e	
10	3					4,60 e	
4	3						6,53 f
<b>Sig.</b>		0,146	,052	,234	,234	,052	1,000

## 7.3. NUMERO DE HOJAS POR BROTE

### 7.3.1. Evaluación a los 30 días

Se evaluó los explantes por tratamiento realizando un conteo de número de hojas con respecto a la brotación con la finalidad de determinar que tratamientos obtienen mejores resultados.

El número de hojas por brote obtenido se evaluó después de los 30 días de ser transferidos los explantes a sus respectivos tratamientos, los resultados que obtuvieron un mayor número de hojas fueron el tratamiento 4 (ANA 0.1 mg/l + 2 mg/l BAP) con 2.3 hojas seguido del tratamiento 10 (ANA 0.1 mg/l + 2 mg/l BAP) con 2.1 hojas y tratamiento 7 (ANA 0.25 mg/l + 2 mg/l BAP) con 1.7 hojas, como se puede visualizar detalladamente en la Tabla 10.

Según la investigación de Sánchez (2005), trabajo con 2 tipos de explantes resultando que en condiciones *in vitro* las yemas provenientes de estolones tienen la capacidad de formar una hoja en un lapso corto de 13 días en cambio los explantes de corona tardaron 29 días, es decir, 16 días más que los estolones.

Este trabajo concuerda con nuestra investigación a los 30 días ya podíamos observar un mínimo de 1 hoja y máximo de 2 hojas formadas en los diferentes tratamientos provenientes de la inoculación *in vitro* de yemas de estolones

**Tabla 10.** Número de hojas por brotes de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra

TRATAMIENTOS	CC		NUMERO DE HOJAS POR BROTE															TOTAL	PROMEDIO
	HORMONAS		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	9	0.6
<b>T2</b>	0.1	0.5	1	2	0	2	0	2	1	0	2	1	1	2	2	1	2	19	1.3
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	2	2	0	0	2	0	2	2	2	1	2	2	2	2	21	1.4
<b>T4</b>	0.1	2	2	2	2	3	2	2	3	2	3	2	2	3	2	3	2	35	2.3
<b>T5</b>	0.25	0.5	1	0	1	0	2	1	0	0	2	2	0	2	1	1	2	15	1.0
<b>T6</b>	0.25	1.5	3	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	0	2	2	23	1.5
<b>T7</b>	0.25	2	2	0	2	2	2	0	2	2	2	3	0	2	2	2	3	26	1.7
<b>T8</b>	0.5	0.5	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	3	0	1	0	1	10	0.7
<b>T9</b>	0.5	1.5	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	0	2	22	1.5
<b>T10</b>	0.5	2	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	32	2.1

En la Tabla 11 se aprecia el valor de  $F = 11,869$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del número de hojas por brote en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina son muy significativos.

**Tabla 11.** ANOVA sobre el número de hojas en los tratamientos a los 30 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento combinado	8,688	9	0,969	11,869	,000
Error experimental	1,627	20	0,081		
Total	10,315	29			

Al ser significativo se realizó el análisis estadístico Tukey como se muestra en la Tabla 12, donde pudimos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado los tratamientos T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 2), que muestran un mayor número promedio de hojas por brote.

**Tabla 12.** Prueba Tukey sobre el número de hojas a los 30 días de siembra

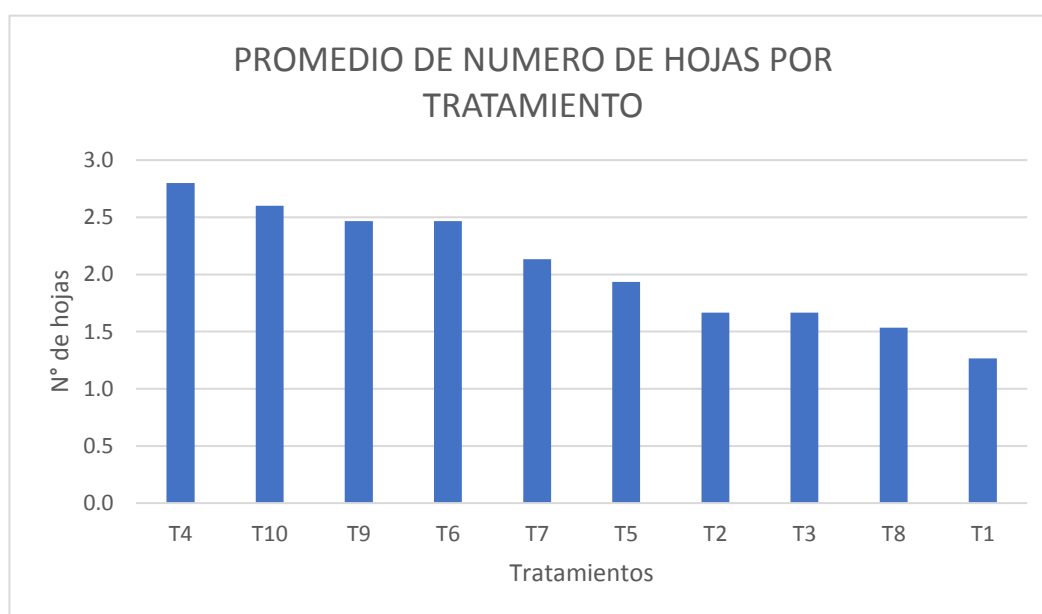
TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
1	3	,600 a				
8	3	,667 a	,667 a			
5	3	1,00 a	1,00 a	1,00 a		
2	3	1,27 a	1,27 a	1,27 a		
3	3	1,40 a	1,40 a	1,40 a	1,40 a	
9	3		1,47 b	1,47 b	1,47 b	
6	3			1,53 c	1,53 c	1,53 c
7	3			1,73 c	1,73 c	1,73 c
10	3				2,13 d	2,13 d
4	3					2,33 e
Sig.		,062	,062	,108	,108	,062



### 7.3.2. Evaluación a los 60 días

Los resultados obtenidos del número de hojas por brotes en cada tratamiento a los 60 días de incubación se muestran en la Tabla 13, en donde se observa que el tratamiento que indujo mayor número promedio de hojas fue el tratamiento 4 (ANA 0.1 mg/l+2 mg/l BAP) con 2.8 hojas, tratamiento 10 (ANA 0.5 mg/l+2 mg/l BAP) con 2.6 hojas, tratamiento 6 (ANA 0.25 mg/l+1.5 mg/l BAP) con el tratamiento 9 (ANA 0.5 mg/l + 1.5 mg/l BAP) ambos con 2.5 hojas y el tratamiento 7 con 2.1 hojas.

Los tratamientos que formaron un promedio de 2 hojas fue el tratamiento 5 (ANA 0.25 mg/l + 0.5 mg/l BAP), tratamiento 3 (ANA 0.1 mg/l + 1.5 mg/l BAP), tratamiento 2 (ANA 0.1 mg/l + 0.5 mg/l BAP) y el tratamiento 1 control como se puede mostrar gráficamente en la figura 2.



