

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**“RESPUESTA DE CITOQUININA Y AUXINA EN LA
MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE LA FRESA**

(Fragaria x ananassa Duch) cv. Aroma”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERA AGRÓNOMA

TIFFANY PILAR CALZADA PELAEZ

LIMA – PERÚ

2021

La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación

(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA

**“RESPUESTA DE CITOQUININA Y AUXINA EN LA MICROPROPAGACIÓN IN
VITRO DE LA FRESA (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Aroma”**

TIFFANY PILAR CALZADA PELAEZ

Tesis para optar el Título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Luz Rayda Gómpez Pando
PRESIDENTA

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

Dr. Hugo Soplín Villacorta
MIEMBRO

Ing. M.S. Andrés Casas Díaz
MIEMBRO

LIMA-PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mi madre Juana Pelaez Moreno y en memoria de mi abuelita Martina Moreno Saavedra

por ser grandes mujeres de admiración y ejemplo, ser mi inspiración

y motivación

por su inmenso amor, esfuerzo, sacrificio y sus consejos e instruirme en la vida

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, a Dios, quien es fuente de sabiduría, conocimiento e inteligencia, por haberme dado la fortaleza y una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A mi asesora Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa, por sus consejos, escucharme, orientarme y confiar en mí para esta presente investigación.

A mis compañeras del laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT) por compartir su experiencia durante la ejecución de la presente investigación.

A los profesores Tejada y David Saravia, quienes me orientaron para terminar la presente investigación.

A mis amigos de la facultad, quienes me apoyaron desinteresadamente durante la ejecución de la investigación.

A los miembros de jurado de tesis por su amabilidad de brindarme parte de su valioso tiempo para poder revisar la tesis

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Generalidades del cultivo.....	3
2.1.1 Distribución geográfica y origen	3
2.1.2 Descripción botánica.....	3
2.1.3. Reproducción.....	4
2.2 La fresa en el Perú.....	5
2.2.1 Variedades de día corto.....	5
2.2.2 Variedades de día neutro	6
2.3 Importancia económica.....	7
2.4 Micropropagación <i>in vitro</i>	7
2.4.1 Ventajas de la micropropagación <i>in vitro</i>	8
2.4.2 Etapas en la micropropagación.....	8
2.4.3 Factores que influyen en la micropropagación	8
2.4.4 Vitricificación	9
2.5 Biorreactores.....	10
2.5.1 Sistema de inmersión temporal.....	10
2.6 Generalidades del medio de cultivo	11
2.7 Reguladores de crecimiento vegetal.....	12
2.7.1 Auxinas	12
2.7.2 Giberelina.....	14
2.7.3 Citocinina	14
2.8 Aclimatación.....	15
2.8.1 Sustrato: Premix #3.....	15
2.8.2 Solución: Hidropónica la Molina®.....	15
2.8.3 Extracto de algas	16
2.8.4 Medio de cultivo: Murashige y Skoog	16
2.9 Antecedentes de reguladores de crecimiento en la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>fragaria sp.</i>	16
III. MATERIALES Y METODOLOGÍA	18
3.1 Lugar de ejecución	18

