

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMIA



**OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE MICROPROPAGACION
IN VITRO CON CUATRO CULTIVARES DE FRESA**

(Fragaria x ananassa Duch.)

Presentado por:

MÓNICA ENDALENCIA ÑAHUINLLA ARONE

Tesis para optar el Título de:

INGENIERO AGRONOMO

Lima- Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**“OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN
IN VITRO CON CUATRO CULTIVARES DE FRESA
(*Fragaria x ananassa* Duch.)”**

Presentado por:

MÓNICA ENDALENCIA ÑAHUINLLA ARONE

Tesis para optar el Título de:

INGENIERO AGRONOMO

.....
Ing. M. S. Andrés Casas Díaz
PRESIDENTE

.....
Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa
ASESORA

.....
Dr. Jorge Jiménez Dávalos
MIEMBRO

.....
Ing. José Palacios Vallejo
MIEMBRO

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres Rodolfo y Rosa,
por ser mi inspiración y motivación, por su inmenso amor, esfuerzo y sacrificio, sus
consejos e instruirme en la vida.

A mis hermanos Italo y Rodolfo,
a quienes les deseo una vida exitosa.

A la memoria de mis abuelos Francisco, Yndalencia, Manuel y Jesusa,

A mi querida tierra de Apurímac,
llaqtaymanta llaqtaypaq.

Ñañayturiykuna allpa ruruchişkuna, sumaq waytakuna,
qamkunapaq kay llamkayni.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso, quien es fuente de sabiduría, conocimiento e inteligencia, por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi asesora Mg. María de Lourdes Tapia y Figueroa, por sus sabios consejos, paciencia, orientación, dedicación y haber depositado su confianza en mí para elaborar el presente trabajo en el Instituto de Biotecnología (IBT)-área de cultivos de tejidos

A mí estimada amiga y profesora Dra. Elsa Elizabeth Carbonell Torres, por creer en mí, motivarme e inculcarme la vida profesional del agrónomo innovador en el mundo, y alentarme en culminar la tesis.

A los profesores Raúl Blas, Percy Zorogastua, Julián Chura y amistades Marycielo, Fabiola, Deisy y Luis de quienes me alentaron a terminar el presente trabajo.

Al Ing. Carlos Somocursio y esposa sra. Carmen, por animarme y ser parte de la familia y por todas las amistades que conocí y recibí los sinceros ánimos.

A los miembros de jurado de tesis por su amabilidad de brindarme parte de su valioso tiempo para poder revisar la tesis y por sus observaciones a fin de mejorar la calidad del trabajo realizado.

INDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.....	3
2.1.1. Distribución geográfica y origen.....	3
2.1.2. Taxonomía.....	3
2.1.3. Descripción botánica.....	5
2.1.4. Fisiología.....	8
2.1.5. Valor nutricional.....	10
2.1.6. Enfermedades.....	13
2.1.7. Importancia económica.....	18
2.2. CULTIVARES DE FRESA EN ESTUDIO.....	20
2.2.1. Cultivares de día corto.....	20
A. Camino Real.....	21
B. Sabrina.....	22
2.2.2. Cultivares de día neutro.....	23
A. Cristal.....	23
B. Albión.....	24
2.3. MICROPROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>.....	27
2.3.1. Etapas de la micropropagación.....	27
A. Selección y preparación de la planta madre.....	28
B. Desinfección.....	28
C. Introducción.....	29
D. Multiplicación.....	29
E. Enraizamiento.....	29
2.3.2. Ventajas de la micropropagación.....	30
2.3.3. Problemas asociados al cultivo <i>in vitro</i>	30
A. Contaminación.....	30
B. Oxidación o fenolización.....	31
C. Vitrificación o hiperhidratación.....	32
2.3.4. Fitohormonas.....	34
A. Auxinas.....	34

B.	Giberelinas.....	34
C.	Citoquininas.....	34
2.4.	PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE FRESA.....	35
2.4.1.	Organogénesis.....	35
2.4.2.	Antecedentes de la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.....	36
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1.	MATERIALES.....	40
3.2.	METODOLOGÍA.....	44
3.2.1.	Medio de cultivo.....	44
3.2.2.	Condiciones de incubación.....	44
3.2.3.	Etapas de estudio.....	44
A.	Etaapa de desinfección.....	45
B.	Etaapa de inicio.....	51
C.	Etaapa de multiplicación.....	51
D.	Etaapa de enraizamiento.....	52
3.2.4.	Estrategia de estudio.....	53
3.2.5.	Variables estudiados.....	55
A.	Tratamientos de desinfección.....	55
B.	Tratamientos de inicio.....	55
C.	Tratamientos de multiplicación.....	56
D.	Tratamientos de enraizamiento.....	58
3.2.6.	Análisis estadístico.....	59
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
4.1.	ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	60
4.1.1.	Introducción a partir de yemas.....	60
4.1.2.	Introducción a partir de meristemos.....	64
4.1.3.	Introducción de los cultivares a partir de meristemos.....	66
4.2.	ETAPA DE INICIO.....	69
4.2.1.	Etaapa de inicio en el cultivar Camino Real.....	69
4.2.2.	Etaapa de inicio en el cultivar Cristal.....	75
4.2.3.	Etaapa de inicio para los cultivares	80
4.3.	ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.....	84

4.3.1. Primer subcultivo.....	84
4.3.2. Segundo subcultivo.....	85
4.3.3. Tercer subcultivo.....	86
4.3.3.1. En el cultivar Camino Real.....	86
4.3.3.2. En los cultivares	100
4.4. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO.....	113
V. CONCLUSIONES.....	128
VI. RECOMENDACIONES.....	129
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
VIII. ANEXOS.....	142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Taxonomía de la fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).	4
Tabla 2.	Composición de la fresa en 100g de materia fresca.	12
Tabla 3.	Virus de la fresa, nombres, acrónimos, modo de transmisión y género.	17
Tabla 4.	Clasificación de características de los cuatro cultivares.	26
Tabla 5.	Medio basal Murashige y Skoog (1962).	39
Tabla 6.	Programación de aplicación.	45
Tabla 7.	Procedimiento de la etapa de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar.	46
Tabla 8.	Procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.	48
Tabla 9.	Descripción de tratamientos de desinfección.	49
Tabla 10.	Descripción de tratamientos de medios de inicio.	51
Tabla 11.	Descripción de tratamientos de medios de multiplicación.	52
Tabla 12.	Descripción de tratamientos de medios de enraizamiento.	52
Tabla 13.	Valores de las variables cualitativas.	58
Tabla 14.	Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y presencia de Tween 20 en la desinfección de coronas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	60
Tabla 15.	Porcentajes de contaminación y sobrevivencia de yemas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch., por tratamiento evaluadas a los 7, 14, 21,28, 35 y 42 días después de la introducción.	61
Tabla 16.	Tratamientos de desinfección para explantes de meristemos de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	64
Tabla 17.	Respuestas de los tratamientos de medios de inicio <i>in vitro</i> en la longitud y número de brotes del cultivar Camino Real, después de 30días.	70
Tabla 18.	Efecto de los tratamientos de medios de cultivo de inicio del cultivar Cristal en las medias de longitud.	76
Tabla 19.	Resultados de la variable vigor en los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Cristal después de 35 días	77

Tabla 20.	Resultados de las variables altura de vitroplanta y número de brotes en medio de inicio en la variedades después de 35 días.	80
Tabla 21.	Efecto de los tratamientos de multiplicación en la formación de brotes del primer sub cultivo después de 30 días de evaluación.	84
Tabla 22.	Efecto de los tratamientos de multiplicación en la formación de brotes del segundo sub cultivo después de 30 días de evaluación.	85
Tabla 23.	Respuestas en la formación de brotes en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en el cultivar Camino Real.	87
Tabla 24.	Respuestas de la formación de hojas en la etapa de multiplicación del cultivar Camino Real.	88
Tabla 25.	Respuestas de formación de raíces en la etapa de multiplicación del cultivar Camino Real.	89
Tabla 26.	Respuestas de peso fresco y seco total en la etapa de multiplicación del cultivar Camino Real.	90
Tabla 27.	Respuestas de la variable vigor en el cultivar Camino Real.	91
Tabla 28.	Textura de hojas en el cultivar Camino Real.	92
Tabla 29.	Relación de hoja - tallo en el cultivar Camino Real.	93
Tabla 30.	Deformidad de explantes en el cultivar Camino Real.	94
Tabla 31.	Presencia de callos en el cultivar Camino Real.	94
Tabla 32.	Respuestas en el número de brotes propagables en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	100
Tabla 33.	Respuestas en número de brotes pequeños no propagables en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	103
Tabla 34.	Respuestas en peso fresco de explantes en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	104
Tabla 35.	Respuestas en la altura de vitroplanta en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	104
Tabla 36.	Respuestas en la longitud de folíolos altos en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	105
Tabla 37.	Respuestas en el número de hojas el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	106
Tabla 38.	Respuestas en el peso fresco aéreo en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	106

Tabla 39.	Respuestas en la longitud de raíces en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	107
Tabla 40.	Respuestas en el número de raíces en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en las los cultivares	108
Tabla 41.	Respuestas en el peso fresco de raíces en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	108
Tabla 42.	Respuestas en el peso fresco total en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	109
Tabla 43.	Res puestas en el peso seco total en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.	110
Tabla 44.	In fluencia de los diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la formación de hojas vitroplanta de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	115
Tabla 45.	Influencia de los diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la formación de raíces de la vitroplanta de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	116
Tabla 46.	Influencia de los diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en el peso fresco y seco total de raíces (g) de la vitroplanta de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Fases reproductiva y vegetativa de la planta adulta de fresa con sus diferentes componentes morfológicos.	6
Figura 2:	Sistema radical de una planta adulta de fresa; nótese las raíces primarias jóvenes y las raíces secundarias.	6
Figura 3:	Fruto del cultivar Camino Real.	22
Figura 4:	Frutos del cultivar Sabrina	22
Figura 5:	Flor y frutos del cultivar Cristal	24
Figura 6:	Sección longitudinal de (a) Brote axilar; (b) Brote apical; de fresa del cultivar Elsanta.	37
Figura 7:	Cultivares de fresa en invernadero.	43
Figura 8:	Estufa para esterilizar y para obtener peso seco de material vegetal.	43
Figura 9:	Pesticidas para la aplicación de plantas de fresa en el invernadero. A: Acaricida; B: Fungicida.	46
Figura 10:	Procedimiento de extracción de coronas de fresa del invernadero.	47
Figura 11:	Materiales para la desinfección dentro de cámara de flujo laminar.	49
Figura 12:	Desinfección en cámara. (1) Coronas en medio de lejía más Tween; (2) Enjuague con agua destilada esterilizada; (3) Enjuague con alcohol 70°.	50
Figura 13:	Estereoscopio para la introducción de meristemas.	50
Figura 14:	Esquema descriptivo de la investigación en la etapa de desinfección.	53
Figura 15:	Esquema descriptivo de la investigación en la etapa de inicio.	53
Figura 16:	Esquema descriptivo de la investigación en la etapa de multiplicación.	54
Figura 17:	Esquema descriptivo de la investigación en la etapa de enraizamiento.	54
Figura 18:	Porcentajes de contaminación y sobrevivencia de la introducción a partir de yemas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch., evaluadas a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después de la introducción.	61
Figura 19:	Yemas contaminadas con desarrollo de hifas (Izquierda y derecha) y yema no contaminada (centro).	63

Figura 20:	Tratamientos evaluados a los 42 días después de la introducción	65
Figura 21:	Explantos de introducción. (A) Yema de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. (B) Meristemo de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	65
Figura 22:	Desinfección en los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina, después de 42 días.	66
Figura 23:	Desarrollo del meristemo <i>Fragaria x ananassa</i> Duch., cultivar Camino Real, en medio líquido MS sin hormonas con puente de papel filtro, evaluado por 6 semanas.	68
Figura 24:	Respuestas de los tratamientos de medio de inicio <i>in vitro</i> en la altura del cultivar Camino Real después de 30 días.	70
Figura 25:	Valores de vigor basado en estado y color de la vitroplanta. A: Verde Oscuro; B: Verde Claro; C: Necrosamiento o Muerto.	71
Figura 26:	Porcentajes de vigor en los tratamientos de medio de inicio de cultivo <i>in vitro</i> del cultivar Camino Real evaluadas después de 30 días.	72
Figura 27:	Valores de desarrollo basado en el crecimiento de la vitroplanta. A: Desarrollado; B: Diferenciado; B: Multibrote; C: Brote.	73
Figura 28:	Efecto en la variable desarrollo de los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Camino Real evaluadas después de 30 días	73
Figura 29:	Evaluación de vitroplantas del cultivar Camino Real en tratamientos de medio de inicio, después de 30 días.	74
Figura 30:	Crecimiento de vitroplanta diferenciada de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch., del cultivar Camino Real, en medio de inicio de cultivo <i>in vitro</i> , evaluado por 4 semanas.	75
Figura 31:	Respuestas de los tratamientos de medio de inicio <i>in vitro</i> en la altura del cultivar Cristal después de 30 días.	76
Figura 32:	Resultados de la variable vigor en los tratamientos de medio de inicio del cultivar Cristal después de 35 días.	77
Figura 33:	Efectos en el la variable desarrollo de los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Cristal después de 35 días.	78
Figura 34:	Evaluación de vitroplantas del cultivar Cristal en los tratamientos de medio de inicio después de 5 semanas.	79
Figura 35:	Altura de vitroplanta (mm) de los cultivares en medio de inicio después de 7, 14, 21, 28 y 35 días.	81

Figura 36:	Respuestas del desarrollo de vitroplantas de los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina a los 35 días después de la transferencia a medio de inicio.	82
Figura 37:	Respuestas del desarrollo de vitroplantas de los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina a los 35 días después de la transferencia a medio de inicio.	83
Figura 38:	Valores de la variable vigor: (1) RVO: Robusto Verde Oscuro; (2) RVc: Robusto Verde claro; (3) vcm: Verde claro marchito.	91
Figura 39:	Valores de la variable Textura de hojas: (NC): No coriáceo; (C): Coriáceo; (T): Translucidos.	91
Figura 40:	Valores de la variable Relación peciolo-foliolo: (1) A: Alto; (2) c: Corto.	92
Figura 41:	Valores de la variable deformidad del explante (1) ND: No deformado; (2) D: Deformado.	93
Figura 42:	Valores de la variable presencia de callos: (1) NC: No hay callos; (2) B: Callos blancos; (3) CT: Callos translucidos.	94
Figura 43:	Resultados del tratamiento de multiplicación M1 (MS) del cultivar Camino Real.	95
Figura 44:	Resultados del tratamiento de multiplicación M2 (MS+1mg/L IBA) del cultivar Camino Real.	96
Figura 45:	Resultados del tratamiento de multiplicación M3 (MS+1mg/L IBA+ 0.5g/L de carbón activado) del cultivar Camino Real.	97
Figura 46:	Resultados del tratamiento de multiplicación M4 (MS+1mg/L BAP+ 1mg/L IBA+ 0.1mg/L AG3) del cultivar Camino Real.	98
Figura 47:	Resultados del tratamiento de multiplicación M5 (MS+4mg/L BAP+ 0.5g/L carbón activado) del cultivar Camino Real.	99
Figura 48:	Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables del cultivar Camino Real.	101
Figura 49:	Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables del cultivar Cristal.	101
Figura 50:	Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables del cultivar Albión	102
Figura 51:	Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables del cultivar Sabrina.	102

Figura 52:	Separación de folíolos, brotes y raíces de los cultivares Cristal y Albión.	111
Figura 53:	Influencia de los tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la longitud de raíces de la vitroplanta <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	117
Figura 54:	Influencia de los tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en el número de raíces de la vitroplanta <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	117
Figura 55:	Influencia de los tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en el peso seco y peso fresco de raíces de la vitroplanta <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	118
Figura 56:	Efecto del carbón activado en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R1 y R2.	120
Figura 57:	Efecto del carbón activado y 0.05 mg/l de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R7 y R3.	121
Figura 58:	Efecto del carbón activado y 2mg/L de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R8 y R4.	122
Figura 59:	Efecto de 1/2MS, carbón activado y 1mg/L de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R9 y R5.	123
Figura 60:	Efecto de 1/2MS, carbón activado y 2mg/L de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R10 y R6.	124
Figura 61:	Resultados de raíces según presencia de carbón. (A, A1) Raíces provenientes de los tratamientos adicionados con 0.5g/L de carbón activado; (B, B1) Raíces provenientes de los tratamientos sin carbón activado.	126

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D1 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.	142
ANEXO 2:	Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D2 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.	142
ANEXO 3:	Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D3 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días	143
ANEXO 4:	Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D4 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.	143
ANEXO 5:	Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D5 de la introducción a partir de meristemos de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días	143
ANEXO 6:	Resultados de desinfección en los cultivares de la introducción a partir de meristemos después de 42 días.	144
ANEXO 7:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de inicio del cultivar Camino Real	144
ANEXO 8:	ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de inicio del cultivar Camino Real.	144
ANEXO 9:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de inicio del cultivar Cristal	145
ANEXO 10:	ANVA de número de brotes para la etapa de inicio del cultivar Cristal.	145
ANEXO 11:	Resultados altura de planta, vigor y desarrollo de los cultivares evaluadas a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días de la transferencia en medio de inicio.	146
ANEXO 12:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de inicio de los cultivares.	147

ANEXO 13:	ANVA de número de brotes para la etapa de inicio de los cultivares.	147
ANEXO 14:	ANVA de número de brotes para la etapa de multiplicación del primer subcultivo del cultivar Camino Real.	147
ANEXO 15:	ANVA de número de brotes para la etapa de multiplicación del segundo subcultivo del cultivar Camino Real.	148
ANEXO 16:	ANVA de número de brotes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	148
ANEXO 17:	ANVA de número de brotes pequeños no propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real	148
ANEXO 18:	ANVA de peso fresco de brotes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real	149
ANEXO 19:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	149
ANEXO 20:	ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	149
ANEXO 21:	ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	150
ANEXO 22:	ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	150
ANEXO 23:	ANVA de longitud de raíz (mm) de la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real	150
ANEXO 24:	ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	151
ANEXO 25:	ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	151
ANEXO 26:	ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	151
ANEXO 27:	ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.	152
ANEXO 28:	ANVA de número de brotes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	152

ANEXO 29:	ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	152
ANEXO 30:	ANVA de peso fresco brotes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	153
ANEXO 31:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	153
ANEXO 32:	ANVA de longitud de foliolos altos (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	153
ANEXO 33:	ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	154
ANEXO 34:	ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	154
ANEXO 35:	ANVA de longitud de raíces (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	154
ANEXO 36:	ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	155
ANEXO 37:	ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	155
ANEXO 38:	ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	155
ANEXO 39:	ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.	156
ANEXO 40:	ANVA de número de brotes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	156
ANEXO 41:	ANVA de número de brotes pequeños no propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	156
ANEXO 42:	ANVA de peso fresco brotes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	157
ANEXO 43:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	157
ANEXO 44:	ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	157
ANEXO 45:	ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	158

ANEXO 46:	ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	158
ANEXO 47:	ANVA de longitud de raíces (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	158
ANEXO 48:	ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	159
ANEXO 49:	ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	159
ANEXO 50:	ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	159
ANEXO 51:	ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.	160
ANEXO 52:	ANVA de número de brotes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	160
ANEXO 53:	ANVA de número de brotes pequeños no propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	160
ANEXO 54:	ANVA de peso fresco de explantes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	161
ANEXO 55:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	161
ANEXO 56:	ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	161
ANEXO 57:	ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	162
ANEXO 58:	ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	162
ANEXO 59:	ANVA de longitud de raíces (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina	162
ANEXO 60:	ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	163
ANEXO 61:	ANVA de peso fresco de raíces ⁶⁴ (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	163
ANEXO 62:	ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	163

ANEXO 63:	ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.	164
ANEXO 64:	Respuestas de la variable vigor de los cultivares	165
ANEXO 65:	Textura de hojas de los cultivares	165
ANEXO 66:	Relación de peciolo-foliolo de los cultivares	166
ANEXO 67:	Deformidad de explantes de los cultivares	166
ANEXO 68:	Presencia de callos de los cultivares	166
ANEXO 69:	ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de enraizamiento.	167
ANEXO 70:	ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de enraizamiento.	167
ANEXO 71:	ANVA de longitud de hojas (mm) para la etapa de enraizamiento.	167
ANEXO 72:	ANVA de número de hojas para la etapa de enraizamiento	168
ANEXO 73:	ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de enraizamiento.	168
ANEXO 74:	ANVA de peso seco aéreo (g) para la etapa de enraizamiento.	168
ANEXO 75:	ANVA de longitud de raíz (mm) para la etapa de enraizamiento.	169
ANEXO 76:	ANVA de número de raíces para la etapa de enraizamiento.	169
ANEXO 77:	ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de enraizamiento.	169
ANEXO 78:	ANVA de peso seco de raíces (g) para la etapa de enraizamiento.	170
ANEXO 79:	ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de enraizamiento.	170
ANEXO 80:	ANVA de peso seco total (g) para la etapa de enraizamiento.	170

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y determinar el protocolo de micropropagación *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) de los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina, en las etapas de desinfección, iniciación, multiplicación y enraizamiento. En la etapa de desinfección, la inmersión en una concentración de 20% de lejía comercial (4% de hipoclorito de sodio) adicionado con Tween 20, permitió obtener el 90% de sobrevivencia en meristemas como explante de introducción en un periodo de 6 semanas. En la etapa de inicio el medio de cultivo *in vitro*, MS suplementado con 2mg/L de IBA, 2mg/L de BAP, 1g/L de carbón activado y el agar como sólido y no Phytigel permitió obtener vitroplantas en los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina con 31, 18.3, 14.5 y 22.7mm de altura, 100% vigorosas en un periodo de 5 semanas. Para lograr el número óptimo de brotes por explante, fueron dos medios en la etapa de multiplicación, resultó empleando MS+1mg/L de BAP y el medio MS+1mg/L IBA+ 1mg/L de BAP + 0.1mg/L de AG3, que permitieron obtener un coeficiente de multiplicación de 6.4 y 5.4, en el cultivar Camino Real, 4 y 6 en Cristal, 9.3 y 10 en Albión y 6 y 6 en Sabrina, respectivamente en un periodo de 8 semanas. En la etapa de enraizamiento el medio *in vitro* que respondió mejor fue ½ MS+ 2mg/L IBA + 0.5g/L carbón activado, que permitió la elongación de raíces de 55.74mm, con un número de raíces de 11, con el 0.05220g y 0.00894g de peso fresco y peso seco de raíces respectivamente en un periodo de 3 semanas. En conclusión los resultados muestran que un protocolo de micropropagación *in vitro* fue representativo en los cuatro cultivares de la fresa.

Palabra clave: Fresa, cultivares, cultivo, *in vitro*, meristemas, protocolo.

I. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es un híbrido natural de *Fragaria chiloensis* L.P. Mill. y *Fragaria virginiana* Duch., con un crecimiento de manera exponencial en el mercado peruano. En la cual el rendimiento promedio nacional es de 20t/ha, mientras que en la sierra de lima el rendimiento esperado es de 40 t/ha (REDAGRICOLA, 2017).

Las fresas es una de las frutas más fascinantes del mundo, contiene numerosos componentes dietéticos importantes, el cual destaca por su contenido de vitamina C, (Driscoll 2004; Kessel, 2012; Husaini, 2016), y han sido tradicionalmente frutas deliciosas popularmente por su sabor, aroma, gusto, uso fresco, congelación, proceso y son valoradas altamente como fruta de postre (Driscoll 2004). También contiene niveles significativos de ácido elálgico el cual se cree que es un anti-carcinógeno (ICAR news 2005).

Los cultivares Camino Real y Albión fueron presentadas por la Universidad de California y los cultivares Cristal y Sabrina fueron presentadas por la empresa española PLANASA. Presentan características excepcionales de producción. Estos cultivares se siembran actualmente en el Perú y en las regiones freseras del mundo. El cultivar Camino Real se caracteriza por su calidad de fruto, tanto por tamaño, sabor, firmeza y peso, similar al cultivar Albión que facilita la recolección y aguanta la post-cosecha. El cultivar Cristal se adapta a climas subtropicales, a terrenos difíciles y es una buena alternativa para la producción precoz. Mientras que el cultivar Sabrina produce frutos cónicos y alargados, posicionándose en el mercado español (PLANASA, 2016; Eurosemillas, 2013).

El problema de virosis que tiene el cultivo de fresa en el Perú se debe a que las fresas son propagadas vegetativamente y están sujetos a la infección por virus durante la reproducción de plantas y la producción de fruta por etapas.

Los informes de detecciones iniciales, niveles de gravedad de los síntomas, y/o vectores para más de 30 virus, enfermedades de tipo viral, y fitoplasmas que afectan a la *Fragaria* spp. (Converse, 1981; Spiengel and Martin, 1998).

Las fresas propagadas vegetativamente, y en la mayoría de los casos, el incremento de plantas madres certificadas y la propagación masiva son vendidos para la producción de fruta que se llevan a cabo en el campo, en donde existe un potencial para la reintroducción de virus. La inspección visual es muy ineficiente en los viveros ya que la mayoría de los virus de la fresa no causan ningún síntoma cuando se presentan en infecciones simples (Martín and Tzanetakis, 2006).

El mejoramiento convencional en la fresa, requieren entre 10 a 15 años para la creación de un nuevo cultivar. Sin embargo las técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la propagación clonal rápida de un gran número de plantas (Valderrama *et al.* 2008). Las plantas de fresa procedentes del cultivo de tejidos producen mayor número de estolones que las plantas propagadas por métodos tradicionales, conjuntamente son más uniformes y sobreviven más en el campo, debido a que poseen un excelente vigor y una óptima producción de frutos (Swartz, H. J. y Lindstrom, J.T. 1986).

Objetivo principal

- Optimizar y determinar la respuesta de cuatro cultivares de fresa a la técnica de micropropagación.

Objetivos específicos

- Determinar el protocolo para la etapa de desinfección
- Determinar el medio de cultivo *in vitro* para la etapa de iniciación
- Determinar el medio de cultivo *in vitro* para la etapa de multiplicación
- Determinar el medio de cultivo *in vitro* para la etapa de enraizamiento

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO

2.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ORIGEN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es un híbrido natural de *Fragaria chiloensis* L.P. Mill. (De distribución geográfica, Oeste, norte y sur de America, Hawaii) y *Fragaria virginiana* Duch., (De distribución geográfica, Norteamérica) (Bonet, 2010; Kessel, 2012; Husaini A., Neri D., 2016).

En Sudamérica se le conoce como fresa o frutilla y en Europa se denomina fresa a la fresa silvestre *Fragaria vesca* y a las cultivadas o híbridadas de *Fragaria x ananassa* son llamadas fresón por tener frutos de gran tamaño. (Maroto y López, 1988). La fresa que actualmente se siembra recibe el nombre genérico de fresa en el Perú y en el mundo. La fresa, recibe el nombre de frutilla o fresón en castellano, fraise en francés, fragola en italiano, strawberry en inglés y morango en portugués. (MINAG 2008).

Tradicionalmente la producción de fresa en el Perú se ha concentrado en diversas localidades del *norte chico* de Lima, aunque desde hace dos años su cultivo está creciendo más al norte e incluso en zonas de Arequipa y Cusco (REDAGRICOLA, 2017).

2.1.2. TAXONOMÍA

El botánico francés Antoine Nicolas Duchesne se acredita con la identificación del híbrido natural *Fragaria x ananassa*. La fresa cultivada *Fragaria x ananassa* Duch. es un miembro de la familia Rosaceae, subfamilia Rosoideae (Tabla 1), junto con moras y frambuesas. Hay alrededor de 34 especies de *Fragaria* encontradas en Asia, América (Norte y Sur) y Europa, de las cuales dos se cultivan comercialmente por su fruto: *F. moschata*, la fresa almizclada, y *F. vesca*, el bosque o la fresa alpina. Las especies fueron cultivadas durante siglos, pero

hay muy poca producción de hoy, debido al éxito de *Fragaria x ananassa*. (Amajad M. Husaini, Davide Neri, 2016)

Staud (2008) mencionado por Bonet (2010) y Branzanti (1989), mencionan que la fresa pertenece al género *Fragaria* cuyo nombre procede del latín “fragans” que significa oloroso y a su vez pertenece a la familia Rosaceae y se distribuyen mayormente en el hemisferio norte. La fresa es una planta dicotiledónea.

La fresa *Fragaria x ananassa* es un octoploide ($2n = 8x = 56$) que se originó a partir de una hibridación natural, que se cree que se originó en Francia, entre las dos especies octoploides *F. virginiana* (origen norteamericano) y *F. chiloensis* (origen sudamericano). (Universidad Estatal de Washington, 2016)

Tabla 1. Taxonomía de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Rosaceae</i>
Subfamilia	<i>Rosoideae</i>
Tribu	<i>Potentilleae</i>
Género	<i>Fragaria</i>
Especie	<i>Fragaria x ananassa</i>
Cultivares	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Camino Real ❖ Cristal ❖ Albión ❖ Sabrina
Nombre común	Fresa
Abreviatura	<i>F. x ananassa</i>
Ploidía	Octoploide
Número de cromosomas	$2n=8x=56$

FUENTE: Bonet, 2010; Folquer, 1986.

2.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA FRESA

La planta de la fresa es perenne ya que por su sistema de crecimiento, constantemente está formando nuevos tallos, que la hacen permanecer viva en forma indefinida (Figura 1) (Ferriol, 2010).

Es una planta herbácea, que posee un sistema radicular fasciculado y adventicio, rizoma cilíndrico; el tallo está constituido por un eje corto (1 a 3cm) de aspecto cónico denominado *corona* que está cubierta por hojas basales superpuestas llamadas estípulas (Figura 2). Los tallos rastreros al cabo de cierto estado emiten ramificaciones de gran longitud llamadas *estolones*, estos están constituidos normalmente por dos entrenudos de 10 a 20 cm de longitud y una yema terminal que forma una nueva planta al desarrollarse. Las hojas son largamente pecioladas, compuestas trifoliadas, con bordes aserrados cubierta con tricomas en el envés de la hoja. La flor está dispuesta en corimbo, una inflorescencia en la que los pedúnculos florales nacen en distintos puntos del eje de aquella y terminan aproximadamente a la misma altura. Los pedúnculos son pilosos y constan de un cáliz de cinco pétalos blancos y de numerosos estambres amarillos insertados en los contornos de un receptáculo convexo. (Ferriol, 2010; Folquer, 1986; Montesinos, 1993)

Lo que se conoce como fruta de fresa es en realidad un falso fruto, producto del engrosamiento del receptáculo floral, *hipanto*; sobre ese falso fruto se encuentran gran cantidad de semillas pequeñas, que son los frutos verdaderos, llamados aquenios (Ferriol, 2010; Folquer, 1986; Montesinos, 1993). “...desde el punto de vista botánico, no tienen nada que ver con las bayas, sino que son una fruta que consiste en un conjunto de aquenios, es decir, son familia de las nueces. Las “nuececillas” de las fresas son los puntitos que hay en la piel del fruto dulce y rojo” (Freshhuelva, 2016).

La forma del fruto cambia según el cultivar y puede ser achatada, globosa-cónica, cónica, cónica-alargada con cuello, en cuña alargada y en cuña corta. (Ferriol, 2010)

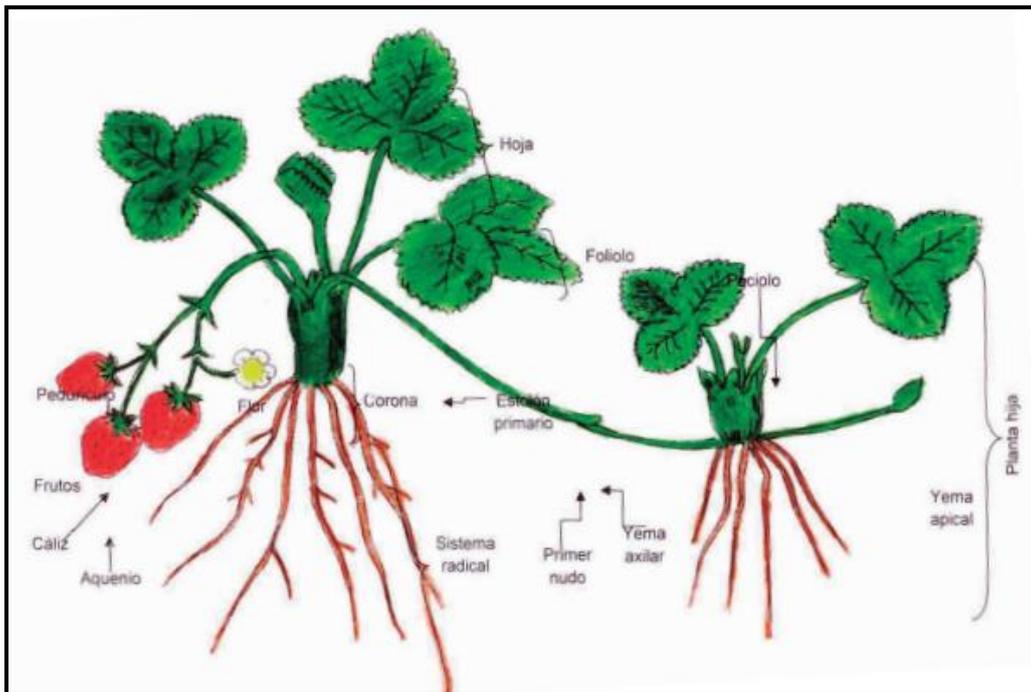


Figura 1: Fases reproductiva y vegetativa de la planta adulta de fresa con sus diferentes componentes morfológicos.

FUENTE: Dana, 1979

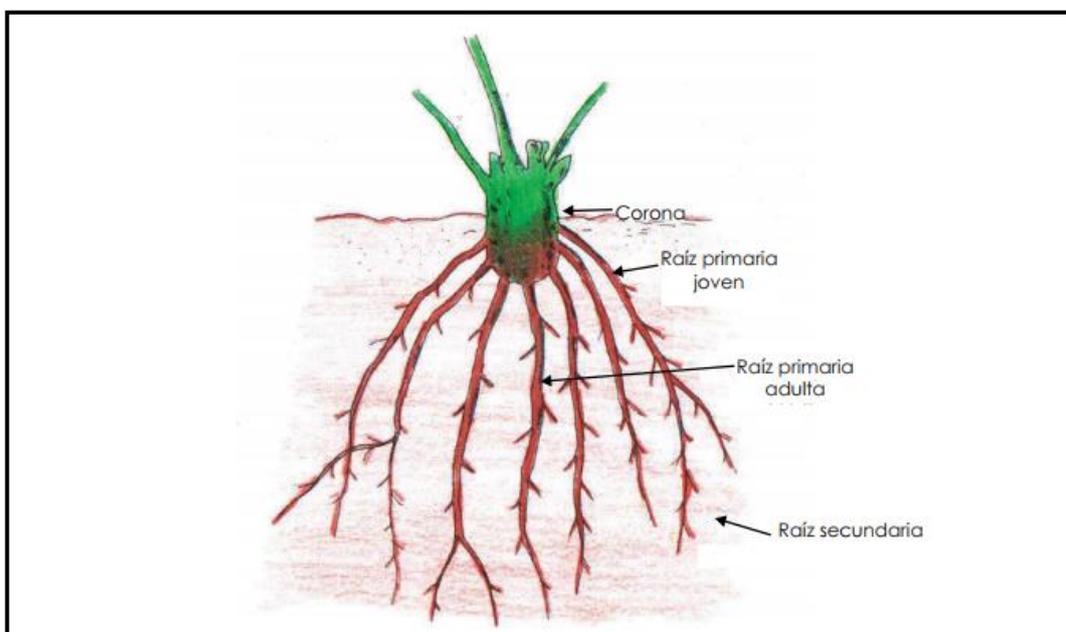


Figura 2: Sistema radical de una planta adulta de fresa; nótese las raíces primarias jóvenes y las raíces secundarias.

FUENTE: Dana, 1979

A. EL FRUTO

Bajo la definición de *frutos blandos* se agrupan varios tipos de bayas. Se trata de frutos pequeños cuyas semillas se encuentran incluidas en un receptáculo.

La fresa se desarrolla a partir de una flor con un gineceo coricárpico (donde cada carpelo representa un *carpidio*) y en la que el androceo se ha multiplicado de modo secundario por intercalación. A partir de los carpelos se forman frutos monocarpelares indehiscentes (aquenios) que se disponen sobre la superficie del eje floral, el cual adopta un aspecto cónico y una textura carnosa (receptáculo) para dar lugar a un fruto múltiple. Por tanto, la fresa es un fruto que posee una estructura de falso fruto constituido por un receptáculo carnoso en cuyo exterior están anclados los verdaderos frutos, los aquenios. (Erendorfer, 1983)

B. LOS AQUENIOS

Los aquenios son una combinación de tejido de la semilla y tejido ovárico y se originan en la base de cada pistilo (Darrow, 1966). Se encuentran embebidos en la capa epidérmica del receptáculo y conectados con el interior de éste mediante haces fibrovasculares a través de los cuales obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo y el de las células parenquimáticas del receptáculo circundante. En función del cultivar del que se trate y de las condiciones de crecimiento del mismo, pueden existir entre 20 y 500 aquenios en cada receptáculo (Darrow, 1966). Estructuralmente, los aquenios maduros se caracterizan por presentar un grueso pericarpo, una delgada testa, una única capa endospermática y un embrión que completa su desarrollo diez días después de la antesis (Thompson, 1963).

C. EL RECEPTÁCULO

En el receptáculo, el tejido vascular forma un eje central en torno al cual se disponen los tejidos parenquimatoso y epidérmico del córtex (Havis, 1943). Los haces vasculares se extienden desde el pedicelo, atravesando el tejido parenquimatoso y el córtex, hasta alcanzar a los aquenios localizados en la superficie del receptáculo. Su epidermis es ligeramente pubescente y está formada por una o dos capas delgadas de células. El receptáculo presenta estomas protuberantes y abiertos, relacionados con la transpiración y respiración del fruto (Perkins-Veazie, 1995).

2.1.4. FISIOLÓGÍA DE LA FRESA

Las fresas poseen un gran número de estomas, por lo que tienden a perder gran cantidad de agua por transpiración. Son termoperiódicas y fotoperiódicas; es decir su crecimiento depende de la luz y la temperatura. Las temperatura óptimas para el crecimiento son entre 18 a 25° C (diurnas) y 8 a 13°C (nocturnas). Cuando las plantas están bajo condiciones de alta temperatura y a más de doce horas de luz se observa un crecimiento vegetativo excesivo y cuando son expuestas a temperaturas bajas y con poca luz, se inicia el proceso de floración. Un clima por debajo de 12°C durante el cuajado acelera la floración y da lugar a frutos deformados mientras que un clima muy caluroso puede originar una maduración y coloración del fruto muy rápida, lo cual le impide adquirir un tamaño adecuado para su comercialización (AGRONOTICIAS, 2017).

A. FLORACIÓN

La formación de flores en la planta de fresa es inducida a bajas temperaturas y con fotoperíodos cortos. Aunque, todas las especies de *Fragaria* muestran una gran variedad de respuesta a la temperatura y a la longitud del día a la hora del desarrollo de yemas florales (Heide y Sonstebj, 2007), también las auxinas y citoquininas juegan un papel importante en este proceso (Hou y Huang, 2005; Eshghi y Tafazoli, 2007). Existen cultivares de día corto, de día largo y de fotoperíodo insensible (día neutro o *Everbearing*)

Actualmente, las investigaciones están centradas en la identificación de genes reguladores de la floración en cultivares de día neutro, ya que son las plantas que se adaptan mejor a los climas continentales (Weebadde *et al.*, 2008).

B. FRUCTIFICACIÓN

El crecimiento del receptáculo de la fresa depende muy directamente del desarrollo de las células del córtex y de la médula, siendo esta última la principal responsable del tamaño del fruto (Hancock, 1999).

a. Crecimiento

Hasta el décimo día tras la polinización, se puede observar un crecimiento logarítmico del peso fresco del receptáculo debido a un aumento de la división y alargamiento celular. A partir del día 20 después de la polinización, aparece una segunda fase de incremento rápido del peso fresco. Posteriormente, a los 25 días, comienza a observarse cambio de color,

quedando completada la maduración a los 30 días tras la polinización. Se ha descrito que hay un incremento en la división celular de hasta tres veces durante los primeros 7 días después de la polinización, mientras que todo el crecimiento posterior es debido a la expansión celular (Knee *et al.*, 1977).

b. Maduración

En la mayoría de los frutos blandos, la maduración es un proceso fisiológico de corta duración que sucede rápidamente y en la que los frutos desarrollan una serie de propiedades organolépticas que los hacen aptos para el consumo. En el caso del fruto de fresa, la maduración se completa en 30-40 días desde la antesis (Dennis, 1984) e invariablemente viene determinada por cambios simultáneos en el color, sabor y textura del mismo. A nivel celular, la maduración produce un aumento del tamaño de la célula, la formación de grandes espacios vacuolares, y una modificación de la pared celular que provoca la oclusión del espacio intercelular con una matriz glucídica (Neal, 1965). En cualquier caso, para que el proceso de maduración transcurra adecuadamente, el fruto debe estar unido a la planta ya que, si es separado de ella, sus propiedades organolépticas se reducen de forma significativa.