**Figura 2.** Promedio de número de hojas por tratamiento.

**Tabla 13.** Número de hojas por brotes de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra

TRATAMIENTOS	CC		NUMERO DE HOJAS POR BROTES															TOTAL	PROMEDIO
	HORMONAS		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	2	1	1	1	0	2	1	2	1	2	1	1	2	2	19	1.27
<b>T2</b>	0.1	0.5	2	2	0	2	0	2	2	0	2	2	3	2	2	2	2	25	1.67
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	2	2	0	1	3	0	2	2	2	2	2	2	2	3	25	1.67
<b>T4</b>	0.1	2	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	42	2.80
<b>T5</b>	0.25	0.5	2	2	2	0	2	2	1	0	3	3	2	3	2	2	3	29	1.93
<b>T6</b>	0.25	1.5	3	2	3	3	2	2	3	3	2	3	2	2	3	3	2	37	2.47
<b>T7</b>	0.25	2	3	0	2	3	2	0	2	3	3	3	0	2	3	3	3	32	2.13
<b>T8</b>	0.5	0.5	1	0	2	1	1	3	0	2	1	2	3	1	2	2	2	23	1.53
<b>T9</b>	0.5	1.5	3	2	2	3	2	3	3	2	3	2	2	3	2	2	3	37	2.47
<b>T10</b>	0.5	2	2	3	3	3	2	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3	39	2.60

**Tabla 14.** ANOVA sobre el número de hojas en los tratamientos a los 60 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	de GI	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento combinado	7,221	9	0,802	6,762	,000
Error experimental	2,373	20	0,119		
Total	9,595	29			

En la Tabla 14 se aprecia el valor de  $F = 6,762$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del número de hojas por brote en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina son muy significativos.

**Tabla 15.** Prueba Tukey sobre el número de hojas a los 60 días de siembra

**HSD Tukey**

TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
1	3	1,27 a			
8	3	1,53 a	1,53 a		
2	3	1,67 a	1,67 a	1,67 a	
3	3	1,67 a	1,67 a	1,67 a	
5	3	1,93 a	1,93 a	1,93 a	1,93 b
7	3	2,13 a	2,13 a	2,13 b	1,93 b
6	3		2,47 b	2,47 b	2,47 b
9	3		2,47 b	2,47 b	2,48 b
10	3			2,60 c	2,60 c
4	3				2,80 d
Sig.		,122	,078	,078	,122

Al ser significativo se realizó el análisis estadístico Tukey como se muestra en la Tabla 15, donde podemos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado los tratamientos T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 20.1mg/l), que muestran un mayor número promedio de hojas por brote. Los investigadores Hurtado y Merino (1997) con los experimentos realizados a las diferentes variedades frutales nos señalan que las citocininas combinadas con las auxinas estimulan la división celular en las plantas interactuando en la determinación de la ruta que seguirá la diferenciación celular.

Los autores Cuazitl & Núñez (2017) en su investigación utilizaron TDZ como citoquinina para generación de brotes y hojas nuevas, en cuanto a hojas nuevas el tratamiento 1 (TDZ a 0.5mg/L) dio mayor número de hojas, con un promedio de 2.67 hojas, en cuanto nuestra investigación utilizamos como citoquinina el BAP combinado con la auxina ANA a bajas cantidades nos resultó como mejor tratamiento el T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 2) resultando un promedio de 2.8 hojas. Por otro lado, Ashrafuzzaman et al (2013), realizó un sub cultivo luego de 3 semanas de inoculación usando solo una hormona (BAP) con distintas concentraciones para la evaluación de número de hojas resultando que en la concentración de 2 mg/l BAP no se obtuvieron hojas esto quiere decir que el uso solamente de la citoquinina BAP a esta concentración sin ayuda de ninguna auxina no es lo indicado, y en concentraciones de BAP 1.5 mg/l se obtuvo un promedio de 2 hojas.

## **7.4. TAMAÑO DEL BROTE**

### **7.4.1. Evaluación a los 30 días**

El tamaño de los brotes obtenidos se evaluó después de los 30 días de ser transferidos los explantes a sus respectivos tratamientos, los resultados obtenidos se muestran detalladamente en la Tabla 16, resultando que el tratamiento que obtuvo un mayor tamaño de brotes fue el Tratamiento 4 (ANA 0.1 mg/l + BAP 2.0 mg/l) con 1.80 cm seguido del Tratamiento 10 (ANA 0.5 mg/l+BAP 2.0 mg/l) con 1.41 cm.

**Tabla 16.** *Tamaño del brote de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra*

TRATAMI ENTOS	CC		TAMAÑO DEL BROTE															TOTAL	PROME DIO
	HORMONA S		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0.6	0.5	0.5	0	4.1	0.27
<b>T2</b>	0.1	0.5	0.4	0.4	0	0.3	0	0.4	0.5	0	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.5	0.4	4.8	0.32
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	0.4	0.5	0	0.5	0.5	0	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	5.7	0.38
<b>T4</b>	0.1	2	2	2.1	1.9	2	2.2	2	1.9	2	2.1	1.8	1.9	2.2	2	1.9	2	30	1.80
<b>T5</b>	0.25	0.5	0.8	0.9	0.8	0	0.9	0.8	0.9	0	0.9	0.7	0.8	0.9	0.8	0.7	0.9	10.8	0.72
<b>T6</b>	0.25	1.5	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.7	0.8	0.8	0.9	0.8	11.9	0.79
<b>T7</b>	0.25	2	0.7	0	1.1	0.9	1.2	0	1.1	1.3	1	1.2	0	1.1	0.9	1.2	1.1	12.8	0.85
<b>T8</b>	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.4	0.5	0.5	0	0.4	0.5	0.5	0.5	0.6	0.4	0.5	0.6	6.4	0.43
<b>T9</b>	0.5	1.5	0.9	1	0.9	1	1.1	1	1.1	0.9	1	1	1.1	1	0.9	1.1	1	15	1.00
<b>T10</b>	0.5	2	1.4	1.5	1.4	1.3	1.5	1.4	1.5	1.3	1.4	1.4	1.5	1.5	1.4	1.3	1.4	21.2	1.41

**Tabla 17.** ANOVA sobre el tamaño del brote en los tratamientos a los 30 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento combinado	6,766	9	0,752	130,521	,000
Error experimental	,115	20	0,006		
Total	6,881	29			

En la Tabla 17 se aprecia el valor de  $F = 130,521$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del tamaño de brotes en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina son muy significativos.

**Tabla 18.** Prueba Tukey sobre el tamaño del brote a los 30 días de siembra

**HSD Tukey**

TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
1	3	,27 a				
2	3	,31 a				
3	3	,38 a				
8	3	,43 a				
5	3		,72 b			
6	3		,79 b	,79 b		
7	3		,85 b	,85 b		
9	3			1,00 c		
10	3				1,41 d	
4	3					1,80 e
<b>Sig.</b>		,337	,516	,075	1,00	1,00

Con el análisis estadístico Tukey podemos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado el tratamiento T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 2mg/l), que muestran un mayor tamaño del brote, el cual se observa en la Tabla 18.

#### **7.4.2. Evaluación a los 60 días**

A los 60 días de evaluación a comparación de los 30 días se duplico el tamaño de brotes como muestra la tabla 19, obteniendo como mejor resultado el tratamiento T4 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2.0 mg/l) con un tamaño 2.92 cm, seguido del tratamiento T10 que (ANA 0.5 mg/l, BAP 2.0 mg/l) con un tamaño de 2.27 cm.