3.2 Material biológico	18
3.3 Metodología.....	20
3.3.1 Preparación del medio de cultivo.....	21
3.3.2 Procedimiento.....	21
3.4 Parámetros de evaluación	25
3.4.1 Etapa de multiplicación.....	25
3.4.3 Etapa de enraizamiento	27
3.4.4 Etapa de aclimatación	27
3.5 Diseño experimental.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Objetivo 1	29
4.1.1 Experimento preliminar de multiplicación.....	29
4.1.2 Multiplicación: brote tipo 1	30
4.1.3 Multiplicación: brote tipo 2	35
4.2 Objetivo 2	40
Determinación del efecto de la concentración de dos Auxina en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i>	40
4.2.1 Enraizamiento: brote tipo 1	40
4.2.2 Enraizamiento: brote tipo 2	43
4.3 Objetivo 3	47
4.3.1 Porcentaje de sobrevivencia	47
4.3.2 Incremento de altura (δ h)	48
4.3.3 Incremento en el número de hojas (δ #h)	49
4.3.4 Incremento de longitud de hoja (δ l)	49
V. CONCLUSIONES.....	51
VI. RECOMENDACIONES.....	52
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	53
VIII.ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch).....	3
Tabla 2: Medio basal Murashige y Skoog (1962)	11
Tabla 3: Concentración de nutrientes	16
Tabla 4: Materiales, equipos y reactivos utilizados	19
Tabla 5: Descripción de tratamientos para la fase de multiplicación	22
Tabla 6: Descripción de tratamientos para la fase de enraizamiento.....	23
Tabla 7: Descripción de tratamientos para la fase de aclimatación.....	24
Tabla 8: Resultado en la formación de brotes, después de los 31 días en la etapa de multiplicación del brote tipo 1	29
Tabla 9: Respuestas del peso fresco y seco de brotes propagables en la etapa de multiplicación del brote tipo 1	31
Tabla 10: Respuestas del número y longitud de raíz (mm) en la etapa de multiplicación del brote tipo 1.....	31
Tabla 11: Respuestas de peso fresco y seco de la hoja en la etapa de multiplicación del brote tipo 1.....	32
Tabla 12: Porcentaje (%) de variables cualitativas del material tipo 1	33
Tabla 13: Respuestas del peso fresco y seco de brotes propagables para la etapa de multiplicación del brote tipo 2.....	36
Tabla 14: Respuestas del número de raíz y longitud de raíz (mm) en la etapa de multiplicación del brote tipo 2.....	36
Tabla 15: Respuestas del peso fresco y seco total en la etapa de multiplicación del brote tipo 2	37
Tabla 16: Porcentaje (%) de variables cualitativas del brote tipo 2.....	38
Tabla 17: Diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la formación de hojas del brote tipo 1.....	40
Tabla 18: Diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la formación de raíces del brote tipo 1.....	43
Tabla 19: Diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la formación de hojas del brote tipo 2.....	44
Tabla 20: Diferentes tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> en la formación de raíces en el brote tipo 2.....	46
Tabla 21: Resultados de la aclimatación de un 1 mes	47
Tabla 22: Comparación de medias del incremento de longitud de hoja de la fase de aclimatación.....	50

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1: Morfología general de una planta de fresa	4
Figura 2: Cultivo Aroma	7
Figura 3: Principios de operación del Sistema de Erlemeyer Gemelos	10
Figura 4: Diagrama de flujo de actividades.....	20
Figura 5: Preparación del medio de cultivo.....	21
Figura 6: Explante fenolizado	22
Figura 7: Brotes sembrados en el medio de cultivo de multiplicación, A: Brotes con 2 tallos a una altura de 0.5 cm, B: Brotes 2 tallos <0.5 cm con hoja y C: Brotes con 3 tallos de 0.5 -1cm> sin hojas	22
Figura 8: Explantes colocados a estufa	23
Figura 9: Procedimiento de la siembra de fresa en el invernadero A: El explante sumergido en Benomil, B: Preparación del Almacigo y C: Siembra del explante.....	24
Figura 10: Microtunel en el invernadero.....	25
Figura 11: Se muestra la diferencia entre dos plantas de fresa crecimiento <i>in vitro</i> A: Planta deforme: Presenta alteraciones en la forma y color de sus hoja y B: Planta no deforme: Planta normal	26
Figura 12: Se muestra la diferencia entre dos plantas de fresa C: Hoja translúcida y D: Hoja no translúcida	26
Figura 13: Se muestra la diferencia del vigor entre las tres plantas de fresa de crecimiento <i>in vitro</i> E: Verde oscuro, F: Verde claro y G: Verde claro marchito.....	27
Figura 14: Resultados del número de brotes propagables y no propagables en la etapa de multiplicación del brote tipo 1	30
Figura 15: Brotes propagables de los tratamientos en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> del brote tipo 1	34
Figura 16: Resultados del número de brotes propagables y no propagables en la etapa de multiplicación del brote tipo 2.....	35
Figura 17: Brotes propagables de los tratamientos en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> del brote tipo 2.....	39
Figura 18: Respuesta del número de raíces en la etapa de enraizamiento del brote tipo1 ...	41
Figura 19: Respuesta de la longitud de raíz en la etapa de enraizamiento del brote tipo 1 .	42