Given *et al.* (1988) propusieron que las auxinas producidas por los aquenios inhiben la maduración en los frutos en estadio verde. A medida que el fruto se desarrolla, el nivel de las auxinas en los aquenios va declinando. Las auxinas estimularían la elongación del fruto mientras que reprimiría la maduración del mismo.

La sugerencia de que la concentración de auxinas podría ser el principal factor hormonal que influye en la maduración del fruto de fresa se ve apoyada por la ausencia de cualquier tipo de relación del etileno con este proceso (Knee *et al.*, 1977; Abeles y Takeda, 1990; Hoad *et al.*, 1971; Iwata *et al.*, 1969b). Todo esto no excluye la existencia de otros factores que intervengan en la maduración, ya que se conoce el efecto enrojecedor sobre el fruto de fresa de compuestos como el ácido fumárico, ácidos de frutas y monofenoles (Guttridge *et al.*, 1977).

En el fruto de fresa, la producción de etileno presenta un máximo en el estadio verde descendiendo su nivel hasta el día 20 tras la antesis. Dicho descenso se correlaciona con la transición del fruto de estadio verde hasta el estadio blanco de maduración (Perkins-Veazie *et al.*, 1995).

El sabor del fruto de fresa tiene su origen en la interacción de una mezcla compleja de compuestos volátiles y otros constituyentes mayoritarios del fruto, especialmente azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y taninos (Manning, 1993; Darnell y Martin, 1988; Lis y Antoszewski, 1979).

El aroma del fruto de fresa es extremadamente conocido no sólo como una característica del fruto fresco, sino que también es utilizado como aditivo de otros productos (Hancock, 1999). La mezcla de compuestos volátiles en el fruto de fresa es compleja (Tressl *et al.*, 1969), aunque los ésteres son uno de los grupos de compuestos volátiles más importantes relacionados con el aroma de la fresa. (Zabetakis y Holden, 1997).

A lo largo del proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa, se observa una transición desde el color verde inicial al color rojo propio de frutos completamente maduros. Este cambio de coloración se debe tanto a la degradación de clorofilas como a la síntesis *de novo* de antocianinas responsables de la coloración de los frutos maduros y localizadas en las vacuolas (Timberlake, 1981; Perkin-Veazie, 1995). Los niveles y la composición cualitativa de los flavonoides en frutos de fresa dependen de factores genéticos, ambientales y de desarrollo, así como de la manipulación que sufren los frutos tras su recogida (Bakker *et al.*, 1994; Häkkinen y Törrönen, 2000; Anttonen *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2008). Debido al cambio de color asociado a la biosíntesis de antocianinas, la vía de los flavonoides se utiliza para estudios funcionales en receptáculo de fruto de fresa (Perkins-Veazie, 1995).

C. RESPIRACIÓN

En el proceso de maduración del fruto, la respiración es máxima en la transición entre los estadios maduros a sobre-maduros (Iwata *et al.*, 1969a y 1969b). La fresa, fruto no climatérico, muestra una intensa fase de maduración que no presenta un requerimiento aparente de energía metabólica adicional (Ben-Arie y Faust, 1980).

2.1.5. VALOR NUTRICIONAL DE LA FRESA

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una de las frutas de mayor aceptación mundial y es también una de las que tiene mayores usos, entre los que se encuentran su exportación e importación. No obstante, y tras amplios estudios en el cultivo, se ha descubierto que este fruto no solo es interesante por su calidad como postre, sino además es un alimento muy

sano, que aporta gran cantidad de sustancias beneficiosas para el organismo (Kessel, 2012).

Posee una composición nutricional notable en términos de micronutrientes, como minerales, vitamina C y folatos, y elementos no nutrientes, tales como compuestos fenólicos, que son esenciales para la salud humana. Aunque los compuestos fenólicos de fresa son conocidos principalmente por sus acciones antiinflamatorias y antioxidantes, estudios recientes han demostrado que sus actividades biológicas también se extienden a otras vías de señalización implicadas en el metabolismo celular y la supervivencia celular (Giampieri, 2014).

La fresa tiene un alto valor nutritivo, es rica en fructuosa y sacarosa y pobre en carbohidratos. Su consumo puede incrementar los índices de absorción de hierro presente en los vegetales, huevos y carne. Es también levemente laxante y diurética y cubre las carencias de minerales y vitaminas del complejo B. Además posee quercitina que es capaz de neutralizar los radicales libres responsables del envejecimiento de las células (Ferriol, 2010).

Son frutas comunes importantes en la dieta mediterránea debido a su alto contenido de nutrientes esenciales y fitoquímicos beneficiosos, que parecen tener actividad biológica relevante en la salud humana. Entre estos fitoquímicos, antocianinas y elagitaninos son los principales compuestos antioxidantes. A pesar de constituyentes fitoquímicos individuales de las fresas han sido estudiados por sus actividades biológicas, estudios de intervención humana utilizando frutas enteras siguen faltando. En este caso, el aporte nutricional y la composición fitoquímica de la fresa son revisados, como es el papel desempeñado por los efectos madurez, genotipo, y almacenaje puestas en esta fruta. La atención específica se centra en la absorción de la fruta, el metabolismo y la posible actividad biológica beneficiosa sobre la salud humana. (Giampieri, 2012)

Sabroso y nutritivo, las fresas son disfrutadas por millones de personas en todos los climas, incluyendo y se utilizan principalmente como fruta fresca. Su uso en formas procesadas como cocidos y endulzando conservas, mermeladas o jaleas y bayas enteras congeladas o endulzados extractos de jugo o aromatizantes, y su uso en la fabricación de una variedad de otros productos transformados los hizo uno de los cultivos de bayas más populares, una distribución más amplia que cualquier otro fruto (Samir C. Debnath, Jaime A. Teixeira da Silva., 2007).

En la tabla 2, se expone la composición de fresa. Ocho fresas medianas contienen más vitamina C que una naranja, 20% de la cantidad diaria recomendada de ácido fólico, sin grasa, sin colesterol y son consideradas de alto en fibra (Driscoll.s. 2004).

Tabla 2. Composición de la fresa en 100g de materia fresca.

COMPONENTE		COMPONENTE	
Agua (g)	90,95	Almidón (g)	0.04
Ac. Orgánicos (g)	1,0	Fructuosa (g)	2.5-3,5
Ceniza (g)	0.4	Glucosa (g)	2,04-3,03
Energía (kcal)	32,0-34,0	Sacarosa (g)	0,12-0,35
Fibra (g)	2,0	Xilitol (g)	0,03
Hidratos de carbono	4,66-7,68	Sorbitol (g)	0,03
Lípidos (g)	0.3-0.5	Vitamina A IU	12,0
Proteínas (g)	0.7	Tiamina (B ₁) (mg)	0,024
Calcio (mg)	16,0	Rivoflavina (B) (mg)	0,06
Cloro (mg)	14,0	Niacina (B) (mg)	0,386
Cobre (mg)	0.048	Ac. Pantoténico (B) (mg)	0,125
Fosforo (mg)	24,0-26,0	Piridoxina (B) (mg)	0,047
Fluor (µg)	25,0	Folatos totales (µg)	24,0
Hierro (mg)	0.42-0.7	Vitamina C (mg)	58,8-60,0
Magnesio (mg)	13,0	Vitamina E (mg)	0,29
Manganeso (mg)	0.386	Vitamina K (mg)	2,2
Potasio (mg)	153,0	Ácido cítrico (mg)	870,0
Sodio (mg)	1,0-2,0	Ácido málico (mg)	140,0
Yodo (µg)	1,0	Ácido oxálico (mg)	16,0
Zinc (mg)	0,14	Ácido salicílico (mg)	1,4

FUENTE: Senser y Scherz, 1999; Mataix *et al.*, 2003; Farran *et al.*, 2004; Sánchez, 2004; Moreiras *et al.* 2006.

También contiene niveles significativos de ácido elágico, que se cree que es un anti-carcinógeno (ICAR news, 2005). En fresas ocurre una disminución de ácido elágico conforme la fruta va madurando; la mayor cantidad se presenta en los aquenios (Williner *et al.*, 2003)

Según Ferriol (2010), las fresas resultan beneficiosas para:

- Combatir la anemia y la deficiencia nutricional
- Incluir en tratamientos de remineralización.
- Incluir de dietas de niños y embarazadas.
- Previene infecciones en el organismo.
- Actúa como desintoxicante.
- Es recomendable para tratamientos reumáticos y de gota.
- Mejora las funciones hepáticas y renales.
- Contribuye a la mejor circulación sanguínea.

2.1.6. ENFERMEDADES

A. POR DEFICIENCIAS

Se pueden distinguir tres grandes tipos de factores relacionados con esto:

a. Sensibilidad varietal

Los cultivares Festival, Camino Real, Palomar, Candonga, Amiga, Liberty, California Giant, son conocidas como las especies más sensibles al estrés y especialmente al inicio de su ciclo productivo (1° y 2° floración). En cultivares sensibles es prácticamente imposible evitar el fenómeno, pero se puede reducir su impacto.

b. Estrés abiótico

En condiciones de temperatura bajo 3°C y de luminosidad insuficiente debida al estrés climático y a estructuras de protección no adecuadas, se registra una mayor aparición del fenómeno.

Factor muy importante a tener en cuenta perteneciente a la clase de estrés de naturaleza abiótica está representado por el control de la salinidad y por lo tanto del correcto control nutricional de la fresa. El aumento de la susceptibilidad en cultivares como Festival y Candonga en regímenes de conductibilidad eléctrica (CEw) superiores a 1,2 ds/cm, es la demostración de la importancia del control y el seguimiento constantes del perfil nutricional. Si se considera que tales valores de conductibilidad no están relacionados con

la calidad de la solución fertilizante, pero sí con la solución circulante del terreno y por lo tanto con respecto a la conductividad eléctrica directamente percibida por el sistema de raíces de la planta.

El factor de naturaleza abiótica relacionado con la correcta asimilación del calcio por parte de la planta. En la fresa la absorción del calcio es muy variable, presencias bajas de este elemento ($[Ca]_{SS} < 3-5 \text{ meq/l}$) no se adaptan bien a la producción de biomasa por parte de la planta, teniendo en cuenta que el 75% del calcio se localiza en las hojas, en los pétalos y el fruto. Se aconseja aportar una concentración de entre 3-6 meq/l en las fases de mayor desarrollo de la planta.

La baja disponibilidad de Ca no depende sólo de su aporte directo sino sobre todo de las condiciones que favorecen más o menos su transporte al interior de los tejidos. En este sentido es fundamental el control hídrico del sistema suelo-planta-agua, la transpiración y la reducción del potencial osmótico, en condiciones favorables del movimiento de la savia xilemática de las raíces a los vértices meristemáticos (que tienen una tasa de transpiración muy baja).

Un aporte hídrico y por lo tanto una buena actividad radical favorece el fenómeno de la gutación permitiendo una adecuada distribución del calcio hacia los vértices vegetativos. (Santos M.B. *et al.*, 2014)

c. Estrés biótico

El moteado zonificado es una enfermedad foliar causada por la *Zythia fragariae*. De hecho la enfermedad aparece al final del invierno o inicio de la primavera, cuando hay lluvias suficientes para activar el hongo y difundir las esporas. Una vez que las lluvias invernales acaban, la enfermedad desaparece antes del desarrollo del fruto.

Los cuerpos fructíferos de *Zythia* están presentes en las lesiones del cáliz y aparecen en marrón oscuro con forma circular alargada. (Santos M.B. *et al.*, 2014)

El correcto control nutricional del cultivo para el control de la desecación del cáliz, son:

- Optimizar los aportes de agua y fertilizantes
- Optimizar el estado nutricional del sistema suelo-planta-agua
- Promover el máximo potencial productivo del cultivo

B. POR PLAGAS

a. Arañitas (Tetranychus sp.)

Este ácaro de cuerpo globoso y naranjado en estadio adulto, es una de las plagas más graves de la fresa. Inverna en plantas espontáneas o en hojas viejas de fresa para atacar a hojas jóvenes con la llegada del calor (Asociación Regional de Exportadores de Lambayeque AREX 2013). Con condiciones climáticas favorables, cada generación se completa en aproximadamente 20 días. Su daño se manifiesta desde comienzos de la época seca, observándose en el envés de las hojas toma una coloración café rojiza, secándose en muchos casos.

Para su tratamiento se recomienda abamectina, y la literatura recomienda también otros productos como Cyhexatin, Tetradifon, Kelthane, Propargite y Azociclotin (Universidad de Concepción, 2008)

b. Mancha de la hoja (Mycosphaerella fragariae)

Aparece como una mancha circular de 2 a 3 mm de diámetro sobre la hoja. Se dispersa por medio de ascosporas y de esporas, con temperaturas suaves y alta (Asociación Regional de Exportadores de Lambayeque AREX, 2013). Las manchas pequeñas son redondas de color rojizo a púrpura pudiendo causar destrucción de hojas. Se recomienda eliminar las hojas atacadas y/o realizar aplicaciones preventivas a base de Mancozeb (Universidad de Concepción, 2008).

c. Podredumbre gris (Botrytis cinerea)

Se desarrolla favorablemente en condiciones de alta humedad relativa y temperaturas entre los 15 y 20°C. La diseminación se realiza por medio de esporas, ayudándose de la lluvia o el viento (Asociación Regional de Exportadores de Lambayeque AREX, 2013). Es un hongo que daña el fruto produciendo un ablandamiento, y cuando es muy severo se cubre completamente con vello gris. Puede penetrar al fruto sin necesidad de heridas y durante la cosecha los frutos sanos pueden ser contaminados con esporas provenientes de otros infestados. Cualquier factor que tienda a producir daños como magulladuras o exceso de manipuleo en la cosecha favorece la propagación de la enfermedad.

Su control puede ser preventivo, evitando el crecimiento muy abundante del follaje y con aplicaciones de Benomil y Captan, varias veces en la temporada de cosecha. La fruta debe ser lo antes posible (Universidad de Concepción, 2008).

d. Oidium (Oidium sp.)

Es un hongo muy común en áreas de gran humedad ambiental y frío. Los órganos más afectados son las hojas, cáliz de las flores y frutos. El síntoma más característico es el curvamiento hacia arriba de los márgenes de las hojas, acompañando de un velo blanquecino. Si el ataque es muy severo, el envés de las hojas adquiere un color rojizo.

Se recomienda aplicaciones sistémicas y azufres (Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción, 2008). Bolda (2013) indica que hay una selección amplia de fungicidas para su uso en fresas. Ejemplo de ello son el mycobutanil, Triflumazol, Pyraclostrobin, boscalid y quinoxyfen.

e. Podredumbre negra de la raíz (Phytophthora sp., Rhizoctonia sp.)

Son varios hongos que afectan a la planta desde su sistema radical o zona del cuello, pudiendo llegar a ser dramáticas las consecuencias (Asociación Regional de Exportadores de Lambayeque AREX, 2013). Las raíces presentan manchas o lesiones ovaladas de color marrón. Debe utilizarse plantas sanas, tratando el material a propagar con Thiram (Universidad de Concepción, 2008).

El SCV, SMYEV, SMOV, y SVBV (Tabla 3) son considerados los cuatro virus más económicamente importantes de la fresa en la mayoría de la producción de las áreas. (Converse, 1981; Spiegel and Martín, 1998).

Tabla 3. Virus de la fresa, nombres, acrónimos, modo de transmisión y género.

NOMBRE DE VIRUS	ACRÓNIMO	MODO DE TRANSMISIÓN	GÉNERO
<i>Apple mosaic</i>	ApMV	Polen, semilla	<i>Ilavirus</i>
<i>Arabis mosaic</i>	ArMV	Nematodo, semilla.	<i>Nepovirus</i>
<i>Beet pseudo-yellows</i>	BPYV	Mosca blanca	<i>Crinivirus</i>
<i>Fragaria chiloensis cryptic</i>	FCICV	Desconocido	Desconocido
<i>Fragaria chiloensis latent</i>	FCILV	Polen, semilla	<i>Ilavirus</i>
<i>Raspberry ringspot</i>	RpRSV	Nematodo, semilla.	<i>Nepovirus</i>
<i>Strawberry chlorotic fleck</i>	StCFV	Áfido	<i>Closterovirus</i>
<i>Strawberry crinkle</i>	SCV	Áfido	<i>Cytorhabdovirus</i>
<i>Strawberry feather leaf</i>	NA	Desconocido	Desconocido
<i>Strawberry latent</i>	StLV	Desconocido	<i>Cripavirus</i>
<i>Strawberry latent C</i>	SLCV	Áfido	<i>Nucleorhabdovirus</i>
<i>Strawberry latent ringspot</i>	SLRSV	Nematodo, semilla.	<i>Sadwavirus</i>
<i>Strawberry mild yellow edge</i>	SMYEV	Áfido	<i>Potexvirus</i>
<i>Strawberry mottle</i>	SMoV	Áfido	<i>Sadwavirus</i>
<i>Strawberry necrotic shock</i>	SNSV	Trips, polen, semilla	<i>Ilavirus</i>
<i>Strawberry pallidosis associated</i>	SPaV	Mosca Blanca	<i>Crinivirus</i>
<i>Strawberry pseudo mild yellow edge</i>	SPMYEV	Áfido	<i>Carlavirus</i>
<i>Strawberry vein banding</i>	SVBV	Áfido	<i>Caulimovirus</i>
<i>Tobacco necrosis</i>	TNV	Oomyceto	<i>Necrovirus</i>
<i>Tomato black ring</i>	TBRV	Nematodo, semilla.	<i>Nepovirus</i>
<i>Tomato ringspot</i>	ToRSV	Nematodo, semilla.	<i>Nepovirus</i>

FUENTE: Martin y Tzanetakis. 2006

2.1.7. IMPORTANCIA ECONÓMICA

La fresa es de gran importancia económica en todo el mundo, porque forma parte de la dieta regular de millones de personas y porque se cultiva en más de 75 países del mundo, desde regiones Árticas hasta los trópicos. (Cumplido 2012, FAOSTAT 2014)

El cultivar *Fragaria x ananassa* Duchesne ex Rozier nothosub. ha alcanzado en los últimos 20 años más de 3,6 millones de toneladas métricas. La mayor parte de la producción tiene lugar en el hemisferio norte (98%), aunque no existen barreras genéticas ni climáticas que impidan la expansión hacia el sur. España representa el primer productor de fresa fresca de Europa y el tercero del mundo, tras Estados Unidos y China (FAOSTAT, 2005). Del 295.000 Tm que representan la producción media anual española, el 95% se concentra en la provincia de Huelva (Freshuelva, 2005), la mitad de la cual es exportada a otros países europeos (Infoagro, 2002). No obstante, se estima que entre el 5 y el 25 % de la producción, dependiendo del cultivar, se pierde debido al reblandecimiento que sufre el fruto a lo largo de su maduración, a la infección por diferentes patógenos (infecciones favorecidas por el sistema de cultivo de la planta y por la siembra sucesiva sobre el mismo sustrato), así como por otros factores que afectan a la calidad del fruto (López & Aranda, 1997).

Las fresas son y seguirán siendo el mercado principal y más maduro dentro de la categoría de berries. El sector está cambiando, de un modelo de negocio bastante fragmentado y local hacia otro más intensivo que amplía la ventana productiva y busca la máxima calidad (, 2016).

La fresa es uno de los frutos de mayor consumo mundial, 1.6 kilogramos por persona al año, en promedio, aunque Estados Unidos llega a 3.6, mientras el Perú apenas 0.7 kg/persona/año (AGRONOTICIAS, 2017).

En el Perú, es un cultivo rentable para los productores. Precisamente esto último es lo que ha motivado el crecimiento en la superficie cultivada, que hoy llega a unas 2,000 ha cada campaña en el país (REDAGRICOLA, 2017).

El mercado de la fresa está creciendo de manera exponencial en el país. Y hoy los productores ya no solo miran con interés a ciudades como Barranca, Huaral, Huaura, Huacho o Chancay, sino también a otras más al sur del país, como Cañete e incluso Arequipa; o más al Centro como Cusco. Huaraz es también una posibilidad (REDAGRICOLA, 2017). Por

nuestra ubicación geográfica, buen clima y suelos podemos instalar fresas en los 2000 msnm., y en la *ceja* de selva, sobre los 800 msnm. (AGRONOTICIAS, 2017).

El rendimiento esperado es de 40 t/ha, entre los meses de agosto y diciembre, y otras 40 t/ha la siguiente campaña, pero eso depende mucho del manejo del campo y las condiciones climáticas. En todo caso, el promedio nacional es de 20 t/ha. en campaña, producen de agosto a diciembre. (REDAGRICOLA, 2017).

La Región Lima posee el 94% de la producción total anual de fresa, cultivo que se comercializa principalmente en el mercado limeño, según reveló la reciente publicación del Sistema de Abastecimiento y Precios (SISAP), elaborado por la Oficina de Estudios Económicos y estadísticos del Ministerio de Agricultura (MINAG). (Yaipén, 2012). Cynthia Falcón gerente general de Miska Farm SAC., señala, “*El 90% de la fresa que se siembra en el Perú está en manos de la agricultura tradicional, de los pequeños agricultores, y se hace con riego por gravedad...*”. Explica con respecto al tipo de riego “*... Por goteo se puede sembrar todos los años en el mismo suelo pero hay que desinfectar, sobre todo con metam sodio*”. (REDAGRICOLA, 2017).

Octubre es el mes donde hay más envíos de exportación (REDAGRICOLA, 2017).

El precio de las fresas en el mes de mayo del 2017, está de S/. 2.50 a S/. 4.50/kg en el Mercado Mayorista de Frutas de San Luis, en Lima. (REDAGRICOLA, 2017).

Las mejores cosechas se logran con los cultivares *San Andreas*, *Albión* y *Cabrillo* (AGRONOTICIAS, 2017). *Albión* es bastante sabrosa pero es un 20% menos productiva que el *San Andreas*. Según los especialistas, la presencia de la arañita roja es la principal plaga de este tipo de cultivo (REDAGRICOLA, 2017).

Según SUNAT (2017) las empresas exportadoras de fresa en el Perú (FOB %) son: Agroworld SAC (59%), Del Ande Alimentos SAC (17%), Frozen foods SAC (15%), Agropackers SAC (3%), Peruvian Agro Services (3%) Mebol SAC (1%), Empresa Agro Export Ica SAC (1%), varios (1%).

2.2. CULTIVARES DE FRESA EN ESTUDIO

Los cultivares de la fresa se clasifican en dos tipos de acuerdo a la respuesta al fotoperiodo para la floración, como cultivares de día corto y día neutro. (Maroto y López, 1988; Olivera 2003; Reyes y Zschau 2012).

A continuación, se describen los cultivares que más se siembran actualmente en el Perú y en las regiones freseras del mundo.

2.2.1. CULTIVARES DE DÍA CORTO

Reyes y Zschau (2012), menciona que son aquellos cultivares que responden al fotoperiodo (Largo del día), es decir requieren días cortos para la desarrollar yemas florales.

Olivera (2003). Menciona que la floración es inducida cuando el fotoperiodo es de 12 horas luz y la temperatura fluctúa entre 14 y 18°C. En el Perú, el trasplante de estos cultivares se realizan entre los meses de abril y mayo.

MINAG-DGIA (2008), indican que, para la sierra, en valles interandinos y valles abrigados se recomiendan las cultivares de día corto.

A continuación, se describe los cultivares de día corto que se siembran en el Perú y principales zonas freseras del mundo como California, Florida, España y Chile. En estas zonas se han desarrollado empresas e instituciones que manejan viveros de semillas de fresa y a la vez están a la vanguardia en la producción de nuevos cultivares. Por tener clima parecidos al nuestro, sus cultivares se han adaptado a nuestro país, se describe las principales cultivares presentadas por la Universidad de California y por la empresa española PLANASA que han destacado en la campaña de la fresa del 2012 en España y Chile respectivamente.

- **Cultivar actual:**

Se tiene a Camino Real de la Universidad de California. (Angulo 2012, MINAG Y DGIA 2008).

- **Cultivar nuevo:**

Se tiene a Sabrina de la empresa española PLANASA. (Semillaria 2014, PLANASA, 2014 y Garcia *et al.*2012).

A. CAMINO REAL

Obtenida por la universidad de California en 1998 (Horticom News 2013).

La empresa española Eusemillas menciona que produce fruta de primera calidad superior a Camarosa y Gaviota. Su estructura de planta es pequeña y erecta el cual permite grandes plantaciones y facilita la recolección. La fruta es muy resistente a daños por lluvia, no presenta problemas de polinización, es decir, el porcentaje de deformación es muy bajo (Figura 3) (Eurosemillas 2013).

Eurosemillas (2013), la describe como un cultivar de producción más tardía que Camarosa y que los rendimientos medios de Camino Real son superiores a Camarosa y Gaviota. Además, su porcentaje de fruta de segunda calidad es considerablemente muy bajo.

Además las plantas de Camino Real son pequeñas, compactas y fáciles de manejar, su frutal es grande (similar a Camarosa), firme y color interno y externo más oscuro que Camarosa.

Angulo (2009), menciona que tiene buena productividad y excelente calidad de los frutos, llega a producir 4 libras por planta en el ciclo de 18 meses que dura la planta en producción, se pueden sembrar 206 plantas por cama de 31m, es decir entre 30 y 35cm entre plantas, al sexto mes comienza la producción cosecha promedio de 3 libras por planta en el ciclo de 18 meses.

Resistencia a plagas y enfermedades:

Eurosemillas (2013) y Angulo (2009), mencionan que Camino Real es un cultivar tolerante a condiciones climatológicas adversas y a enfermedades importantes del suelo como *Phytophthora* sp., *Verticillium*, *Colletotrichum* sp., Antracnosis y *Xanthomonas*.

Es resistente al ataque de ácaros y a las manchas comunes de la hoja, pero es susceptible a la *Botrytis* sp. (Eurosemillas, 2013).

Experiencias

Eurosemillas (2013), menciona que los ensayos realizados en Irvine (California) y en Huelva (Palos de la Frontera) en el año 2001 mostraron que los rendimientos de fruta de segunda de Camino Real son menos de la mitad de este de Camarosa.



Figura 3: Fruto del cultivar Camino Real.

FUENTE: Distribuidora de fresa Camino Real, 2016

B. SABRINA

Cultivar obtenida por la empresa española Plantas de Navarra S.A. (Planasa) en el 2010. Es más Precoz que Candonga y muy productiva. La planta es vigorosa, erecta y compacta de hojas de color verde intenso, tiene un buen sistema radicular. Produce frutos de forma cónica alargadas de color rojo brillante. El calibre del fruto es grande, con pesos promedios de 23 a 25 gramos y los mantiene hasta el final de campaña. Presenta pedúnculos largos que facilita la cosecha (Figura 4). (PLANASA, 2014).

Tolera el Oidium y Botrytis pero no tanto como la Candonga y debido a su buen sistema radicular no presenta problemas radiculares. (PLANASA, 2014).

Sabrina ha sido un éxito en la cuenca mediterránea, según su creador, Planasa. Su cuota de mercado en la zona en sólo cuatro años está por encima de 35% (PLANASA, 2015)



Figura 4: Frutos del cultivar Sabrina.

FUENTE: PLANASA, 2017

2.2.2. CULTIVARES DE DÍA NEUTRO

Estos cultivares se caracterizan porque no responden al fotoperiodo, es decir solo requieren de temperaturas adecuadas (sobre 12°C en el suelo) para desarrollar yemas florales.

Presentan una producción y calibre de frutos más homogéneos a lo largo de la temporada. (Reyes y Zschau, 2012).

En el Perú se puede sembrar en cualquier época del año este tipo de cultivares neutros. (MINAG-DGIA 2008).

A continuación, se describe todos los cultivares de día neutro que se siembran en el Perú y las principales zonas freseras del mundo como California, Florida, España y Chile. En estas zonas se han desarrollado empresas e instituciones que manejan viveros de semillas de fresa y a la vez están a la vanguardia en la producción de nuestro país. Pertenecen a la Universidad de California y en pequeño porcentaje otras empresas privadas.

Cultivares nuevos:

Tenemos a Albión lanzado en 2004, obtenido por la Universidad de California (Horticom News, 2013).

A. CRISTAL

El cultivar Cristal fue obtenido por cruce en la finca experimental de Planasa en Cartaya, Huelva (España) y fue lanzado al mercado en el 2007. Es un cultivar de día neutro que presenta una buena precocidad en producción, pero requiere de un manejo adecuado como la poda de las primeras flores.

Cristal con código de EU27263, es un cultivar de calidad remontante de calibre medio, de gran calidad de fruta para producciones de otoño. Es muy productiva (300g en otoño y hasta 1kg en primavera por planta), el fruto tiene un buen color homogéneo. Con buena adaptación a climas subtropicales y terrenos difíciles. Es una buena alternativa para producción precoz. No presenta quemaduras de cáliz (Figura 5). Es resistente a sales, adecuada para el cultivo en suelos difíciles. (PLANASA, 2016)



Figura 5: Flor y frutos del cultivar Cristal.

FUENTE: PLANASA, 2017

B. ALBIÓN

Obtenida por la Universidad de California y lanzado comercialmente en el 2004 (Horticom News, 2013).

Eurosemillas (2013), la describe como un cultivar de excepcional calidad organoléptica de sabor excepcional, con rendimientos parecidos a Diamante y un poco menos que Aroma. Reyes y Zschau (2012), señalan que es un cultivar moderadamente neutra.

Se debe sembrar de 40-50cm entre plantas. Producción de 3 a 4 libras por planta en los 18 meses. (Angulo, 2009)

Descripción:

Eurosemillas (2013), la destaca que su principal característica es su excepcional calidad de fruta, tanto por tamaño, como por sabor, firmeza y del peso que llega a 32 gramos por fruta. AlbiÓN es un cultivar que mezcla las cualidades buenas de Diamante y las de Aroma (cultivares de fresa). Es de muy fácil recolección y resiste más en la pos-cosecha que estos dos, tiene mejor sabor y aspecto.

Plagas y enfermedades

Tiene alta resistencia a condiciones meteorológicas adversas (Eurosemillas, 2013). Es resistente a *Phytophthora sp*, *Verticillium sp*, *Colletotrichum sp*, susceptible a ácaros en el fruto (Angulo, 2009).

Eurosemillas 2013; Reyes y Zschau (2012), indican que Albión es muy resistente a Anthracnosis, Verticillium, Phytophthora y al Oidium. También es más resistente a Aromas en araña roja.

Reyes y Zschau (2012), describe una planta de tamaño intermedio, de lento crecimiento.

Comenta que los frutos acumulan gran cantidad de azúcar (10-14°Brix) y son muy firmes, con excelente vida post cosecha. Es un cultivar sembrada en Chile desde la campaña 2008-2009. Recomienda una densidad de plantación de 62,000 plantas/hectárea y ha mostrado un potencial de rendimiento de 1,200gr/ planta (74 toneladas/ hectárea).

Tabla 4. Clasificación de características de los cuatro cultivares.

	CAMINO REAL	SABRINA	CRISTAL	ALBIÓN
Fotoperiodo	Corto	Corto	Neutro	Neutro
Procedencia	U. California	PLANASA	PLANASA	U. California
País	USA	España	España	USA
Año	1998	2010	2007	2004
Producción	3 a 4 libras/planta en 18 meses.	-	-	3 a 4 libras/planta en 18 meses.
Manejo	Sembrar a 30-35cm entre plantas.	-	Poda de la primeras flores	Sembrar a 40-50cm entre plantas. Fácil de cosechar.
Fruto				Fruto color rojo fuerte, grande, cónico,
Resistencia	Arañita roja	-	-	Al manipuleo, Condiciones meteorológicas.
Tolerante	Phytophthora sp., Colletotrichum sp., Verticillium sp., Antracnosis, Xanthomonas. y a las manchas comunes de la hoja.	Oidium y Botrytis. No presenta problemas radiculares.	-	-
Suceptible	Botrytis sp	-	-	Phytophthora sp., Verticillium sp., Colletotrichum sp. y Xantomonas sp

2.3. MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO*

La micropropagación es el conjunto de técnicas y métodos de cultivos de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades y utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por ingeniería genética, mutagénesis o mejoramiento genético. Se utiliza también la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente por métodos convencionales.

En la propagación a partir de un fragmento (explante) de una planta seleccionada (llamada planta madre), se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* con las yemas vegetativos de las plantas. Los frascos que contienen las plantas, se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21° y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Mejia, 1994).

2.3.1. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Según Castilla (2004) menciona que dentro del proceso de micropropagación se puede diferenciar varias fases o etapas:

La etapa 0: Etapa preparativa

La etapa 1: Establecimiento del explante.

La etapa 2: Multiplicación y elongación de brotes.

La etapa 4: Enraizamiento *in vitro*.

La etapa 5: Aclimatación del material obtenido *in vitro*.

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro*; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes a este proceso de propagación.

A. LA SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE (*Fragaria x ananassa* Duch.)

La fresa es un vegetal que puede vivir por mucho tiempo; sin embargo, se mantiene en producción económicamente rentable, durante los primeros dos años. En plantaciones de mayor edad, las plantas se muestran débiles, con bajo rendimiento y frutos de menor calidad, debido a una mayor incidencia de plagas y enfermedades (Agrocadena de fresa, 2007).

Por ser una planta híbrida, no se utilizan sus semillas para propagarla. Su sistema de crecimiento y formación de nuevas coronas y estolones permite una propagación vegetativa rápida y segura. (Agrocadena de fresa, 2007).

Esta planta normalmente se propaga por estolones, obtenidos de plantas madres que han estado sometidas a largos períodos de frigoconservación, característica que estimula un gran crecimiento vegetativo cuando son llevadas al campo (Agrocadena de fresa, 2007).

Se dice que la adecuación de nuevas tecnologías para el cultivo de la fresa, presenta inconvenientes por su falta de difusión y uso. La dificultad que afrontan los trabajos de mejoramiento convencional en esta especie, son básicamente la lentitud y los altos costos, ya que se requieren entre 10 a 15 años para la creación de un nuevo cultivar. Una alternativa de solución a estas limitaciones, son las técnicas de cultivo *in vitro*, que permiten la propagación clonal rápida de un gran número de plantas. De aquí que muchos investigadores se han dedicado a la implementación de las mismas, en vistas a mejorar el cultivo de la fresa (Valderrama *et al.* 2008).

Para el caso de obtener plantas saneadas, libre de virus es recomendable que para el establecimiento se elija el meristemo apical de guías terminales del futuro estolón. Se cree que están algunas libre de patógenos (virus), por factores como alta actividad metabólica, carencia de tejido vascular, alta concentración de auxinas. El tamaño también es importante. A menor tamaño menor posibilidad de contener virus, pero el crecimiento es más lento. Se recomienda de 0.4 mm a 0.8 mm de tamaño con el que se garantiza porcentaje de plantas sanas (Agrocadena de fresa, 2007).

B. DESINFECCIÓN

El explante puede ser un fragmento de cualquier parte de la planta y para cada uno existe un determinado tratamiento de desinfección. Una vez elegida y acondicionada la planta madre,

se extraen los explantes, que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Previo a la extracción del explante elegido se hará una desinfección del mismo para eliminar los contaminantes (Boxus *et al.*, 1977)

C. INTRODUCCIÓN

Luego de la desinfección del explante (coronas). Kajic y Cvjetkovic (1989) reportan éxito en la erradicación de ciertos virus utilizando sólo el cultivo de meristemas.

Las plantas donadoras deben ser vigorosas. Se seleccionan estolones jóvenes en plena etapa de crecimiento vegetativo, donde la planta utilizada tenga un diámetro de corona de 0.5cm al menos y con las raíces primarias apenas en etapa de formación, seccionando el meristemo de la yema apical o axilar (Boxus *et al.*, 1977; Boxus 1981), y de no más de 0.3mm de longitud para mayores probabilidades de estar libre de virus (Maas, 1998).

Son introducidas en un recipiente, conteniendo un medio de cultivo estéril (macronutrientes, micronutrientes y vitaminas), seguidamente trasladadas a un cuarto de incubación, en donde la influencia de la temperatura es constante de 25°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz, con una humedad relativa de 70-80% (Boccon, 1989; Dávalos *et al.*, 2011).

D. MULTIPLICACIÓN

Una vez introducido y desarrollado el explante, pasa a una etapa de multiplicación de brotes, se espera que los explantes que sobrevivieron la etapa anterior originen nuevos brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrolla luego de ser sub-cultivados en un nuevo medio mediante divisiones y realizan en la cámara de flujo laminar o en un ambiente aislado que permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma se obtiene un determinado número de brotes en cada repique o división de explante, que se manifiesta en una tasa de multiplicación. La tasa de multiplicación que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de micro plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Boxus *et al.*, 1977; Boxus 1981).

E. ENRAIZAMIENTO

Posteriormente a la etapa de enraizamiento de los explante desarrollados, se utilizan principalmente brotes de un tamaño aproximado de 2cm. Los brotes obtenidos durante de la

fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Castilla, 2004)

2.3.2. VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Autores como Murashige (1978), Caldaza (1980), Hartman (1995) entre otros mencionan las principales ventajas de la micropropagación.

- Plantaciones genéticamente uniformes, conservación del cultivar de plantas que se propaga.
- Incremento acelerado del número de plantas derivado del genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajas costos y en tiempos económicamente costeados.
- Mayor control sobre sanidad del material *in vitro* a otros lugares, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente a un cultivar de la cual existen pocos individuos.

2.3.3. PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO *IN VITRO*

A. CONTAMINACIÓN

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo (Debergh & Zimmerman, 1991).

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistemáticos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando

desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto el material, puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistemáticos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Casells, 1991).

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Roca & Mroginski, 1991).

B. OXIDACIÓN O FENOLIZACIÓN

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro* (como la composición del medio). Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura (Debergh & Read, 1991).

En general, los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación tienen carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar eventos morfogénicos y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, puesto que se convierten en potentes oxidantes (Dixon & Paiva, 1995).

Por lo dicho, en el cultivo de tejidos se hace necesario controlar el efecto de la oxidación. Una forma mediante la cual se puede realizar esto es evitando el estrés que estimula la biosíntesis de compuestos fenólicos, con el fin de impedir que estas sustancias aparezcan en los cultivos y produzcan efectos tóxicos e inhiban el crecimiento (Debergh & Read, 1991).

Según Debergh & Zimmerman (1991); Thomas & Ravindra (1997) y Toledo *et al.* (1998), Los explantes frecuentemente se tornan marrones o negruzcos poco después del aislamiento y cuando esto ocurre, se inhibe el crecimiento y el tejido generalmente muere, los tejidos jóvenes son menos susceptibles al oscurecimiento que los más maduros. La síntesis de fenoles se puede evitar.

a. Prevención

El oscurecimiento de los tejidos, especialmente de los explantes recientemente aislados y el medio puede prevenirse generalmente siguiendo estos pasos

- Removiendo los compuestos fenólicos producidos por dispersión, adsorción o lavado:
 - Adsorción mediante carbón activado (CA).
 - Adsorción por polyvinilpirolidona (PVP).
- Modificando el potencial redox (disminuyendo los agentes redox), o la disponibilidad de oxígeno.
 - Agentes reductores: ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína HCL, ditriotreitól, glutatión y mercaptoetanol.
 - Menor disponibilidad de oxígeno: medios líquidos estacionarios.
- Inactivando las enzimas fenolasas (quelatantes).
 - Agentes quelantes: NaFeEDTA, EDTA, dietilditiocarbamato, dimetilditiocarbamato.
- Reduciendo la actividad fenolasa y la disponibilidad del sustrato.
 - Bajo pH
 - Oscuridad

La incubación a temperaturas más bajas, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar estas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima (Debergh & Zimmerman, 1991; Thomas & Ravindra, 1997; Toledo *et al.* 1998).

La adición de sustancias antioxidantes, es otro de los métodos que suelen aplicarse, aunque es necesario tener mucho cuidado, ya que se pueden convertir en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles (Debergh & Read, 1991).

C. VITRIFICACIÓN O HIPERHIDRATACIÓN

La vitrificación o hiperhidratación, es un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados *in vitro*, especialmente en las hojas, que incide sobre dos de los procesos más importantes que realizan estas estructuras: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso. En menor medida los tallos y raíces también resultan afectados por estas anomalías anatómicas, que en

ciertos casos van a impedir el establecimiento de las plantas micropropagadas en condiciones *ex vitro* (Ziv, 1991; Kevers *et al.*, 2004; Saher *et al.*, 2004).

a. Posibles causas de la hiperhidratación

Los estudios realizados sobre la hiperhidratación, señalan que los defectos anatómicos y fisiológicos observados, son el resultado de varias alteraciones en determinadas rutas metabólicas. Así los cambios en la síntesis de proteínas, inciden en varias enzimas implicadas en la fotosíntesis (Rubisco), en la síntesis de celulosa y lignina (fenilalanina amonioliasa, glucano sintetasa), y en procesos asociados con la producción de etileno (peroxidasas) (Saher *et al.*, 2004). Los niveles de proteínas de hojas hiperhidratadas son inferiores a los de las hojas normales y se han detectado una proteína de 30kD exclusiva de hojas vitrificadas y otras proteínas de 30-32 kD de tipo peroxidasa asociadas con la síntesis de lignina (Kevers *et al.*, 1984).

b. Factores que influyen en la hiperhidratación

Están ligados a las diferentes condiciones de cultivo *in vitro*, tales como: concentración de sales, el agente gelificante, elevadas dosis de reguladores de crecimiento (citoquininas, auxinas, etileno, entre otras); una baja intensidad lumínica durante la incubación; y la humedad relativa y un potencial hídrico, que según Debergh, (1987) son los factores claves para explicar estas complejas anomalías producidas *in vitro* (Majada *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2003).

c. Signos

Los primeros signos de la hiperhidratación en los explantes se manifiestan durante las primeras semanas, y se van incrementando con el tiempo de cultivo. Inicialmente parte del explante o de una o de dos hojas, generalmente las que están en contacto con el medio. El crecimiento de los brotes es más rápido de lo normal y puede mostrar tamaños anormales en la formación de brotes axilares. Las hojas presentan una apariencia frágil y translúcida y su longitud es menor comparada con la de las hojas normales (Ziv, 1991; Kevers *et al.*, 2004; Saher *et al.*, 2004).