Los tratamientos con menor tamaño de brote fueron los tratamientos: Tratamiento 1 (control) con 0.51 cm, tratamiento 2 (ANA 0.1 mg/l, BAP 0.5 mg/l) con 0.58 cm, tratamiento 3 (ANA 0.1 mg/l, BAP 1.5 mg/l) con 0.67 cm y tratamiento 8 (ANA 0.5 mg/l, BAP 0.5 mg/l) con 0.83 cm como se puede observar gráficamente en la figura 3. Estos tratamientos estuvieron constituidos por solo medio basal, baja concentración de la auxina ANA y la relación de auxina citoquinina fueron iguales respectivamente lo cual no permitió una mayor elongación de los tallos en los brotes.

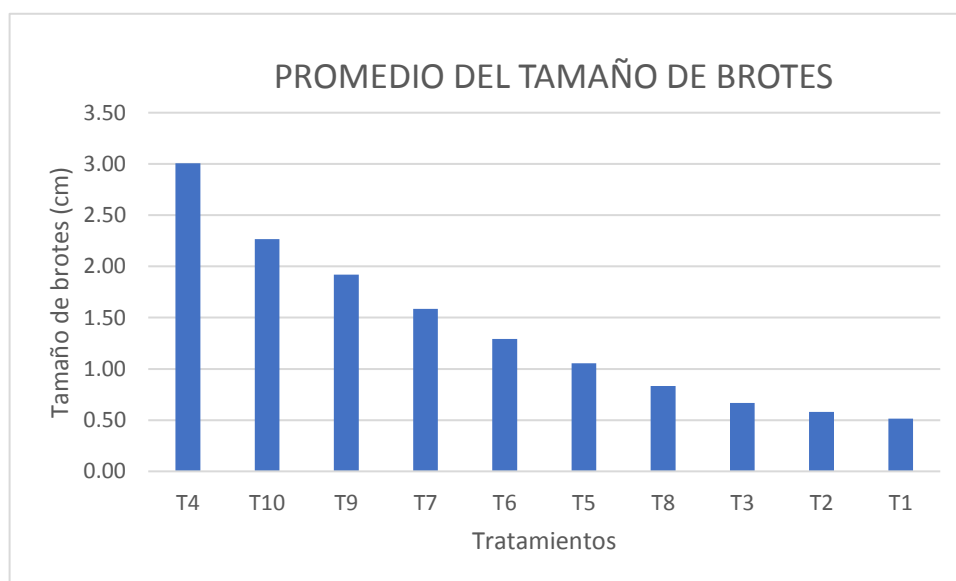
Según Mir et al 2010, pasado los tres meses aproximadamente de incubación de la *Fragaria ananassa*, se obtuvo buena regeneración en variedad Camarosa en medio MS con 2 mg/l BAP + 0.5 mg/L ANA, obteniendo un tamaño del brote de 7.18 cm seguido del medio MS con 2 mg/l BAP + 0.1 mg/L ANA con 5.8 cm, el cual esta última concentración en nuestro experimento es la mejor por los buenos resultados obtenidos con un tamaño promedio de 2.9 cm en 60 días.

Cabe resaltar que en el estudio de este autor sus cultivos se sub cultivaron cada 3 semanas. Autores como Hu y Wang (1983) y Mc Cown y Amos (1979) han concluido que al subcultivar en periodos relativamente cortos, el crecimiento de los tallos puede llegar a ser más rápido y su multiplicación más fácil de estimular.

De la misma manera en el de estudio de (Ñahuinlla, 2018) los resultados variaron de acuerdo a variedad de la fresa, en la etapa de inicio el medio de cultivo *in vitro*, MS suplementado con 2mg/L de IBA+ 2mg/L de BAP, le permitió obtener plantulas en los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina con 3.1, 1.83, 1.45 y 2.27 cm de altura, 100% vigorosas en un periodo de 5 semanas realizando sub cultivos.

De la misma manera Ashrafuzzaman et al (2013) realizo un sub cultivo luego de 3 semanas de inoculación usando solo una hormona (BAP) con distintas concentraciones siendo la mejor concentración 0.5 mg/L de BAP registrando el número máximo de 3.34 cm de longitud en brotes.

En la investigación de Sakila (2007), utilizaron la hormona KIN que ayuda tanto a la estimulación de crecimiento y multiplicación de brotes *Fragaria ananassa* Duch, con ayuda del BAP, donde se valoraron el efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal en la respuesta *in vitro* de explantes de *Fragaria ananassa* Duch obteniendo mejores resultados: KIN (0.5 mg/l) y BAP (1.5 mg/l) con un tamaño de 3.40 cm.



**Figura 3.** Promedio de tamaño de brotes por tratamiento.



**Tabla 19.** *Tamaño del brote de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra*

TRATA-IENTOS	CC		TAMAÑO DEL BROTE															TOTAL	PROMEDIO
	HORMONAS		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	0.6	0.7	0.5	0.7	0	0.7	0.5	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.5	8.1	0.54
<b>T2</b>	0.1	0.5	0.7	0.8	0	0.6	0	0.6	0.8	0	0.8	0.6	0.8	0.6	0.8	0.8	0.8	8.7	0.58
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	0.9	0.7	0	0.9	0.8	0	0.9	0.8	0.9	0.8	0.7	0.9	0.9	0.8	10	0.67
<b>T4</b>	0.1	2	2.8	2.9	3	2.9	3	2.8	2.9	3	2.9	3	2.8	2.9	3	2.9	3	43.8	2.92
<b>T5</b>	0.25	0.5	1.2	1.3	1.4	0	1.2	1.3	1.3	0	1.2	1.4	1.2	1.3	1.4	1.2	1.3	16.7	1.11
<b>T6</b>	0.25	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.6	1.6	1.7	1.8	1.8	1.8	1.6	1.8	1.6	1.8	1.7	25.8	1.72
<b>T7</b>	0.25	2	1.7	0	1.8	1.9	1.8	0	1.9	1.8	1.7	1.9	0	1.9	1.8	1.9	1.8	21.9	1.46
<b>T8</b>	0.5	0.5	1	0	1.1	0.8	1	0.9	0	0.9	1	0.9	1	1.1	0.9	0.9	1	12.5	0.83
<b>T9</b>	0.5	1.5	1.9	2.1	2	1.9	1.8	2.2	2	1.8	2.1	2	1.9	2	1.9	2.2	1	28.8	1.92
<b>T10</b>	0.5	2	2.5	2	2.4	2.6	2.4	2	2.3	2.2	2.4	2.2	2.1	2.3	2.2	2	2.4	34	2.27

**Tabla 20.** ANOVA sobre el tamaño del brote en los tratamientos a los 60 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento combinado	17,373	9	1,930	160,681	,000
Error experimental	,240	20	0,012		
<b>Total</b>	<b>17,613</b>	<b>29</b>			

En la Tabla 20 se aprecia el valor de  $F = 160,681$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del tamaño de brotes en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina son muy significativos.