Figura 20: Etapa de enraizamiento del brote tipo 1, T1: MS +ANA 0.1mg/L, T2: MS +ANA 0.01mg/L, T3: MS + IBA 0.1mg/L, T4: MS + IBA 0.01mg/L y T5: MS	43
Figura 21: Respuesta del número de raíces en la etapa de enraizamiento del brote tipo 2 ..	44
Figura 22: Respuesta de la longitud de raíces en la etapa de enraizamiento del brote tipo 2	45
Figura 23: Etapa de enraizamiento brote tipo 2, T1: MS +ANA 0.1mg/L, T2: MS +ANA 0.01mg/L, T3: MS + IBA 0.1mg/L, T4: MS + IBA 0.01mg/L y T5: MS.....	47
Figura 24: Porcentaje de sobrevivencia (%) por tratamiento en la fase de aclimatación	47
Figura 25: Resultados de medias del incremento de la altura en la fase de aclimatación ...	48
Figura 26: Resultados de medias del incremento del número de hojas en la fase de aclimatación.....	49
Figura 27: Plántulas de fresa cv. Aroma aclimatadas a los 31 días	50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Ficha técnica de sustrato premix 3.	61
ANEXO 2: Ficha técnica del producto Phycoterra de extracto de algas.	62
ANEXO 3: ANVA de número de brotes propagables para ensayo preliminar multiplicación del brote tipo 1.....	63
ANEXO 4: ANVA del número de brotes propagables para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	63
ANEXO 5: ANVA del número de brotes no propagables en la vitroplanta en la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	63
ANEXO 6: ANVA de peso fresco propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	64
ANEXO 7: ANVA del peso seco propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	64
ANEXO 8: KRUSKAL WALLIS del número de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	64
ANEXO 9: KRUSKAL WALLIS de la longitud de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del material tipo 1.	65
ANEXO 10: ANVA de la altura de vitroplanta (mm) para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	65
ANEXO 11: ANVA del peso fresco de hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	65
ANEXO 12: ANVA de peso seco de hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	66
ANEXO 13: ANVA de peso fresco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación sin del brote tipo 1.	66
ANEXO 14: ANVA Peso seco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.....	66
ANEXO 15: ANVA de número de brotes propagables de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	66
ANEXO 16: ANVA de número de brotes no propagables de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	67

ANEXO 17: ANVA de peso fresco de brotes propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del material tipo 2.....	67
ANEXO 18: ANVA de peso seco de brotes propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.	67
ANEXO 19: KRUSKAL WALLIS de número de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	67
ANEXO 20: KRUSKAL WALLIS de longitud de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	68
ANEXO 21: ANVA de altura (mm) de la vitroplanta para la segunda multiplicación el brote tipo 2.....	68
ANEXO 22: ANVA de peso fresco hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	68
ANEXO 23: ANVA de peso seco de hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	68
ANEXO 24: ANVA de peso fresco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	69
ANEXO 25: ANVA de peso seco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.....	69
ANEXO 26: ANVA Altura (mm) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	69
ANEXO 27: ANVA Número de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	69
ANEXO 28: ANVA Peso fresco de hoja (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.	70
ANEXO 29: ANVA Peso seco de hoja (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	70
ANEXO 30: ANVA de Número de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	70
ANEXO 31: ANVA de longitud de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	70
ANEXO 32: ANVA Peso fresco de raíz (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	71
ANEXO 33: ANVA del peso seco de raíz (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.	71

ANEXO 34: ANVA de peso fresco Total (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.	71
ANEXO 35: ANVA de Peso seco total (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.....	71
ANEXO 36: ANVA Altura (mm) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.	72
ANEXO 37: ANVA del número de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.....	72
ANEXO 38: ANVA peso fresco de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.....	72
ANEXO 39: ANVA del peso seco de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.....	72
ANEXO 40: ANVA Número de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento brote tipo 2.	73
ANEXO 41: ANVA Longitud de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento brote tipo2.	73
ANEXO 42: ANVA del peso fresco raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.....	73
ANEXO 43: ANVA del peso seco de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.....	73
ANEXO 44: ANVA de peso fresco total de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento brote tipo2.....	74
ANEXO 45: ANVA del peso seco total de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.....	74
ANEXO 46: Prueba de Kruskal Wallis para variable altura en la etapa de aclimatación. ..	74
ANEXO 47: Prueba de Kruskal Wallis para la variable del número de hojas en la etapa de aclimatación.....	74
ANEXO 48: Prueba de Kruskal Wallis para la variable de longitud de foliolo en la etapa de aclimatación.....	75