Las características morfológicas y anatómicas de las hojas hiperhidratadas incluyen cambios estructurales y químicos. La capa cuticular y la epidermis se vuelven más delgadas, los estomas son anormales, aumenta la cantidad de tejido parenquimático, y se presentan células del mesófilo con pocos cloroplastos mal desarrollados y con cantidades bajas de clorofila y

proteínas. Todas estas anomalías interfieren en la aclimatación y el trasplante, causando supervivencias bajas e incluso la muerte (Debergh *et al.*, 1992; Olmos & Hallin, 1998; Majada *et al.*, 2002).

2.3.4. FITOHORMONAS

La composición del medio, especialmente los reguladores del crecimiento (como las fitohormonas) y las concentraciones utilizadas, afecta directamente el crecimiento y el tiempo de propagación de los explantes *in vitro* (Khan *et al.* 2015). Además, en las plantas, los reguladores de crecimiento tienen efectos pleiotrópicos y pequeños cambios en las concentraciones resultan en cambios en la activación de genes que pueden dificultar o iniciar procesos metabólicos esenciales dentro de la célula (House-keeping-genes). Así pues, una concentración óptima en los niveles de los reguladores de crecimiento es necesario para el funcionamiento celular normal.

Del mismo modo, la optimización en las diferentes concentraciones en el medio es un requisito previo de la propagación *in vitro* (Thomas, 2000) ya que este balance hormonal determina ciertas vías de desarrollo en una célula vegetal (Khan *et al.* 2015).

A. AUXINAS

Es una fitohormona que controla la elongación, entre otros procesos. En cultivo de tejidos, las auxinas se han utilizado para inducir la división celular y la cito diferenciación. En general, las auxinas en bajas concentraciones favorecen el enraizamiento, mientras que en las altas concentraciones induce la formación de callos. En la presente investigación se hará uso del ácido indol butírico (IBA)

B. GIBERELINAS

Según estudios, estimulan la elongación de los entrenudos, el crecimiento de los meristemas en algunas especies y principalmente para generar un desarrollo normal de las plántulas de embriones adventicias *in vitro* (Bhojwani, 2013). AG3

C. CITOQUININAS

La incorporación de estos compuestos en medios de cultivo es principalmente para activar la división celular, y para inducir la diferenciación de brotes adventicios en callos y órganos, es la proliferación de brotes de las yemas axilares al reprimir la dominancia apical (Bhojwani, 2013). En la presente investigación se hará uso del bencil Amino Purina (BAP).

2.4. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE FRESA

La técnica convencional de mejoramiento de cultivos es un proceso largo. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han sido desarrolladas como una herramienta nueva, rápida y potente para la mejora de los cultivos (Carlson, 1975). El método de micropropagación de fresa fue descrito hace unos treinta años (Boxus, 1999).

Muchas experiencias señalan que las plantas de fresa procedentes del cultivo de tejidos producen mayor número de estolones que las plantas propagadas por métodos tradicionales, conjuntamente son más uniformes y sobreviven más en el campo, debido a que poseen un excelente vigor y una óptima producción de frutos (Swartz, H. J. y Lindstrom, J.T. 1986).

A pesar de las bondades que le brinda la propagación *in vitro* al cultivo, para su empleo se debe tener en cuenta dos factores muy importantes; la alta pubescencia de los tejidos y el contacto directo con el suelo, que inducen una gran contaminación de los explantes, especialmente cuando estos son extraídos de plantas provenientes del campo (Villalobos, V. M. y Pérez, M. G. 1979). Estos contaminantes pueden ocasionar la muerte de los tejidos, competir con ellos o modificar el medio de cultivo (Mroginski, L. A. y Roca, W. M. 1991).

Además, según Swartz, H. J. y Lindstrom, J.T. 1986, mencionan que frecuentemente ocurre el ennegrecimiento del tejido, con posterior necrosis del explante. Para evitarlo se sugiere lo siguiente:

- Disminuir la intensidad de la luz,
- Agregar antioxidantes en el medio,
- Sub cultivar con frecuencia,
- Incrementar las sales de calcio,
- Reducir el nivel de nitrato en el medio,
- Sumergir el material que se va a micropropagar en medio líquido por un día.

2.4.1. ORGANOGÉNESIS

Barona y Sancho (1998), mencionan que el tallo o corona, es un tallo modificado llamado corona central. Maroto y López (1988), menciona que el tallo es un eje corto de forma cónica llamado “corona”, con numerosas escamas foliares.

Reyes y Zschau (2012), describen que es corto de 2 a 3cm y está cubierta de estípulas. Desde la corona se desarrollan las hojas, flores, estolones y raíces. Las yemas de acuerdo a las condiciones ambientales y nutricionales pueden ser vegetativa o reproductiva. Después de

la primera estación de crecimiento la corona comienza a lignificar algunos elementos vasculares y comienza un crecimiento de coronas laterales. En toda plantación es importante que se desarrolle este crecimiento coronas laterales y esto depende de la fertilización, de un riego adecuado y la poda de los estolones (Figura)

El meristemo, es una estructura dinámica en la que continuamente se está produciendo crecimiento y división celular (Azcon, Bieto y Talón, 2000).

Los meristemos se pueden clasificar por su origen, posición y la estructura que originan. Los meristemos apicales (o primarios) del tallo y de la raíz conducen al desarrollo del cuerpo primario (raíces, tallos y hojas) de la planta y se forman durante la embriogénesis (Randall y Hake, 1997). Los meristemos axilares (o secundarios) son similares a los primarios en estructura y desarrollo, aunque dan origen a raíces o tallos secundarios (Margara, 1988; Kerstetter y Hake 1997; Randal y Hake, 1997).

El meristemo apical se divide en tres regiones o zonas:

Zona central (ZC): Ubicada en el extremo distal, presenta vacuoladas y nucleos prominentes, ocurren menos divisiones celulares que en el resto.

Zona periférica (ZP): Rodea a la zona central, presenta índices más elevados de división celular, su función principal es la formación e órganos laterales.

Zona medular (ZM): Situada en la base del meristemo, las células que origina la parte central del tallo y los tejidos vasculares.

Durante el desarrollo vegetativo se conserva la organización el meristemo, pero la posición y el destino de las células derivadas del mismo cambian con el tiempo. Este proceso está regulado por la información de la posición y por la regulación génica. (Azcon, Bieto y Talón, 2000).

La ausencia de virus en el meristemo por la inexistencia del tejido vascular (tejido a través del cual se movilizan los virus) en directa relación con el meristemo. Incluso si el virus fue capaz de invadir o moverse de célula a célula, la velocidad de avance de los virus sería inferior a la de crecimiento del meristemo, lo cual impediría su invasión. (Azcón; Bieto & Peña, 2000)

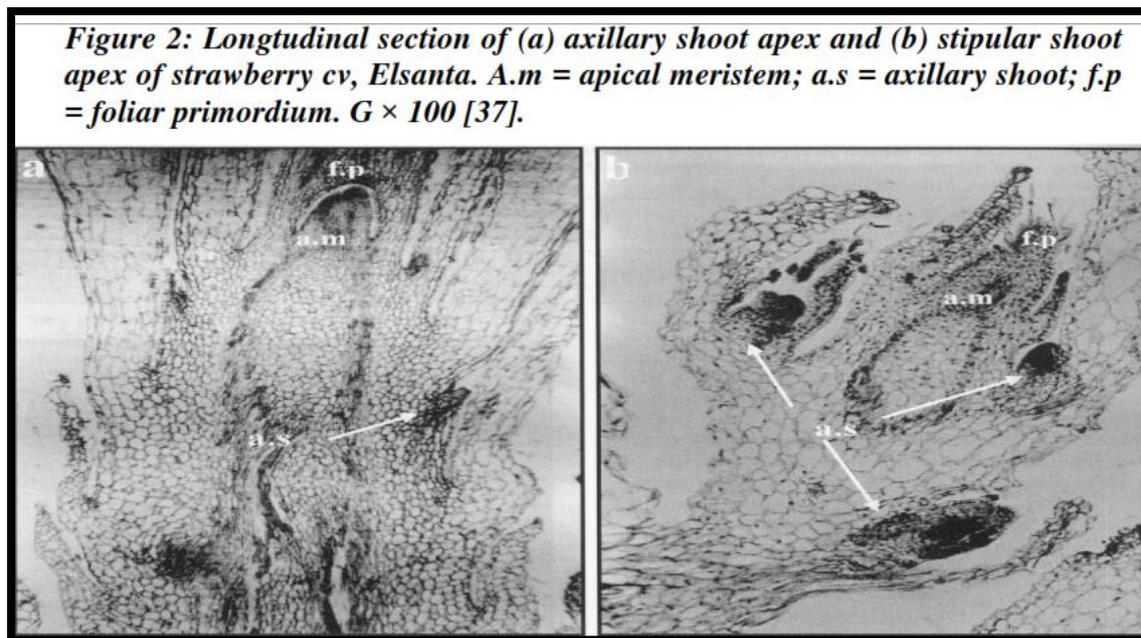


Figura 6: Sección longitudinal de (a) Brote axilar; (b) Brote apical; de fresa cultivar Elsanta.

FUENTE: Jemmali, A. 2002

2.4.2. ANTECEDENTES DE LA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Fragaria x ananassa* Duch.

Según Sánchez, M. C. y Salaverría, J. L. 2004, apreciaron que con la inmersión de los explantes en hipoclorito de sodio 20 % en 20 minutos se controló la contaminación por hongos y bacterias y con antioxidantes cisteína 4 g/L en presencia de luz se controla la contaminación y la oxidación fenólica. La cisteína, de acuerdo con George y Sherrington (1984), no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma.

Otro factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido. Villalobos y Pérez (1979) señalaron que, si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol 70% durante 30s para romper la tensión superficial y hacer la superficie más accesible a la acción de los agentes desinfectantes. Otros autores han utilizado exitosamente el cloro en cultivos en los que la contaminación y la fenolización del tejido dificultan el establecimiento de los explantes (Romero, 2000a; Romero, 2000b).

En cultivares Aiko y fresno, la contaminación de los explantes por hongos y bacterias y por la gran pubescencia del tejido de la fresa, fue controlada efectivamente con la inmersión de los explantes en una solución de cloro 20% durante 20 min. Concentraciones más altas o periodos más prolongados causan necrosis en el tejido (Sánchez y Salaverría, 2004).

Para el éxito en la introducción de explantes de la var. Dulce Charly, los meristemos se cultivaron en medio MS libre de hormonas durante 4 semanas, los meristemas extirpados se convierten en una roseta de hojas volantes (Emad Y. Youssief, 2009).

La multiplicación de explante se da entre las 3 - 4 semanas después de esta escisión, traslado a medio MS+1 mg / l de BA, dos o tres nuevos brotes se aparecerá en la base de los peciolo de las hojas más viejas (dentro de 3 - 4 semanas después de su transferencia). Después de 6 -8 semanas, las yemas axilares invaden la base de los peciolo de las más antiguas hojas (Emad Y. Youssief, 2009).

El enraizamiento se obtuvo la respuesta más alta cuando la transferencia de los brotes al medio MS de fuerza completa y a medio MS suplementado con carbón activado (0,5 g / l), todos los dos medios de comunicación sin hormona (Emad Y. Youssief, 2009).

Se investigó que entre los cultivares de Chandler, Oso Grande y Ofra, la regeneración se registra después de 7 semanas, la proliferación después de 7 semanas y el enraizamiento después de 2 semanas. En los tres cultivares se registró la máxima regeneración en medio MS+4mg/L BAP, así también el máximo número de brotes por explante. Entre los cultivares se observó el número medio máximo de brotes múltiples ($13,8 \pm 3,6$) y el rango de brotes por explante (4-36) en el cultivar Ofra. Se observó un máximo enraizamiento con 1/2MS+ 1mg/L IBA. (Lal, M. *et al*, 2003).

La proliferación y desarrollo de brotes se dieron lugar al primer sub cultivo desarrollándose por 3 semanas, el segundo sub cultivo fue por 5 semanas. Luego se transfirió al mejor medio para la posterior inducción de brotes múltiples. El máximo número de brotes se obtuvo con MS+0.5mg/L BAP, el más alto número promedio de brotes fue de 7. El mejor parámetro estudiado de enraizamiento se obtuvo con 1/2MS+0.5mg/L IBA, el mayor número de raíces (6) con el menor tiempo (8-10 días) con una longitud promedio de 3.05cm. (Ashrafuzzaman *et al*. 2013)

Maliaricikova y Mokra (1986) observó la formación de raíces dentro de 3 a 4 semanas después de la inoculación de las plántulas en los medios de enraizamiento. Asahira y Kano (1977) observaron raíces óptimas a las 2 semanas.

A continuación en la Tabla 5 se muestra el medio basal de Murashige y Skoog (MS).

Tabla 5. Medio basal Murashige y Skoog (1962).

Solución	Reactivo -Fórmula	Concentración (mg)
Macronutrientes	Nitrato de amonio – NHNO_3	16500
	Nitrato de potasio – KNO_3	19000
	Cloruro de calcio dihidratado – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4400
	Sulfato de magnesio heptahidratado – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3700
	Fosfato de potasio monobásico – KH_2PO_4	1700
Micronutrientes	Yoduro de potasio – KI	8.3
	Ácido trioxobórico – H_3BO	62
	Sulfato de manganeso monohidratado – $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	223
	Sulfato de zinc heptahidratado – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	86
	Molibdato de sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5
	Sulfato de cobre pentahidratado – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
	Cloruro de cobalto hexahidratado – $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25
Quelatos de Hierro	Sulfato ferroso heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278
	Etilen diamino tetra acetato- Na_2EDTA	373
Vitaminas y aminoácidos	My-inositol	1
	Ac. Nicótico	5
	Piridoxina	5
	Tiamina	1
	Glicina	20

FUENTE: Murashige y Skoog (1962).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto de Biotecnología – IBT, de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.1.2. LOS CULTIVARES DE FRESA

Se estudiaron las siguientes (Figura 7):

- **CAMINO REAL:** De USA, 1998; de día corto, y es tardía; produce 1,8kg de fruto por planta; el fruto es resistente a daños por lluvia.
- **SABRINA:** De España, 2010; de día corto, es precoz, frutos de forma cónica alargada, de calibre 25g /fruto.
- **CRISTAL:** De España, 2007; de día neutro, muy precoz, produce 1kg de fruto/planta; se adapta a climas subtropicales y terrenos difíciles.
- **ALBIÓN:** De USA. 2004; de fruto grande, excelente sabor, resiste en la postcosecha. De calibre 32g/ fruto.

3.1.3. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Estufa (Figura 8)
- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Balanza analítica cámara de flujo laminar
- Refrigeradora
- Horno microondas
- Estereoscopio
- pH-metro

3.1.4. AMBIENTES

- Sala de incubación
- Sala de siembra
- Sala de preparación de medios
- Invernadero

3.1.5. MATERIAL, EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE INVERNADERO

- Turba
- Perlita
- Bolsas plástico 10x20
- Etiquetas
- Mochila agrícola

3.1.6. MATERIAL E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- Vasos precipitados de 500ml
- Pipetas 5 y 10ml
- Jarra transparente de 2 litros
- Varillas de vidrio
- Varillas de metal
- Cuchara
- Tubos de ensayo
- Frascos ámbar
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Etiquetas
- Lápiz
- Guantes de goma
- Gorro
- Tapabocas
- Placas Petri
- Mechero de alcohol
- Pinzas

- Mangos de bisturí
- Hoja de bisturí
- Papel bond
- Bolsas plásticas
- Cintas selladoras
- Termómetro de máximas y mínimas.

3.1.6. MATERIALES DE DESINFECCIÓN

- Hipoclorito de sodio
- Alcohol de 96°C
- Tween-80
- Detergente
- Benlate (Benomil)
- Phytol
- Acaricida
- Agua destilada

3.1.7. REACTIVOS

- Sales Murshine & Skoog (1978)
- Vitaminas MS
- Myo-inositol
- Sacarosa/ azúcar
- PPM
- BAP (bencil amino purina)
- IBA
- AG3
- Carbón activado
- Antibiótico
- Agua destilada

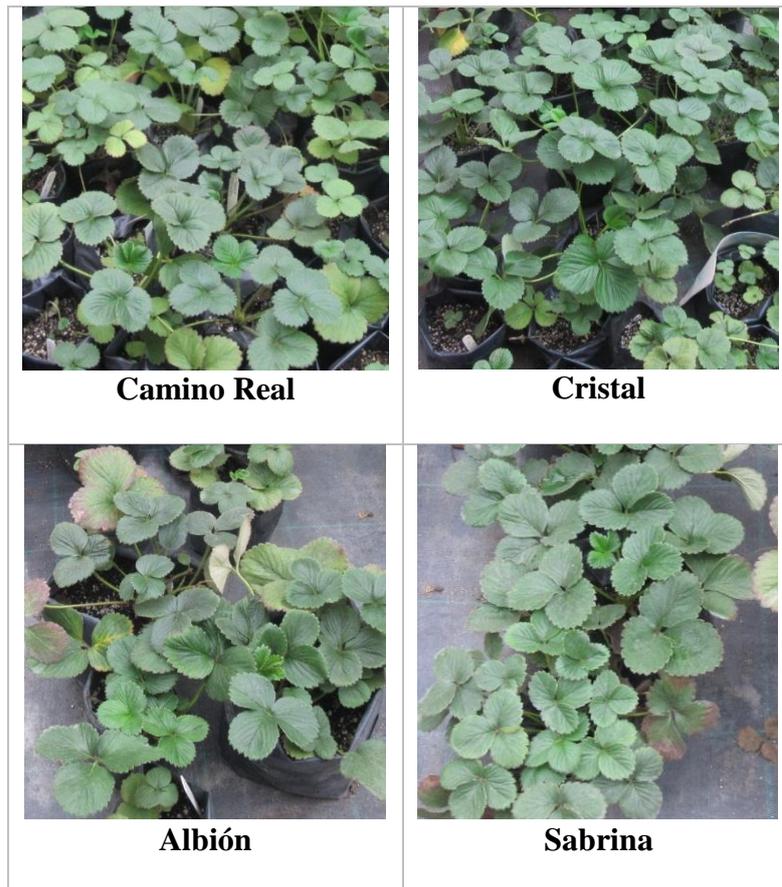


Figura 7: Cultivares de fresa en invernadero.



Figura 8: Estufa para esterilizar y para obtener peso seco de material vegetal.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se aplicaron para los experimentos, son los que se muestra en las Tablas 10, 11 y 12. Los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos de esos medios de cultivo se muestran en la Tabla 5.

Después de ajustar el pH a $5,7 \pm 0,1$ y añadiendo agar 7.2g/L, y 3g/L en el caso de Phytigel, en los medios preparados se dispensó 15 ml por frasco de vidrio de 200 ml. Si el medio fue líquido ya no se añadió agar ni Phytigel, inmediatamente después que se ajustó el pH, se dispensó 5ml por tubo de vidrio de 10ml. Se utilizó tapas de papel aluminio para cubrir el frasco. Los medios preparados se introdujeron en la autoclave y se sometieron a 121 °C bajo 1,5 bar durante 25 minutos. Así mismo para esterilizar los materiales y reactivos que se utiliza en la campana de cámara de flujo laminar se sometieron a la misma temperatura, presión y tiempo de los medios de cultivo.

3.2.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Los cultivares de los experimentos de propagación *in vitro* se incubaron en las siguientes condiciones (Ashrafuzzaman *et al.*, 2013):

- **Temperatura:** De 24°C día/noche, horarios controlados por el aire acondicionado (Moradi *et al.*, 2011).
- **Fotoperiodo:** A 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Bhatt *et al.*, 2012).
- **Intensidad de iluminación:** 3000 lux con focos fluorescente (120 cm - 40 W).

3.2.3. ETAPAS DE ESTUDIO

Las etapas de micropropagación son 5, de las cuales la etapa 0 y 1 se unió para ser la fase de desinfección.

- **Etapa 0. Invernadero**
- **Etapa 1. Desinfección**
- **Etapa 2. Iniciación**
- **Etapa 3. Multiplicación**
- **Etapa 4. Enraizamiento**

A. ETAPA DE DESINFECCIÓN

Las plantas de fresa mantenidas en invernadero, con o sin aplicación de pesticidas (pre-tratamiento) de donde se utilizaron las coronas y las guías de los estolones.

Lavado con agua de caño, luego se pasó por agua destilada, detergente y Benomil (Figura 9). Luego se llevó a la sala de siembra, dentro de la cámara de flujo laminar, se sumergió en alcohol, después en hipoclorito de sodio y Tween 20, la determinación del tiempo y reactivo se aplicó según el tratamiento destinado. Terminado la desinfección se enjuagó con agua destilada esterilizada.

a. Pre-tratamiento (en invernadero)

Consistió en la aplicación de pesticidas durante 5 semanas (Tabla 6 y Figura 9).

Tabla 6. Programación de aplicación.

Semana	Lunes	Miércoles	Jueves
1	- Bactericida - Prometex Cu 6.75ml/3L	- Nutrición MS/3L - Trampas pegantes amarillas	- Fungicida Phyton 7.5ml/3L
2	- Bactericida - Prometex Cu 6.75ml/3L	-Nutrición MS/ 3L	- Fungicida Phyton 7.5ml/3L
3	- Bactericida - Prometex Cu 6.75ml/3L	-Nutrición A ¹ Y B ² solución de 3L	- Fungicida Phyton 7.5ml/3L
4	-Acaricida 4.5ml/3L	-Nutrición A y B solución de 3L	
5	-Acaricida 4.5ml/3L + Bactericida Prometex Cu 6ml/3L	- Nutrientes A y B solución de 3L	

¹. A: Macronutrientes; ². B: Micronutrientes



Figura 9: Pesticidas para la aplicación de plantas de fresa en el invernadero.

A: Acaricida; B: Fungicida.

b. Fuera de la cámara

Tabla 7. Procedimiento de la etapa de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar.

Lugar	Procedimiento – DESINFECCIÓN
Invernadero	Se cortó las raíces al ras de la corona y cortar los tallos dejando 2 cm. Se lavó con agua de caño retirando la tierra. Se introdujo las coronas lavadas en un frasco y tapar (Figura 10).
Laboratorio (Fuera de la cámara)	Se usó un frasco para lavar las coronas, en una solución de agua destilada con detergente por 1 minuto, luego sin enjuagar se sumergió en una concentración de Benomil 2g/100ml de agua destilada por 20 minutos, después enjuagar tres veces con agua destilada, se colocó en un frasco estéril y se llevó a cámara de flujo laminar.

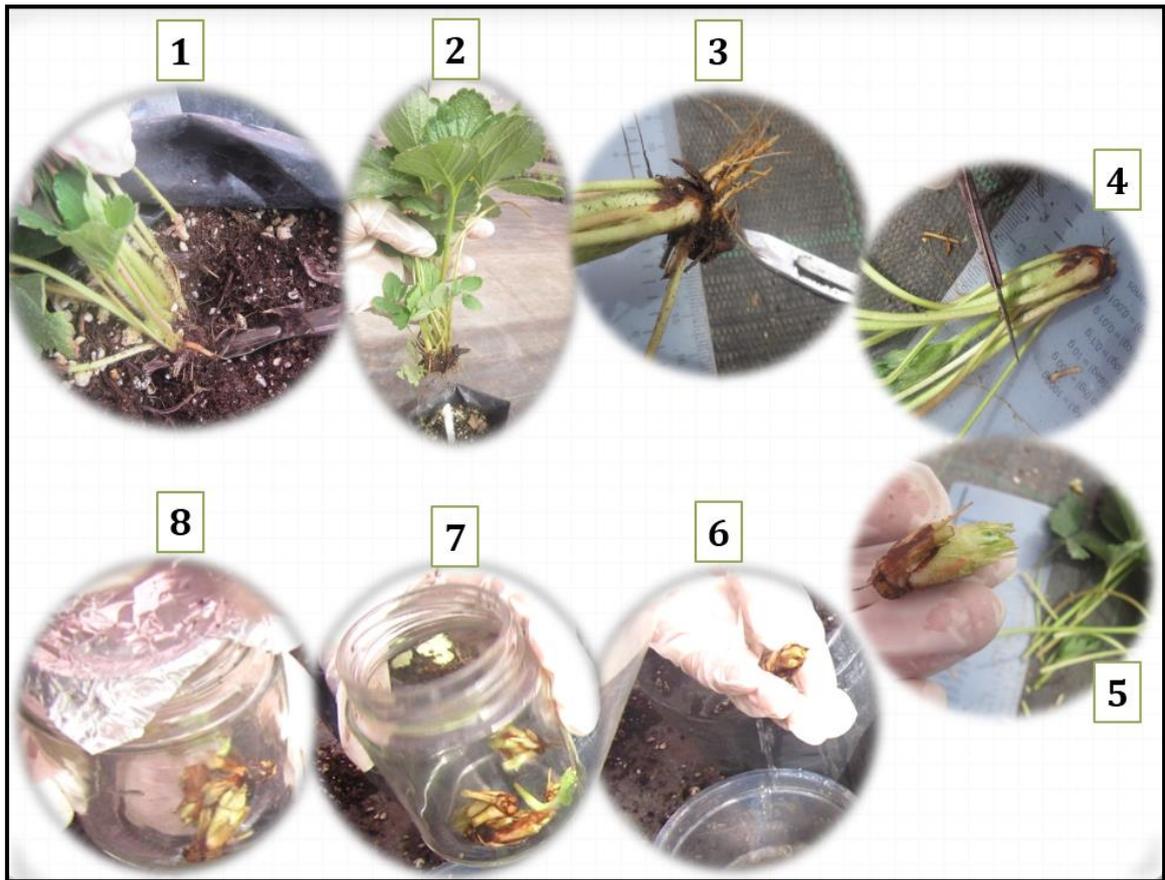


Figura 10: Procedimiento de extracción de coronas de fresa del invernadero.

c. Dentro de la cámara de flujo laminar

En condiciones de asepsia, se hizo los siguientes pasos (Tabla 8 y Figura 11) dependiendo del tratamiento de desinfección.

Tabla 8. Procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.

Trat.	Procedimiento – DESINFECCIÓN
D1	<p>Se introdujo el explante un frasco estéril y se sumergió con lejía al 10% estéril por 20 minutos. Terminado el tiempo se retiró la solución y se enjuagó con agua destilada estéril. Se procedió a rosear con alcohol 70° por 2 segundos, se enjuagó inmediatamente con agua destilada estéril.</p> <p style="text-align: center;">= Lejía 10% por 20 minutos + Alcohol 70° x 2”</p>
D2	<p>Se introdujo el explante un frasco estéril y se sumergió con lejía al 10% estéril con una gota de Tween 20 por 20 minutos. Terminado el tiempo se retiró la solución y se enjuagó con agua destilada estéril. Se procedió a rosear con alcohol 70° por 2 segundos, se enjuagó inmediatamente con agua destilada estéril.</p> <p style="text-align: center;">= (Lejia 10% + Tween 20)x20 minutos + Alcohol 70° x 2”</p>
D3	<p>Se introdujo el explante un frasco estéril y se sumergió con lejía al 20% estéril por 20 minutos. Terminado el tiempo se retiró la solución y se enjuagó con agua destilada estéril. Se procedió a rosear con alcohol 70° por 2 segundos, se enjuagó inmediatamente con agua destilada estéril.</p> <p style="text-align: center;">= Lejia 20% por 20 minutos + Alcohol 70° x 2”</p>
D4	<p>Se introdujo el explante un frasco estéril y se sumergió con lejía al 20% estéril con una gota de Tween 20 por 20 minutos (Figura 12). Terminado el tiempo se retiró la solución y se enjuagó con agua destilada estéril. Se procedió a rosear con alcohol 70° por 2 segundos, se enjuagó inmediatamente con agua destilada estéril.</p> <p style="text-align: center;">= (Lejia 20% + Tween20)x 20 minutos + Alcohol 70° x 2”</p>
D5	<p>Requirió pre-tratamiento. En un frasco esterilizado se vertió lejía al 20% estéril con 2 gotas de Tween 20 sumergirlo, se agitó y sumergió las coronas por 20 minutos, se tapó el frasco y se movió la solución a 125 rpm. Terminado el tiempo se retiró la solución y se enjuagó con agua destilada estéril. Se procedió a sumergir con alcohol 70° por 2 segundos, se enjuagó inmediatamente con agua destilada estéril. Finalmente se puso el explante encima de papel esterilizado, quitado la mayor de humedad posible. Se dejó secar por 3min.</p> <p style="text-align: center;">= (Lejia 20% + Tween20)x 20 minutos+ Alcohol 70° x 2”+ secar x 3’</p>

Cada tratamiento de desinfección se procedió a introducir en un MS sin hormonas líquido con puente de papel filtro (Tabla 9).

Tabla 9. Descripción de tratamientos de desinfección.

Trat.	Pre tratamiento	Lejía %	Tween 20	Tiempo (min)	OH	MS Líquido . Pf	MS+PP M Líquido. Pf	MS con agar
D1	No	10	No	20	70°	Si	No	Si
D2	No	10	Si	20	70°	Si	No	Si
D3	No	20	No	20	70°	Si	No	Si
D4	No	20	Si	20	70°	Si	No	Si
D5	Si	20	Si	20	70°	No	Si	No

OH: Alcohol; Pf: papel filtro



Figura 11: Materiales para la desinfección dentro de cámara de flujo laminar.



Figura 12: Desinfección en cámara. (1) Coronas en medio de lejía más Tween; (2) Enjuague con agua destilada esterilizada; (3) Enjuague con alcohol 70°.

Se realizó la disección de la yema y del meristemo con un microscopio estereoscópico (Figura 13), y se utilizaron pinzas y bisturís, en una placa Petri esterilizada se cambió de bisturí 2 veces, se sumergió en alcohol y mechero. Al obtener el meristemo, este se cortó con un bisturí y con cuidado se colocó en un tubo de prueba con medio líquido sobre el puente de papel filtro. Se llevó a la sala de incubación durante 6 semanas



Figura 13. Estereoscopio para la introducción de meristemos.

FUENTE: SUNEDU, 2017

B. ETAPA DE INICIO

Culminado la etapa de desinfección en el cual el meristemo se desarrolló en un medio líquido sin hormonas con puente de papel filtro durante 6 semanas, se llevó a cabo la transferencia de meristemos diferenciados a la etapa de iniciación, medios de cultivo, según el tratamiento de experimento y nuevamente se llevó a la sala de incubación donde estuvo 4 semanas, hasta diferenciarse.

La descripción de cada tratamiento de inicio se explica en la siguiente Tabla 10. Cada tratamiento contiene 2mg/L de PPM.

Tabla 10. Descripción de tratamientos de medios de inicio.

Tratamientos	Procedimiento - INICIO
T1	Testigo 1: MS sin hormonas. Testigo 2: MS+ PPM. Sin hormonas. Testigo 3: MS I3+ Antibióticos. Testigo 4: MS+ PPM + 7.2g/L Agar
T2	MS + 1mg/L IBA + 3g/L Phytigel
T3	MS + 2mg/L IBA + 2mg/L BAP + 1g/L Carbón activado + 7g/L Agar.
T4	MS + 6mg/L BAP + 7.2g/L Agar
T5	MS + 4mg/L BAP + 0.5g/ Carbón activado + 7.2g/L Agar
T6	MS + 0.5mg/L IBA + 0.5mg/L BAP + 3g/L Phytigel + 0.5 g/L Carbón activado

C. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

Esta fase de multiplicación se dividió en tres fases (sub cultivos). Los primeros dos sub cultivos consistieron 30 días en los diferentes tratamientos, se cortaron las raíces al ras, se cortaron las hojas sin quitar los tallos, es decir cada explante tenía alrededor de 7 tallos, para lograr la mayor cantidad de explantes. La tercera fase duró 8 semanas en la cual se instaló los explantes en los diferentes tratamientos, cortando las hojas y raíces, dejando 3 tallos sin ninguna yema visible alrededor del explante.

La descripción de cada tratamiento de multiplicación se explica en la siguiente Tabla 11. Cada tratamiento contiene 2mg/L de PPM.

Tabla 11. Descripción de tratamientos de medios de multiplicación.

Tratamientos	Procedimiento
M1	MS
M2	MS+ 1mg /L BAP
M3	MS + 1mg /L BAP + 0,5g/L carbón activado
M4	MS+ 1mg/L IBA + 1mg/L BAP + 0.1mg/L AG3
M5	MS + 4mg/L BAP + 0.5g/L Carbón activado

D. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Se dejó sin raíces y se colocó en un medio de cultivo con mayor cantidad de vitroplantas por envase. En la sala de incubación estuvo durante 3 semanas.

La descripción que contenía cada tratamiento de enraizamiento se explica en la siguiente Tabla 12 (Cada tratamiento contiene 2mg/L de PPM).

Tabla 12. Descripción de tratamientos de medios de enraizamiento.

Tratamientos	Procedimiento
R1	MS
R2	MS + 0.5 g/L carbón activado
R3	MS+ 0.5mg/L IBA + 0.5g/L carbón activado
R4	MS + 2mg/L IBA + 0.5g/L carbón activado
R5	½ MS+ 1mg/L IBA +0.5g / L carbón activado
R6	½ MS+ 2mg/L IBA + 0.5g/L Carbón activado
R7	MS+ 0.5mg/L IBA
R8	MS + 2mg/L IBA
R9	½ MS+ 1mg/L IBA
R10	½ MS+ 2mg/L IBA

3.2.4. ESTRATEGIA DE ESTUDIO

DETALLES	DESINFECCIÓN			
Introducción de yemas	D1	D2	D3	D4
Resultado	D4			
Introducción de meristemos	D5			
Aplicación en los cultivares	Camino Real	Kristal	Albi3n	Sabrina
	D5	D5	D5	D5

Figura 14: Esquema descriptivo de la investigaci3n en la etapa de desinfecci3n.

DETALLES	INICIO			
Tratamientos en el cultivar Camino Real	T1	T2	T3	T4
Resultado	T3			
Tratamientos en el cultivar Cristal	T1	T5	T3	T6
Resultado	T3			
Aplicaci3n en los cultivares	Camino Real	Kristal	Albi3n	Sabrina
	T3	T3	T3	T3

Figura 15: Esquema descriptivo de la investigaci3n en la etapa de inicio.

DETALLES	MULTIPLICACIÓN				
Tratamientos en el cultivar Camino Real	M1	M2	M3	M4	M5
1° Subcultivo		M2	M3	M4	
2° Subcultivo		M2	M3	M4	
Transferencia			M3		
3° Subcultivo en los cultivares	M1	M2	M3	M4	M5
Resultado		M2		M4	

Figura 16: Esquema descriptivo de la investigación en la etapa de multiplicación.

DETALLES	ENRAIZAMIENTO				
Tratamientos en el cultivar Camino Real	R1	R2	R3	R4	R5
	R6	R7	R8	R9	R10
Resultado			R6		

Figura 17: Esquema descriptivo de la investigación en la etapa de enraizamiento.

3.2.5. VARIABLES EVALUADOS

A. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

a. Introducción a partir de yemas

En un periodo de evaluación cada 7 días por 6 semanas, los parámetros evaluados de desinfección en este trabajo son:

- N° Yemas sobrevivientes
- N° Yemas contaminadas
- N° de días

b. Introducción a partir de meristemos

En un periodo de evaluación cada 7 días por 6 semanas, los parámetros evaluados de desinfección en este trabajo son:

- N° Meristemos sobrevivientes
- N° Meristemos contaminados
- N° Meristemos necrosados
- N° de semanas

c. Introducción en los cultivares

En un periodo de evaluación cada 7 días por 6 semanas, los parámetros evaluados de desinfección en este trabajo son:

- Cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina.
- N° Meristemos sobrevivientes
- N° Meristemos contaminados
- N° Meristemos necrosados

B. TRATAMIENTOS DE INICIO

a. Etapa de inicio en el cultivar Camino Real

Los parámetros de medios de cultivo de inicio evaluados un periodo de evaluación de 35 días en este trabajo son:

- Cuatro medios de cultivo T1, T2, T3 y T4
- Altura de vitroplantas
- N° brotes
- Desarrollo
- Vigor

b. Etapa de inicio en el cultivar Cristal

Los parámetros de medios de cultivo de inicio evaluados en un periodo de evaluación de 35 días en este trabajo son:

- Cuatro medios de cultivo T1, T3, T5 y T6
- Altura de vitroplantas
- N° brotes
- Desarrollo
- Vigor

c. Etapa de inicio en los cultivares

Los parámetros de medios de cultivo de inicio evaluados en un periodo de evaluación de 4 semanas en este trabajo son:

- Cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina
- Altura de vitroplantas
- Número de brotes
- Desarrollo
- Vigor

C. TRATAMIENTOS DE MULTIPLICACIÓN

a. Primer sub cultivo

Los parámetros de 4 medios de cultivo de multiplicación evaluados en un periodo de evaluación por 30 días en este trabajo son:

- Cultivar Camino Real
- Medios de multiplicación M2, M3, M4, M5.

- Número de brotes

b. Segundo sub cultivo

Los parámetros de 4 medios de cultivo de multiplicación evaluados en un periodo de evaluación por 30 días en este trabajo son:

- Cultivar Camino Real
- Medios de multiplicación M2, M3, M4, M5.
- Número de brotes

c. Tercer subcultivo

Los parámetros de 5 medios de cultivo de multiplicación evaluados en un periodo de 8 semanas en este trabajo son:

- Cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina
- Medios de multiplicación M1, M2, M3, M4, M5.
- Altura de planta (mm)
- Longitud de raíz (mm)
- Longitud de hoja alta (mm)
- N° Hojas
- N° Raíces
- N° brotes propagables
- N° brotes pequeños no propagables
- Peso fresco hojas (g)
- Peso fresco brotes (g)
- Peso fresco raíces (g)
- Peso fresco total (g)
- Peso seco total (g)
- Textura de hojas
- Presencia de callos
- Relación de longitud de hoja y tallo
- Forma de explantes
- Vigor de vitroplanta

Los valores de cada variable cualitativa son mencionados en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores de las variables cualitativas.

Vigor	Forma de explantes	Relación peciolo-Foliolo	Callo	Textura de hojas
Robusto Verde oscuro	No deforme	Tallos largos	No hay presencia de callos	No coriácea
Robusto Verde claro	Deforme	Tallos cortos	Hay presencia de callos transparentes.	Coriácea (hojas endurecidas)
Verde claro marchito			Hay presencia de callos blancos	Coriácea (hoja transparente)

D. TRATAMIENTOS DE ENRAIZAMIENTO

Los parámetros de 10 medios de cultivo de enraizamiento evaluados en un periodo de evaluación por 3 semanas en este trabajo son:

- Cultivar Camino Real
- Número de brotes
- Longitud de tallo
- Longitud de raíz
- Longitud de hoja alta
- N° Hojas
- N° Raíces
- N° Brotes
- Peso fresco hojas
- Peso fresco raíces
- Peso fresco total
- Peso seco hojas
- Peso seco de raíces
- Peso seco total

3.2.6. ANALISIS ESTADISTICOS

En las investigaciones donde se aplican técnicas de cultivo de tejidos, generalmente se emplea el diseño completamente al azar (DCA), puesto que el material experimental que usan es homogéneo (por ejemplo se puede determinar cuál es el mejor medio de cultivo para meristemas, callos, anteras, hojas, embriones, óvulos, etc.) (Hurtado, 1994).

Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba de normalidad con el test de Anderson – Darling, para la prueba de homogeneidad fue con el test de Bartlett. Luego se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey, así como una prueba de correlación. Se utilizó el software estadístico SAS v.8.

En el presente trabajo los datos que cumplieron normalidad se aplicó la prueba paramétrica el diseño completamente al azar (DCA), aplicándose la comparación de medias de Tukey al 95% de confianza. Los datos que no cumplieron una distribución normal se le aplicó una transformación de datos de raíz cuadrada del valor más uno, $\sqrt{x+1}$, a las variables número de brotes pequeños no propagables, brotes propagables y número de raíces.

A. DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

En la etapa de desinfección se utilizó la evaluación por porcentajes, constó de 5 tratamientos con 10 repeticiones, evaluadas cada 7 días por 6 semanas

B. DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En la etapa de inicio constó de 6 tratamientos y 4 repeticiones, y en las comparaciones de cultivares contó de 6 repeticiones. En la etapa de multiplicación, el primer y segundo sub cultivo constaron de 4 tratamientos y 5 repeticiones, en el tercer sub cultivo constó de 5 tratamientos y 6 repeticiones (cada repetición con 3 explantes iniciales). En la etapa de enraizamiento constó de 10 tratamientos con 5 repeticiones (cada repetición con 5 explantes iniciales), donde se realizó el análisis de varianza con un índice de confiabilidad del 0.05 de medias de Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN

Las yemas de corona se encuentran en contacto directo con el suelo, la misma que favorece que el tejido este más expuesto a agentes contaminantes dificultando de esta manera la total eliminación de los microorganismos por el desinfectante. Al respecto, Villalobos y Pérez (1979) citado por Sánchez (2004) mencionan que la alta pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo inducen una alta contaminación de los explantes de fresa.