**Tabla 21.** Prueba Tukey sobre el tamaño del brote a los 60 días de siembra

**HSD Tukey**

TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
1	3	,54 a					
2	3	,58 a					
3	3	,67 a					
8	3	,83 a	,83 a				
5	3		1,11 b				
7	3			1,46 c			
6	3			1,72 c	1,72 c		
9	3				1,92 d		
10	3					2,27 e	
4	3						2,92 f
<b>Sig.</b>		,084	,112	,168	,467	1,00	1,00

Con el análisis estadístico Tukey, Tabla 21 podemos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado el tratamiento T4 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2mg/l), que muestran un mayor tamaño del brote.

## 7.5. NUMERO DE RAÍCES

### 7.5.1. Evaluación a los 30 días

El número de raíces se evaluó después de los 30 días de ser transferidos los explantes a sus respectivos tratamientos, los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 22, el mayor número de raíces fueron: tratamiento 9 (ANA 0.5 mg/l, BAP 1.5 mg/l) con 1,9 raíces, tratamiento 6 (ANA 0.25 mg/l+ BAP 1.5 mg/l) con 1.4 raíces y Tratamiento 5 (ANA 0.25 mg/l+ BAP 0.5 mg/l) con 1.1 raíces.

**Tabla 22.** Numero de raíces de fresa in vitro en los tratamientos a los 30 días de siembra

TRATA- MIENTOS	CC		NUMERO DE RAICES															TOTAL	PROMEDIO
	HORMONAS		Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
	ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	12	1	1	15		
<b>T1</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3	0.2
<b>T2</b>	0.1	0.5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	0.2
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	5	0.3
<b>T4</b>	0.1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	45	3
<b>T5</b>	0.25	0.5	1	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	2	16	1.1
<b>T6</b>	0.25	1.5	1	1	0	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	21	1.4
<b>T7</b>	0.25	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	6	0.4
<b>T8</b>	0.5	0.5	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	9	0.6
<b>T9</b>	0.5	1.5	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	3	2	2	28	1.9
<b>T10</b>	0.5	2	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	12	0.8

En la Tabla 23 se aprecia el valor de  $F = 221,485$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del número de raíces en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina son muy significativos.

**Tabla 23.** ANOVA sobre el número de hojas en los tratamientos a los 30 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento combinado	21,927	9	2,436	221,485	,000
Error experimental	,220	20	,011		
Total	22,147	29			

**Tabla 24.** Prueba Tukey sobre el número de raíces a los 30 días de siembra  
*HSD Tukey*

TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
1	3	,200 a						
2	3	,200 a						
3	3	,300 a	,300 a					
7	3	,400 a	,400 a					
8	3		,600 b	,600 b				
10	3			,800 c	,800 c			
5	3				1,100 d	1,100 d		
6	3					1,400 e		
9	3						1,900 f	
4	3							3,000 g
Sig.		,410	,054	,410	,054	,054	1,000	1,000

Con el análisis estadístico Tukey, en la Tabla 24, podemos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado el tratamiento T4 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2 mg/l), que muestra un mayor número de raíces por brote.

### **7.5.2. Evaluación a los 60 días**

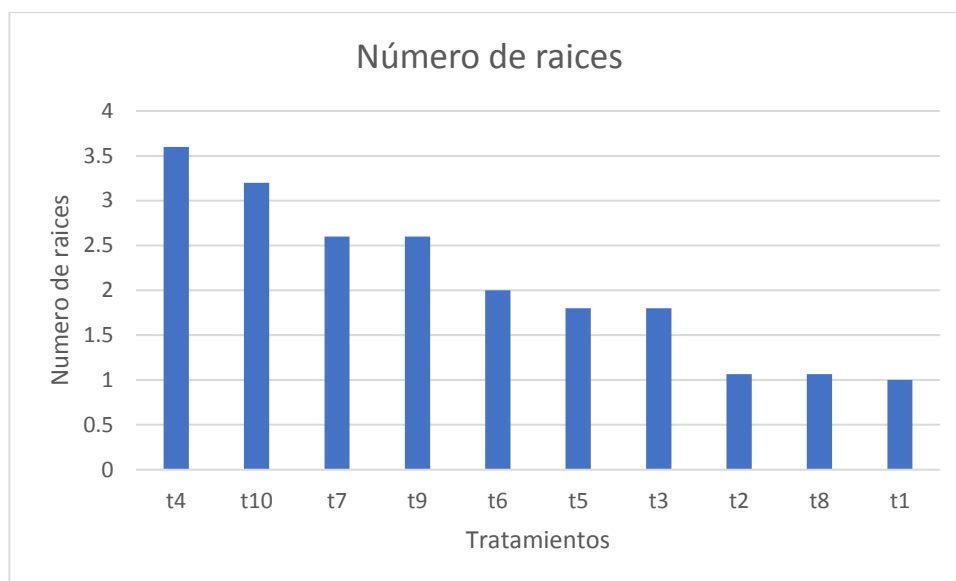
El resultado de la evaluación del número de raíces a los 60 días se puede observar en la Tabla 25, el mejor resultado fue el T10 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2 mg/l) con un promedio de 3.6 raíces, seguido al T10 (ANA 0.5 mg/l, BAP 2 mg/l) con un promedio de 3.2 raíces y al T7 (ANA 0.25 mg/l, BAP 2 mg/l) con un promedio de 2.6 raíces.

Según Hurtado y Merino (1997), las concentraciones de las auxinas varían de especie a especie, pero usualmente se utilizan de 0.1 a 10 mg/L. De la misma manera, Gómez (1990) indica que el rango más empleado está comprendido entre 0.25 hasta 3 mg/L, lo cual concuerda con nuestra investigación que al usar los tratamientos que contenían la auxina ANA a cantidades de 0.25 y 0.5 mg/l se obtuvo mejores resultados en la variable número de raíces.

Los tratamientos que presentaron menores cantidades de raíces generadas fueron los tratamientos: T1 (tratamiento control) que consistía en medio MS sin adición de hormonas, T8 (ANA 0.5 mg/l, BAP 0.5 mg/l) y T2 (ANA 0.1 mg/l, BAP 0.5 mg/l), como se puede observar detalladamente y gráficamente en la Tabla 25 y figura 4, estos tratamientos contenían menor cantidad de la auxina ANA. Azcón-Bieto y Talon (2000), mencionan que los efectos fisiológicos de las auxinas están implicados en muchos procesos del desarrollo vegetal porque afectan en la división, crecimiento y diferenciación de las células. La respuesta a nivel celular inducido por las auxinas es el alargamiento de las células, la formación de raíces adventicias y presentan dominancia apical.

**Tabla 25.** *Numero de raíces de fresa in vitro en los tratamientos a los 60 días de siembra*

TRATA- MIENTO	CC HORMONAS		NUMERO DE RAICES															TOTAL	PROMEDIO
	ANA	BAP	Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
<b>T1</b>	0	0	0	1	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1
<b>T2</b>	0.1	0.5	2	1	0	2	0	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	9	1.1
<b>T3</b>	0.1	1.5	0	3	2	0	3	3	0	2	2	2	2	2	2	2	2	13	1.8
<b>T4</b>	0.1	2	4	3	4	4	3	3	4	4	3	4	3	4	4	3	4	75	3.6
<b>T5</b>	0.25	0.5	2	2	2	0	3	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	33	1.8
<b>T6</b>	0.25	1.5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	38	2
<b>T7</b>	0.25	2	3	0	4	3	3	0	4	3	3	3	0	3	3	3	4	16	2.6
<b>T8</b>	0.5	0.5	1	0	1	2	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	22	1.1
<b>T9</b>	0.5	1.5	3	2	3	3	3	2	2	3	2	3	2	3	2	3	3	50	2.6
<b>T10</b>	0.5	2	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3	3	3	27	3.2



**Figura 4.** Promedio de número de raíces.

En la Tabla 26 se aprecia el valor de  $F = 170,192$  y la significancia  $p = 0,000$ . Al ser la significancia  $p < 0,05$  se evidencia de manera suficiente que las diferencias de media del número de raíces en al menos una de las combinaciones de ácido naftalenacético y 6 – bencilaminopurina son muy significativos.

**Tabla 26.** ANOVA sobre el número de raíces en los tratamientos a los 60 días de siembra

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Tratamiento combinado</b>	22,465	9	2,496	170,192	,000
<b>Error experimental</b>	,293	20	,015		
<b>Total</b>	22,759	29			

Con el análisis estadístico Tukey podemos observar que las medias que comparten letras distintas son significativamente diferentes, obteniendo como mejor resultado el tratamiento T4 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2 mg/l), que muestran un mayor número de raíces por brote, el cual lo podemos observar en la Tabla 27.

**Tabla 27. Prueba Tukey sobre el número de raíces a los 60 días de siembra**

**HSD Tukey**

TRATAMIENTO COMBINADO	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
1	3	1,00 a				
2	3	1,07 a				
8	3	1,07 a				
3	3		1,80 b			
5	3		1,80 b			
6	3		2,00 b			
9	3			2,60 c		
7	3			2,60 c		
10	3				3,20 d	
4	3					3,60 e
<b>Sig.</b>		,999	,595	1,000	1,000	1,000

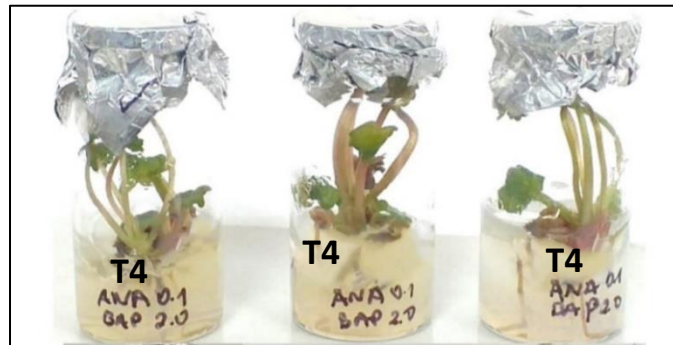
En las diversas investigaciones realizadas de fresa *in vitro* la evaluación del conteo del número de raíces que se forman lo realizan en la etapa de enraizamiento, esto se realiza una vez obtenidos brotes propagados *in vitro*, esta etapa tiene gran importancia debido al objetivo de producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero (Ruscitti et al., 2000).

Muchas investigaciones para obtener número de raíces usan otras hormonas para el crecimiento de estas, una de las más usadas es él IBA que ayuda a la formación y elongación de raíces, tal es el caso de la investigación de Mir et al, (2010), que utilizaron esta hormona para el enraizamiento de los brotes obtenidos *in vitro*, resultando 5.2 raíces en la variedad Camarosa en medio MS que contenía 2 mg/l de AIB. En nuestra investigación tenemos como variable evaluar el número de raíces generados en la Inducción de brotes *in vitro* de fresa var. Camarosa utilizando diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6- bencilaminopurina (BAP), con la finalidad de tener presente todos los efectos que resulten nuestros tratamientos obteniendo como el mejor resultado el tratamiento T4 (ANA 0.1mg/l, BAP

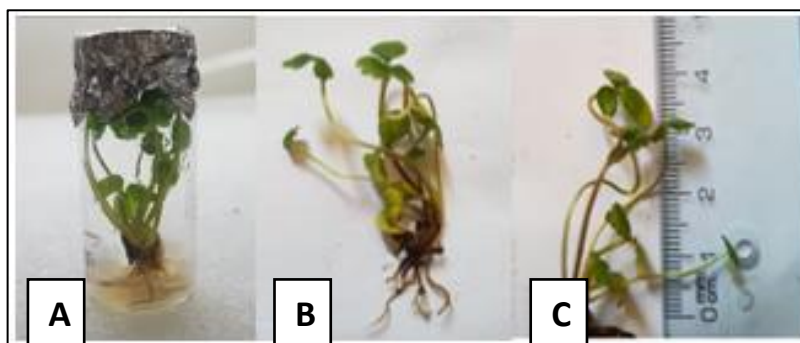


2 mg/l) con un promedio de 3.6 raíces por brote seguido del tratamiento T10 (ANA 0.5 mg/l, BAP 2 mg/l) con un promedio de 3.2 por brote. El balance entre citoquinina y auxina es importante en la etapa de enraizamientos debido a que en esta etapa, las auxinas son las hormonas importantes, debido que son necesarias para el proceso de inducción de raíces, aunque no se requieren o pueden inhibir, su crecimiento posterior. Por lo que hay que tener en cuenta tres cosas básicas para cada cultivo, el tipo de auxina a emplear, la concentración requerida y la duración del tratamiento. (George y Debergh, 2008).

En las siguientes figuras podemos observar el T4 (ANA 0.1mg/l, BAP 2 mg/l) el mejor tratamiento en la inducción de brotes de fresa *var. Camarosa* así como en los distintos factores de análisis que se evaluaron en esta investigación: sobrevivencia, número de brotes, tamaño del brote, número de hojas por brote y número de raíces.



**Figura 5.** tratamiento 4 (ANA 0.1 mg/l, BAP 2 mg/l) a los 60 días de su siembra.



**Figura 6.** A) Visualización tratamiento 4, B) Visualización de las raíces., C) Visualización de tamaño de brotes.

## VIII. CONCLUSION

Se determinó que indujo mayor número de brotes *in vitro* el tratamiento con la combinación de ácido naftalenacético 0.1mg/l y 6- bencilaminopurina 2 mg/l con un resultado de 6.5 brotes, siendo este el tratamiento del cual se obtendrá más cantidad de material vegetal y permitirá una masiva propagación de este cultivo.

El tratamiento optimo en la fresa var.camarosa *in vitro* fue el con la combinación de ácido naftalenacético 0.1 mg/l y 6- bencilaminopurina 2 mg/l brindándonos una mayor brotación, 2.9 cm del tamaño del brote, 2.8 número de hojas y un promedio de 3.6 raíces.