4.1.1. INTRODUCCIÓN A PARTIR DE YEMAS

En este protocolo de desinfección se utilizaron como explantes, las yemas. Fueron 10 explantes por tratamiento (4 tratamientos). Los resultados obtenidos fueron llevados a porcentaje (considerando las 10 repeticiones como el 100%). En Tabla 14 se aprecian los resultados después de 42 días después de la introducción.

Tabla 14. Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y presencia de Tween 20 en la desinfección de coronas de *Fragaria x ananassa* Duch.

Tratamiento	Concentración de lejía (4% Hipoclorito de sodio)	Presencia de Tween 20	Contaminadas (%)
D1	10%	Sin Tween 20	100%
D2	10%	Con Tween 20	90%
D3	20%	Sin Tween 20	90%
D4	20%	Con Tween 20	70%

A. EVALUACIÓN DE DESINFECCIÓN POR SEMANAS

Según Alvarado, (1992) utilizó 4% de hipoclorito de Calcio obteniendo un 70% de sobrevivencia. Además Rodríguez (1997) menciona que el hipoclorito de sodio y el alcohol garantizan niveles de control aceptables solo para hongos, mas no para bacterias.

Con la aplicación de antibióticos reporta 70% de explantes sanos sin signos de fitotoxicidad.

Se evaluaron a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después de la introducción (Tabla 15 y Figura 18), ya que a medida que pasa el tiempo el porcentaje de contaminación aumenta debido principalmente a la presencia de bacterias endógenas en el tejido.

Tabla 15. Porcentajes de contaminación y sobrevivencia de yemas de *Fragaria x ananassa* Duch., por tratamiento evaluadas a los 7, 14, 21,28, 35 y 42 días después de la introducción.

TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	7ddi		14ddi		21ddi		28ddi		35ddi		42ddi	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
D1	70	30	80	20	80	20	100	0	100	0	100	0
D2	40	60	80	20	80	20	90	10	90	10	90	10
D3	90	10	90	10	90	10	90	10	90	10	90	10
D4	10	90	50	50	50	50	60	40	70	30	70	30

*ddi= Días después de la introducción; C: Contaminado; S: Sobreviviente.

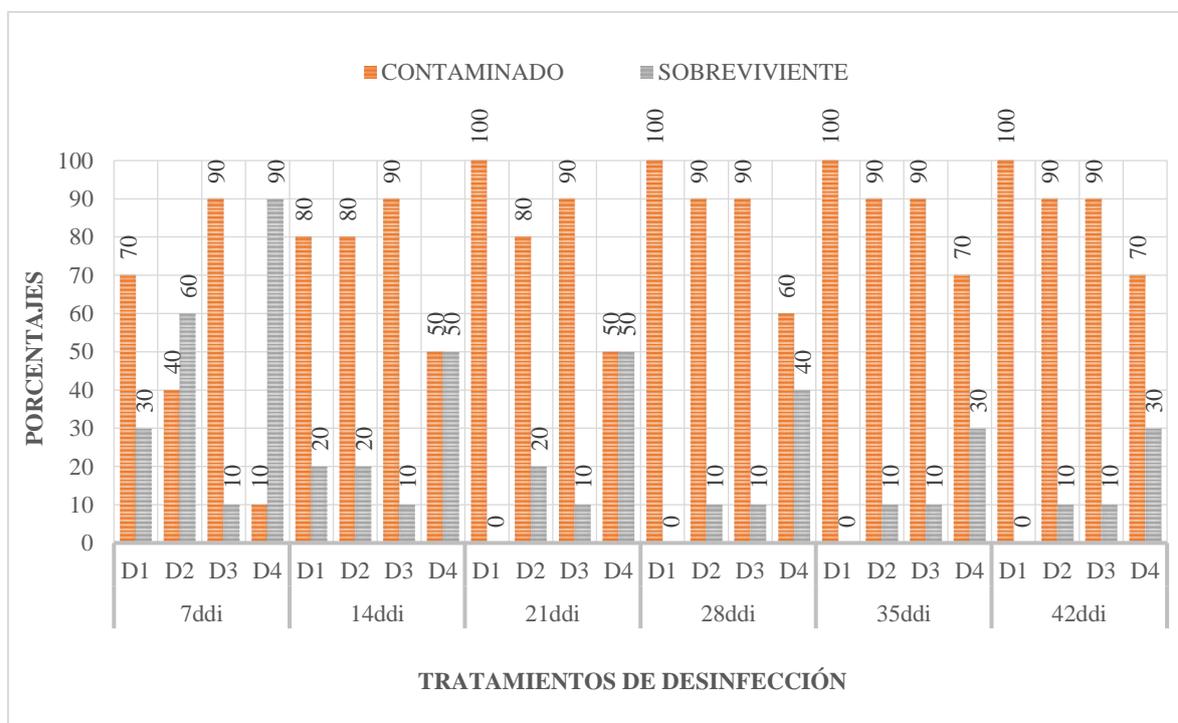


Figura 18: Porcentajes de contaminación y sobrevivencia de la introducción a partir de yemas de *Fragaria x ananassa* Duch., evaluadas a los 7, 14, 21,28, 35 y 42 días después de la introducción.

A los 7 días, el tratamiento D3 (20% lejía sin Tween) presentó el 90% de contaminación con el 10% de sobrevivencia. El tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) presentó el menor porcentaje de contaminación, con el 10% contaminación y el 90% de sobrevivencia. Sin embargo siendo el tratamiento D1 (10% lejía sin Tween20) el testigo, fue el segundo porcentaje más alto de contaminación de 70% y de sobrevivencia 30%, mientras que el tratamiento D2 (10% lejía + Tween20) presentó el 40% de contaminación y el 60% de sobrevivencia, cabe destacar que la presencia de Tween 20 influyó en los tratamientos D2 y D4 para obtener menos porcentaje de contaminación.

A los 14 días, el tratamiento D1 (10% lejía sin Tween20) y D2 (10% lejía + Tween20), presentaron el mismo porcentaje de contaminación, 80%, como el 20% de sobrevivencia. Mientras que el tratamiento D3 (20% lejía sin Tween20) se mantiene con el 90% de contaminación y el 10% de sobrevivencia, en el tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) se observó el 50% de contaminación y el 50% como de sobrevivencia, siendo el de menor porcentaje de contaminación con más porcentaje se sobrevivencia.

A los 21 días, el tratamiento D1 (10% lejía sin Tween20) testigo, presentó el 100% de contaminación y el 0% de sobrevivencia, siendo descartado como alternativa. Mientras que el tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) se mantuvo con el porcentaje más bajo de contaminación 50% y 50% de sobrevivencia.

A los 28 días, los tratamientos D2 (10% lejía + Tween20) y D3 (20% lejía sin Tween20), se observaron mismos porcentajes de contaminación, del 90% frente a un 10% de sobrevivencia, mientras el tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) presentó el 60% de contaminación y el 40% de sobrevivencia.

A los 35 días, el tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) presentó el 70% de contaminación y el 30% de sobrevivencia, da entender que las plantas que proceden del invernadero debe aplicarse pesticidas, es decir un pre-tratamiento que se explica en la Tabla.

Al cabo de 42 días de evaluación, del tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) se obtuvo el 70% de contaminación y 30% de sobrevivencia y en los tratamientos D2 (10% lejía + Tween20) y D3 (20% lejía sin Tween20) presentaron el 90% de contaminación y 10% de sobrevivencia. El tratamiento D1 (10% lejía sin Tween20) testigo, presentó el 100% de

contaminación y el 0% sobrevivencia. Observando así que 20% de Lejía y el Tween20 son importantes en la desinfección.

El tratamiento D4 (20% lejía + Tween20) resultó ser el mejor en este experimento porque presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia, aunque el porcentaje de contaminación es muy alta, se debió a que el explante de yema, contiene más tejido con mayores probabilidades de contaminación (Figura 19)



Figura 19: Yemas contaminadas con desarrollo de hifas (Izquierda y derecha) y yema no contaminada (centro).

Otros investigadores también han utilizado cloro para desinfectar tejidos de fresa. Dodds & Roberts (1985) recomiendan desinfectar con 10% de cloro (0.5% de hipoclorito de sodio). También se ha recomendado tener cuidado con la dosis del desinfectante y el tiempo de inmersión seleccionados, pues todos los desinfectantes son tóxicos para el tejido. De acuerdo con Sanchez-Cuevas & Salaverry (2004), la inmersión de los explantes en una solución de cloro 20% durante 20 minutos es el recomendado, mientras que la desinfección con 30% de cloro es tóxico para los explantes. Otro factor que se debe tomar en cuenta es la pubescencia del tejido. Villalobos & Pérez (1979) señalaron que, si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol 70% durante 30 segundos para romper la tensión superficial y hacer la superficie más accesible a la acción de los agentes desinfectantes. Abboud & Elkichaoui (2014) indicaron que el máximo de explantes asépticos fueron obtenidos con la desinfección de 30% de cloro (1.5% de hipoclorito de sodio) que contiene dos o tres gotas de Tween 20 por 100 ml durante 20 minutos.

Después del pre tratamiento (Tabla) se obtuvo mayor seguridad de superar el porcentaje de sobrevivencia, pero el porcentaje de contaminación fue muy alto; porque se utilizó como explante la yema, las cuales contienen más tejidos con una alta probabilidad de estar contaminado. La obtención de vitroplantas a partir de yemas, es más rápido a comparación de los meristemos (con menos tejidos probablemente contaminados). Considerando que el tratamiento D4 presentó mayor porcentaje de explantes sobrevivientes se decidió elegirlo para introducir meristemos como explante de introducción.

4.1.2. INTRODUCCIÓN A PARTIR DE MERISTEMOS

En el protocolo realizado para la desinfección se utilizaron como explantes, los meristemos, 10 explantes por el tratamiento. Los resultados obtenidos fueron llevados a porcentaje (considerando las 10 repeticiones como el 100%). En la Tabla 16 se aprecian los resultados de la desinfección.

Tabla 16. Tratamientos de desinfección para explantes de meristemos de *Fragaria x ananassa* Duch.

Tratamiento de desinfección	Concentración de lejía (Hipoclorito de sodio)	Presencia de Tween20	Contaminados
D4 (Yemas)	20%	Con Tween 20	70%
D5 (Meristemos)	20%	Con Tween 20	10%

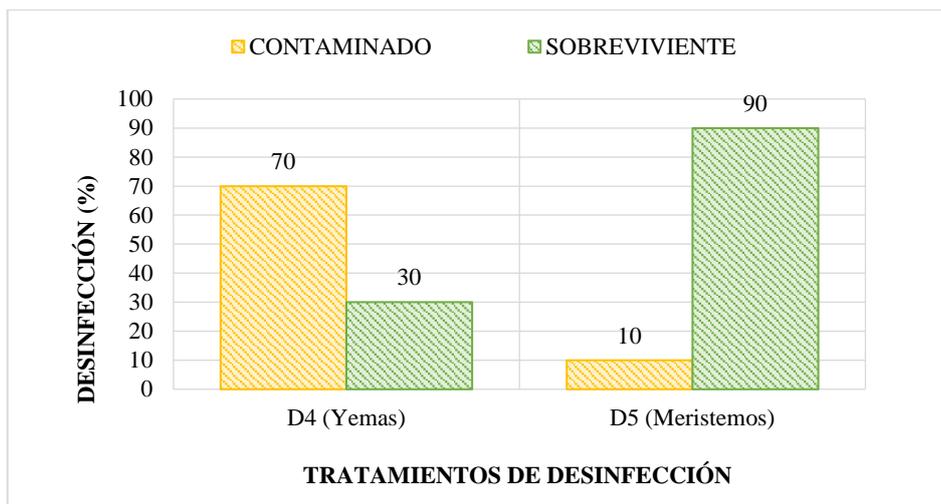


Figura 20: Tratamientos evaluados a los 42 días después de la introducción.

Como resultado de la introducción de dos tipos de explantes de *Fragaria x ananassa* Duch. Se evaluó después de 42 días de la introducción de dos tipos de explantes de fresa (Figura 21) a condiciones *in vitro* muestra que el tratamiento de desinfección D5 que se utilizó meristemos, el 90% de los explantes no presentaron contaminación, en inmersión al desinfectante de 20% lejía más Tween 20 (Figura 20).

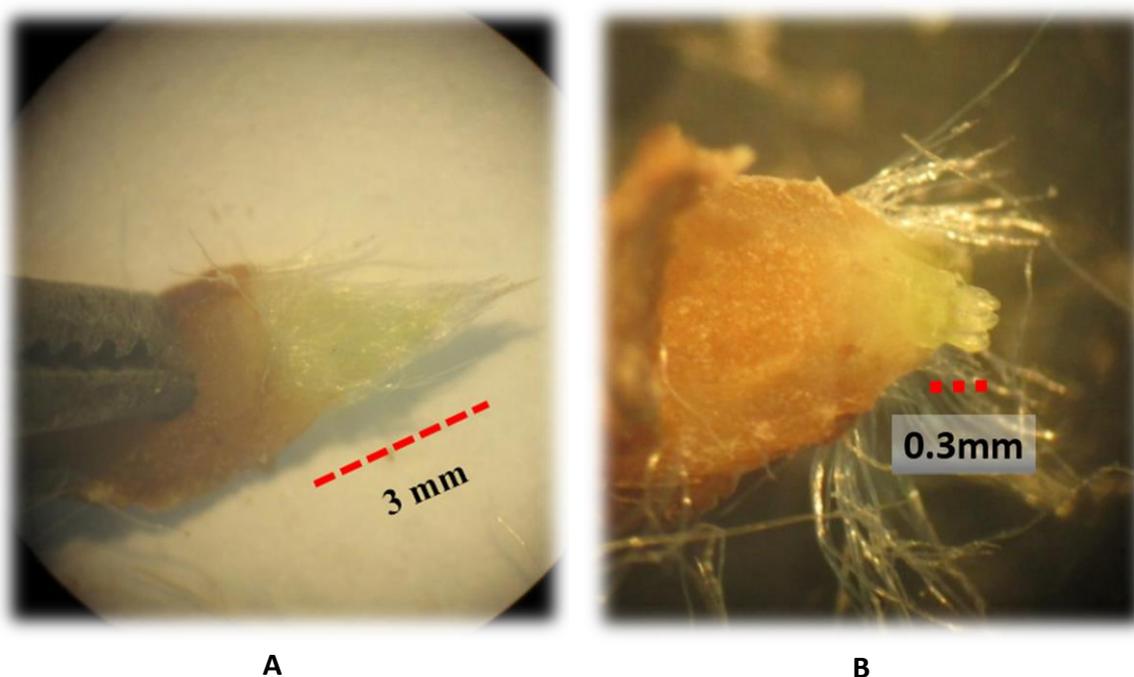


Figura 21: Explantes de introducción. (A) Yema de *Fragaria x ananassa* Duch. (B) Meristemo de *Fragaria x ananassa* Duch.

4.1.3. INTRODUCCIÓN DE LOS CULTIVARES A PARTIR DE MERISTEMOS

Se introdujo los cultivares Camino Real (Figura 23), Cristal, Albión y Sabrina utilizando el tratamiento de desinfección D5 y se obtuvo los porcentajes de sobrevivencia, contaminación y necrosamiento que también se pueden apreciar en el Figura 22. Estos porcentajes son parecidos, a diferencia de los cultivares Cristal y Sabrina, que muestran levemente más contaminación a comparación de los cultivares Camino Real y Albión, el factor que puede influir en este aspecto es la presencia de vellosidad en los explantes, el cual los productos y agentes de desinfección no llegan a descontaminar los tejidos a profundidad.

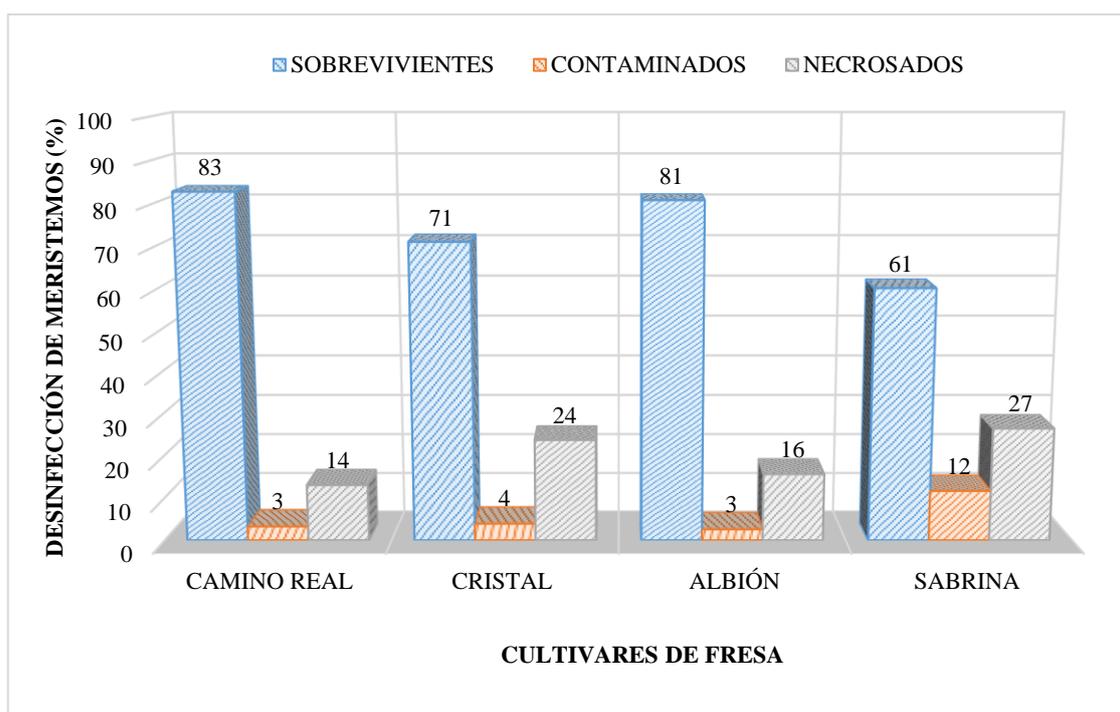


Figura 22: Desinfección de meristemos en los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina, después de 42 días.

En el cultivar Camino Real, el resultado de desinfección mostró el 83% de sobrevivencia, 3% de contaminación y 14% de necrosamiento. Siendo el que presentó el menor porcentaje de contaminación, a comparación de los demás cultivares de fresa, el cual es más tolerante

ante organismos contaminantes y por la poca vellosidad alrededor del meristemo y de la yema.

En el cultivar Cristal, se observó el 71% de sobrevivencia, mientras que se presentó el 4% de contaminación, el cual la presencia de vellosidad puede influir en la desinfección profunda así como la susceptibilidad del cultivar. El 24% de necrosamiento también se debió a la vellosidad, aunque se usó un estereoscopio, ya que influyó al momento la extracción del meristemo, fue dificultoso el corte del meristemo.

En el cultivar Albión, se observó el 81% de sobrevivencia, 3% de contaminación y el 16% de necrosamiento. Los resultados son parecidos al cultivar Camino Real, por tener poca vellosidad.

En el cultivar Sabrina, presentó el 61% de sobrevivencia, 12% de contaminación y el 27% de necrosamiento. Este cultivar resultó ser la más susceptible, así como la alta vellosidad.

El necrosamiento también se debió al tiempo entre el corte y la siembra en tubo. Otro factor es que la manipulación del meristemo requiere mucho cuidado para no maltratar al momento de ponerla sobre el papel filtro.

El meristemo es tejido vegetal embrionario o inmaduro, zona de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse activamente. A partir de los meristemos se forman los otros tejidos que forman el cuerpo vegetal. (Alonso J., 2011)

Semana	1	2	3	4	5	6
Meristemo en desarrollo						

Figura 23: Desarrollo del meristemo *Fragaria x ananassa* Duch., cultivar Camino Real, en medio líquido MS sin hormonas con puente de papel filtro, evaluado por 6 semanas.

4.2. ETAPA DE INICIO

4.2.1. ETAPA DE INICIO EN EL CULTIVAR CAMINO REAL

Cada muestra está determinada por los tratamientos, es independiente y aleatoria, y cada tamaño de muestra es cuatro.

A. ALTURA DE VITROPLANTA Y NÚMERO DE BROTES

El análisis de varianza de la altura de vitroplanta (Anexo 8), determina que no hay diferencia significativa entre los tratamientos lo que indica que entre las evaluaciones, todos los tratamientos son iguales, al igual que el análisis de varianza del número de brotes (Anexo 9) muestra que el valor p es mayor que 0.05, es decir que todos los tratamientos son iguales.

Así mismo en el Tabla 17 se muestran las medias de la altura de vitroplanta (mm). Según la prueba estadística de Tukey con el nivel de significancia de 0,05 las medias que presentan la misma letra no son significativamente diferentes.

Sin embargo (Figura 24), el desarrollo de los meristemos para generar una vitroplanta diferenciada generada por el tratamiento 3 (MS+ 2mg/L IBA+ 2 mg/L BAP+ 1g/L Carbón activado + Agar) es el único que obtuvo mejores resultados (22.5mm) frente al resto de los tratamientos evaluadas después de 30 días de cultivo. Mientras que el tratamiento 2 (MS+ 1mg/L IBA+ Phytigel) y el tratamiento 4 (MS+ 6mg/L IBA+ Agar) presentaron vitroplantas muy pequeñas (9.75 y 10.75mm respectivamente), mostrando que la formulación y/o el sólido de Phytigel no es el adecuado para el establecimiento *in vitro* del cultivar Camino Real.

Tabla 17. Respuestas de los tratamientos de medios de inicio *in vitro* en la longitud y número de brotes del cultivar Camino Real, después de 30 días.

Tratamientos de medios de inicio	IBA (mg/l)	BAP (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Sólido	Altura de vitroplanta (mm)	Número de brotes
T1 (Testigo)	0	0	0	Agar	14a	1.5a
T2	1	0	0	Phytigel	9.75a	1.25a
T3	2	2	1	Agar	22.25a	2.75a
T4	6	0	0	Agar	10.75a	3.5a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

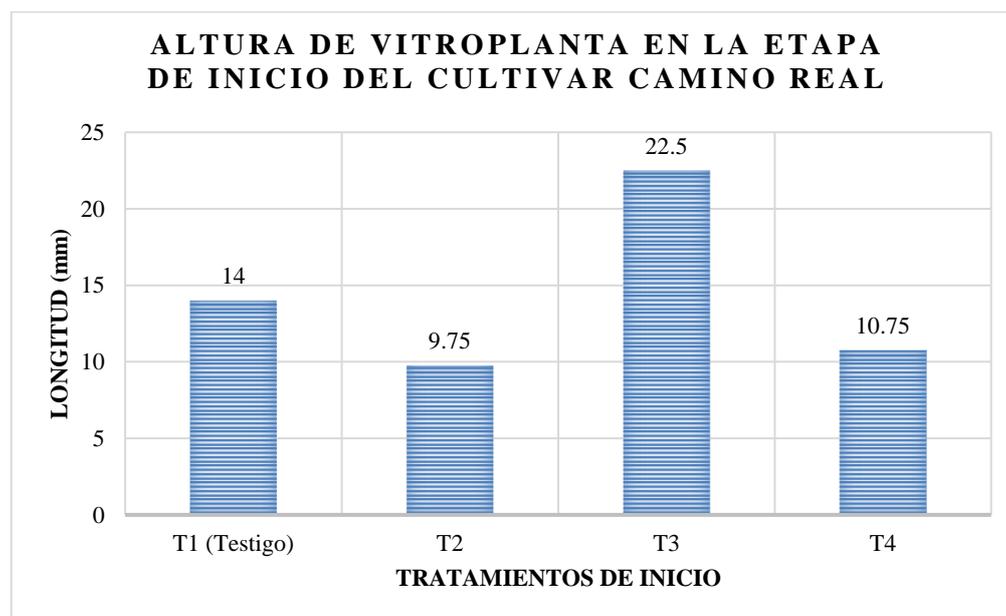


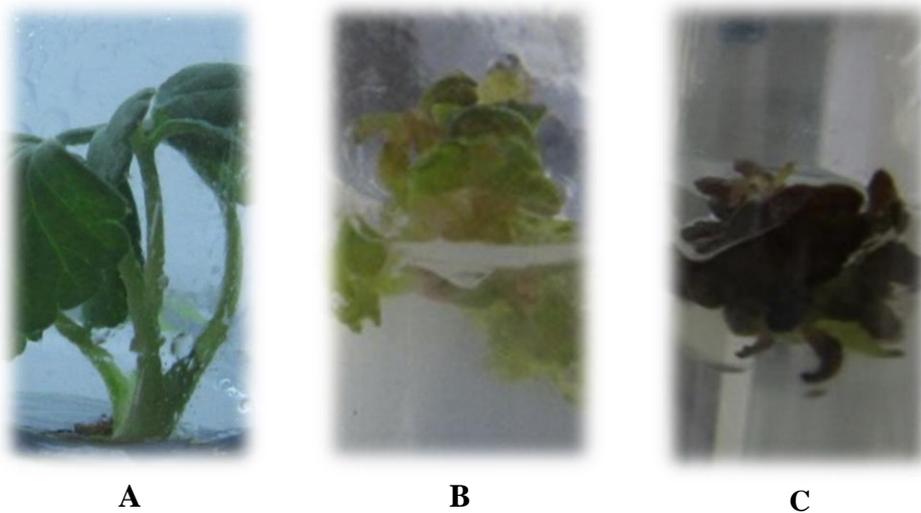
Figura 24. Respuestas de los tratamientos de medio de inicio *in vitro* en la altura del cultivar Camino Real después de 30 días.

B. VIGOR Y DESARROLLO

Las evaluación de los datos de la variable *vigor*, se hizo en base a la Figura 25, y se evaluó en porcentajes, notándose la predominancia de *color verde oscuro* en 100% en el tratamiento 3 (MS+ 2mg/L IBA+2mg/L IBA+ 1g/L carbón activado + Agar), como una característica de buen estado de la vitroplanta. La participación del carbón activado puede ser un factor que influyó en el color.

Siendo el *vigor* relacionado al *color verde claro*, como el segundo mejor los cuales presentaron los tratamientos 1 testigo (MS sin hormonas+ Agar) y 4 (MS+ 6mg/L IBA+ Agar) que presentaron el 50% de *color verde oscuro* como el 50% de color verde claro.

También la participación del Phytigel sustituyendo al agar fue clave, ya que las vitroplantas obtenidas del tratamiento 2 (MS+ 1mg/L IBA + 4.2g/L Phytigel) presentaron el 75% de explantes muertos producto del necrosamiento, descartando así el uso del Phytigel en el cultivar Camino Real en el resto de la investigación.



**Figura 25: Valores de vigor basado en estado y color de la vitroplanta
A: Verde Oscuro; B: Verde Claro; C: Necrosamiento o Muerto.**

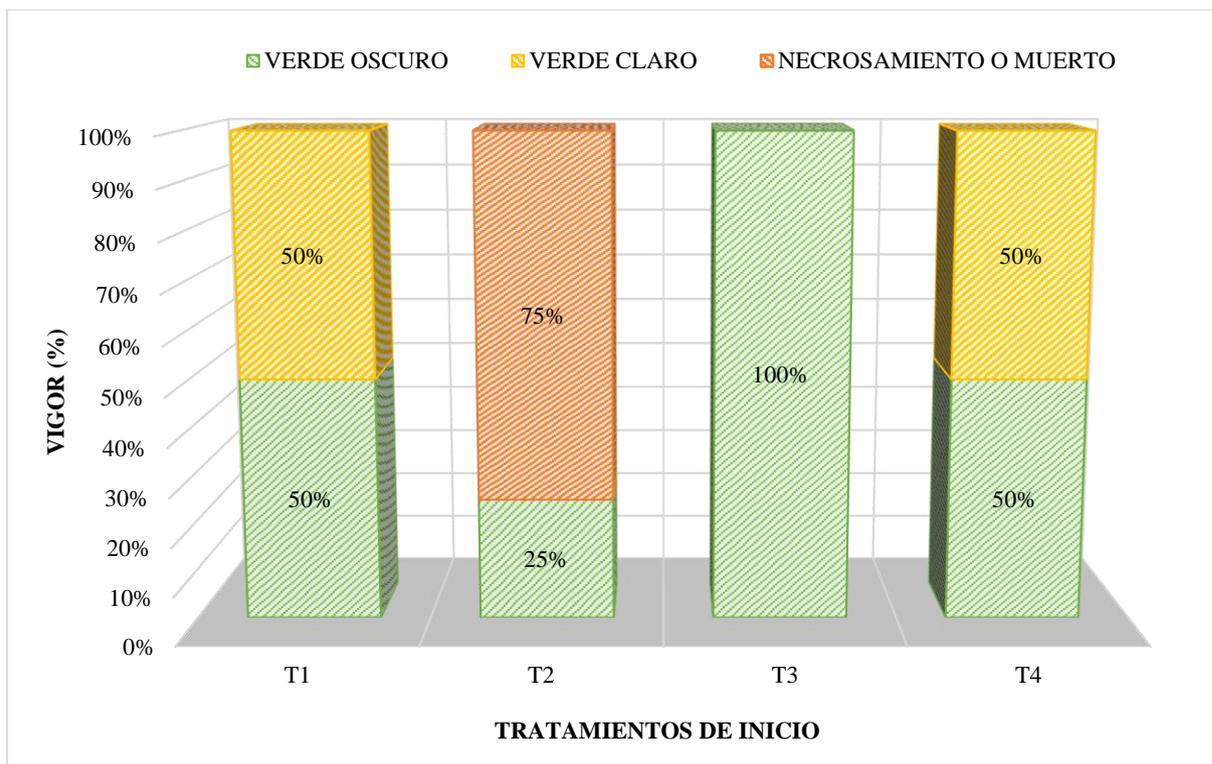


Figura 26: Porcentajes de vigor en los tratamientos de medio de inicio de cultivo *in vitro* del cultivar Camino Real evaluadas después de 30 días.

Los datos de la variable *desarrollo* se evaluaron en base a la Figura 27 y los resultados en porcentajes (Figura 28), notándose la predominancia de la característica *desarrollados* en un 50% y el 25% *diferenciados* en el tratamiento 3 (MS+ 2mg/L IBA+2mg/L IBA+ 1g/L de carbón activado + Agar), estas características son las esperadas como elongación de la vitroplanta.

Según Damiano *et al.* (1997) encontraron que la adición de 1 o 2 g de carbón vegetal activado por litro de medio MS promueve alargamiento tanto de los brotes y raíces de fresa.

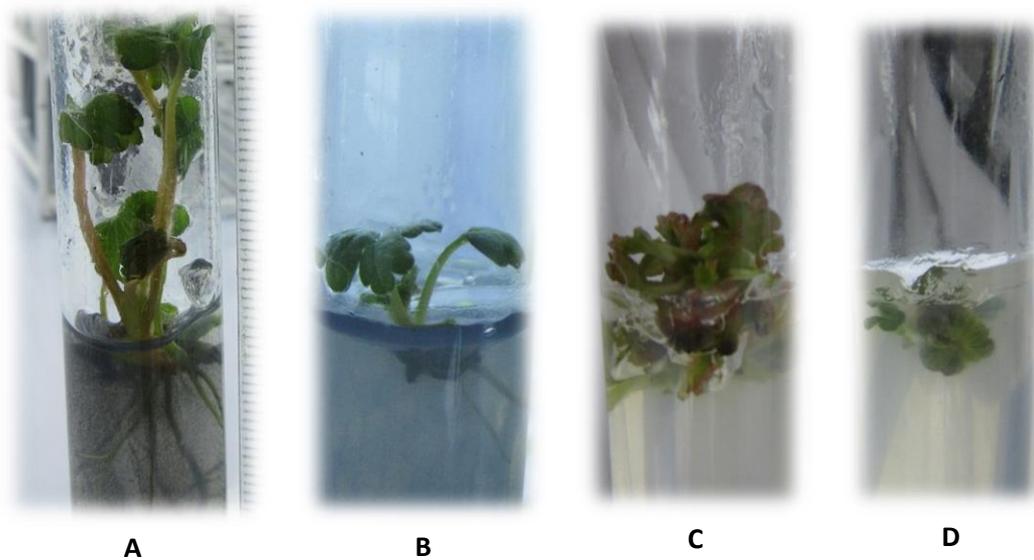


Figura 27. Valores de desarrollo basado en el crecimiento de la vitroplanta. A: Desarrollado; B: Diferenciado; C: Multibrote; D: Brote.

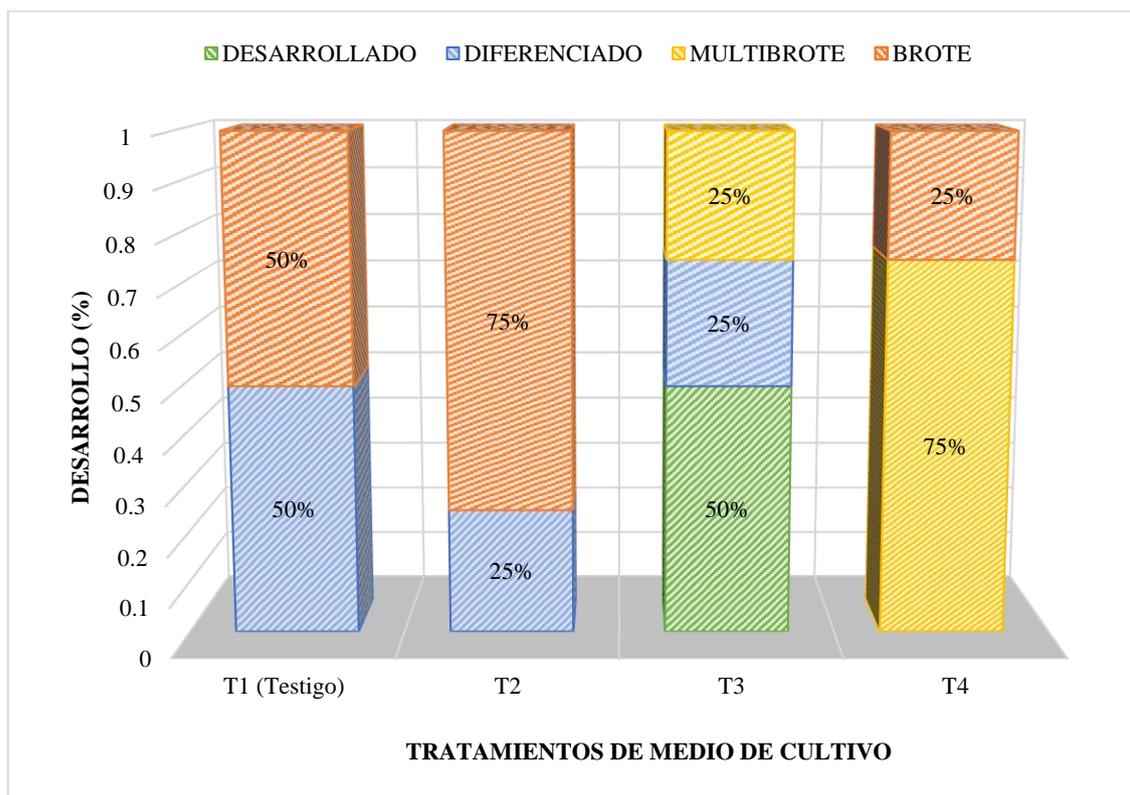


Figura 28. Efecto en la variable desarrollo de los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Camino Real evaluadas después de 30 días.

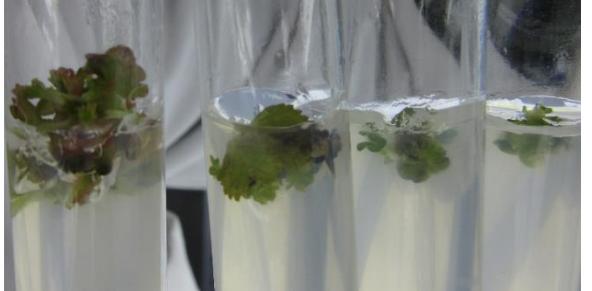
TRAT	1° SEMANA	5° SEMANA
T1		
T2		
T3		
T4		

Figura 29: Evaluación de vitroplantas del cultivar Camino Real en tratamientos de medio de inicio, después de 30 días.



Figura 30: Crecimiento de vitroplanta diferenciada de *Fragaria x ananassa* Duch., del cultivar camino real, en medio de inicio de cultivo *in vitro*, evaluado por 4 semanas.

4.2.2. ETAPA DE INICIO EN EL CULTIVAR CRISTAL

A. ALTURA DE VITROPLANTA Y NÚMERO DE BROTES

El análisis de varianza de la altura de vitroplanta (Anexo 10), determina la diferencia significativa entre los tratamientos lo que indica que entre las evaluaciones realizadas al menos uno de los tratamientos difiere de otro. Mientras que el análisis de varianza del número de brotes (Anexo 11) muestra que el valor p es mayor que 0.05, es decir que todos los tratamientos son iguales. Se realizó la prueba comparativa de Tukey correspondiente que se aprecia en la Tabla 18.

El desarrollo de los meristemos para generar una vitroplanta diferenciada generada por el tratamiento T3 (MS+ 2mg/L IBA+ 2 mg/L BAP+ 1g/L Carbón activado+ Agar) es el único que obtuvo mejores resultados, estadísticamente superiores frente al resto de los tratamientos evaluados después de 30 días de cultivo. Mientras que el medio de inicio T6 (MS+ 0.5mg/L de IBA+0.5g/L de Carbón activado+ 4 g/L Phytigel) fue el que desarrolló menor longitud,

aun incluyendo carbón activado para la elongación de la vitroplanta, no logró desarrollarse. Así mismo la concentración de 4mg/L de IBA en el tratamiento de inicio T5, desarrolló un poco más que el tratamiento T6.

En el cultivar Cristal también se determina que el uso del Phytigel no es el indicado para el desarrollo de la fresa, por lo tanto se descarta este sustituto del agar en el resto de la investigación. También se confirma el tratamiento T3 es el adecuado (Figura 31) y efectivo para ambos cultivares Camino Real y Cristal, por lo que se elige como medio de inicio para los demás cultivares.

Tabla 18. Efecto de los tratamientos de medios de cultivo de inicio del cultivar Cristal en las medias de longitud.

Tratamiento	IBA (mg/l)	BAP (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Sólido	Longitud de vitroplanta (mm)	Número de brotes
T1 (Testigo)	0	0	0	Agar	7.75b	1.25a
T5	4	0	0.5	Agar	6.25b	1.25a
T3	2	2	1	Agar	18.75a	2.75a
T6	0.5	0	0.5	Phytigel	4.75b	1a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

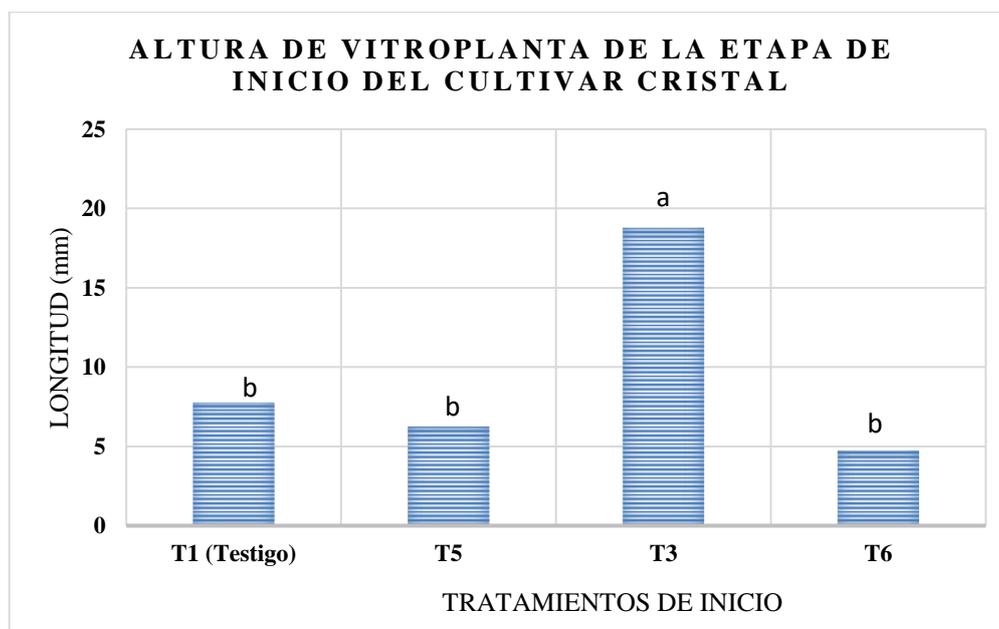


Figura 31. Respuestas de los tratamientos de medio de inicio *in vitro* en la altura del cultivar Cristal después de 30 días.

B. VIGOR Y DESARROLLO

Efectivamente se observó que en la variable *vigor*, resaltó el tratamiento T3 (MS+ 2mg/L IBA+ 2 mg/L BAP+ 1g/L Carbón activado+ Agar) con un 100% de vitroplantas *verde oscuro*, mientras que el tratamiento T6 (MS+ 0.5 mg/L IBA+ 0.5 g/L Carbón activado+ Agar) se obtuvo el 100% de vitroplantas con *necrosamiento a muertas*, se puede apreciar en la Tabla 19 y Figura 32.