El método de desinfección utilizado permitió reducir la contaminación y oxidación, brindando un 90 % de explantes vivos

## X. RECOMENDACIONES

- Continuar con las etapas de micropropagación para establecer un protocolo completo para cultivo *in vitro* de fresa *var. camarosa*.
- Evaluar en investigaciones futuras otros antioxidantes y métodos de desinfección para tratar de controlar en un 100 % la oxidación y contaminación de la fresa.
- Estudiar otras citoquininas en combinación con auxinas para determinar si existe una mejor combinación que permita aumentar la inducción de brotes en fresa *var. camarosa*.
- Emplear la información generada en este estudio para el desarrollo de futuras investigaciones con la finalidad de evaluar rangos cercanos a los valores obtenidos poder obtener mayor número de brotes.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aceves, J. L. y J. Hernández. (1997). "Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales, para beneficio social de la comunidad". Ciencia Administrativa, vol. 1.
- Albendín, G., García, Ma.C. y Molina, J.Ma (2012). El trips de las flores y su control en el cultivo de la fresa. Revista Rural, ISSN:1133-8938.
- Almenar, E. (2005). Envasado activo de fresas silvestres (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia. España.
- Alvarado, Y. Pérez, (1998) Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Arex. (2013). Área de Comercio Exterior. Asociación regional de exportadores de Lambayeque. Arancel de Aduanas. Sierra Exportadora. Lambayeque, Perú.
- Ashrafuzzaman, M. et al. (2013). Micropropagation of strawberry (fragaria ananassa) through runner culture. Bangladesh J. Agril. Bangladesh.
- Attra. (2006). El cultivo de la fresa. Agricultura sustentable
- AZCON, BIETO, J & TALON. (2001). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc GrawHill Internatamericana. España 522p
- Bethancourt, M. (2006). Impacto del Tratado de Libre Comercio DR\_CAFTA en el sector exportador guatemaltecos de fresa. Universidad Rafael Landivar, Guatemala, Guatemala.
- BHOJWANI, S Y DANTU P. (2013). Plant Tissue Culture: an introductory yext. Springer, Agra, Ultrtar Pradesh. India.
- Boxus, P. (1984). Handbook of Plant Cell Culture: Strawberry. New York, USA. Editorial Library of Congress Cataloging, 3, 453-483.

- Boxus, P.; Damiano, C., & Brasseur, E. (1984). Strawberry. In: P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, and Y. Yamada (EDS). Handbook of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Macmillan. New York, 3, 453-486.
- Castillo, A. (2004). Propagación de planta por cultivo *in vitro*: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de biotecnología, INIA
- Cuazitl, M., Núñez, H. (2017). ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACIÓN DE FRESA (FRAGARIA X ANANASSA DUCH.) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT). Universidad Politécnica de Chiapas, México.
- Darías, R. (1993). Recopilación de Temas sobre Técnicas de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Oruro, Bolivia U.T.O. y Universidad Cienfuegos de Matanzas. Cuba.
- Flórez, R., & Mora, R. (2010). Fresa (Fragaria x ananassa Duch.) producción y manejo post cosecha. Primera edición, Corredor Tecnológico Agroindustrial y Cámara de Comercio de Bogotá, Bogotá, 114.
- George, E. F & Debergh, P. (2008) .Micropropagation: uses and methods. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. The Background. E. F. George, M. A. Hall and G. J. De Klerck (eds.). Springer, The Netherlands. pp:29-64
- Hartmann, H. (1994). Propagación de plantas principios y prácticas. Tercera Edición. México, D.F. Continental, 662.
- Hu. C.Y. and P.J. Wang. (1983). Meristem shoot tip and bud culture. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV and Yamada Y (Eds) Hand book of Plant Tissue Culture. Vol. I. Macmillan, New York, 177-227.
- Hurtado, D. y Merino, M. 1997). Cultivo de Tejidos Vegetales: Primera edición. México, D.F. Editorial Trillas. 225 p.
- Jami, L. (2018). Establecimiento in vitro de fresa *Fragaria x ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier a partir de meristemos (tesis de grado). Universidad zamorano, Honduras.
- Jiménez, E. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Editorial Santa Clara, Cuba. 13-24.

- Jiménez, E. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología Cuba. Ediciones GEO, 45-56.
- Jiménez, E. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Pérez, J.). Ed. rev. Santa Clara, Cuba. s.e. pp 13-24.
- Klee, H., & Estelle, M. (1991). Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review of Plant Physiol. 42:529 – 551.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., & Hopp, E. L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Biotecnología Y Mejoramiento Vegetal II, 2–648.
- MINAG. (2009). Sostenimiento de la fresa, Composición nutritiva de la fresa. Lima, Perú.
- MINAG. (2011). Producción y multiplicación de la fresa variedad “Aroma”. Lima, Perú, Ministerio de Agricultura. (2008). Estudio de la fresa en el Perú y el mundo. Lima, Perú.
- Mir, J, N. Ahmed, Rizwan Rashid, Shabir. H. Wani, Hidayatullah Mir and M.A. Sheikh, (2010). Micropropagation of Strawberry (fragaria ananassa), India; 153-156 p.
- Mir, J., Ahmed, N., Rizwan, R., Shabir, H., Hidayatullah, M., and Sheikh, M., (2010). Micropropagation of Strawberry (fragaria ananassa), India, 153-156.
- Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. (2006). Tablas de composición de alimentos. 10a ed. Madrid: Pirámide. ISBN 84-368-2050-9.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, 473-497
- Nunes, M. (2007). Caracterización y procesado de kiwi y fresa cultivados por diferentes sistemas (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Ñahuinlla M. (2018). Optimización del protocolo de micropropagacion in vitro con cuatro cultivares de fresa (fragaria x ananassa Duch.), Universidad nacional Agraria la Molina. Lima-Peru. 67P.
- Olivera, J. (2003). *El cultivo de la fresa en el Perú*. (Serie: Manual N.º 1), 1º edición. Lima: Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA. Recuperado de:

[http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/897/1/Olivera-Cultivo\\_Fresa.pdf](http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/897/1/Olivera-Cultivo_Fresa.pdf)

- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia: Centro internacional de Agricultura Tropical.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT. Palmira. Valle.
- Ruscitti, M.; Marinucci, L.; Núñez, M.; Abedini, W.; Sharry, S. (2000). Enraizamiento *in vivo* e *in vitro* de *Pelargonium graveolens*.
- Sakila, S. et al. (2007). Micropropagation of Strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.), A Newly Introduced Crop in Bangladesh, American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2(2), 151-154.
- Sakila, S.; Ahmed, M. B.; Roy, U. K.; Biswas, M. K; Karim, R.; Razvy, M. A.; Hossain, M.; Islam, R. y Hoque. (2007). A. Micropropagation of Strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). A Newly Introduced Crop in Bangladesh, American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2(2), 151-154.
- Sanchez B. (2005). Comportamiento *in vitro* de dos variedades de frutilla (*Fragaria Ananassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo (Tesis de grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia. 34p.
- Sánchez, M. & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de la fresa. Rev. UDO Agrícola, 4(1), 21-26.
- Sánchez-Cueva, M y Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de la fresa. Rev. UDO Agrícola, 4(1), 21-26.
- Saucedo, S., Ramos, L. y Reyes. T, (2007). Efecto de Reguladores de Crecimiento para la propagación *in vitro* de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott), Ciencia y Tecnología 1: 17-21. 2008.
- Sivori, E.M.; Montaldi, E.R.; Caso, O.H. (1986). Fisiología vegetal. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, 117.
- Srivastava, L. 2002. Plant growth and development. Hormones and environment. London., UK. Academic Press Elsevier science, 772.

- Steiner, MY & Goodwin, S. (2005). Management of western flower thrips. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), in hydroponic strawberry crops: using yellow sticky traps to determine acción thresholds. *Australian Journal of Entomology* 44, 175-185 in press.
- Toledo, M. (2003). Guía para la Producción de Fresa en Honduras. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). La Esperanza, Intibucá, Honduras, 36.
- Villagrán, V. (2005). Como cultivar frutillas, Manual Agrícola Llahuen. Santiago de Chile, 8 -10.
- Villalobos V.M & M.G. Pérez. (1979). Alta producción de plantas de fresa libres de virus a partir del cultivo de meristemos. *Proc. Tropical Región ASHS* 23: 70-72.

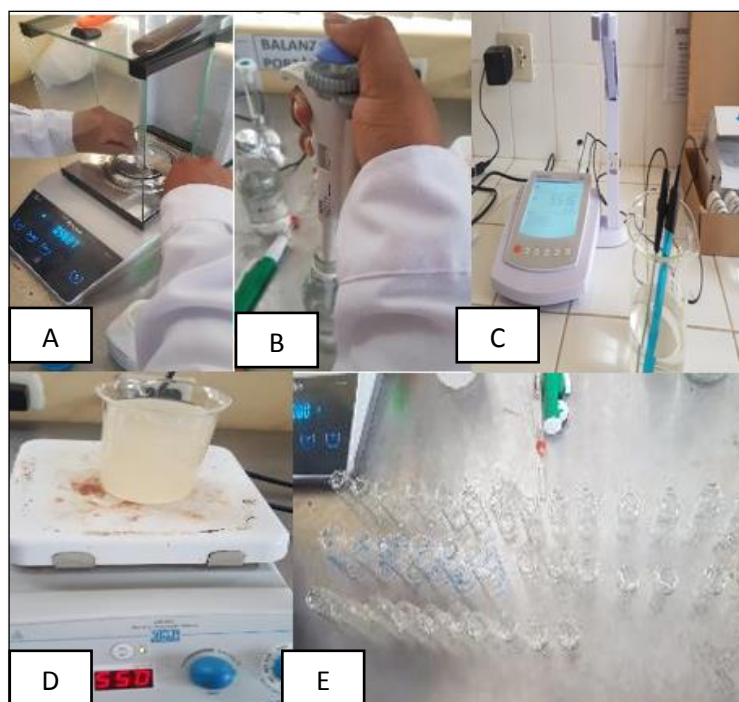


## ANEXOS

### ANEXO 1 DESCRIPCIÓN Y PROCEDIMIENTO DEL EXPERIMENTO



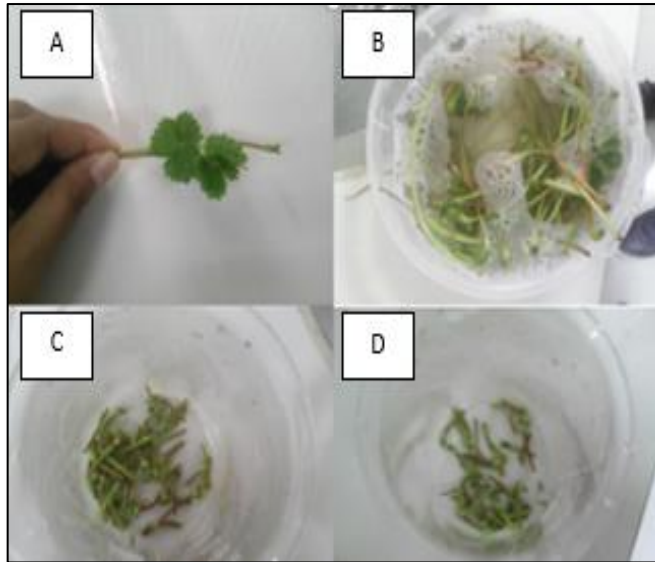
**Figura 7.** Plantas de fresa variedad Camarosa de vinzos.



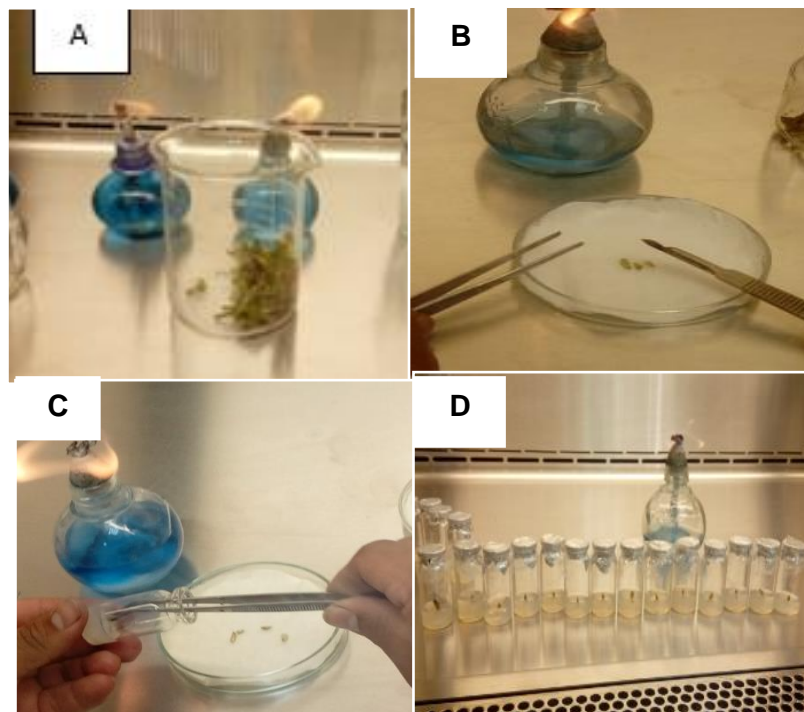
**Figura 8.** Preparación del medio de cultivo A) Pesado de componentes del medio, B) Adición de las hormonas., C) Lectura del ph. D) Adición de agar y calentamiento del medio. E) Vertimiento del medio a los viales.

**Tabla 28.** *Composición del medio MS*

Solución	Reactivo	Concentración (mg/l)
Macronutrientes	Nitrato de potasio	1900.00
	Nitrato de amonio	1650
	Cloruro de calcio	440
	Sulfato de magnesio	180.69
	Fosfato de potasio monobásico	170
Micronutrientes	Ácido bórico	6.2
	Yoduro de potasio	0.83
	Sulfato de manganeso	16.9
	Sulfato de zinc	8.6
	Molibdato de sodio	0.25
	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	Cloruro de cobalto	0.025
Quelatos de Hierro	Sulfato ferroso	27.8
	EDTA	37.3



**Figura 9.** Desinfección del material vegetal. A) Selección de material vegetal, B) Material vegetal en fungicida, C) Desinfección con etanol 70% y D) Desinfección de hipoclorito 1.5%.



**Figura 10.** Introducción *in vitro*. A) Selección de material vegetal, B) Cortes al material vegetal, C) Introducción a los viales. D) Viales sembrados.