Tabla 19. Resultados de la variable vigor en los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Cristal después de 35 días.

Tratamiento	IBA (mg/l)	BAP (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Sólido	Verde Oscuro	Verde Claro	Necrosamiento a muerto
T1	0	0	0	Agar	75%	25%	0%
T5	4	0	0.5	Agar	0%	100%	0%
T3	2	2	1	Agar	100%	0%	0%
T6	0.5	0	0.5	Phytigel	0%	0%	100%

*VO=Verde Oscuro; VC= Verde Claro; N=Necrosamiento; M=Muerto.

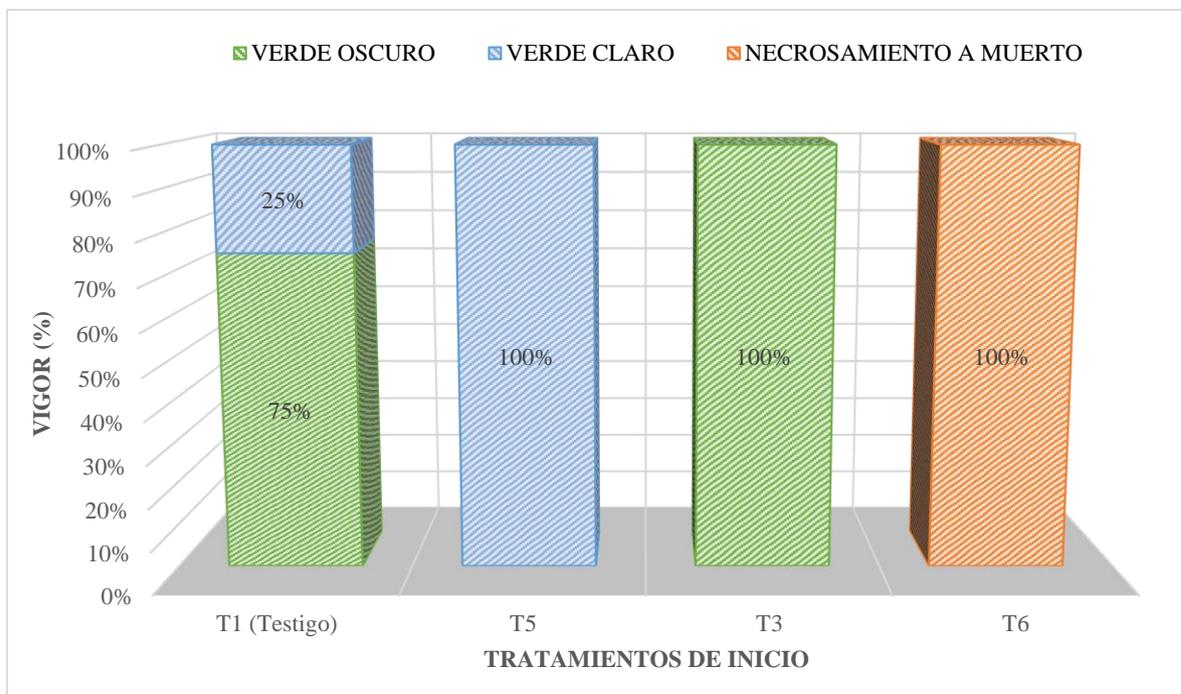


Figura 32: Resultados de la variable vigor en los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Cristal después de 35 días.

Los mejores resultados de la variable *desarrollo* obtuvo el T3 (MS+ 2mg/L IBA+ 2 mg/L BAP+ 1g/L Carbón activado+ Agar), el 25% *desarrolladas*, 50% *diferenciadas* y 25% *multibrote*. Mientras que el tratamiento que no se desarrolló fue el T6 (MS+ 0.5 mg/L IBA+ 0.5 g/L Carbón activado+ Agar) en un 100% se quedó en con el valor de *brote*.

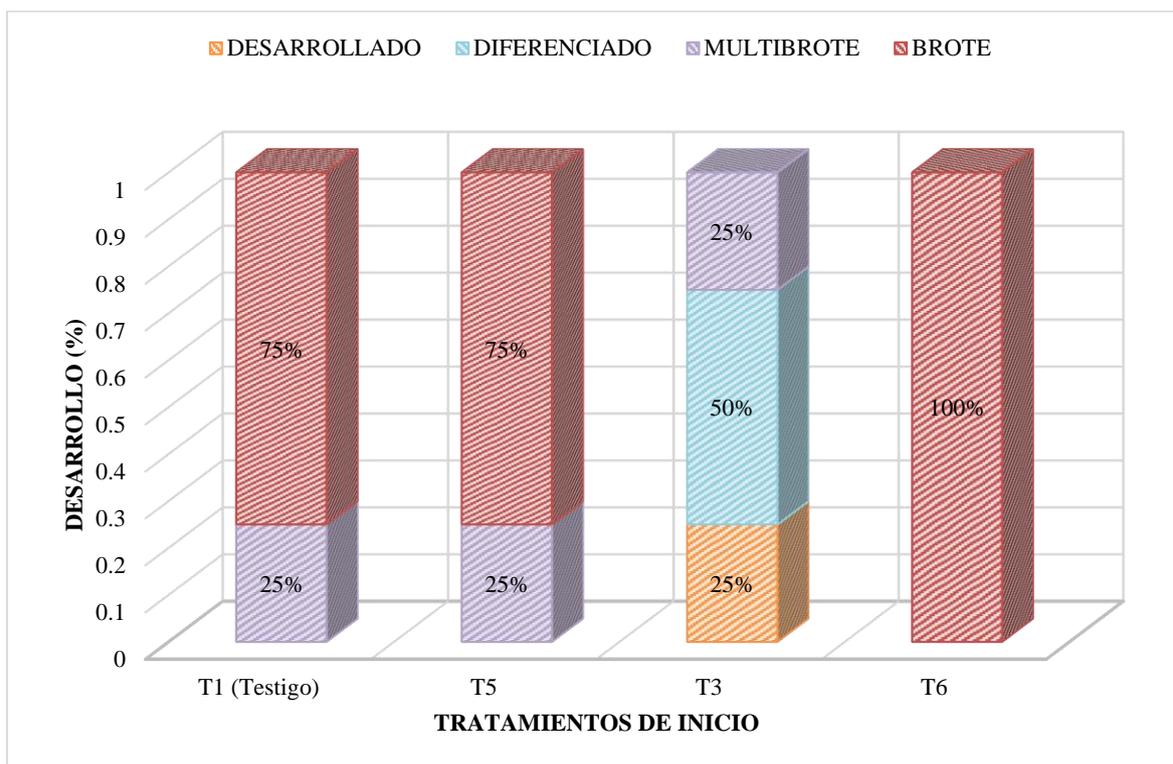


Figura 33. Efectos en el la variable desarrollo de los tratamientos de medio de inicio en el cultivar Cristal después de 35 días.

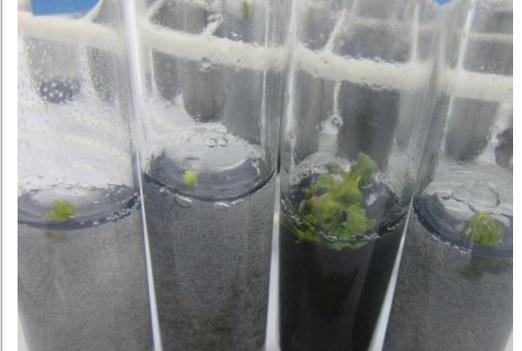
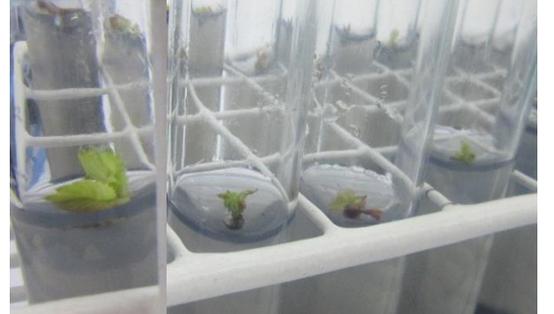
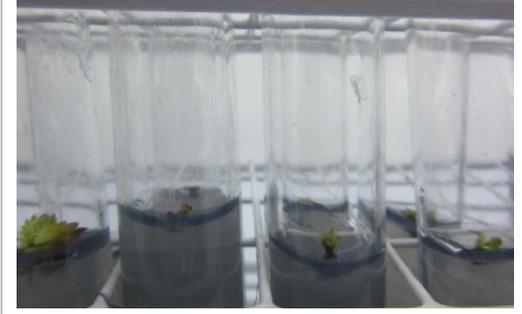
TRAT	1° SEMANA	5° SEMANA
T1		
T5		
T3		
T6		

Figura 34. Evaluación de vitroplantas del cultivar Cristal en los tratamientos de medio de inicio después de 5 semanas.

4.2.3. ETAPA DE INICIO PARA LOS CULTIVARES

Se instaló los cultivares en el mejor medio de inicio por lo que se evaluó cada 7 días las variables de altura de la vitroplanta (Figura 35), el *vigor* (Figura 25), el *desarrollo* (Figura 27) hasta los 35 días (Anexo 11), excepto la variable número de brotes la cual se evaluó solamente el día 35.

El análisis estadístico se hizo a la evaluación del día 35, siendo los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina como tratamientos.

Los datos de las variables altura de vitroplanta y número de brotes se distribuyeron normalmente, por lo que se decidió hacer un prueba paramétrica DCA.

A. LONGITUD DE VITROPLANTA Y NÚMERO DE BROTES

El ANVA de Altura de vitroplanta (Anexo 12) muestra que el p-valor es menor a 0.05, es decir que uno de los tratamientos es diferente a los demás. Mientras que el ANVA de la variable número de brotes (Anexo 13) muestra que todos los tratamientos son iguales.

En la Tabla 20 se observa que el cultivar Camino Real se destacó en altura de vitroplanta (31mm), le sigue los cultivares Sabrina (22.7mm), Cristal (18.3mm) y por último el cultivar Albión (14mm), siendo esta última la de menor altura de vitroplanta lograda después de 35 días. En la misma tabla se observa que la producción de brotes ha sido similar en todos los cultivares.

Tabla 20. Resultados de las variables altura de vitroplanta y número de brotes en medio de inicio en los cultivares después de 35 días.

Medio de cultivo inicio	Tratamiento= Cultivares	Altura de vitroplanta (mm)	Número de brotes
T3	Camino Real	31a	2.5a
T3	Cristal	18.3bc	1.8a
T3	Albión	14.5c	2a
T3	Sabrina	22.7b	2a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

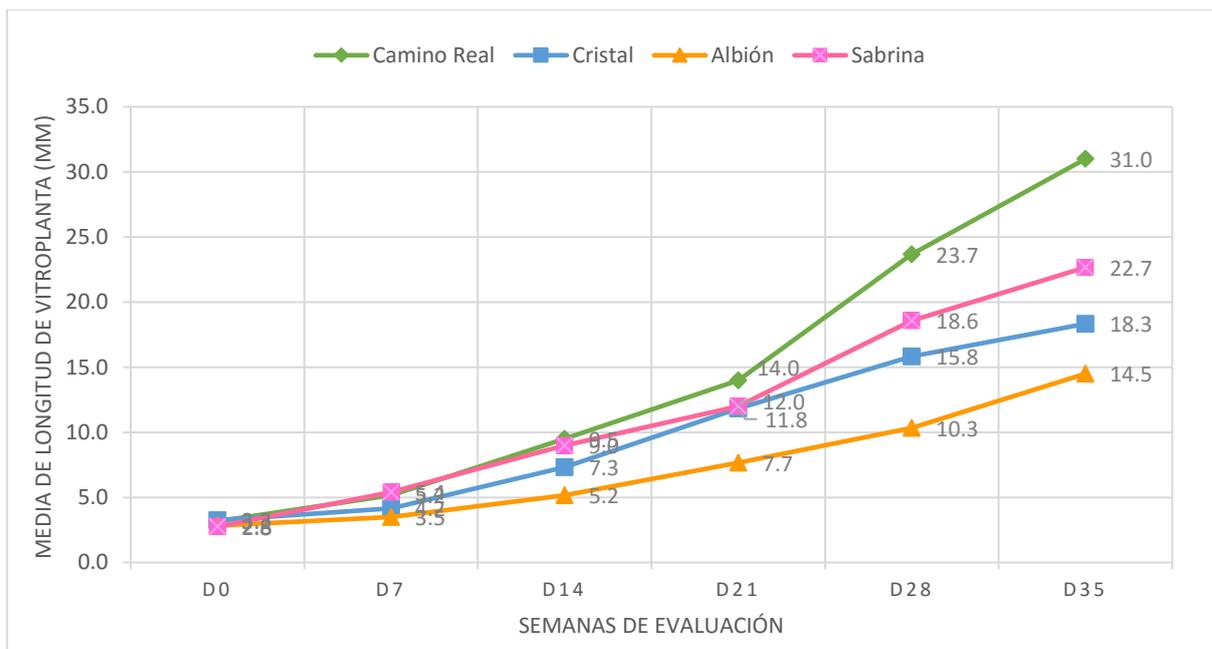


Figura 35. Altura de vitroplanta (mm) de los cultivares en medio de inicio después de 7, 14, 21, 28 y 35 días. *D0: Día 0; D7: Día 14; D21: Día 28; D35: Día 35.

B. VIGOR Y DESARROLLO

En el Anexo 11, la variable vigor resultó en un 100% en los cultivares mientras que en la variable desarrollo mostró algunas diferencias, los cuales se observan en la Figura 36 se observa que el cultivar Camino Real se obtuvo de vitroplantas con 83.3%, 16.7%, 0% y 0% entre *desarrolladas*, *diferenciadas*, *multibrote* y *brote* respectivamente, le sigue los cultivares Sabrina (33.3% y 66.7%, 0%, 0%) y Cristal (33.3%, 50%, 16.7% y 0%) y por último el cultivar Albión (0%, 66.7% 0% y 33.3%), siendo este último la que obtuvo pocas vitroplantas diferenciadas y ninguna desarrolladas después de 35 días.

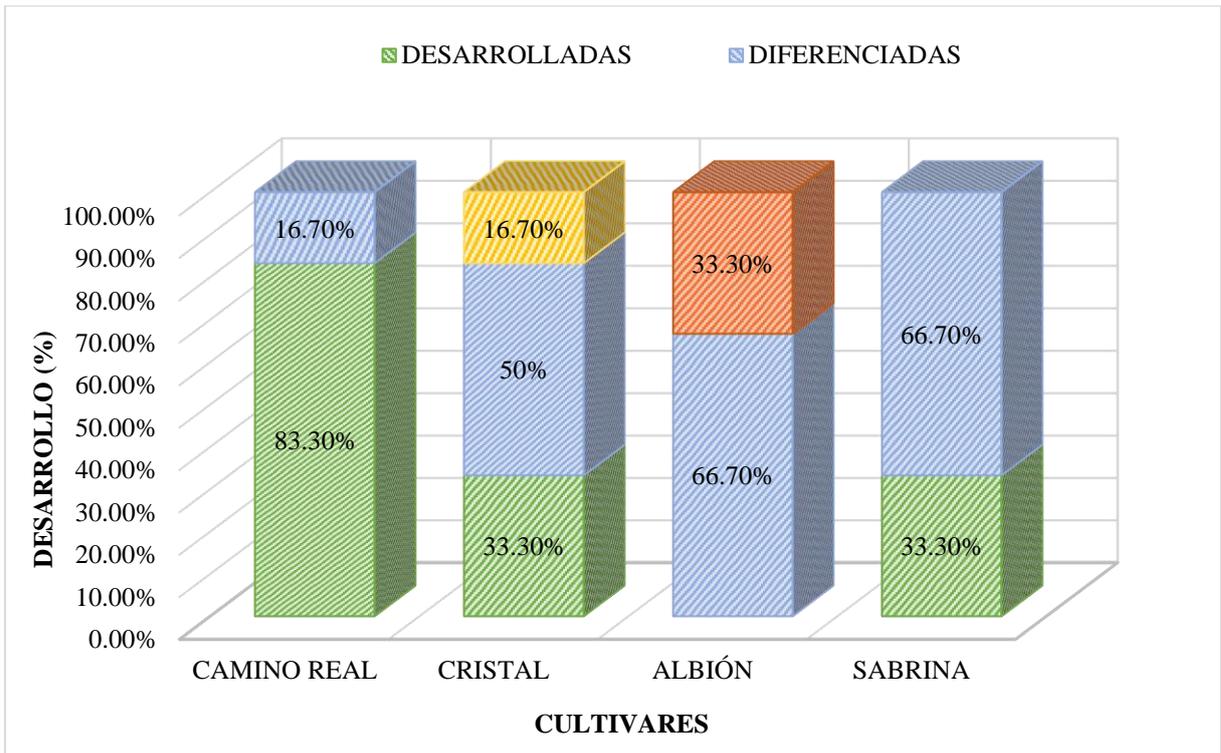


Figura 36: Respuestas del desarrollo de vitroplantas de los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina a los 35 días después de la transferencia a medio de inicio.

CULTIVAR	DESARROLLO DE VITROPLANTAS
CAMINO REAL	
KRISTAL	
ALBIÓN	
SABRINA	

Figura 37: Respuestas del desarrollo de vitroplantas de los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina a los 35 días después de la transferencia a medio de inicio.

4.3. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

4.3.1. PRIMER SUBCULTIVO

A. NÚMERO DE BROTES

Se aplicaron las siguientes pruebas de normalidad y homogeneidad, por consiguiente se aplicó la prueba paramétrica DCA.

Los resultados del análisis de varianza para el número de brotes se muestran en el Anexo 14, en el que se muestra que el p valor es mayor a 0.05, significa que todos los tratamientos son iguales.

En esta evaluación no se pudo determinar el mejor tratamiento, ya que los resultados eran similares entre los tratamientos (Tabla 21), por lo tanto se dio la evaluación del segundo subcultivo.

Tabla 21. Efecto de los tratamientos de multiplicación en la formación de brotes del primer subcultivo después de 30 días de evaluación.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Numero de brotes
M1	0	0	0	0	-
M2	1	0	0	0	4.6a
M3	1	0	0	0.5	3.2a
M4	1	1	0.1	0	2a
M5	4	0	0	0.5	1.2a

*Medias con la misma letra en la misma columna para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

4.3.2. SEGUNDO SUBCULTIVO

A. NÚMERO DE BROTES

La evaluación del segundo subcultivo se obtuvo datos los cuales se le aplicaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de variancia, por consiguiente se aplicó la prueba paramétrica DCA.

Los resultados del análisis de variancia para el número de brotes se muestran en el Anexo 15, en el que se muestra que el p valor es menor a 0.05, significa que al menos un tratamiento difiere a los demás.

En esta evaluación según la prueba comparativa de Tukey determina el mejor tratamiento (Tabla 22), pero comparando con el primer sub cultivo los resultados eran similares por lo se decidió que se realiza un tercer sub cultivo ya que los resultados eran similares entre los tratamientos M2, M3 Y M4.

Tabla 22. Efecto de los tratamientos de multiplicación en la formación de brotes del segundo sub cultivo después de 30 días de evaluación.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Numero de brotes
M1	0	0	0	0	-
M2	1	0	0	0	5.8ab
M3	1	0	0	0.5	3.8ab
M4	1	1	0.1	0	6.2a
M5	4	0	0	0.5	1.6b

*Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

4.3.3. TERCER SUBCULTIVO

Las respuestas de los diferentes tratamientos en el primer y segundo sub cultivo fueron similares en más de dos tratamientos, estableciéndose así el tercer sub cultivo. Se sembraron explantes con 3 peciolo y los resultados después de 8 semanas fueron analizados.

Se adicionaron variables cuantitativas como cualitativas, entre las cuantitativas las evaluadas fueron: Número de brotes propagables, número de brotes pequeños no propagables, peso fresco de brotes (g), altura de vitroplanta (mm), número hojas, longitud de foliolo alto (mm), peso fresco aéreo (g), longitud de raíces (mm), número de raíces, peso fresco de raíces (g), peso fresco total (g), peso seco total (g). Entre las cualitativas fueron: vigor, textura de foliolos, relación peciolo- foliolo, presencia de callos, y deformación de explante.

4.3.3.1. EN EL CULTIVAR CAMINO REAL

A. MEDICIÓN DE BROTES

El análisis de varianza de las variables número de brotes propagables, número de brotes pequeños no propagables y peso fresco de brotes, se encuentra en los Anexos 16, 17 y 18 respectivamente, que muestran diferencias significativas entre los tratamientos. En la Tabla 23 muestra las diferencias comparativas según Tukey.

El medio de cultivo de multiplicación M2 (MS+1mg/L BAP) obtuvo por explante transferido una media de 6.4 brotes propagables, 4 brotes pequeños no propagables y 0.173116g de peso fresco de brotes. El medio de multiplicación M4 (MS+1 mg/L BAP+1 mg/L IBA+0.1 mg/L AG3) obtuvo por explante transferido una media de 5.4 brotes propagables, 4.8 brotes pequeños no propagables y 0.17674g de peso fresco de brotes.

Según Emad Y. Youssief, (2009) y Emarah (2008) indicaron que el medio MS +1mg/L BAP obtuvo mayor número de brotes. De acuerdo con la presente investigación si cumple el medio M2.

Tabla 23. Respuestas en la formación de brotes en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en el cultivar Camino Real.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Nº de brotes propagables	Nº de brotes pequeños no propagables.	Peso fresco de brotes (g)
M1	0	0	0	0	1.4c	3cb	0.08314b
M2	1	0	0	0	6.4a	4ab	0.173116a
M3	1	0	0	0.5	2c	2.4c	0.09382b
M4	1	1	0.1	0	5.4a	4.8a	0.17674a
M5	4	0	0	0.5	3.4b	2c	0.15674a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

B. MEDICIONES DE HOJAS

El análisis de varianza de las variables altura de vitroplanta, longitud de foliolo alto, número de hojas y peso fresco aéreo (vitroplanta sin raíces), se encuentra en los Anexos 19, 20, 21 y 22 respectivamente, muestran diferencias significativas entre los tratamientos excepto la variable número de hojas. En la Tabla 24 muestra las diferencias comparativas según Tukey.

En la Tabla 24 muestra que las variables de altura de vitroplanta y longitud de foliolo, fueron superiores en los tratamientos M1 (MS), M3 (MS+1mg/L BAP+ 0.5g/L carbón activado) y M5 (MS+4mg/L BAP+0.5g/L carbón activado) lograron magnitudes superiores a los tratamientos M2 (MS+1mg/L BAP) y M4(MS+1 mg/L BAP+1 mg/L IBA+0.1 mg/L AG3).

Con respecto al peso fresco aéreo M5 obtuvo 0.46802g, ya que desarrolló vitroplantas con extensas estructuras de las siguientes variables: Altura de vitroplanta (33.5mm), número de hojas (12.56), longitud de foliolos altos (14.46mm). Asimilando así la concentración de 4mg/L BAP y 0.5g/L de carbón activado, sin embargo se obtuvo raíces y esta es una característica que no debe formar en sus primeros subcultivos, el cual se discute más adelante.

En base al propósito de la etapa de multiplicación que es la producción de brotes, el tratamiento M1 (testigo) y los medios MS complementados de carbón activado a las formulaciones, no son las indicadas para la producción de explantes, ya que permiten el desarrollo de hojas.

Tabla 24. Respuestas de la formación de hojas en la etapa de multiplicación del cultivar Camino Real.

Trat.	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Altura de vitroplanta (mm)	N° hojas	Longitud de foliolos altos (mm)	Peso fresco aéreo (g)
M1	0	0	0	0	35a	15a	12.64a	0.24340b
M2	1	0	0	0	13.2c	12.4a	6.82c	0.34094b
M3	1	0	0	0.5	22.1b	12.2a	10.70b	0.24340b
M4	1	1	0.1	0	15.0c	13.8a	9.64b	0.34248b
M5	4	0	0	0.5	33.5a	12.6a	14.46a	0.46802a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

C. MEDICIONES DE RAICES

El análisis de varianza de las variables longitud de raíz, número de raíces y peso fresco de raíces, se encuentra en los Anexos 23, 24 y 25 respectivamente, muestran diferencias significativas entre los tratamientos. En la Tabla 25 muestra las diferencias comparativas según Tukey.

En la tabla 25 muestra que los tratamientos M1, M3 y M5 lograron formar raíces de longitudes superiores a los tratamientos M2 y M4, así como el número de raíces y el peso fresco. Los medios M2 y M4 mostraron longitudes casi nulas.

Demuestra que las vitroplantas de fresa en los tratamientos M1, M3 y M5 se desarrollaron formando raíces, que en la producción de brotes. La producción de raíces de los medios M2 y M4 fue casi nula.

La absorción de nutrientes a través de los tejidos en contacto con el medio posee el mecanismo que se da por osmosis, de mayor a menor presión osmótica. (Morard & Henry, 1998; George 1993; Pierik & Steegmans, 1975)

Tabla 25. Respuestas de formación de raíces en la etapa de multiplicación del cultivar Camino Real.

Trat.	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Longitud de raíces (mm)	Número de raíces	Peso fresco de raíces (g)
M1	0	0	0	0	39.6b	11.4a	0.04836a
M2	1	0	0	0	4c	0.8c	0.00306c
M3	1	0	0	0.5	41.2b	3.4b	0.02802b
M4	1	1	0.1	0	0.2c	0.4c	0.00306c
M5	4	0	0	0.5	62.6a	4.2b	0.04740a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

D. PESO TOTAL

El análisis de variancia de las variables peso fresco total y peso seco total se muestran en los Anexos 26 y 27, que muestran diferencias significativas entre los tratamientos. En la Tabla 25 muestra las diferencias comparativas según Tukey.

La diferencia de pesos muestra la humedad contenida en la vitroplanta según los distintos tratamientos de multiplicación.

En la Tabla 26 se puede observar que el M5, fue el que acumuló mayor peso fresco y seco total (0.47500g y 0.07754g), la concentración de 4mg/L de BAP y el carbón activado favoreció en este aspecto de acumular mayor biomasa. El tratamiento M4 es el segundo en acumular peso (0.35150g y 0.05612g), según los resultados de brotes, este es el medio que más brotes acumuló y puede que este sea el factor que favoreció en la acumulación peso.

Tabla 26. Respuestas de peso fresco y seco total en la etapa de multiplicación del cultivar Camino Real.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Peso fresco total (g)	Peso seco total (g)
M1	0	0	0	0	0.31906b	0.05754b
M2	1	0	0	0	0.32998b	0.04980b
M3	1	0	0	0.5	0.26986b	0.05164b
M4	1	1	0.1	0	0.35150ab	0.05612b
M5	4	0	0	0.5	0.47500a	0.07754a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

E. VARIABLES CUALITATIVAS

Con respecto a las variables cualitativas, se evaluó: vigor, textura de hojas, relación peciolo-foliolo, presencia de callos y deformidad de explantes.

La Figura 38 muestra los valores de vigor y la Tabla 27 muestra que la predominancia vigor *robusto verde claro* se obtiene en el medio M4. Así mismo los tratamientos M3 y M5 contiene carbón activado, aunque el M5 contiene 4mg/L de BAP, mantuvo constante su vigor, la M3 presentó el 1ml/L de BAP, el cual indica que al aumentar el BAP hace mantenga su vigor.

El vigor *robusto verde claro* (RVc) es típico en los medios que se obtienen mayor cantidad de brotes, es decir que la vitroplanta no concentra mucho en la producción de clorofila para producir brotes.

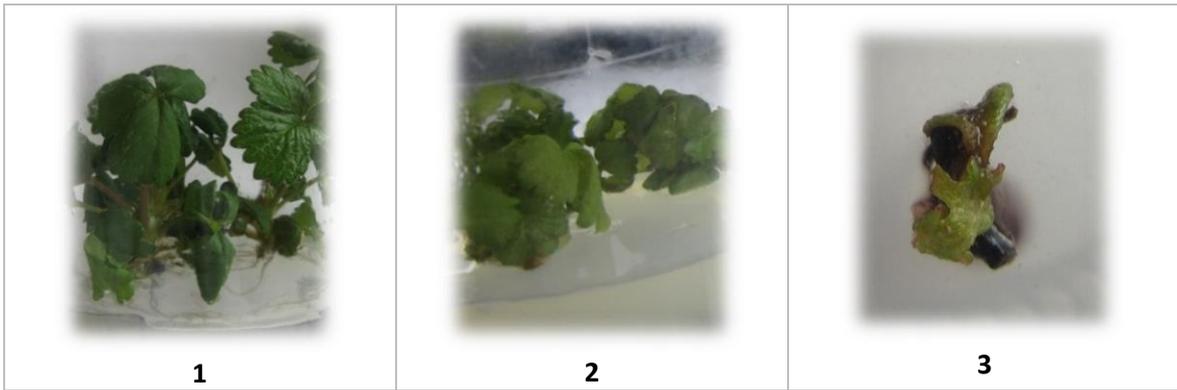


Figura 38: Valores de la variable vigor: (1) RVO: Robusto Verde Oscuro; (2) RVc: Robusto Verde claro; (3) vcm: Verde claro marchito.

Tabla 27. Respuestas del variable vigor en el cultivar Camino Real.

Tratamientos de medios de multiplicación	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
M1	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO
M2	RVO	RVc	RVc	vcm	RVc
M3	RVO	RVc	RVO	RVO	RVO
M4	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc
M5	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO

La Figura 39 muestra los valores de *textura de hojas* y la Tabla 28 muestra que la predominancia *textura coriácea* (C) se obtiene en los medio M2, M3 y M4. Esta variable también no es impedimento para la producción de brotes.

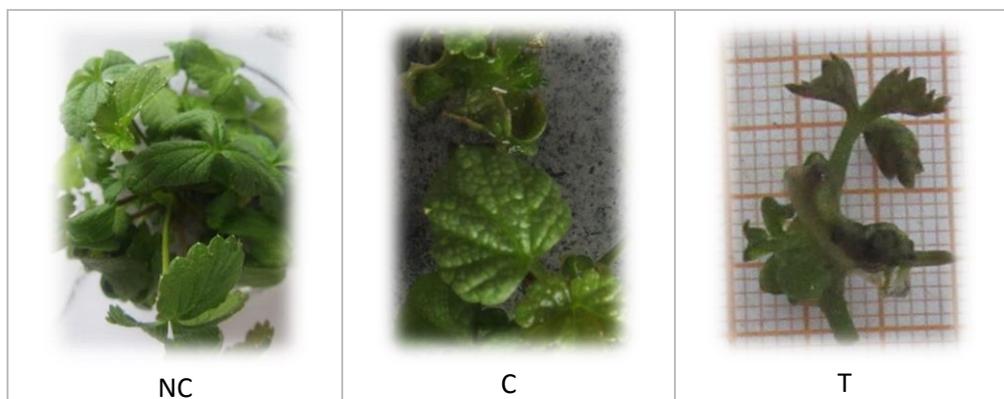


Figura 39: Valores de la variable Textura de hojas: (NC): No coriáceo; (C): Coriáceo; (T): Translucidos.

Tabla 28. Textura de hojas en el cultivar Camino Real.

Tratamientos de medios de multiplicación	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
M1	NC	NC	NC	NC	NC
M2	T	C	C	C	C
M3	C	C	C	C	C
M4	C	C	NC	C	C
M5	NC	C	C	NC	NC

La Figura 40 muestra los valores de *relación de peciolo - foliolo* y la Tabla 29 muestra que la predominancia *corto* (c) se obtiene en el medio M2 y M4. Esta variable se refuerza con las mediciones longitud de foliolo y longitud de hoja. Y el valor de que la vitroplanta sea de menor altura es típico en los medios que se obtienen mayor cantidad de brotes, es decir que la vitroplanta no concentra mucho en la producción de grandes dimensiones de longitud para producir brotes.



Figura 40: Valores de la variable Relación peciolo-foliolo: (1) A: Alto; (2) c: Corto.

Tabla 29. Relación de hoja- tallo en el cultivar Camino Real.

Tratamiento	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
M1	A	A	A	A	A
M2	c	c	c	c	c
M3	A	A	c	c	c
M4	c	c	c	c	c
M5	A	c	c	A	A

En la Figura 41, se puede apreciar explantes de diferentes tamaños y valores de *deformación de explantes*. En la Tabla 30 se observa la predominancia de explantes *no deformados* (ND) del medio M4. Es una cualidad de este medio ya que facilita la disección de brotes al momento de micropropagar.

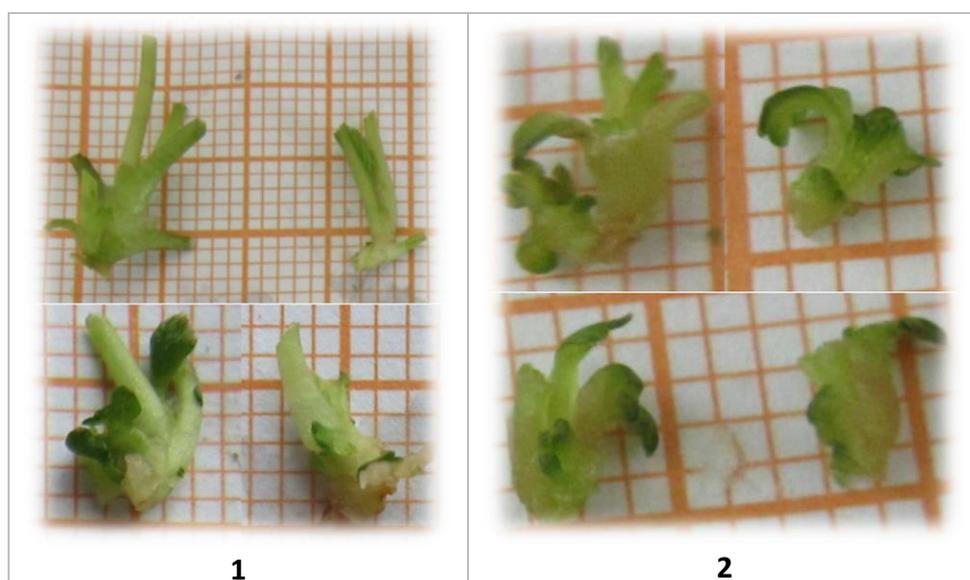


Figura 41: Valores de la variable deformidad del explante (1) ND: No deformado; (2) D: Deformado.

Tabla 30. Deformidad de explantes en el cultivar Camino Real

Tratamiento	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
M1	ND	ND	ND	ND	ND
M2	D	ND	D	D	D
M3	ND	ND	ND	ND	ND
M4	ND	ND	ND	ND	ND
M5	ND	ND	ND	ND	ND

En la Figura #, se puede apreciar explantes con valores de *presencia de callos*. En la Tabla # se observa la con presencia de *callos transparentes* (CT) y *callos blancos* (B) en los medios M2 y M4, Aunque el medio M2 tiene vitroplantas que *no presentaron callos* (NC). La concentración de 1mg/L de IBA promovió obtener vitroplantas con menor cantidad de callos.



Figura 42: Valores de la variable presencia de callos: (1) NC: No hay callos; (2) B: Callos blancos; (3) CT: Callos translucidos.

Tabla 31. Presencia de callos en el cultivar Camino Real.

Tratamiento	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
M1	NC	NC	NC	NC	NC
M2	B	CT	B	NC	NC
M3	NC	NC	B	NC	NC
M4	CT	CT	CT	B	CT
M5	NC	NC	NC	NC	NC

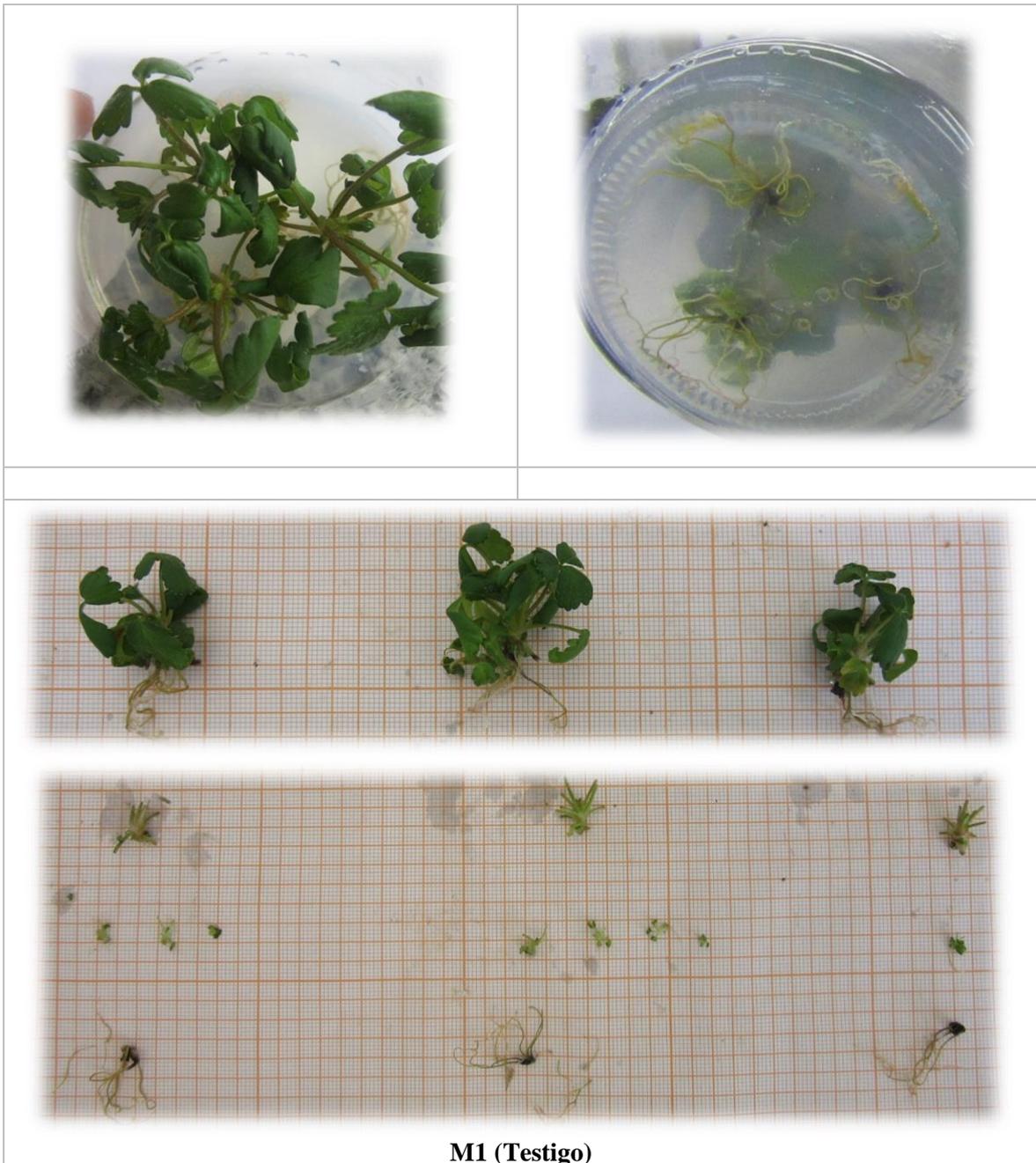


Figura 43: Resultados del tratamiento de multiplicación M1 (MS) del cultivar Camino Real.

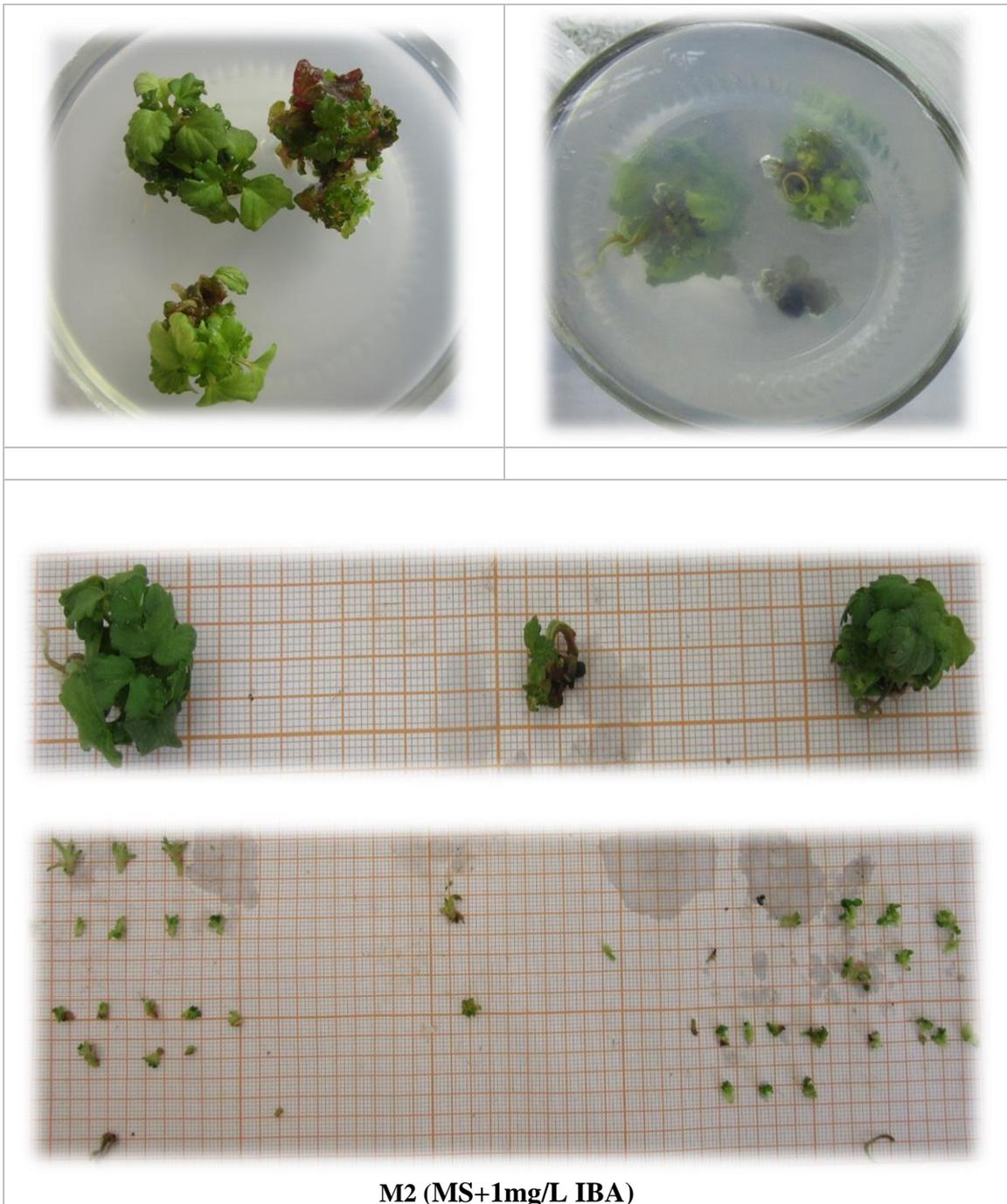


Figura 44: Resultados del tratamiento de multiplicación M2 (MS+1mg/L IBA) del cultivar Camino Real.