## ANEXO 2: NUTRIENTES, REACTIVOS, PREPARACIÓN DEL MEDIO Y LUGAR DE INCUBACIÓN

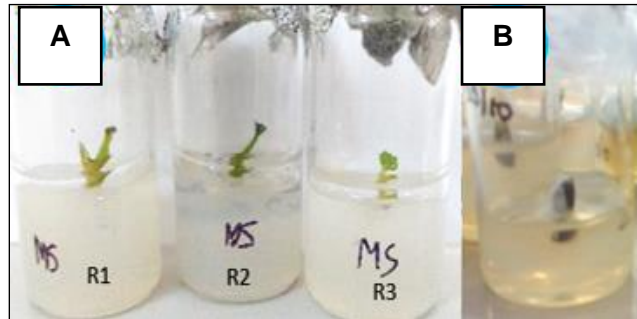


**Figura 11.** Reactivos y nutrientes para preparación de medio MS.

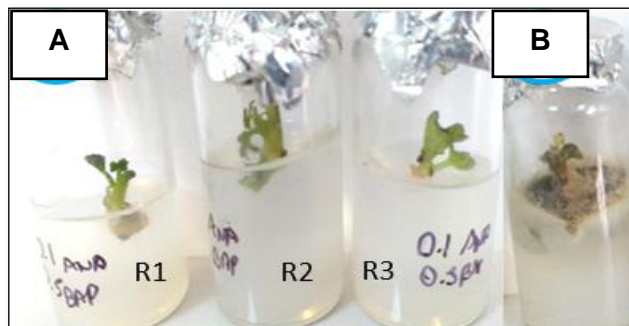


**Figura 12.** Lugar de incubación del medio sembrado a diferentes concentraciones de ANA y BAP.

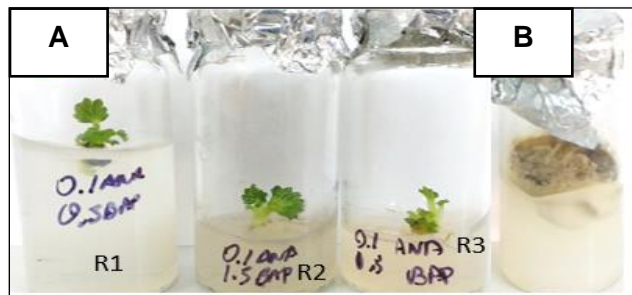
### ANEXO 3: VISUALIZACION DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 60 DIAS



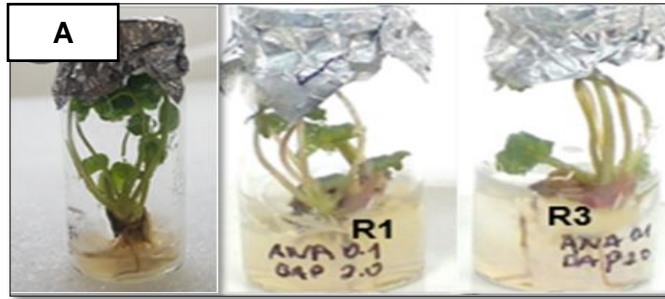
**Figura 13.**A) Brotes del tratamiento 1 que contiene solo Ms a los 60 días de su siembra B) yema contaminada con hongo.



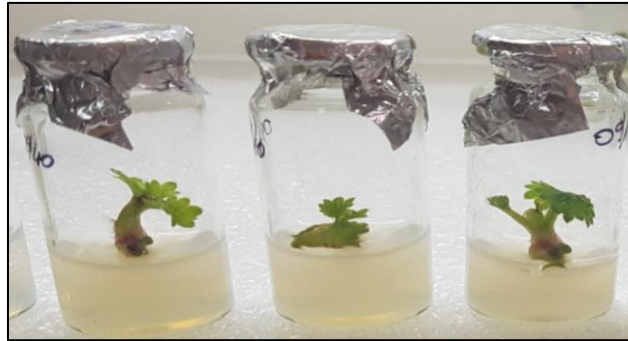
**Figura 14.** A) Brotes del tratamiento 2 que contiene ANA 0.1, BAP 0.5 a los 60 días de su siembra. B) yema contaminada con hongo.



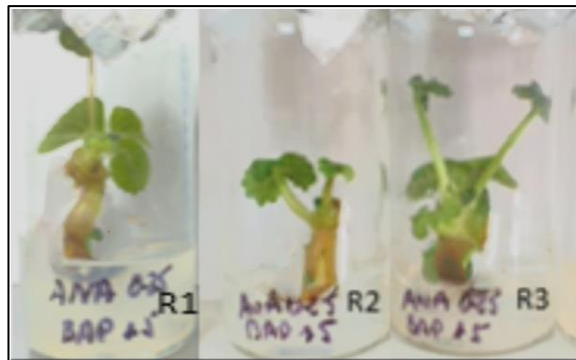
**Figura 15.** A) Brotes del tratamiento 3 que contiene ANA 0.1, BAP 1.5 a los 60 días de su siembra. (B) yema contaminada con hongo



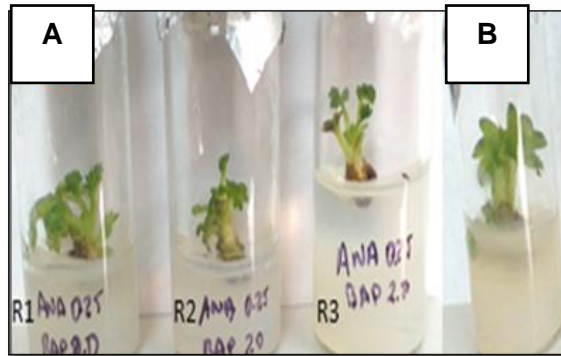
**Figura 16.** Brotes del tratamiento 4 que contiene ANA 0.1, BAP 2 a los 60 días de su siembra.



**Figura 17.** Brotes del tratamiento 5 que contiene ANA 0.25, BAP 0.5 a los 60 días de su siembra.



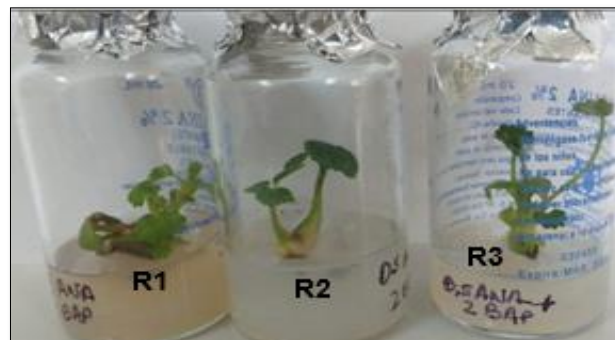
**Figura 18.** Brotes del tratamiento 6 que contiene ANA 0.25, BAP 1.5 a los 60 días de su siembra.



**Figura 19.** A) Brotes del tratamiento 7 que contiene ANA 0.25, BAP 2 a los 60 días mes de su siembra. B) yema contaminada con bacteria y fenolizada.



**Figura 20.** A) Brotes del tratamiento 8 que contiene ANA 0.5, BAP 0.5 a los 60 días de su siembra. (B) yema contaminada con bacteria y fenolizada.



**Figura 21.** Brotes del tratamiento 10 que contiene ANA 0.5, BAP 2 a los 60 días de su siembra.