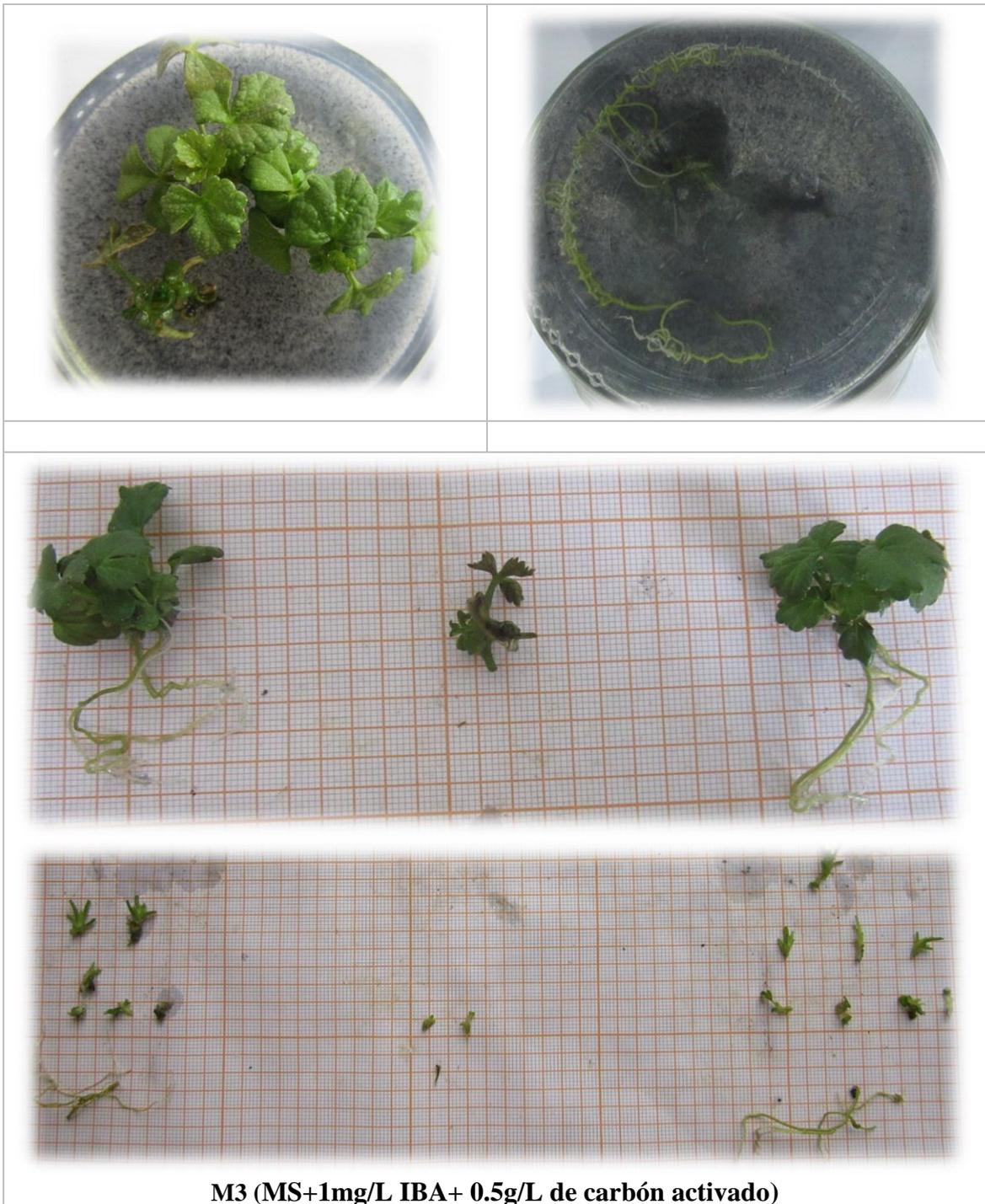


Figura 45: Resultados del tratamiento de multiplicación M3 (MS+1mg/L IBA+ 0.5g/L de carbón activado) del cultivar Camino Real.

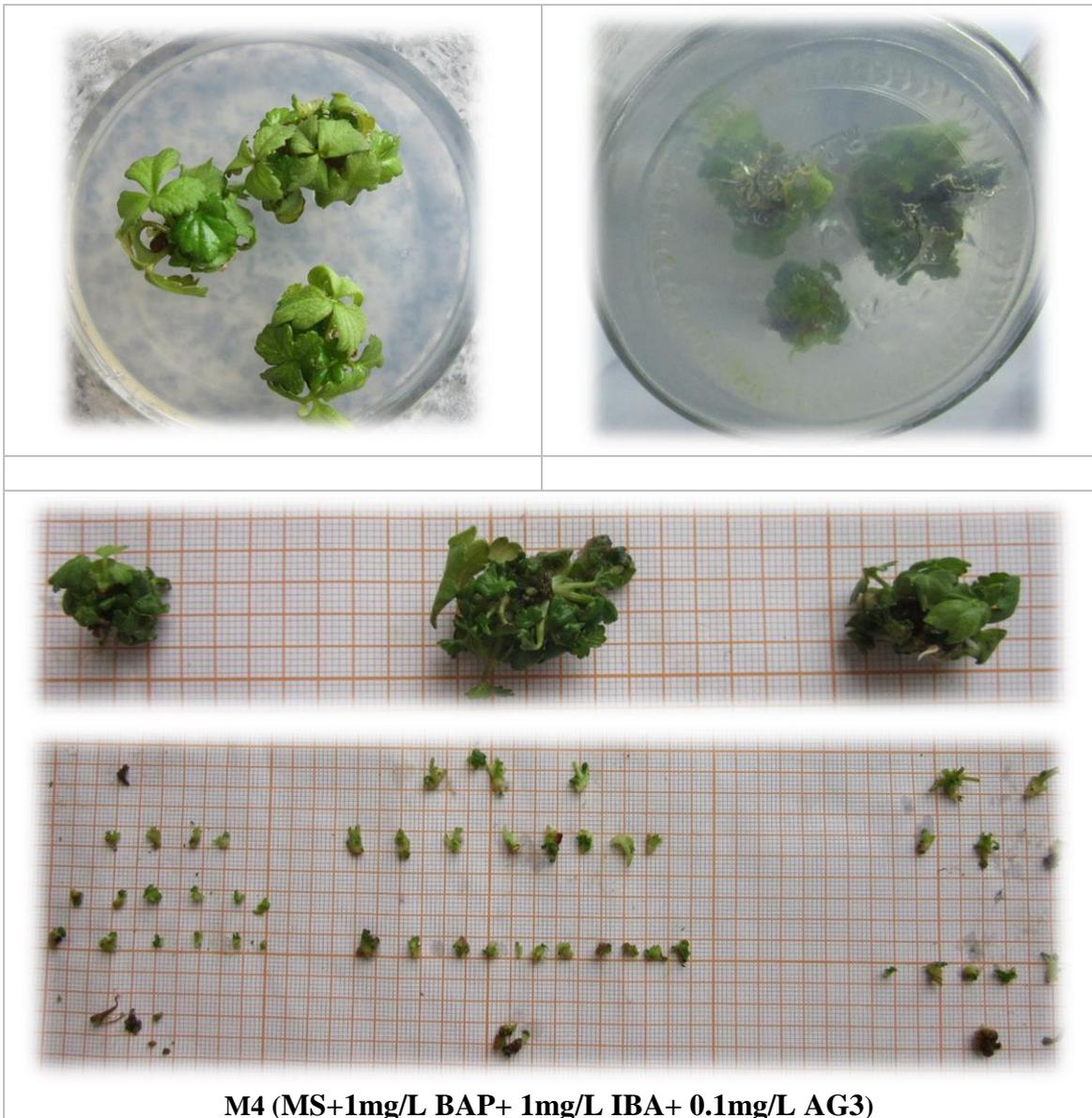


Figura 46: Resultados del tratamiento de multiplicación M4 (MS+1mg/L BAP+ 1mg/L IBA+ 0.1mg/L AG3) del cultivar Camino Real.

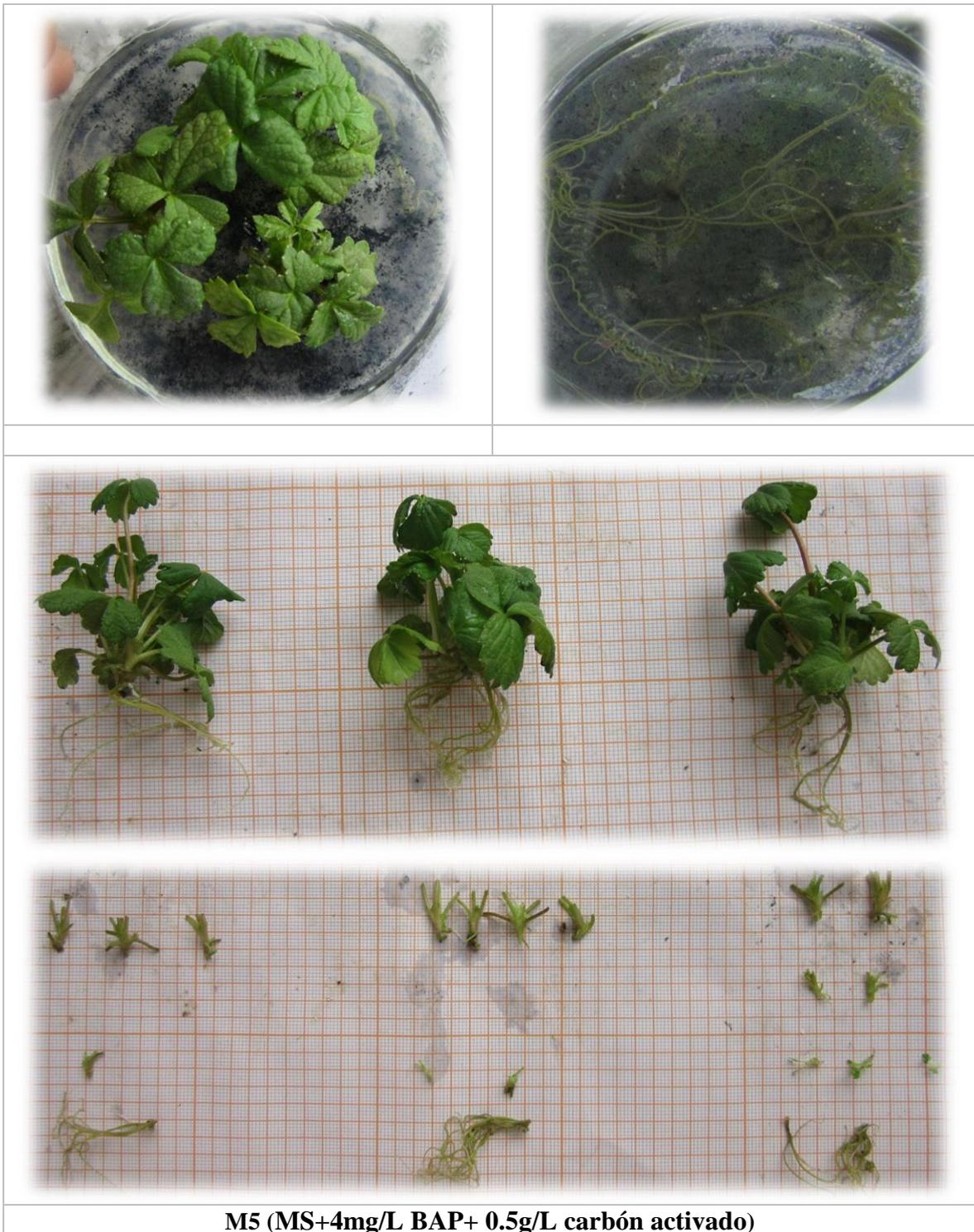


Figura 47: Resultados del tratamiento de multiplicación M5 (MS+4mg/L BAP+ 0.5g/L carbón activado) el cultivar Camino Real.

4.3.3.2. EN LOS CULTIVARES

La multiplicación de los diferentes explantes en el medio de cultivo *in vitro* puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes principales.

Según los análisis estadísticos en los datos obtenidos de los cultivares, se puede apreciar que los cultivares Cristal, Albión y Sabrina obtuvieron respuestas similares al cultivar Camino Real.

A continuación se muestran los resultados que más adelante se discutirán.

A. MEDICIÓN DE BROTES

El análisis de variancia de la variable número de brotes propagables de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 28, 40 y 52 respectivamente), muestran que son significativos.

En la tabla 32, el cultivar Albión respondió bien en la cantidad de brotes con una media de 10 en el tratamiento M4. Mientras que en el tratamiento M2 (MS+1mg/L BAP) obtuvo una media de 9.3. Con respecto al tratamiento M2, en la producción de brotes propagables, le siguieron los cultivares Camino Real, Sabrina y Albión con medias de 6.4, 6 y 4 respectivamente y 5.4, 6 y 6 con el tratamiento M4.

Tabla 32. Respuestas en el número de brotes propagables en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albión	Sabrina
M1	0	0	0	0	1.4c	1c	1b	1.6b
M2	1	0	0	0	6.4a	4ab	9.3a	6a
M3	1	0	0	0.5	2c	2bc	2.3b	2b
M4	1	1	0.1	0	5.4a	6a	10a	6a
M5	4	0	0	0.5	3.4b	1.7c	2b	2b

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

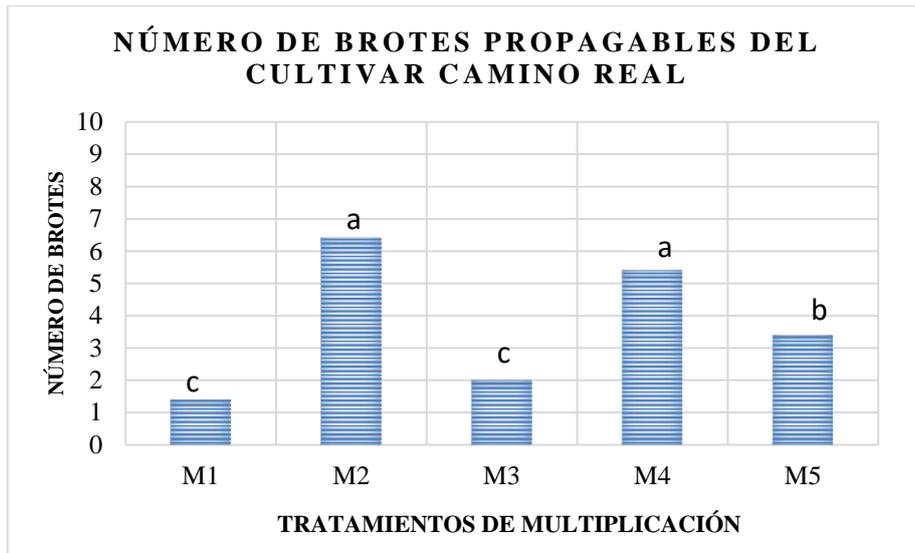


Figura 48: Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables en el cultivar Camino Real.

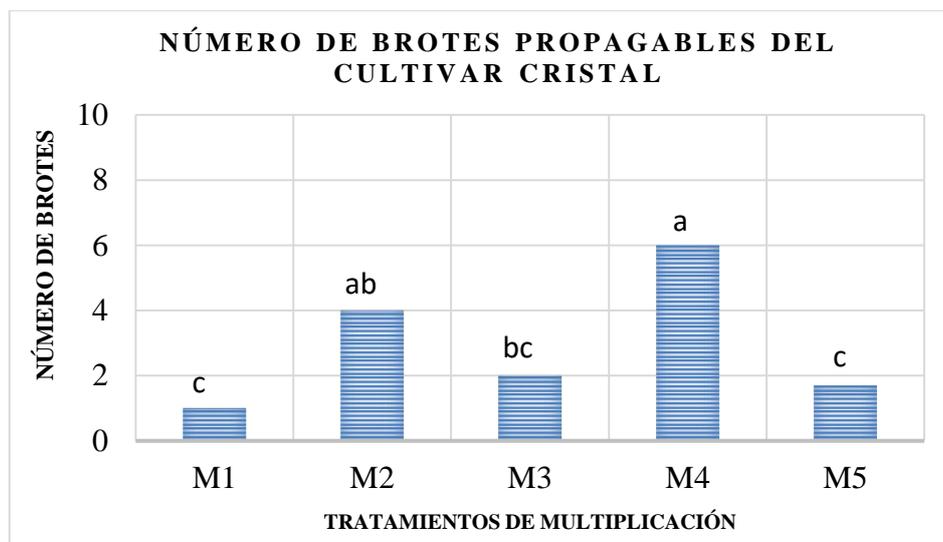


Figura 48: Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables en el cultivar Cristal.

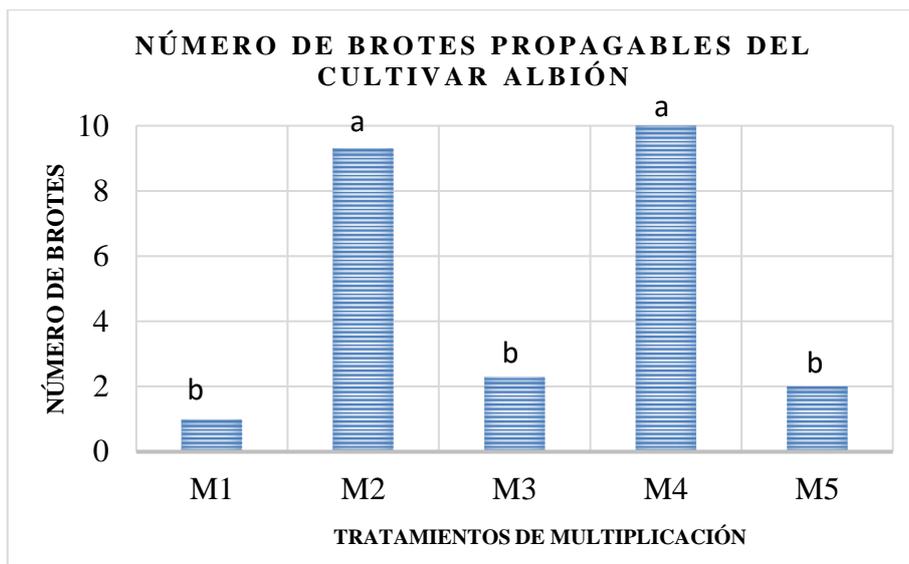


Figura 48: Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables en el cultivar Albión.

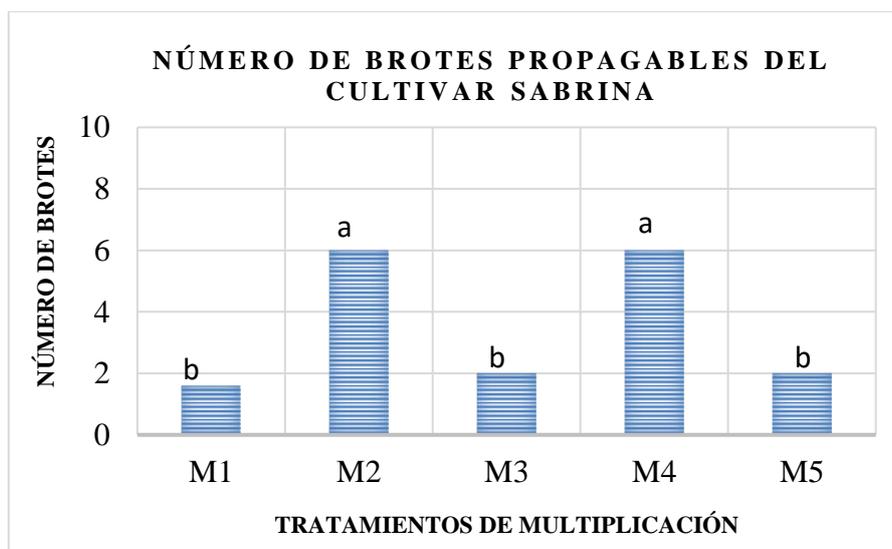


Figura 48: Resultados de los tratamientos de multiplicación en el número de brotes propagables en el cultivar Sabrina.

El análisis de variancia de la variable número de brotes pequeños no propagables de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 29, 41 y 53 respectivamente), muestran que los cultivares Camino Real y Sabrina son significativos, mientras que Cristal y Albión no.

En la tabla 33, el cultivar Sabrina y Camino Real obtuvieron una media de 5 y 4 brotes pequeños no propagables en el medio de cultivo M2 (MS+1mg/L BAP), mientras que en el tratamiento M4 (MS+1mg/L BAP +1mg/L IBA+ 0.5g/L carbón activado) obtuvo una media de 4 y 4.8 respectivamente.

Los brotes pequeños no propagables son explantes inmaduros, pero, que al sembrarlas adjuntas con los explantes propagables se desarrollan, proveyendo de mas explantes para las siguientes semanas.

Tabla 33. Respuestas en número de brotes pequeños no propagables en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	3d	1a	0a	1b
M2	1	0	0	0	4ab	2a	3a	5a
M3	1	0	0	0.5	2.4bc	2a	1a	1b
M4	1	1	0.1	0	4.8a	2a	1a	4a
M5	4	0	0	0.5	2cd	0a	1a	1b

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

El an3lisis de variancia de la variable peso fresco de brotes de los cultivares Cristal, Albi3n y Sabrina (Anexo 30, 42 y 54 respectivamente), muestran que los cultivares Camino Real y Albi3n son significativos, mientras que Cristal y Sabrina no.

En la tabla 34, el cultivar Camino Real y Albi3n obtuvieron una media de 0.173116g y 0.037167g peso fresco de ra3ces en el medio de cultivo M2 (MS+1mg/L BAP), mientras que en el tratamiento M4 (MS+1mg/L BAP +1mg/L IBA+ 0.5g/L carb3n activado) obtuvieron medias de 0.17674g y 0.058867g.

Tabla 34. Respuestas en peso fresco de explantes en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Trat	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	0.08314b	0.024767b	0.021600b	0.04148a
M2	1	0	0	0	0.173116a	0.086467a	0.037167ab	0.06890a
M3	1	0	0	0.5	0.09382b	0.081667a	0.024967b	0.04470a
M4	1	1	0.1	0	0.17674a	0.047300b	0.058867a	0.06900a
M5	4	0	0	0.5	0.15674a	0.095833a	0.034133ab	0.04552a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

B. MEDICI3N DE HOJAS

El an3lisis de variancia de la variable altura de vitroplanta de los cultivares Cristal, Albi3n y Sabrina (Anexo 31, 43 y 55 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicaci3n de los cultivares son significativas.

En la tabla 35, los cultivares Cristal, Albi3n y Sabrina, obtuvieron vitroplantas de menor tama1o, indicadas ya anteriormente que este es una caracter3stica de vitroplantas productoras de brotes. Con referencia al cultivar Camino real, los dem3s cultivares se desarrollaron de manera similar, frente a los medios. Los cultivares en los tratamientos M2 y M4 fueron los que obtuvieron menor altura.

Tabla 35. Respuestas en la altura de vitroplanta en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicaci3n en los cultivares.

Trat.	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carb3n activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	35a	17.0c	42.0a	31.3a
M2	1	0	0	0	13.2c	35.3b	20.7b	20.4b
M3	1	0	0	0.5	22.1b	35.3b	37.3ab	25.1ab
M4	1	1	0.1	0	15.0c	25.0c	27.7ab	20.2b
M5	4	0	0	0.5	33.5a	48.3a	29.3ab	31.0a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

El análisis de variancia de la variable longitud de foliolos altos de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 32, 44 y 56 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicación de los cultivares Camino Real y Cristal son significativas.

En la tabla 36, los cultivares Cristal, Albión y Sabrina, tienen predominancia de foliolos de menor longitud. Sin embargo, esto no se cumple en Cristal y Sabrina, ya que la medición de la variable longitud de foliolo alto es relativa, de manera que, se midió únicamente el foliolo alto, en los medios M2 y M4, solo tenían un foliolo grande, las demás eran muy pequeñas.

Tabla 36. Respuestas en la longitud de foliolos altos en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albión	Sabrina
M1	0	0	0	0	12.64a	9b	15.5a	13.52a
M2	1	0	0	0	6.82c	18a	11.83a	15.86a
M3	1	0	0	0.5	10.70b	17.7a	17.67a	12.52a
M4	1	1	0.1	0	9.64b	19a	11.83a	14.54a
M5	4	0	0	0.5	14.46a	20a	13.33a	12.9a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

El análisis de variancia de la variable número de hojas de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 33, 45 y 57 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicación no muestran significancia, a excepción del cultivar Albión.

Tabla 37. Respuestas en el número de hojas el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Tratamientos de multiplicación	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	15a	8a	9ab	7a
M2	1	0	0	0	12.4a	6a	4.3c	10.8a
M3	1	0	0	0.5	12.2a	6a	7.3abc	4.2a
M4	1	1	0.1	0	13.8a	6a	10a	6.6a
M5	4	0	0	0.5	12.6a	4.3a	5.3bc	6a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

El an3lisis de variancia de la variable peso fresco a3reo (vitroplanta sin ra3ices) de los cultivares Cristal, Albi3n y Sabrina (Anexo 34, 46 y 58 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicaci3n de los cultivares son significativas.

En la tabla 38, se observa que los pesos en gramos mayores obtenidos fueron obtenidos por los siguientes cultivares: Albi3n pes3 0.53380g en el tratamiento M4, Cristal, acumul3 0.39147g en el tratamiento M5 y Sabrina con 0.26540g y 0.25200g en los tratamientos M4 y M2 respectivamente. Con respecto a estos pesos Camino Real queda entre Albi3n y Cristal.

Tabla 38. Respuestas en el peso fresco a3reo en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicaci3n en los cultivares.

Trat.	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carb3n activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	0.24340b	0.08103b	0.23527bc	0.18700ab
M2	1	0	0	0	0.34094b	0.34997a	0.23107c	0.25200a
M3	1	0	0	0.5	0.24340b	0.31980a	0.33173b	0.13180b
M4	1	1	0.1	0	0.34248b	0.27767a	0.53380a	0.26540a
M5	4	0	0	0.5	0.46802a	0.39147a	0.22053c	0.18420ab

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

C. MEDICIÓN DE RAÍCES

El análisis de variancia de la variable longitud de raíces de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 35, 47 y 59 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicación de los cultivares son significativas.

En la Tabla 39, se observa que los medios M2 y M4 con respecto al cultivar Camino Real y los demás, la elongación de raíces fue casi nula.

Tabla 39. Respuestas en la longitud de raíces en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Trat.	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albión	Sabrina
M1	0	0	0	0	39.6b	23.3c	41a	46.2a
M2	1	0	0	0	4c	5.3d	0b	5c
M3	1	0	0	0.5	41.2b	61a	51a	34b
M4	1	1	0.1	0	0.2c	1.7d	6b	5c
M5	4	0	0	0.5	62.6a	40.7b	59a	36b

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

La variable número de raíces está ligado a la longitud de raíces, sin embargo, se procedió hacer el análisis de variancia de la variable mencionada de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 36, 48 y 60 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicación de los cultivares son significativas.

En la Tabla 40, se observa que los medios M2 y M4 con respecto al cultivar Camino Real y los demás, la elongación de raíces fue casi nula.

Tabla 40. Respuestas en el número de raíces en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Trat.	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	11.4a	3.3b	9.3a	3.8a
M2	1	0	0	0	0.8c	2.3c	0.0d	0.0c
M3	1	0	0	0.5	3.4b	5ab	5.3b	0.6c
M4	1	1	0.1	0	0.4c	0.0c	0.7cd	0.0c
M5	4	0	0	0.5	4.2b	5.7a	2.0c	1.8b

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

La variable n3mero de ra3ces tambi3n est3 ligado a la peso fresco de ra3ces, sin embargo, se procedi3 hacer el an3lisis de variancia de la variable mencionada de los cultivares Cristal, Albi3n y Sabrina (Anexo 37, 49 y 61 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicaci3n de los cultivares son significativas.

En la Tabla 41, se observa que los medios M2 y M4 con respecto al cultivar Camino Real y las dem3s, la elongaci3n de ra3ces fue casi nula.

Tabla 41. Respuestas en el peso fresco de ra3ces en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicaci3n en los cultivares.

Trat	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carb3n activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	0.04836a	0.01703b	0.03340b	0.06554a
M2	1	0	0	0	0.00306c	0.00167c	0d	0.00128d
M3	1	0	0	0.5	0.02802b	0.04953b	0.09330a	0.01432c
M4	1	1	0.1	0	0.00306c	0c	0.01007cd	0.00134d
M5	4	0	0	0.5	0.04740a	0.07430a	0.02163bc	0.03022b

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

D. PESO FRESCO Y SECO TOTAL

La diferencia de pesos totales (g) muestra la humedad contenida en la vitroplanta según los distintos tratamientos de multiplicación.

El análisis de variancia de la variable peso fresco total de los cultivares Cristal, Albión y Sabrina (Anexo 38, 50 y 62 respectivamente), muestran que los tratamientos de multiplicación de los cultivares son significativas. Asimismo, se hizo en la variable peso seco (Anexo 39, 51 y 63 respectivamente) muestran que los tratamientos de multiplicación de los cultivares son significativas.

En la Tabla 42 y 43, se observa que el cultivar Albión fue el que acumuló mayor peso fresco, con una media de 0.54387g y peso seco total 0.099000g en el tratamiento M4, le sigue Cristal 0.64387g de peso fresco total y 0.088233g peso seco total en el tratamiento M2, luego Camino Real 0.47500g de peso fresco total y 0.07754g de peso seco total en el tratamiento M5 y después Sabrina 0.25496g y 0.03850g de peso fresco y seco respectivamente.

Tabla 42. Respuestas en el peso fresco total en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Trat.	BAP (mg /L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albión	Sabrina
M1	0	0	0	0	0.31906b	0.08577d	0.26867c	0.16236b
M2	1	0	0	0	0.32998b	0.64387a	0.23107c	0.25496a
M3	1	0	0	0.5	0.26986b	0.36933bc	0.40837b	0.14338b
M4	1	1	0.1	0	0.35150ab	0.27767c	0.54387a	0.25246a
M5	4	0	0	0.5	0.47500a	0.46577b	0.24183c	0.20018ab

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

Tabla 43. Respuestas en el peso seco total en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación en los cultivares.

Trat	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	AG3 (mg/L)	Carbón activado (g/L)	Camino Real	Cristal	Albi3n	Sabrina
M1	0	0	0	0	0.05754b	0.016267c	0.043600b	0.03544a
M2	1	0	0	0	0.04980b	0.088233a	0.039133b	0.03850a
M3	1	0	0	0.5	0.05164b	0.068367ab	0.080867a	0.02970a
M4	1	1	0.1	0	0.05612b	0.054500b	0.099000a	0.04276a
M5	4	0	0	0.5	0.07754a	0.077467ab	0.044300b	0.03362a

*medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notaci3n Tukey).

E. VARIABLES CUALITATIVAS

Las respuestas de las variables cualitativas (Anexos 64, 65, 66, 67 y 68) muestran similitud en entre los cultivares.

En el Anexo 64, la predominancia del *vigor robusto verde claro* (RVc) fue en medio M2 y mientras que la M4 present3 tambi3n este vigor en excepci3n al cultivar Cristal en un 100% de *vigor robusto verde oscuro* (RVO).

En el Anexo 65, la predominancia de *textura de hojas coriáceas* (C) fue en medio M2 y M4.

En el Anexo 66, la predominancia de *relaci3n de peciolo-foliolo corto* (c) fue en medio M2 y mientras que la M4 present3 tambi3n este vigor en excepci3n al cultivar Cristal en un 100% de *relaci3n de peciolo-foliolo alto* (A).

En el Anexo 67, la predominancia de la *no deformidad de explantes* (ND) fue de un 100% en los tratamientos M1, M3, M4 y M5 y mientras que la M2 present3 tambi3n este vigor en excepci3n al cultivar Camino Real en un 80% de *deformidad de explantes* (D), en Albi3n con un 33.3% y Sabrina con 60% de esta característica.

En el Anexo 68, la predominancia de la *no presencia de callos* (NC) fue de los tratamientos M1, M3 y M5 y mientras que la M2 present3 tambi3n esta característica excepci3n al cultivar Camino Real y Sabrina en un 20% y 40% de *presencia de callos translucidos* (CT) respectivamente y 40% de *presencia de callos blancos*. En M4 present3 la *presencia de*

callos translucidos (CT) en un 80% el cultivar Camino Real, 33.3% en Cristal, 100% en Albión.



Figura 52: Separación de folíolos, brotes y raíces de los cultivares Cristal y Albión.

INIA (2015) ya había reportado que con 1mg/L de BAP el índice de multiplicación era de 5-6 yemas por vitroplanta, con lo cual aumentaba de forma exponencial cada 8 semanas.

Murari Lal. *et al.* (2003) demostraron que con una concentración de 4mg/L de BAP, el número máximo de brotes fue de 10.1; 12.9 y 13.8 en los cultivares Chandler (día neutro), Oso Grande (día corto) y Ofra, respectivamente. Aunque, en esta investigación, se le adicionó 0.5 g/L de carbón activado, el cual permitió desarrollar hojas grandes y vigorosas, además, raíces largas. Sin embargo, no influyó en el número de brotes.

La etapa de multiplicación es muy importante en el proceso de micropropagación, los resultados indicaron que el medio de multiplicación M2 (MS+ **1mg /L BAP**) y M4 (MS+**1mg/L BAP**+ **1mg/L IBA** + **0.1mg/L AG3**) resultaron ser los mejores para la formación de brotes, el número de brotes. Mientras que M2 presentaban callos blancos entre los brotes, deformidad de callos textura de hojas coriáceas, en el cultivar Camino Real producía más brotes que M4 que presentaba similares características cualitativas menos deformación de brotes. En el cultivar Albión ambos tratamientos M2 y M4 se obtuvieron el máximo número de brotes. En el cultivar Sabrina se obtuvo resultados muy parecidos al de Camino Real, mientras que en el cultivar Cristal, el M4 fue el mejor medio de multiplicación.

Con respecto al tratamiento de multiplicación M3 (MS+ **1mg /L BAP** + 0.5g/L de carbón activado), es igual al M2, con la diferencia de la adición de 0.5g/L de carbón activado, sin embargo sus resultados fueron menores, aunque aparentemente lucen vigorosas, mayor longitud de hojas, de mayor altura de las vitroplantas, raíces largas, brotes grandes, producidas por los explantes en este medio. El tratamiento M5 (4mg/L de BAP+0.5g/L de carbón activado) obtuvo buenos resultados en el cultivar Camino Real en comparación a los demás cultivares.

Ashrafuzzaman, M., *et al* (2013) indicaron que la concentración de 0,5 mg/L de BAP registró el número máximo promedio de 7 brotes y 3.34cm de longitud.

Los resultados están de acuerdo con los de Y. Youssief, E. (2009) que indicó que 1mg/L de BAP resultó ser el mejor medio para la multiplicación en el cultivar Sweet Charlie. Emarah (2008) informó de que el 1mg/L BAP presentó el mayor número de brotes registrado, seguido del tratamiento que contenía **1mg/L de BAP** y **0.1mg/L de IBA**, que reportó una respuesta similar. La importancia de BAP, en la formación de brotes de fresa, también se informó por Lal, M. *et al.* (2003) quienes encontraron que se observó el número máximo de brotes por explante en un medio MS+ **4,0 mg/L de BAP**, en cultivares de Chandler, Oso

Grande y Ofra. Lopez *et al.* (1994) indicó que el uso de bajas concentraciones de BAP en la fresa ha sido recomendado por varios autores, ya que disminuye el riesgo de anomalías fenotípicas después del establecimiento de plantas *in vitro* en el campo, Simpson D.W. (1989). Singh y Pandey (2004) informaron de que el medio 1/2MS, 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de IBA produjo el mayor número de brotes (13 por explante).

Económicamente, la división dentro de los brotes aislados no es muy fácil, se tarda mucho tiempo. Por lo tanto, después de una o dos transferencias por medio de proliferación, el grupo se divide ahora más o menos en cuatro o cinco pequeños brotes. Para mantener una alta tasa de proliferación, las transferencias deben realizarse inmediatamente después de la aparición de las primeras raíces. De esta manera, la tasa de proliferación es de aproximadamente cuatro a cinco veces por mes, es decir, varios millones de una meristemo en sólo un año (Anon, 1982). Lopes *et al.* (1994) explicó que el número de sub cultivos (3-8) no afecta la productividad; señalaron que surgen problemas cuando se utiliza el material con más de 10 sub cultivos.

4.4. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

Se sembró las vitroplantas cortando al ras las raíces. La evaluación de las variables de cada tratamiento de la etapa de enraizamiento se realizó 3 semanas después de la siembra.

El análisis estadístico que se hizo en todas las variables que se distribuyeron normalmente se empleó un diseño completamente al azar (DCA)

A. MEDICIÓN DE BROTES PEQUEÑOS

Los datos de la variable número de brotes fueron analizados el cual cumplieron una distribución normal, aplicándose un prueba paramétrica DCA, los análisis de variancia se muestran en los Anexos 69.

El p-valor resultó ser mayor de 0.05, es decir que todos los tratamientos fueron iguales.

B. MEDICIÓN DE HOJAS

Los datos de las variables Altura de vitroplanta, Número de hojas, longitud de foliolo alto, peso fresco de hojas y peso seco de hojas fueron analizados el cual cumplieron una

distribución normal, aplicándose un prueba paramétrica DCA, los análisis de variancia se muestran en los Anexos 70, 71, 72, 73 y 74 respectivamente.

Respectivamente sus p-valor de cada variable analizada mostraron que son mayores de 0.05, excepto la variable de longitud de hoja alta, que salió menor de 0.05, es decir que al menos un tratamiento es diferente a los demás.

La longitud de hoja representativa se desarrolló mejor en el medio *in vitro* de enraizamiento R4 (1MS+2mg/L de IBA+ 0.5g/L de carbón activado).

Los datos de la variable número de hojas se esperó el aumento de hojas después de 3 semanas, sin embargo los resultados muestran que se mantuvo la cantidad de hojas mayores a través en los diez tratamientos.

El peso fresco y seco aéreo (vitroplanta menos raíces) no presentaron significancia, con respecto a estas variables, todos los tratamientos son iguales.

Tabla 44. Influencia de los diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la formación de hojas vitroplanta de *Fragaria x ananassa* Duch.

Trat.	MS	IBA (mg/l)	Carbón activado (g/L)	Altura de vitroplanta (mm)	Longitud de hoja (mm)	Nº hojas	Peso fresco de hojas (g)	Peso seco de hojas (g)
R1	1	0	0	45.120a	11.58abc	9a	0.27588a	0.0484 ^a
R2	1	0	0.5	52.98a	13.62ab	8a	0.34716a	0.05624 ^a
R3	1	0.5	0.5	49.18a	12.38abc	9a	0.30854a	0.04986 ^a
R4	1	2	0.5	49.48a	13.90 ^a	9a	0.34306a	0.05606 ^a
R5	½	1	0.5	54.74a	11.88abc	8a	0.31632a	0.04490 ^a
R6	½	2	0.5	61.40a	11.02abc	9a	0.31850a	0.04308 ^a
R7	1	0.5	0	51.74a	11.26abc	10a	0.29182a	0.05138 ^a
R8	1	2	0	49.54a	10.54bc	10a	0.26964a	0.04824 ^a
R9	½	1	0	50.50a	9.64c	9a	0.25436a	0.04770a
R10	½	2	0	45.42a	10.30bc	9a	0.26154a	0.04974a

*Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

C. MEDICIÓN DE RAICES

Los datos de las variables longitud de raíces (mm), número de raíces, peso fresco de raíces (g) y peso seco de raíces (g), fueron analizados de los cuales cumplieron una distribución normal, aplicándose la prueba paramétrica DCA, los análisis de variancia se muestran en los Anexos 75, 76, 77 y 78. Respectivamente sus p-valor de cada variable analizada mostraron que son menores de 0.05, es decir que al menos un tratamiento es diferente a los demás. Efectivamente se hizo la prueba comparativa de Tukey a los datos de las variables mencionadas (Tabla 45).

El tratamiento de medio de enraizamiento R9 (1/2MS+ 1mg/L de IBA) acumuló mayor peso fresco de raíces de 0.13670g, sin embargo, el tratamiento R10 (1/2MS+ 2mg/L de IBA)

acumuló mayor peso seco de raíces de 0.02266g. Los resultados se aprecian en las Figuras 53, 54 y 55.

Tabla 45. Influencia de los diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la formación de raíces de la vitroplanta de *Fragaria x ananassa* Duch.

Tratamiento	MS	IBA (mg/l)	Carbón activado (g/L)	Longitud de raíces (mm)	Número de raíces	Peso fresco raíces (g)	Peso seco raíces (g)
R1	1	0	0	38.22b	9.2c	0.05028c	0.00912bc
R2	1	0	0.5	51.98a	8.4c	0.06052bc	0.00896bc
R3	1	0.5	0.5	44.38ab	8.2c	0.05670cb	0.00968bc
R4	1	2	0.5	45.36ab	7.6c	0.05992bc	0.01022bc
R5	½	1	0.5	52.34a	8.4c	0.04196c	0.00630c
R6	½	2	0.5	55.74a	11c	0.05220bc	0.00894bc
R7	1	0.5	0	18.22c	16bc	0.08600bc	0.01239bc
R8	1	2	0	12.64c	24.8a	0.11942abc	0.01674ab
R9	½	1	0	15.48c	23.4ab	0.13670ab	0.01746ab
R10	½	2	0	14.3c	24.4ab	0.17540a	0.02266 ^a

*Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

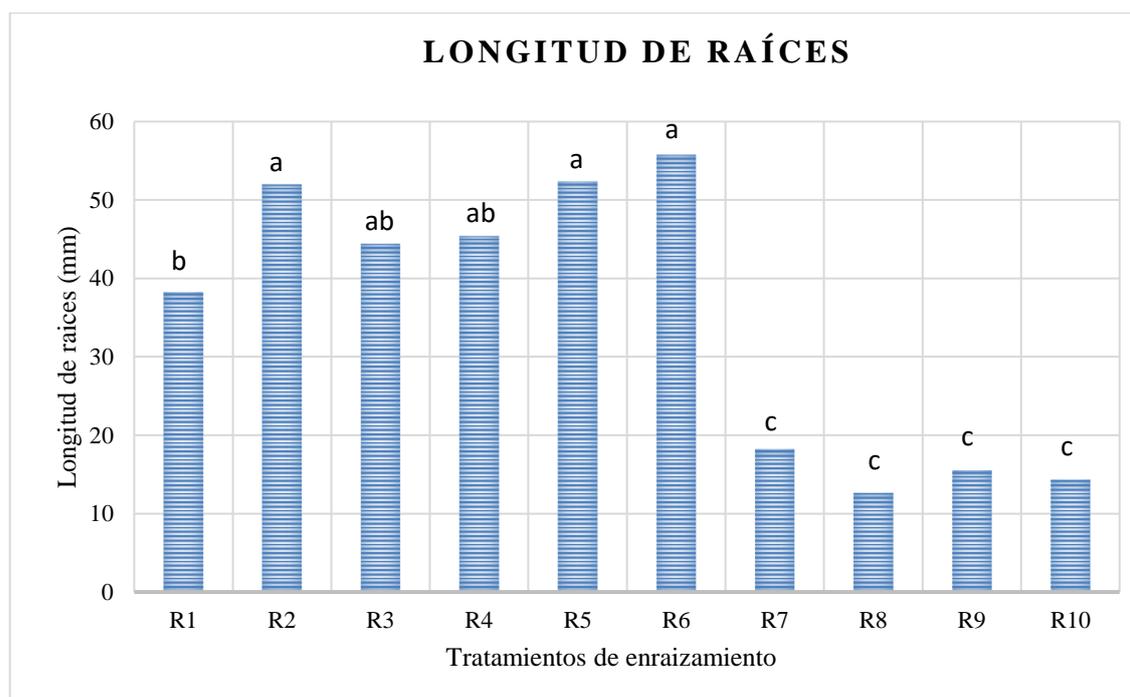


Figura 53: Influencia de los tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la longitud de raíces de la vitroplanta *Fragaria x ananassa* Duch.

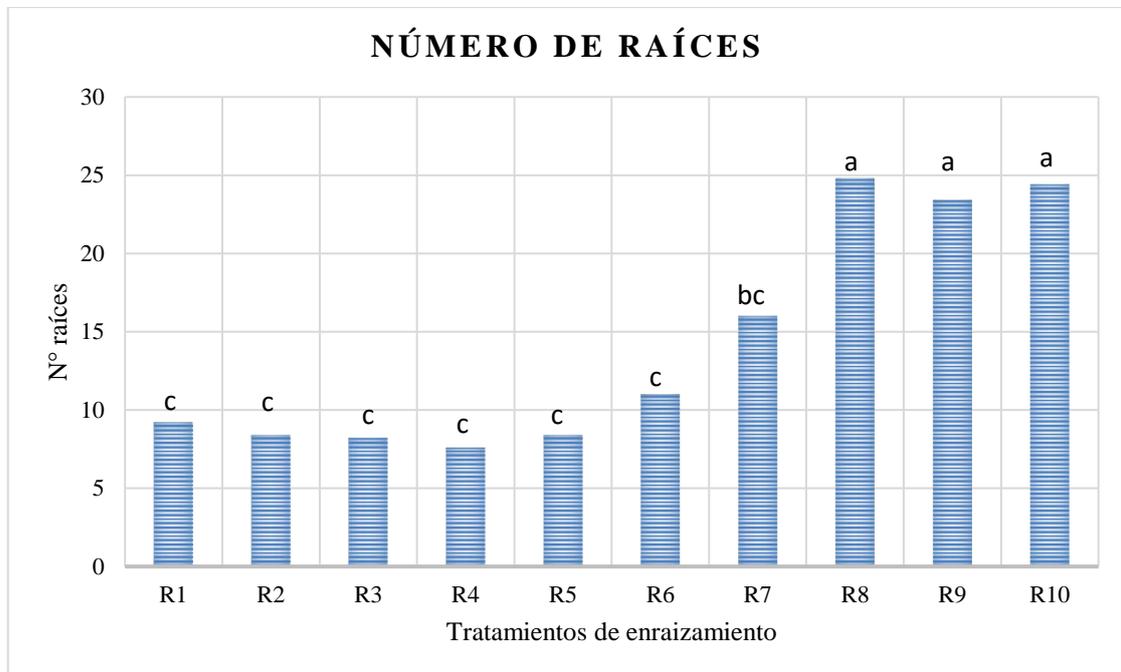


Figura 54: Influencia de los tratamientos de enraizamiento *in vitro* en el número de raíces de la vitroplanta *Fragaria x ananassa* Duch.

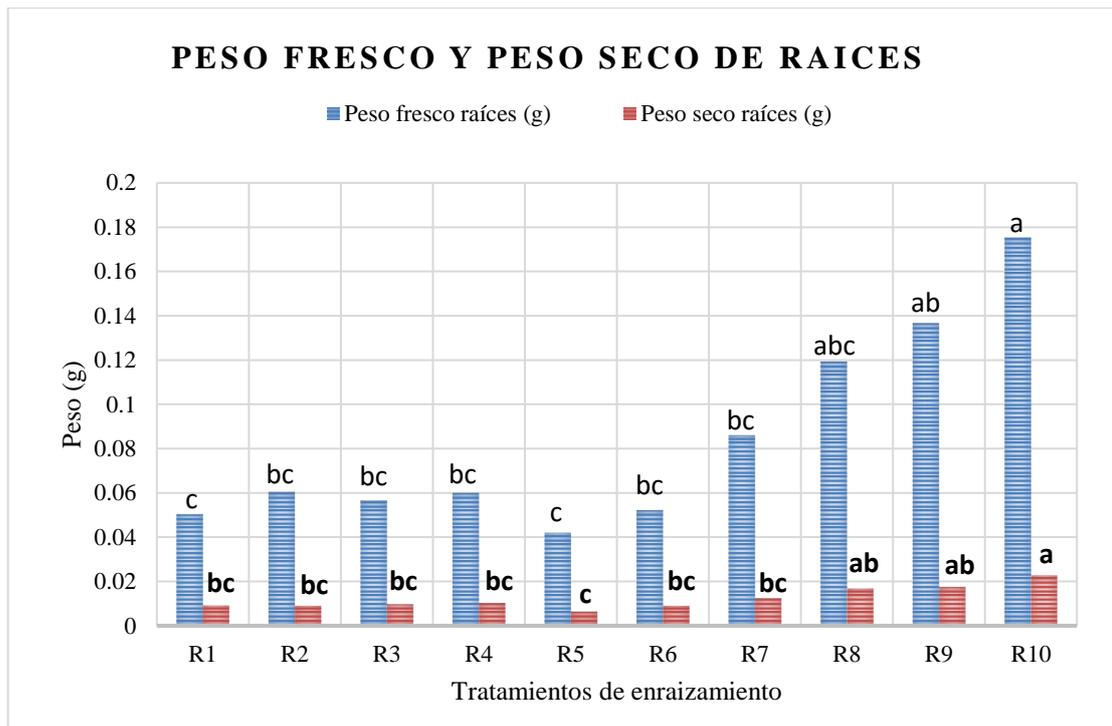


Figura 55: Influencia de los tratamientos de enraizamiento *in vitro* en el peso seco y peso fresco de raíces de la vitroplanta *Fragaria x ananassa* Duch.

D. PESO FRESCO Y SECO TOTAL

Los datos de las variables peso fresco total (g) y peso seco total (g) fueron analizados el cual cumplieron una distribución normal, aplicándose un prueba paramétrica DCA, los análisis de variancia se muestran en los Anexos 79 y 80.

Respectivamente sus p-valor de cada variable analizada mostraron que son mayores de 0.05, es decir que todos los tratamientos son iguales.

Tabla 46. Influencia de los diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en el peso fresco y seco total de raíces (g) de la vitroplanta de *Fragaria x ananassa* Duch.

Tratamiento	MS	IBA (mg/l)	Carbón activado (g/L)	Peso fresco total (g)	Peso seco total (g)
R1	1	0	0	0.32616a	0.05752a
R2	1	0	0.5	0.40762a	0.065222a
R3	1	0.5	0.5	0.36524a	0.05950a
R4	1	2	0.5	0.40298a	0.06632a
R5	½	1	0.5	0.35828a	0.05118a
R6	½	2	0.5	0.37070a	0.05202a
R7	1	0.5	0	0.37782a	0.06368a
R8	1	2	0	0.38904a	0.06500a
R9	½	1	0	0.39108a	0.06514a
R10	½	2	0	0.43694a	0.07242a

*Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$ (Notación Tukey).

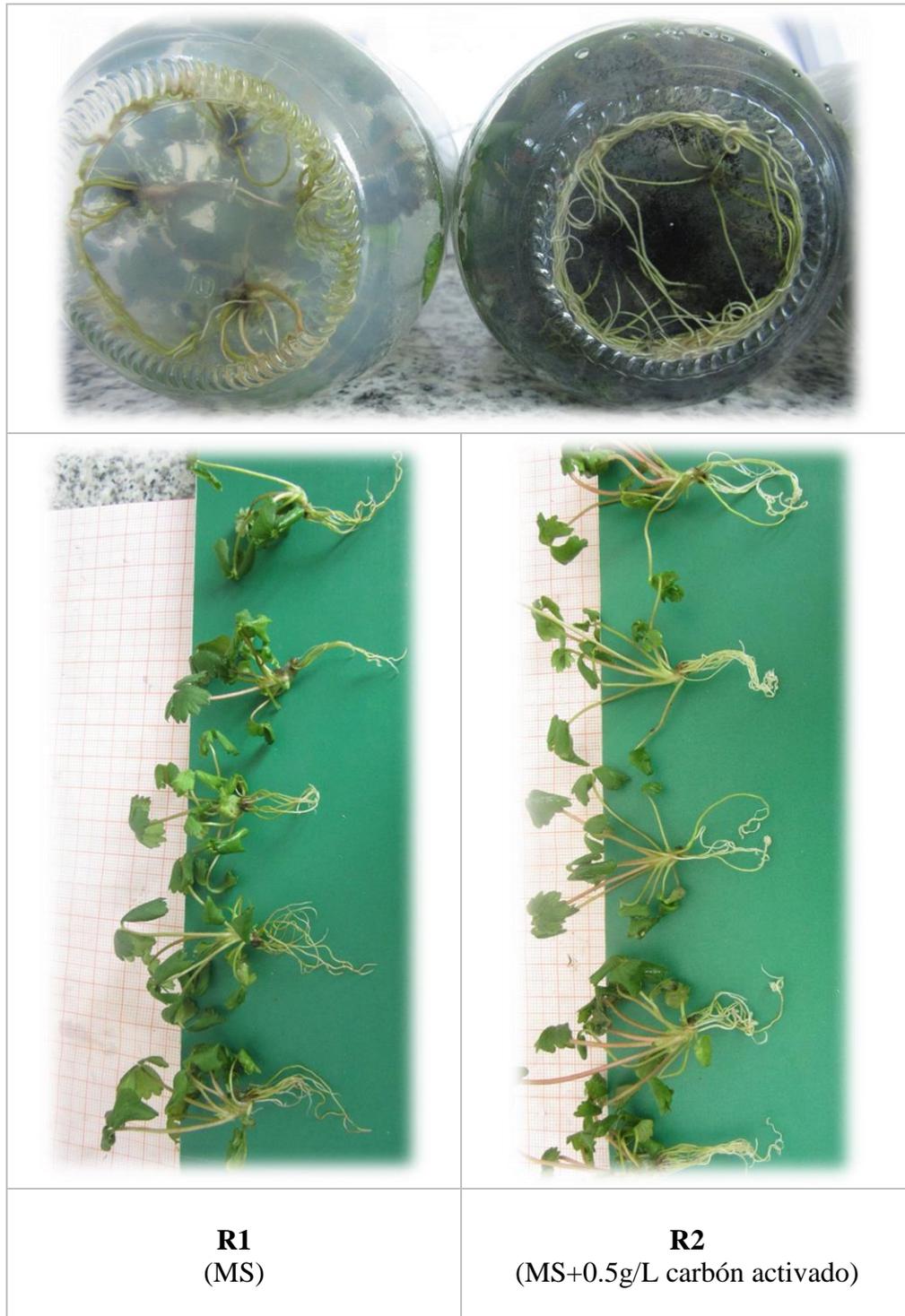


Figura 56: Efecto del carbón activado en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R1 y R2.



Figura 57: Efecto del carbón activado y 0.05 mg/l de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R7 y R3.



Figura 58: Efecto del carbón activado y 2mg/L de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R8 y R4.

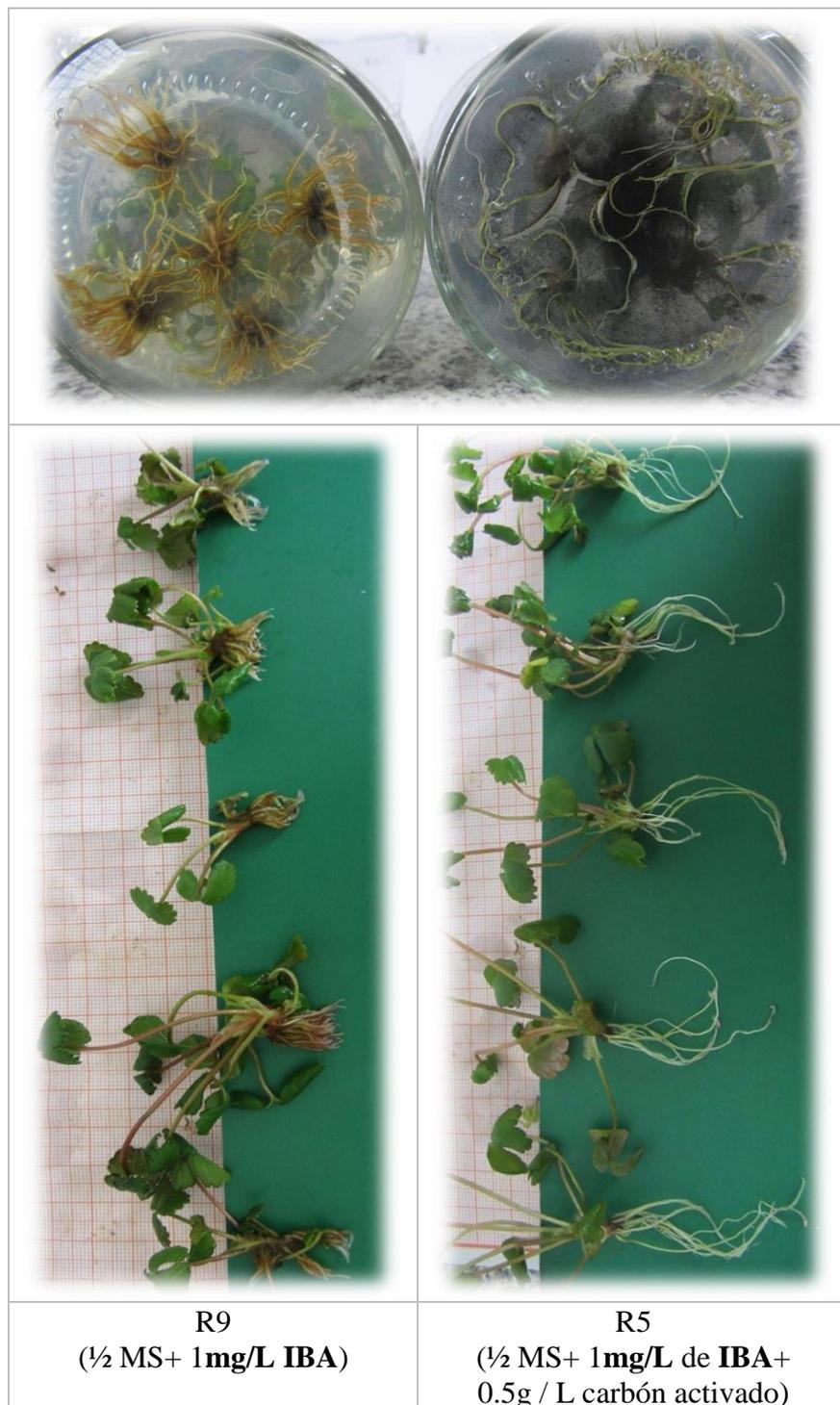


Figura 59: Efecto de 1/2MS, carbón activado y 1mg/L de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R9 y R5.



Figura 60: Efecto de 1/2MS, carbón activado y 2mg/L de IBA en los tratamientos de medio de cultivo de enraizamientos R9 y R5.

El tratamiento de medio de enraizamiento R2 (MS+0.5g/L de carbón activado) obtuvo raíces de 51.98mm de longitud, por ende de mayor peso fresco 0.06052g, con respecto al R1 (MS sin hormonas), formó raíces porque el tejido ya contenía auxinas, resultó efectivamente que la adición de carbón favoreció en la longitud de la raíz (Figura 56). La adición de 0.5mg/L de IBA, R7 (MS+0.5mg/L de IBA), efectivamente favoreció en el número de raíces (16) pero la longitud fue menor (18.22mm). Al incluir carbón activado a este medio, R3 (MS+0.5mg/L de IBA+0.5g/L carbón activado), aumentó la longitud de raíces (44.38mm) mientras que el número de raíces (8) disminuyó (Figura 57). Hasta el momento el medio R2 es el mejor, mientras que al aumentar la concentración de IBA, el R4 (MS+2mg/L de IBA+0.5g/L de carbón activado) disminuyó la longitud de raíces (45.36mm) y también disminuyó el número de raíces (8), sin embargo quitándole el carbón activado, tratamiento R8 (MS+2mg/L de IBA) generó una longitud menor de 12.64mm y mayor número de raíces (25) (Figura 58). Al disminuir la carga de 1MS a 1/2MS se logró el objetivo con el medio R6 (1/2MS+2mg/L de IBA+0.5g/L de carbón activado) obteniéndose la mayor longitud (55.7mm) y mayor número de raíces (11) de los tratamientos que incluyen carbón activado (Figura 60).

La adición de carbón activado en los tratamientos de medio de enraizamiento fueron claves en la longitud, el número y el peso de raíces, además quitar los restos de agar fueron más fáciles a comparación de los que no tenían carbón activado, excepto el testigo R1 (MS). (Figura 61) .Los resultados concordaron con Y. Youssief, 2009, que indicó que la respuesta más alta se obtuvo con 0.5 mg/L.

El carbón activado regula internamente procesos fisiológicos, también es posible que algunas sustancias, que antagoniza la actividad de la citoquinina, fue adsorbido por el carbón activado vegetal (Pan *et al.*, 1998).

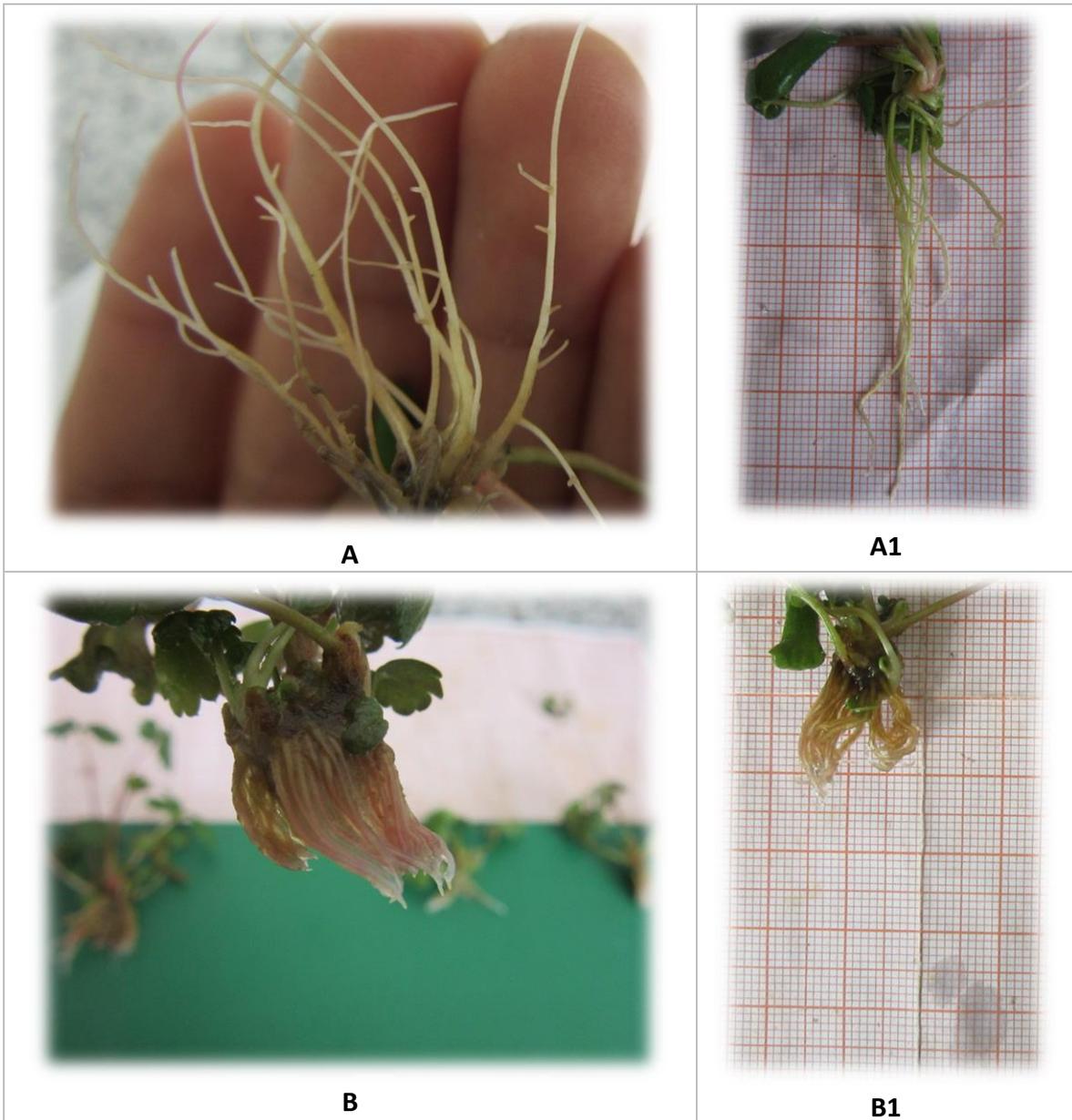


Figura 61: Resultados de raíces según presencia de carbón. (A, A1) Raíces provenientes de los tratamientos adicionados con 0.5g/L de carbón activado; (B, B1) Raíces provenientes de los tratamientos sin carbón activado.

El tratamiento R9 (1/2MS +1.0 mg/L IBA) generó mayor cantidad de raíces, en referencia a Lal, M. *et al.* (2009), que obtuvo el máximo enraizamiento MS+1.0 mg/L de IBA y 1/2MS +1.0 mg/L de IBA, pero en esta investigación se obtuvo la menor longitud de raíces.

Ashrafuzzaman, M., *et al* (2013) indicaron que 0,5 mg /L de IBA registró el número más alto de raíces (6) y raíces más largas (3,05 cm). Y que el medio 1/2MS sin concentración de IBA no mostró ninguna respuesta con respecto a la inducción de raíz. De acuerdo con los resultados de esta investigación el tratamiento R7 (MS+ 0.5mg/L IBA) se reportó la menor longitud de raíces (18mm).

Nayem, Z. *et al* (2011) quienes indican que la frecuencia máxima de enraizamiento y el mayor número de raíces se produjo en medio que contiene 1.0 mg/L de IBA, aunque no detalló la longitud.

Mahmood *et al.* (1994) informaron en su estudio que la mejor respuesta fue observado en los medios suplementados con 0,5 mg/L de BAP, que era igual a al resultado obtenido por Ashrafuzzaman *et al.* (2013), mientras que el número de hojas fue 8, que era diferente de resultado, es decir, 5 hojas, de la segunda investigación mencionada.

Marcotrigiano *et al.* (1984) observaron que el nivel más bajo de BAP (0.5 mg /L) era más efectivo para la proliferación de brotes en comparación con 1.0 a 3.0 mg /L de BAP. Según Ashrafuzzaman *et al.* (2013) los mismos resultados también se observaron a una mayor concentración de BAP (2.0 mg /L).

Lal, M. *et al.* (2003) observaron que el 1/2MS indica la reducción de sales principales que ayuda a promover el número de raíces y longitud de raíces. Cazador *et al.* (1984) sugirió que para la formación de raíces, la concentración óptima está en el rango de 0.75 a 1.0 mg/L IBA.

Nissen y Sutter (1990) encontraron que el aumento de la concentración de auxina promueve el enraizamiento sin formación de callos, debido a una concentración creciente de carbón activado, el cual tiene un papel eficaz en la absorción de algunos componentes del medio. Otras investigaciones han demostrado que el carbón activado tenía un papel eficaz en la absorción de los componentes desconocidos, que se produce a través de procesos químicos dentro de los medios de comunicación. A veces, estos componentes desconocidos jugaron el papel de inhibidor del crecimiento en etapas morfogénesis. Además, el carbón activado, el cual disminuye la entrada de luz y proporciona un entorno físico razonable para la rizosfera, evitando indeseables formaciones de callos, ayudando así a erradicarlos.

V. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el mejor protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa*. Duch., se obtuvo sumergiendo las coronas en 20% de lejía (0.8% de Hipoclorito de Sodio) más 3 gotas de Tween 20 durante 20 minutos, luego un enjuague con alcohol de 70° por 3 segundos y la de explante para la introducción fue el meristemo, en un tubo con puente de papel filtro con medio líquido.
2. El mejor medio de cultivo *in vitro* para la etapa de inicio fue el medio MS+ 2mg/L de IBA+2mg/L de BAP+ 1g/L de carbón activado+ 7.2g/L Agar que permitió la mayor elongación de la vitroplanta, desarrollándose de con el mayor porcentaje vigorosas y diferenciadas. Entre los cultivares, Camino Real resultó ser el cultivar de crecimiento rápido, seguido por Sabrina y Cristal, mientras que Albión demoró en desarrollarse.
3. El mejor medio de cultivo para la multiplicación resultaron ser dos medio, MS+ 1mg/L de BAP y el medio MS+ 1mg/L de BAP+ 1mg/L de IBA + 0.1mg/L AG3, que permitieron obtener mayor número de brotes.
4. En la etapa de enraizamiento la diferentes combinaciones del medio con 1/2MS, 0.5g/L de carbón activado y diferentes concentraciones de IBA, presentaron un efecto positivo en la elongación y número de raíces por vitroplanta. El tratamiento que contiene 1/2MS+2mg/L de IBA+0.5g/L de carbón activado permitió la máxima longitud de raíces y con respecto a un medio que incluye carbón activado fue que se obtuvo el número máximo de raíces.

VI. RECOMENDACIONES

1. Hacer un pre tratamiento a las plantas que se encuentran en el invernadero un mes antes para hacer la introducción.
2. Utilizar el mejor tratamiento de desinfección y emplearlos para realizar nuevos estudios que incluyan sustancias antioxidantes en el medio líquido para disminuir el necrosamiento.
3. Evitar el uso de Phytigel en vez de agar para el desarrollo *in vitro* de los cultivares Camino Real, Cristal, Albión y Sabrina.
4. Incluir Plant Preservative Mixture (PPM) especialmente en medios para la micropropagación *in vitro* de Cristal, Albión y Sabrina.
5. Plantear modificaciones en los medios de la etapa de multiplicación que no incluyan carbón activado, evitando así la formación de raíces.
6. Realizar estudios en la etapa de multiplicación para determinar el número de explantes por frasco y el número máximo de subcultivos.
7. Continuar con los estudios de investigación, de modo tal que se pueda lograr un protocolo para la micropropagación *in vitro* de *Fragaria x ananassa* Duch.
8. Continuar con los estudios de aclimatación para que nos permita obtener mayor conocimiento sobre el comportamiento de las plantas *in vitro* en invernadero, hidroponía y campo.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **ABBOUD & ELKICHAOUI**, 2014. *In vitro*, Propagation Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Through Organogenesis via Runner Tips. Gaza. Revizado el 20 de agosto del 2016. Disponible en: <http://annalsofplantsciences.com/index.php/aps/article/viewFile/6/3>.
2. **AGRIOS, G. N.** 1991. Fitopatología. 1era edición. México. 756p.
3. **AGRONOTICIAS.** 2017. La costa central y los valles interandinos: Tierra ideal para la fresa. Revista AgroNOTICIAS. 38(435):38-41. Consultado 7 oct. 2017. Disponible en <http://www.redagricola.pe/la-hora-las-fresas/>
4. **ALONSO, J.** 2011. Manual de Histología Vegetal. Ediciones Muldi-Prensa. México. 294p.
5. **ABELES F.B., TAKEDA F.** 1990. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. Scientia Horticulturae, 42: 269-275.
6. **AFANADOR PÉREZ, AM.** 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemos de cinco cultivares comerciales de *Dianthus caryophyllis* L. (clavel). Tesis Biología. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 137p
7. **AGRARIA.PE-AGENCIA AGRARIA DE NOTICIAS, 2016.** Consumo de frambuesas, arándanos y moras frescas en Europa crecería al menos 7% anual en próximos cinco años. Disponible en <http://agraria.pe/noticias/consumo-de-frambuesas-arandanos-y-moras-10916>
8. **AGQ. 2016.** Fisiología, estrés y control de la fresa. AGQ, Labs & Technological Services. Consultado .Disponible en <http://www.agq.com.es/doc-es/fisiologia-estres-control-agronomico-fresa>
9. **ANGULO, R.** 2009. Fresa, *Fragaria ananassa*. Bayer CropScience. Colombia. Consultado. Disponible en https://www.cropscience.bayer.co/~media/Bayer%20CropScience/Peruvian/Country-Colombia-Internet/Pdf/Cartilla-FRESA_baja.ashx
10. **ANON**, 1982 Aseptic Bud Cultures for Safer International Exchange of Sugar Cane varieties. West Indies Central Sugar Cane Breeding Station, Barbados, Bulletin 44. Barbados, West Indies: CSCBS.

11. **ANTTONEN M.J., HOPPULA K.I., NESTBY R., VERHEUL M.J., KARJALAINEN R.O.** 2006. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 2614–2620.
12. **ASHRAFUZZAMAN, M. et al.** 2013. Micropropagation of strawberry (*fragaria ananassa*) through runner culture. *Bangladesh J. Agril. Bangladesh*.
13. **AZCON, BIETO, J & TALON.** 2001. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw-Hill Internatamericana. España 522p.
14. **BAKKER J., BRIDLE P., BELLWORTHY S.J.** 1994. Strawberry juice colour: A study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes. *Journal Science Food Agriculture*. 64:31–37.
15. **BARONA C. M Y SANCHO B.E.** 1998. *Fruticultura II: Manzana, melocotón, fresa y mora. Fruticultura especial. Primera reimpresión de la primera edición. La editorial Universidad Nacional a Distancia. San José. CR. 144p.*
16. **BEN-ARIE R., FAUST M.** 1980. ATPase in ripening strawberries. *Phytochemistry*, 19:1631-1636.
17. **BHATT ID, DHAR U.** 20012. Micropropagation of Indian wild strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60, 83-88
18. **BHOJWANI, S Y DANTU P.** 2013. *Plant Tissue Culture: an introductory yext.* Springer, Agra, Ulrtar Pradesh. India.
19. **BOCCON G. J.** 1989. La technologie de la culture *in vitro*. In *Auge et al. La culture in vitro et ses applications horticoles*. H. Vidalie (ed). 3 ed. Paris, FR, Jb. Bailliee. p 57-58.
20. **BONET, J.** 2010. *Desarrollo y Caracterización de herramienta genómicas en Fragaria diploid para la mejora del cultivo de fresa. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 2010.*
21. **BOXUS et al.,** 1984. Starwberry. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W. R. Sharp, and Y. Yamada (EDS). *Handbook of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol 3. Macmillan. New York. 453-486p.*
22. **BOXUS et al.,** 1977. Large scale Propagation of strawberry planats from tissue culture. In: J. Reinnert, and P.S. Bajaj (EDS). *Applies and fundamental aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. New York. 131-206p.*
23. **BRAZANTI, E.** 1989. *La Fresa. Primera edición. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 386 p.*

24. **CALZADA, J.** 1980. 143 frutales nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 320 p.
25. **CASELLS.** 1991. Problems in tissue culture contamination. En: Micropropagation Technology and Application. Ed: DEBERGH, P.C & R.H. ZIMMERMAN. Kluwer Academic Publishers. USA. 479p.
26. **CASTILLO, A.** 2004. Propagación de planta por cultivo *in vitro*: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de biotecnología, INIA, Las Brujas UY (en línea). Consultado 15 mar 2016. Disponible en http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf.
27. **CONAFRUT (COMISIÓN NACIONAL DE FRUTICULTURA. PE).** 1997. El Cultivo de la Fresa. Boletín técnico N° 12. Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Y Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT). Lima. 36 p.
28. **CONVERSE, R. H.** 1987. Virus and viruslike diseases of *Fragaria* (Strawberry). Pages 1-100 in: Virus Diseases of Small Fruits. R. H. Converse, ed. U.S. Dep. Agric. Agric. Res. Serv. Agric. Handb. No. 631.
29. **CUMPLIDO L. G.** 2012. Funcional Caracterización of strawberry (*Fragaria x Ananassa*) fruitspecific and ripening-related genes involved in aroma and anthochyanins biosynthesis” (en línea). Tesis Doctoral. Universidad de Cordova. ES. 422p. Consultado 17 Feb 2014. Disponible en <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/9362/201300000695.pdf?sequence=1>
[tesisguadalupecumplido](#)
30. **DALE, A., AND LUBY, J. J., EDS.** 1990. The Strawberry into the 21st Century. Timber Press, Portland, OR.
31. **DAMIANO C., MONTICELLI S., CORAZZA L.,** 1997. Somaclonal variability and *in vitro* regeneration of strawberry. Acta Hort. 447, 87-93.
32. **DARNELL R.L., MARTIN G.C.** 1988. Role of assimilate translocation and carbohydrate accumulation in fruit set of strawberry. Journal of the American Society for Horticultural Science, 113: 114-118.
33. **DA SILVA F.L., ESCRIBANO-BAILN M.T., PÉREZ ALONSO J.J., RIVAS-GONZALO J.C., SANTOSBUELGA C.** 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. LWT – Food Science Technology, 40: 374–382.
34. **DARROW G.M.** 1966. The Strawberry. New York: Holt, Rinehart & Winston
35. **DAVALOS, P. et al.,** 2011. Tecnología para sembrar viveros de fresa. Primera edición, México.

36. **DENNIS F.G.** (1984). Fruit development. Physiological basis of crop growth and development. M.B. Tesar, (Eds.) Madison: American Society of Agronomy, pp: 265-288.
37. **DEBERGH, PC & READ, PE.** 1991. Micropropagación. En: Micropropagation Technology and Application. USA. 479p.
38. **DEBERGH, PC. & ZIMMERMAN, RH.** 1991. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishing. USA, 479P
39. **DISTRIBUIDORA DE FRESAS CAMINO REAL.** 2 de enero del 2016. (En línea, Facebook). Guanajuato, México. Consultado 19 de marzo del 2016. Disponible en <https://www.facebook.com/distribuidoracaminoreal/photos/pcb.969854129728408/969853256395162/?type=3&theater>
40. **DIXON, RA. & PAIVA, NL.** 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7: 1085- 1097.
41. **DEBNATH. S. AND TEIXEIRA DA SILVA, J.** 2007. Strawberry Culture *In Vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology. Atlantic Cool Climate Crop Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada; Kagawa University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Miki cho, Ikenobe Japón.
42. **DOMINGUEZ, P.** 2012. Evaluación agronómica de selecciones avanzadas del Programa Nacional de Mejora Genética de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), en diferentes sistemas de cultivo y valoración de parámetros de calidad del fruto. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba. ES.
43. **DODDS & ROBERTS.** 1985. Experiment in plant tissue culture. Third Edition. Cambridge University Press. USA. Pp 69 - 101.
44. **DRISCOLL'S.** 2016. Strawberry associates. Only the finest berries. Consultado 10 de Junio del 2016. Disponible en: <http://www.driscolls.com/strawberries/nutrition.html>.
45. **EMAD Y. YOUSSEF E.** 2009. *In Vitro*, Propagation of Strawberry (*Fragaria × annanasa* Duch.) Through Organogenesis via Runner Tips. The Islamic University. Gaza. Disponible en: <http://library.iugaza.edu.ps/thesis/87120.pdf>
46. **EMARAH.** 2008. Factors affecting propagation of strawberry (*Fragaria spp.*) through tissue cultures. *J. Product. & Dev.*, 13 (1): 191-212. Faedi, W., Mourgues, F. and Rosati, C. 2002.
47. **ERENDORFER F.** 1983. Sinopsis del reino vegetal. En Tratado de Botánica, Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A.F.W., Von Denffer, D., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. y Ziegler, H. (Eds.). Barcelona: Omega, pp: 854-856.

48. **ESHGHI S., TAFAZOLI E.** 2007. Possible role of cytokinins in flower induction in strawberry. *American Journal Plant Physiology*, 2: 167–174.
49. **EUROSEMILLAS**, 2016. Tu Grupo Agraria virtual: cultivares de fresa (en línea). Empresa Eurosemillas.Córdoba ES. Consultado el 15 de marzo del 2016. Disponible en: <http://www.eurosemillas.com/es/2015-10-14-08-58-51/fresa.html>
50. **FAOSTAT**. 2013. Producción de Fresa del Perú: 1965 al 2011 (en línea). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). Roma. IT. Consultado el 16 de Agosto del 2013. Disponible. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
51. **FARRAN, A.; ZAMORA, R. Y CERVERA, P.** 2004. Tabla de composición de alimentos del CESNID. Editorial Universitat de Barcelona, S.A.U., Barcelona.
52. **FERRIOL, X.**, 2010. Propiedades nutritivas y otras curiosidades de la fresa. *Revista CitriFrut*. Vol. 27, N°2. Cuba.
53. **FONSECA, A.**, 1996. Perfil del exportador del cultivo de la fresa (*Fragaria* sp.) *Revista FORES*. p 16.
54. **FRESHPLAZA**, 2017. Revisado en <http://www.freshplaza.com/article/134761/New-strawberry-and-raspberry-varieties>
55. **FRESHUELVA**. 2016. (En línea). La calidad de la fruta marca una larga campaña de la fresa. *Primera Plana*. Consultado 13 de octubre del 2017. Disponible en: <http://freshuelva.es/wp-content/uploads/2016/08/Freshuelva-35.pdf>
56. **GEORGE EF; SHERRINGTON PD.** 1984. *Plant propagation by tissue culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. London: Exegetics Ltd. p102-110.
57. **GIAMPIERI, F. et al.** 2014. Fresa y salud humana: Efectos más allá de la actividad antioxidante. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* 62. Revisado en <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf405455n>
58. **GIAMPIERI, F. et al.** 2012. La fresa: Composición, calidad nutricional, y el impacto en la salud humana. Revisado en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900711003066>
59. **GIVEN N.K., VENIS N.A., GRIERSON D.** 1988. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climateric fruit. *Planta*, 174: 402-404
60. **GOMEZ, J.** 2006. Descripción del comportamiento de insectos y enfermedades asociadas al cultivo de fresa (*Fragaria* spp, L) en el municipio de la Habana, Tesis. Departamento de Madriz. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua. Disponible en: <http://repositorio.una.edu.ni/1978/1/tnh10g633d.pdf>

61. **GÓMEZ, R.** 2006. Micropropagación de plantas de fresa a partir de meristemos. Laboratorio de cultivo de tejidos y transformación Genética de Plantas. Departamento de ingeniería genética del CINVESTAV. México. Disponible en: http://concyteg.gob.mx/ideasConcyteg/Archivos/13082006_MICROPROPAGACION_PLANTAS_FRESA_PARTIR_MERISTEMOS.pdf
62. **GOTARDO, L.** 2013. Biotecnología Vegetal Fresa. SlideShare. Recuperado de: <http://es.slideshare.net/gothardoleonardo/biotecnologa-vegetal-fresa>
63. **GUTTRIDGE C.G., JARRET J.M., STINCHCOMBE G.R., CURTIS P.J.** (1977). Chemical induction of local reddening in strawberry fruits. *Journal of Sciences of Food and Agriculture*, 28: 243246.
64. **HANCOCK, J.** 1999. Strawberries. *Crop Production science in Horticulture*. CABI Publishing.
65. **HARTMAN, Hudson.** 1995. Propagación de plantas. Compañía editorial Trillas S. A. Tercera impresión. MX. Pág. 85. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/12234>
66. **HAVIS A.L.** 1943. A developmental analysis of strawberry fruit. *American Journal of Botany*, 30: 311-314.
67. **HEIDE O.M., SONSTEBY A.** 2007. Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Physiology*, 130: 280–289.
68. **HOU Z.X., HUANG W.D.** 2005. Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction. *Planta*, 222: 678–687.
69. **HOAD G.V., ANDERSON H.M., GUTTRIDGE C.G., SPARKS T.R.** (1971). Ethylene and ripening of strawberry fruits. In Bristol University, Long Ashton Research Station Annual Report, pp: 3334.
70. **HUSAINI, A. AND NERI, D.** 2016. Strawberry: Growth, Development and Diseases. Revisado el 5 de marzo del 2017. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=iAauDQAAQBAJ&pg=PA1&lpg=PA1&dq=strawberry+taxonomy+2016&source=bl&ots=PdEhGI63kD&sig=54VUPd9DoCFm_fwKu99TMsO3nyk&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwizrYyS6ZrRAhWGYiYKHdbrB1wQ6AEIaDAN#v=onepage&q=strawberry%20taxonomy%202016&f=false
71. **IWATA T., OMATA I., OGATA K.** 1969a. Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern. II. Respiratory pattern of fruits and its classification. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 2: 73-80.

72. IWATA T., OMATA I., OGATA K. 1969b. Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern. III. Changes of ethylene concentration in fruits and responses to applied ethylene with relation to the respiratory pattern. Journal of the Japanese Society of Horticultural Science, 7: 64-72.
73. ICAR News. 2005. Indian council of agriculture research, Vol 11, no. 4, New Delhi, India.
74. INIA-MINAGRI, 2015. Cultivo *in vitro*. Dirección de desarrollo tecnológico agrario, área de transferencia de tecnología y servicios agrarios.
75. INIA PERU, 2015. Técnicas de micropropagación. https://www.youtube.com/watch?v=mR_hkX3x8XE . Estación Experimental Agraria Donoso del Instituto Nacional Agraria- INIA PERU.
76. KEVERS, C., FRANCK, R.J., STRASSER, R.J, DOMMES, J. & GASPAR, T. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress- induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 77: 181- 191.
77. KEVERS, C. & GASPAR, T. 1986. Vitrification of Carnation *in vitro*: changers in wáter content, extracelular space, air volumen, and ion levels. Physiologie Végétale. 24 (6): 647- 653.
78. KEVERS, C., COUMANS, M., COUMANS- GILLES, MF. & GASPAR, T. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrificación of plants cultures *in vitro*. Physiology plant. 61: 69-74.
79. KNEE M., SARGENT J.A., OSBORNE D.J. 1977. Cell wall metabolism in developing strawberry fruit. Journal of Experimental Botany, 28: 977-396.
80. KESSEL, D. A. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria* × *annanasa* Duch.) a través de métodos biotecnológicos. Cultivos Trop. 33(3): 34-41.
81. LAL, MURARI; SUNEEL SHARMA AND M. V. HEGDE. 2003. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* duch.). Department of Horticulture, CCS Haryana Agricultural University, Hisar, India. Consultado el 25 de diciembre del 2016. Disponible en: <http://arccjournals.com/journal/indian-journal-of-agricultural-research/ARCC2956>
82. LIS E.K., ANTOSZEWSKI R. 1979. Modification of the strawberry receptacle accumulation ability by growth regulators. En Photosynthesis and Plant Development. R. Marcell, H. Clijster, M. van Poucke (Eds.) La Haya: Dr. W. Junk Ed.: 263-270.
83. LÓPEZ, S., MARTINS, J., TORRES, M. 2003. Influence of NaOCl on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) ehavior. Plant Cell Tiss Organ Cult, Springer Science. DOI10.1007/s11240-006-9121-3.

- 84. MAINLAB BIOINFORMÁTICA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE WASHINGTON, 2016.** *Fragaria x ananassa*. GDR. Revisado en <https://www.rosaceae.org/organism/Fragaria/x-ananassa>
- 85. MAJADA, JP., FAL, MA., TADEO, F., & SÁNCHEZ- TAMÉS, R.** 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllis* L. Cultured *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 38: 272- 278.
- 86. MALIARICIKOVA, V. AND A. MOKRA.** 1986. Clonal propagation of strawberry *in vitro*. *Ved. Pra. Vyskum. Usta. Ovecny. Okrasn. Dre Boj*. 6: 117-123
- 87. MANNING K.** 1993. Soft fruits. In *Biochemistry of fruit ripening*. G. Seymour, J. Taylor and G.A. Tucker, (Eds.) London: Chapman & Hall, pp: 347-378.
- 88. MAROTO B.J.V. Y LOPEZ G. S.** 1988. Producción de fresas y fresones. Primera edición. editorial Mundi Prensa. Madrid. 120p.
- 89. MARTIN, R Y TZANETAKIS, L.** 2006. Characterization and Recent Advances in Detección of Stawberry Viruses. USDA-ARS Horticultural Crops Research Laboratory, Corvallis, OR and Oregon State University, Corvallis.
- 90. MATAIX VERDU, J.; GARCÍA DIZ, L.; MAÑAS ALMENDROS, M.; MARTÍNEZ DE VICTORIA, E. Y LLOPIS GONZÁLEZ, J.** 2003. Composición en nutrientes de los alimentos: frutas. En: *Tablas de composición de alimentos*. J. Mataix Verdu (ed.), 4ª ed., Editorial Universidad de Granada, Granada.
- 91. MEJIA ANAYA, R.** 1994. Agrobiotecnología fundamentos y aplicaciones, propagación de 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*.
- 92. MINAGRI** 2008. Estudio de la fresa en el Perú y el mundo. Dirección general de información Agraria. Lima. 1-23. Disponible en: http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/estudio_fresa.pdf
- 93. MOLINOS DA SILVA, C.** 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110" Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000700009
- 94. MORARD P, HENRY M.** 1998. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *J. Plant Nutr.* 21: 1565-1576.
- 95. MOREIRAS, O.; CARBAJAL, A.; CABRERA, L. Y CUADRADO, C.** 2006. Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide, Madrid.

- 96. MURASHIGE, T. AND F. SKOOG.** 1978. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tabaco tissue Biotechnology Meeting. India, p 4-8.
- 97. MURASHIGE, T. AND F. SKOOG.** 1962. Un medio revisado para crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejido de tabaco. *Physiologia plantarum* 15 (3): 473-497.
- 98. NEAL G.E.** 1965. Changes occurring in the cell walls of strawberries during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16: 604-611.
- 99. NISSEN SJ & SUTTER EG, 1990.** Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures, *Hort Science*, 25: 800-802.
- 100. NUNES, M.** 2007. Caracterización y procesado de kiwi y fresa cultivados por diferentes sistemas. Tesis doctoral. (En línea) consultado el 17 de junio del 2016. Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: https://dspace.usc.es/bitstream/10347/2317/1/9788497508643_content.pdf
- 101. OLMOS, E., HALLIN, E.** 1998. Ultrastructural differences of hyperhidric and normal leaves from regenerated Carnation plants. *Sci. Horticulturae*. 75: 91- 101.
- 102. PAN & J VAN STADEN,** 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture, A review, *Plant Growth Regulation*, 26:155-163.
- 103. PEÑA, C.** 2000. Adaptación de técnicas para la micropropagación a partir de meristemas de *vitis vivnifera* L. (Vid) cv. Muller Thurgau (Riesling x Sylvaner). Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Biología. Bogotá.
- 104. PERKINS-VEAZIE P.** 1995. Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Review*, 17:267-297.
- 105. PIERIK RL, STEEGMANS HHM.** 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendron. *Scientia Horticult*. 3: 1-20.
- 106. PLANASA.** 2013. Innovation in plant Varieties (en línea). Grupo Planasa. Navarra. ES. Consultado el 05 de setiembre del 2013. Disponible en: <http://www.planasa.com/pdf-cat-es.pdf>
- 107. PLANASA.** 2014. Cultivar cristal (en línea). Grupo Planasa. Navarra. ES. Consultado el 27 de marzo del 2014. Disponible en: <http://planasa.com/index.php?m=67&prod=541&var=39>
- 108. PLANASA.** 2016. Cristal. PLANASA INNOVATION IN PLANT VARIETIES. Revisado en <http://www.planasa.com/index.php?m=67&prod=541&var=39>
- 109. RAMOS, E. 2012.** Evaluación de tres tratamientos de desinfección y cuatro medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantes seleccionados de *Dipteryx alata* Vogel (Shihuahuaco). Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

- 110. REDAGRICOLA.** 2017. El cultivo se expande en el Perú: La hora de las fresa. Frutales. (En línea). Consultado 13 de octubre del 2017. Disponible en: <http://www.redagricola.pe/la-hora-las-fresas/>
- 111. REYES M. y ZSCHAU V, B.** 2012. Frutilla, concideracines económicas y manejo. Instituto de investigaciones agrícolas INIA Raihuen. Boletín INIA-N° 252. Villa Alegre. 153 p.
- 112. ROCA, WM. & MROGINSKI, LA.** 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. 970p
- 113. ROMERO, D.** 2000a. Una metodología para la desinfección y el control de la oxidación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). Acta científica Venezolana 51 (Sup. 2):7.
- 114. ROMERO, D.** 2000b. Control de la oxidación y contaminación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). Acta científica Venezolana 51 (Sup. 2):7.
- 115. SAHER S., PIQUERAS, A., HELLIN, E. & OLMOS, E.** 2004. Hyperhydricity in micropropagated Carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia plantarum*. 120: 152- 161.
- 116. SAMIR C. DEBNATH, JAIME A. TEIXEIRA DA SILVA.** 2007 - Strawberry culture *in vitro*. Applications in genetic transformation and biotechnology. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology.
- 117. SÁNCHEZ PINEDA DE LAS INFANTAS, M. T.** (2004). Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales. Ediciones A. Madrid Vicente, Madrid.
- 118. SÁNCHEZ, M. C. Y SALAVERRÍA, J. L.** 2004. Control de la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa. UDO Agrícola. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg04002>
- 119. SENSER, F. Y SCHERZ, H.** 1999. El pequeño “Souci-Fachmann-Kraut”: tabla de composición de alimentos. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- 120. SEMILLARIA.** 2014. Portal web semillaria un mundo de semillas (en línea). España. Consultado el 03 de Enero del 2014. Disponible en: <http://semillaria.es/index.php/libros-y-articulos/articulos/2936-actualizacion-del-uso-de-los-cultivares-de-fresa-en-españa>
- 121. SINGH Y PANDEY.** 2004. Genotypic variation among strawberry cultivars for shoot organogenesis. *Acta Horticulturae*. 662: 277- 80.

122. **SPIEGEL, S., AND MARTIN, R. R.** 1998. Virus and viruslike diseases. Pages 62-72 in: Compendium of Strawberry Diseases. J. L. Maas, ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
123. **SUNEDU (SUPERINTENDENCIA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR UNIVERSITARIA).** 20 de marzo 2017. (En línea, Facebook). Lima, Perú. Consultado el 20 de marzo del 2017. Disponible en https://www.facebook.com/SuneduPeru/videos/717502151743790/?hc_ref=ARSA7G23uunCnVrVQSKRWbcFt1e7an56TE0iixOwgu2UOCSeHo2XCyTbJmizI4bQ8Y
124. **SWARTZ, H. J. Y LINDSTROM, J.T.** 1986. Pequeñas de frutas y cultivo tejidos de uva de 1980 a 1985: Comercialización de la técnica En: R.H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerchlag y R.H. Lawson (EDS). El cultivo de tejidos como un sistema de producción vegetal para cultivos hortícolas. Martinus Nijhob publica Dordrecht (Neotherlands). 201-220p.
125. **THOMPSON P.A.** 1963. The development of embryo, endosperm and nucellus tissues in relation to receptacle growth in the strawberry. *Annals of Botany*, 27: 589-605.
126. **THOMAS, P., & RHAVINDRA, MB.** 1997. Shoot tip culture in mango: Influence of médium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments *Journal of Horticulture Science*. 72 (5): 713- 722.
127. **TIMBERLAKE C.F.** 1981. Anthocyanins in fruit and vegetables. In *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*. J. Friend and M.J.C. Rhodes, eds. London: Academic Press, pp: 221-247.
128. **TOLEDO J., ESPINOZA, N., GOLMIRZAIE A.,** 1998. Cultivo de tegidos, Manejo de Plantulas *In Vitro* en la Producción de Semilla de Papa. Manual de Capacitación. Centro internacional de la papa (CIP). Perú.
129. **TRESSL R., DRAWERT F., HEIMANN W.** (1969). Gaschromatographischmassen spektrometrische Bestandsaufnahme von Erdbeer-Aromastoffen. *Zeitschrift für Naturforschung*, 24: 1201-1202.
130. **TULIPANI S., MEZZETTI B., CAPOCASA F., BOMPADRE S., BEEKWILDER J., DE VOS C.H., CAPANOGLU E., BOVY A., BATTINO M.** (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 696–704.
131. **VALDERRAMA et al.** 2008. **VALDERRAMA, S.; CHICO, J.; TEJADA, J. Y VEGA, A.** 2008. Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa. *Fragaria virginiana*, utilizando ANA y BAP. *EBIOL*. Vol. 28, N°2.

132. **VILLALOBOS V.M Y 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.
133. **WEEBADDE C.K., WANG D., FINN C.E., LEWERS K.S, LUBY J.J., BUSHAKRA J., SJULIN T.M., HANCOCK J.F.** 2008. Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. Plant Breeding, 127: 94–101.
134. **WILHELM, S. AND J. E. SAGEN.,** 1974 - A history of the strawberry, from ancient gardens to modern markets., Div. Agric. Sci., Univ. Cal. Berkeley, pp 3-10.
135. **WILLINER R. M.; PIROVANI E., M.; GUEMES R., D.** 2003. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. Journal of Agriculture 83: 842-845.
136. **WOJCIECH LITWIŃCZUK, EWA OKOŁOTKIEWICZ, IWONA MATYASZEK.** 2009. Development of *in vitro* shoot cultures of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) *Senga Sengana* and *Elsanta* under the influence of high doses of gibberellic acid. Department of Plant Production. Rzeszów University. Polonia.
137. **USDA.** 2003 - Economics, Statistics, and Marketing Information.
138. **YADAV, MK., GAUR, AK. & GARG, GK.** 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in Carnation during micropropagation. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 72: 153- 156.
139. **YAIPÉN CARRANZA, R.** 2012. Lima primer productor de fresa a nivel nacional. Consultado 7 oct. 2017. Disponible en <http://agraria.pe/noticias/lima-primer-productor-de-fresa-a-nivel-nacional-3681>
140. **ZABETAKIS I., HOLDEN MA.** 1997. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. Journal Science Food Agriculture, 74: 421–434.
141. **ZIV, M., SCWARTZ, M., & FLEMINGER, D.** 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of Carnation (*Dianthus caryophyllis* L) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. Plan Science. 52: 127-134.
142. **ZIV, M.** 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Micropropagation Tecnology and Aplication.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D1 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.

Trat.	N° Rep	7ddi	14ddi	21ddi	28ddi	35ddi	42ddi	Total
D1	1	Contam						1
D1	2	-	-	-	Contam			1
D1	3	Contam						1
D1	4	Contam						1
D1	5	-	-	-	Contam			1
D1	6	Contam						1
D1	7	-	Contam					1
D1	8	Contam						1
D1	9	Contam						1
D1	10	Contam						1
Total		7	1	0	2	0	0	10

ANEXO 2: Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D2 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.

Trat.	N° Rep	7ddi	14ddi	21ddi	28ddi	35ddi	42ddi	Total
D2	1	-	Contam					1
D2	2	Contam						1
D2	3	Contam						1
D2	4	-	Contam					1
D2	5	-	Contam					1
D2	6	Contam						1
D2	7	-	Contam					1
D2	8	Contam						1
D2	9	-	-	-	Contam			1
D2	10	-	-	-	-	-	-	
Total		4	4	0	1	0	0	9

ANEXO 3: Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D3 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.

Trat.	N° Rep	7ddi	14ddi	21ddi	28ddi	35ddi	42ddi	TOTAL
D3	1	Contam						1
D3	2	Contam						1
D3	3	Contam						1
D3	4	Contam						1
D3	5	Contam						1
D3	6	Contam						1
D3	7	-	-	-	-	-	-	
D3	8	Contam						1
D3	9	Contam						1
D3	10	Contam						1
Total		9	0	0	0	0	0	9

ANEXO 4: Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D4 de la introducción a partir de yemas de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.

Trat.	N° Rep	7ddi	14ddi	21ddi	28ddi	35ddi	42ddi	Total
D4	1	-	-	-	Contam			1
D4	2	-	Contam					1
D4	3	-	-	-	-	-	-	
D4	4	Contam						1
D4	5	-	-	-	-	Contam		1
D4	6	-	Contam					1
D4	7	-	Contam					1
D4	8	-	-	-	-	-	-	
D4	9	-	Contam					1
D4	10	-	-	-	-	-	-	
Total		1	4	0	1	1	0	7

ANEXO 5: Resultados de contaminados del tratamiento de desinfección D5 de la introducción a partir de meristemos de los periodos 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.

Trat.	N° Rep	7ddi	14ddi	21ddi	28ddi	35ddi	42ddi	Total
D5	1	Contam						1
D5	2	-	-	-	-	-	-	
D5	3	-	-	-	-	-	-	
D5	4	-	-	-	-	-	-	
D5	5	-	-	-	-	-	-	
D5	6	-	-	-	-	-	-	
D5	7	-	-	-	-	-	-	
D5	8	-	-	-	-	-	-	
D5	9	-	-	-	-	-	-	
D5	10	-	-	-	-	-	-	
Total		1	0	0	0	0	0	1

ANEXO 6: Resultados de desinfección en los cultivares de la introducción a partir de meristemos después de 42 días.

CULTIVAR	DESINFECCIÓN	CANTIDAD	PORCENTAJE (%)
Camino Real	Sobreviviente	49	83
Camino Real	Contaminado	2	3
Camino Real	Necrosado	8	14
Cristal	Sobreviviente	35	71
Cristal	Contaminado	2	4
Cristal	Necrosado	12	24
Albi3n	Sobreviviente	30	81
Albi3n	Contaminado	1	3
Albi3n	Necrosado	6	16
Sabrina	Sobreviviente	20	61
Sabrina	Contaminado	4	12
Sabrina	Necrosado	9	27

ANEXO 7: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de inicio del cultivar Camino Real.

Source	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	3	386.421875	128.807292	1.91	0.1813
Error	12	807.937500	67.328125		
Corrected Total	15	1194.359375			
CV (%)	57.20521				
Promedio	14.34375				

ANEXO 8: ANVA de n3mero de brotes peque3os para la etapa de inicio del cultivar Camino Real.

Source	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	3	0.89422847	0.29807616	2.16	0.1458
Error	12	1.65582898	0.13798575		
Corrected Total	15	2.55005745			
CV (%)	21.12974				
Promedio	1.758016				

ANEXO 9: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de inicio del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	963.187500	321.062500	29.13	<.0001
Error	12	132.250000	11.020833		
Corrected Total	15	1095.437500			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALP Mean	
	0.879272	31.06212	3.319764	10.68750	

ANEXO 10: ANVA de número de brotes para la etapa de inicio del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.44638883	0.14879628	3.39	0.0539
Error	12	0.52682305	0.04390192		
Corrected Total	15	0.97321188			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXPTR Mean	
	0.458676	13.41592	0.209528	1.561786	

ANEXO 11: Resultados altura de planta, vigor y desarrollo de los cultivares evaluados a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días de la transferencia en medio de inicio.

REP	CULTIVAR	ALTURA DE VITROPLANTA						VIGOR						DESARROLLO					
		24/04	1/05	8/05	15/05	22/05	29/05	24/04	1/05	8/05	15/05	22/05	29/05	24/04	1/05	8/05	15/05	22/05	29/05
1	CAMINO REAL	5	10	16	18	26	30	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Multi	Difer	Desarr	Desarr
2		3	5	11	16	30	34	2	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Difer	Difer	Desarr	Desarr
3		3	3	5	11	15	28	2	2	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Multi	Difer	Difer
4		3	6	14	15	19	30	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	brote	Multi	Multi	Desarr
5		3	4	5	9	25	33	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Multi	Difer	Desarr
6		2	3	6	15	27	31	2	2	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Desarr
1	CRISTAL	2	2.5	5	10	14	16	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Difer
2		3.5	3	6	10	14	21	2	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Desarr
3		4	5	9	12	15	16	2	2	1	1	1	2	Brote	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer
4		3.5	4	4	9	13	15	2	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Multi	Multi
5		3	4.5	10	12	16	18	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	brote	Difer	Difer
6		3.5	6	10	18	23	24	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Desarr
1	ALBIÓN	2.5	3	5	7.5	10	14	2	2	2	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer
2		3	4	5	7	8	8	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Brote	Brote
3		3	4	6	8	14	19	2	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Brote	Difer
4		2.5	3	5	8.5	12	15	2	2	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Brote	Difer
5		2.5	3	3	6	5	11	2	2	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Brote	Brote
6		3.5	4	7	9	13	20	2	2	3	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer
1	SABRINA	3	10	17	20	26	26	2	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Difer	Difer	Desarr	Desarr
2		3	6	7	11	21	24	2	2	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Desarr
3		3	3	4	9	16.5	22	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Difer
4		3	3	4	9	15	20	3	3	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Brote	Difer
5		1.5	2.5	10	10	16.5	22	4	2	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Difer
6		3	8	12	13	16.5	22	1	1	1	1	1	1	Brote	Brote	Brote	Difer	Difer	Difer

REP: Repetición; Multi: Multibrote; Difer: Diferenciado; Desarr: Desarrollado.

ANEXO 12: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de inicio de los cultivares.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	903.458333	301.152778	28.39	<.0001
Error	20	212.166667	10.608333		
Corrected Total	23	1115.625000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALP Mean	
	0.809823	15.06147	3.257044	21.62500	

ANEXO 13: ANVA de número de brotes para la etapa de inicio de los cultivares.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.13230743	0.04410248	0.61	0.6151
Error	20	1.44125708	0.07206285		
Corrected Total	23	1.57356451			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NBROTR Mean	
	0.084081	15.45300	0.268445	1.737172	

ANEXO 14: ANVA de número de brotes para la etapa de multiplicación del primer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1.50062941	0.50020980	1.56	0.2381
Error	16	5.13312220	0.32082014		
Corrected Total	19	6.63375161			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NbrotoslerENST Mean	
	0.226211	30.63550	0.566410	1.848868	

ANEXO 15: ANVA de número de brotes para la etapa de multiplicación del segundo subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3.56502508	1.18834169	5.01	0.0123
Error	16	3.79829967	0.23739373		
Corrected Total	19	7.36332475			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Nbrotos2doENST Mean		
0.484160	21.82931	0.487231	2.232002		

*Con una transformación de datos Raíz C +1

ANEXO 16: ANVA de número de explantes para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	4.95673595	1.23918399	46.61	<.0001
Error	20	0.53167635	0.02658382		
Corrected Total	24	5.48841229			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXOTR Mean		
0.903127	7.790201	0.163045	2.092956		

ANEXO 17: ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	3.47912959	0.86978240	22.99	<.0001
Error	20	0.75651510	0.03782576		
Corrected Total	24	4.23564469			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXPTR Mean		
0.821393	10.26389	0.194488	1.894881		

ANEXO 18: ANVA de peso fresco (g) de explantes para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.04020750	0.01005188	26.26	<.0001
Error	20	0.00765688	0.00038284		
Corrected Total	24	0.04786438			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFEX Mean	
	0.840030	14.31129	0.019566	0.136720	

ANEXO 19: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	2063.786400	515.946600	106.35	<.0001
Error	20	97.028000	4.851400		
Total corregido	24	2160.814400			
	R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ALP Media	
	0.955097	9.267037	2.202589	23.76800	

ANEXO 20: ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	169.8184000	42.4546000	44.87	<.0001
Error	20	18.9240000	0.9462000		
Corrected Total	24	188.7424000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LHA Mean	
	0.899736	8.963584	0.972728	10.85200	

ANEXO 21: ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	28.0000000	7.0000000	1.09	0.3866
Error	20	128.0000000	6.4000000		
Corrected Total	24	156.0000000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NH Mean	
	0.179487	19.16532	2.529822	13.20000	

ANEXO 22: ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.16989580	0.04247395	12.43	<.0001
Error	20	0.06832735	0.00341637		
Corrected Total	24	0.23822315			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFHX Mean	
	0.713179	17.81851	0.058450	0.328028	

ANEXO 23: ANVA de longitud de raíz (mm) de la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	14216.24000	3554.06000	530.46	<.0001
Error	20	134.00000	6.70000		
Corrected Total	24	14350.24000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOR Mean	
	0.990662	8.768414	2.588436	29.52000	

ANEXO 24: ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	17.47003951	4.36750988	113.85	<.0001
Error	20	0.76721373	0.03836069		
Corrected Total	24	18.23725324			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NRATR Mean	
	0.957932	9.433631	0.195859	2.076177	

ANEXO 25: ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.01004047	0.00251012	74.07	<.0001
Error	20	0.00067775	0.00003389		
Corrected Total	24	0.01071822			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFR Mean	
	0.936766	22.38275	0.005821	0.026008	

ANEXO 26: ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.11701761	0.02925440	5.90	0.0026
Error	20	0.09915609	0.00495780		
Corrected Total	24	0.21617370			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFTO Mean	
	0.541313	20.17064	0.070412	0.349080	

ANEXO 27: ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Camino Real.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.00245927	0.00061482	7.02	0.0011
Error	20	0.00175054	0.00008753		
Corrected Total	24	0.00420981			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSTO Mean	
	0.584175	15.98482	0.009356	0.058528	

ANEXO 28: ANVA de número de explantes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	2.99778904	0.74944726	18.18	0.0001
Error	10	0.41226821	0.04122682		
Corrected Total	14	3.41005725			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXOTR Mean	
	0.879102	10.54721	0.203044	1.925096	

ANEXO 29: ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	1.01242678	0.25310669	1.64	0.2401
Error	10	1.54654041	0.15465404		
Corrected Total	14	2.55896718			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXPTR Mean	
	0.395639	27.16301	0.393261	1.447781	

ANEXO 30: ANVA de peso fresco explantes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.01079086	0.00269772	25.24	<.0001
Error	10	0.00106863	0.00010686		
Corrected Total	14	0.01185949			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFEX Mean		
0.909893	15.38157	0.010337	0.067207		

ANEXO 31: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	1688.400000	422.100000	43.07	<.0001
Error	10	98.000000	9.800000		
Total corregido	14	1786.400000			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ALP Media		
0.945141	9.722035	3.130495	32.20000		

ANEXO 32: ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	234.2666667	58.5666667	5.82	0.0110
Error	10	100.6666667	10.0666667		
Corrected Total	14	334.9333333			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LHA Mean		
0.699443	18.96096	3.172801	16.73333		

ANEXO 33: ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	20.26666667	5.06666667	2.71	0.0913
Error	10	18.66666667	1.86666667		
Corrected Total	14	38.93333333			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	NH Mean		
0.520548	22.52077	1.366260	6.066667		

ANEXO 34: ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.17525371	0.04381343	18.48	0.0001
Error	10	0.02370721	0.00237072		
Corrected Total	14	0.19896092			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFHX Mean		
0.880845	17.14519	0.048690	0.283987		

ANEXO 35: ANVA de longitud de raíces (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	7396.933333	1849.233333	94.99	<.0001
Error	10	194.666667	19.466667		
Corrected Total	14	7591.600000			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOR Mean		
0.974358	16.71252	4.412105	26.40000		

ANEXO 36: ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	4.69240249	1.17310062	21.97	<.0001
Error	10	0.53391860	0.05339186		
Corrected Total	14	5.22632110			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NRATR Mean	
	0.897840	11.67325	0.231067	1.979456	

ANEXO 37: ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.01261141	0.00315285	68.38	<.0001
Error	10	0.00046110	0.00004611		
Corrected Total	14	0.01307251			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFR Mean	
	0.964728	23.82051	0.006790	0.028507	

ANEXO 38: ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.52043139	0.13010785	33.10	<.0001
Error	10	0.03930635	0.00393064		
Corrected Total	14	0.55973774			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFTO Mean	
	0.929777	17.01443	0.062695	0.368480	

ANEXO 39: ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Cristal.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.00933117	0.00233279	19.25	0.0001
Error	10	0.00121203	0.00012120		
Corrected Total	14	0.01054319			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSTO Mean		
0.885042	18.05775	0.011009	0.060967		

ANEXO 40: ANVA de número de explantes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	9.63025479	2.40756370	63.97	<.0001
Error	10	0.37634959	0.03763496		
Corrected Total	14	10.00660439			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXOTR Mean		
0.962390	8.453683	0.193997	2.294826		

ANEXO 41: ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	1.10500159	0.27625040	1.28	0.3392
Error	10	2.15024509	0.21502451		
Total corregido	14	3.25524667			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NEXPTR Media		
0.339452	33.49734	0.463707	1.384311		

ANEXO 42: ANVA de peso fresco explantes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.155

15					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	0.00256407	0.00064102	4.31	0.0279
Error	10	0.00148885	0.00014888		
Total corregido	14	0.00405292			
	R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PFEX Media	
	0.632648	34.52046	0.012202	0.035347	

ANEXO 43: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	842.933333	210.733333	4.63	0.0225
Error	10	455.166667	45.516667		
Total corregido	14	1298.100000			
	R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ALP Media	
	0.649359	21.48600	6.746604	31.40000	

ANEXO 44: ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	76.5666667	19.1416667	2.12	0.1524
Error	10	90.1666667	9.0166667		
Corrected Total	14	166.7333333			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LHA Mean	
	0.459216	21.39746	3.002776	14.03333	

ANEXO 45: ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	68.40000000	17.10000000	7.12	0.0056
Error	10	24.00000000	2.40000000		
Corrected Total	14	92.40000000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NH Mean	
	0.740260	21.51657	1.549193	7.200000	

ANEXO 46: ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.21113236	0.05278309	37.79	<.0001
Error	10	0.01396805	0.00139680		
Corrected Total	14	0.22510040			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFHX Mean	
	0.937947	12.03744	0.037374	0.310480	

ANEXO 47: ANVA de longitud de raíces (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	6877.066667	1719.266667	5.63	0.0123
Error	10	3052.666667	305.266667		
Corrected Total	14	9929.733333			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOR Mean	
	0.692573	58.49961	17.47188	29.86667	

ANEXO 48: ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	9.92561290	2.48140322	48.73	<.0001
Error	10	0.50920390	0.05092039		
Total corregido	14	10.43481680			
	R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NRATR	Media
	0.951201	11.62029	0.225655	1.941909	

ANEXO 49: ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.01611503	0.00402876	102.25	<.0001
Error	10	0.00039399	0.00003940		
Corrected Total	14	0.01650902			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFR	Mean
	0.976135	19.81341	0.006277	0.031680	

ANEXO 50: ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.21845862	0.05461466	26.92	<.0001
Error	10	0.02028849	0.00202885		
Corrected Total	14	0.23874712			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFTO	Mean
	0.915021	13.29636	0.045043	0.338760	

ANEXO 51: ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Albión.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.00869329	0.00217332	21.11	<.0001
Error	10	0.00102947	0.00010295		
Corrected Total	14	0.00972276			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSTO Mean	
	0.894117	16.53030	0.010146	0.061380	

ANEXO 52: ANVA de número de explantes propagables para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	5.53151449	1.38287862	34.07	<.0001
Error	20	0.81173047	0.04058652		
Corrected Total	24	6.34324496			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXOTR Mean	
	0.872032	9.753641	0.201461	2.065495	

ANEXO 53: ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	7.15419052	1.78854763	24.05	<.0001
Error	20	1.48708090	0.07435405		
Corrected Total	24	8.64127143			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NEXPTR Mean	
	0.827909	17.40540	0.272679	1.566636	

ANEXO 54: ANVA de peso fresco de explantes (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.00381064	0.00095266	1.87	0.1550
Error	20	0.01018370	0.00050918		
Corrected Total	24	0.01399434			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFEX Mean		
0.272299	41.84926	0.022565	0.053920		

ANEXO 55: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	593.6664000	148.4166000	7.85	0.0006
Error	20	378.2800000	18.9140000		
Total corregido	24	971.9464000			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ALP Media		
0.610802	16.99634	4.349023	25.58800		

ANEXO 56: ANVA de longitud de hojas altas (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	35.8136000	8.9534000	2.72	0.0586
Error	20	65.7720000	3.2886000		
Corrected Total	24	101.5856000			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LHA Mean		
0.352546	13.02391	1.813450	13.92400		

ANEXO 57: ANVA de número de hojas para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	117.0400000	29.2600000	1.62	0.2078
Error	20	360.8000000	18.0400000		
Corrected Total	24	477.8400000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NH Mean	
	0.244936	61.37792	4.247352	6.920000	

ANEXO 58: ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.05983904	0.01495976	6.17	0.0021
Error	20	0.04849280	0.00242464		
Corrected Total	24	0.10833184			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFHX Mean	
	0.552368	24.12810	0.049241	0.204080	

ANEXO 59: ANVA de longitud de raíces (mm) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	7255.760000	1813.940000	107.72	<.0001
Error	20	336.800000	16.840000		
Corrected Total	24	7592.560000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOR Mean	
	0.955641	16.25855	4.103657	25.24000	

ANEXO 60: ANVA de número de raíces para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	5.03326177	1.25831544	30.18	<.0001
Error	20	0.83391591	0.04169580		
Total corregido	24	5.86717767			
	R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NRATR	Media
	0.857868	14.41966	0.204195	1.416091	

ANEXO 61: ANVA de peso fresco de raíz (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.01438489	0.00359622	87.32	<.0001
Error	20	0.00082371	0.00004119		
Corrected Total	24	0.01520860			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFR	Mean
	0.945839	28.47198	0.006418	0.022540	

ANEXO 62: ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.05179844	0.01294961	8.75	0.0003
Error	20	0.02959891	0.00147995		
Corrected Total	24	0.08139735			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFTO	Mean
	0.636365	18.98181	0.038470	0.202668	

ANEXO 63: ANVA de peso seco total (g) para la etapa de multiplicación del tercer subcultivo del cultivar Sabrina.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.00048808	0.00012202	1.59	0.2169
Error	20	0.00153935	0.00007697		
Corrected Total	24	0.00202743			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSTO Mean	
	0.240737	24.36706	0.008773	0.036004	

ANEXO 64: Respuestas de la variable vigor en los cultivares

	Camino Real					Cristal			Albi3n			Sabrina				
TRAT	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R4	R5
M1	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVc	RVO
M2	RVO	RVc	RVc	vmc	RVc	RVO	RVO	RVO	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc
M3	RVO	RVc	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO
M4	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc	RVc
M5	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO	RVO

R1, R2, R3, R4, R5: Repeticiones; RVO: Robusto Verde Oscuro; (2) RVc: Robusto Verde claro; (3) vcm: Verde claro marchito.

ANEXO 65: Textura de hojas en los cultivares

	Camino Real					Cristal			Albi3n			Sabrina				
TRAT	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R4	R5
M1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
M2	T	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	T	C	C	C	C
M3	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C
M4	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	T	C	C	T
M5	NC	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	NC	NC	NC	NC	NC

R1, R2, R3, R4, R5: Repeticiones; NC: No coriáceo; C: Coriáceo; T: Translucidos.

ANEXO 66: Relación de peciolo-foliolo en los cultivares.

TRA T	Camino Real					Cristal			Albión			Sabrina				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R4	R5
M1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M2	c	c	c	c	c	A	A	A	c	c	c	c	c	c	c	c
M3	A	A	c	c	c	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M4	c	c	c	c	c	A	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
M5	A	c	c	A	A	A	A	A	A	A	c	A	A	A	A	A

R1, R2, R3, R4, R5: Repeticiones; A: Alto; c: Corto.

ANEXO 67: Deformidad de explantes en los cultivares

TRA T	Camino Real					Cristal			Albión			Sabrina				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R4	R5
M1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2	D	ND	D	D	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	ND	D	ND
M3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

R1, R2, R3, R4, R5: Repeticiones; ND: No deformado; D: Deformado.

ANEXO 68: Presencia de callos en los cultivares

TRAT	Camino Real					Cristal			Albión			Sabrina				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R4	R5
M1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
M2	B	CT	B	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	CT	CT	NC	NC	NC
M3	NC	NC	B	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
M4	CT	CT	CT	B	CT	CT	NC	NC	CT	CT	CT	NC	B	NC	NC	NC
M5	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

R1, R2, R3, R4, R5: Repeticiones; NC: No hay callos; B: Callos blancos; CT: Callos translucidos

ANEXO 69: ANVA de número de brotes pequeños para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.36998768	0.04110974	0.89	0.5420
Error	40	1.84633540	0.04615838		
Corrected Total	49	2.21632308			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NBROTR Mean	
	0.166938	15.85724	0.214845	1.354870	

ANEXO 70: ANVA de altura de vitroplanta (mm) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	999.308200	111.034244	1.37	0.2334
Error	40	3239.284000	80.982100		
Corrected Total	49	4238.592200			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALP Mean	
	0.235764	17.65688	8.999006	50.96600	

ANEXO 71: ANVA de longitud de hojas (mm) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	85.8168000	9.5352000	3.79	0.0016
Error	40	100.5760000	2.5144000		
Corrected Total	49	186.3928000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOH Mean	
	0.460408	13.65558	1.585686	11.61200	

ANEXO 72: ANVA de número de hojas para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	15.2800000	1.6977778	0.62	0.7768
Error	40	110.4000000	2.7600000		
Corrected Total	49	125.6800000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NH Mean	
	0.121579	18.29653	1.661325	9.080000	

ANEXO 73: ANVA de peso fresco aéreo (g) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.04937490	0.00548610	0.57	0.8103
Error	40	0.38246050	0.00956151		
Corrected Total	49	0.43183539			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFH Mean	
	0.114337	32.73816	0.097783	0.298682	

ANEXO 74: ANVA de peso seco aéreo (g) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.00080280	0.00008920	0.39	0.9331
Error	40	0.00916104	0.00022903		
Corrected Total	49	0.00996384			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSH Mean	
	0.080572	30.53592	0.015134	0.049560	

ANEXO 75: ANVA de longitud de raíz (mm) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	14078.52420	1564.28047	37.44	<.0001
Error	40	1671.10800	41.77770		
Corrected Total	49	15749.63220			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOR Mean	
	0.893895	18.53831	6.463567	34.86600	

ANEXO 76: ANVA de número de raíces para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	2438.980000	270.997778	16.46	<.0001
Error	40	658.400000	16.460000		
Corrected Total	49	3097.380000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NRA Mean	
	0.787433	28.61137	4.057093	14.18000	

ANEXO 77: ANVA de peso fresco de raíces (g) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.09090916	0.01010102	6.19	<.0001
Error	40	0.06525634	0.00163141		
Corrected Total	49	0.15616551			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFR Mean	
	0.582133	48.13574	0.040391	0.083910	

ANEXO 78: ANVA de peso seco de raíces (g) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.00116689	0.00012965	5.49	<.0001
Error	40	0.00094486	0.00002362		
Corrected Total	49	0.00211176			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSR Mean	
	0.552570	39.71405	0.004860	0.012238	

ANEXO 79: ANVA de peso fresco total (g) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.04175163	0.00463907	0.28	0.9770
Error	40	0.66654109	0.01666353		
Corrected Total	49	0.70829272			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFTO Mean	
	0.058947	33.74072	0.129087	0.382586	

ANEXO 80: ANVA de peso seco total (g) para la etapa de enraizamiento.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.00200941	0.00022327	0.64	0.7589
Error	40	0.01402661	0.00035067		
Corrected Total	49	0.01603602			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSTO Mean	
	0.125306	30.30106	0.018726	0.061800	