RESUMEN

En la actualidad se está empleando técnicas de micropropagación *in vitro*, porque se pueden obtener plantas libres de enfermedades con altas tasas de multiplicación y rejuvenecidas de alta calidad durante cualquier época del año y en un corto tiempo. Por ello, en esta investigación se realizaron ensayos de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación y enraizamiento *in vitro*, aclimatando el cultivo. El lugar de ejecución fue en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se trabajó con dos tipos de materiales. En la multiplicación del material tipo 1, el tratamiento T1: MS +BAP 0.5mg/l, obtuvo 3 número de brotes propagables y en la etapa de enraizamiento el tratamiento T4: IBA + 0.01mg/l, mostró una mayor disposición en la formación de longitud y número raíz de 33.22 mm y 8 respectivamente. En la etapa de multiplicación para el material tipo 2, el tratamiento T1: MS +BAP 0.5mg/Lt, resultó con mayor número de brotes propagables de 6 y en la etapa de enraizamiento el T5: MS testigo resultó con la mayor longitud y número de raíz de 36.6mm y 9, respectivamente. Los resultados mostraron que el material tipo 2, fue el mejor en la formación de los brotes propagables y raíz. Asimismo, los explantes enraizados se llevaron aclimatar, y se logró en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 una supervivencia de 100, 88, 88 y 100 % respectivamente a los 31 días. Luego se aplicaron las diferentes fuentes nutricionales, solución hidropónica A y B, extracto de algas y medio de cultivo Murashige Skoog, los resultados muestran que no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos realizados.

Palabras clave: Fresa, multiplicación, brotes, enraizamiento, raíz y aclimatación

ABSTRACT

In vitro micropropagation techniques are currently being used because disease free materials with high multiplication rates and high quality rejuvenated plants at any time of the year and in a short time. Therefore, in this research, tests were carried out on different concentrations of growth regulators in the multiplication and rooting phase *in vitro*, acclimatizing the crop. The place of the implementation was at the Biotechnology Institute of the National Agrarian University La Molina (UNALM), under a Completely Random Design (DCA). It worked with two types of materials. In the multiplication of the type 1 material, the T1 treatment: MS + BAP 0.5mg / l, obtained 3 number of spreadable buds and in the rooting phase the T4 treatment: IBA + 0.01mg / l, showed a greater disposition in the length formation and root number of 33.22mm and 8 respectively. In the multiplication phase for the type 2 material, the treatment T1: MS + BAP 0.5mg / l, resulted in a greater number of 6 spreadable buds and in the rooting phase the control T5: MS was found with the greatest length and root number of 36.6mm and 9 respectively. The results showed that the type 2 material was the best in the formation of the spreadable buds and root. Likewise, the rooted explants were taken to acclimatize, and a survival of 100, 88, 88 and 100% was achieved in treatments T1, T2, T3 and T4, respectively, at 31 days. Then different nutritional sources were applied, hydroponic solution A and B, algae extract and Murashige Skoog culture medium, the results show that there was no significant difference between the treatments performed.

Keywords: Strawberry, multiplication, buds, rooting, root and acclimatization.

I. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) es una de las frutas de mayor aceptación mundial y es también una de las que tiene usos diversos en fresco y procesado (medicinas o repostería, entre otros). Es un cultivo de importancia económica; sin embargo, presenta diversos problemas en la producción de nuevas plantas por ser una planta híbrida, resultado de una cruce entre *Fragaria virginiana* L.P. Mill. y *Fragaria chiloensis* Duch., y presenta un genoma poliploide complicando la producción de semillas para propagarla; lo que determina su propagación vegetativa conduce al debilitamiento de las plantas y su mayor susceptibilidad a problemas fitosanitarios. La excesiva propagación vegetativa conduce al debilitamiento de las plantas y su mayor susceptibilidad a problemas fitosanitarios.

En el Perú se puede afirmar que se han incrementado los rendimientos de la fresa, debido al uso de los paquetes tecnológicos que incluye material libre de virus, uso de mulching, entre otros. Según la información proporcionada por Miska Farm, se siembran de 1,500 a 2,000 ha de fresas, en promedio, cada campaña. El rendimiento en promedio nacional es de 20 t/ha.

Diversas variedades de fresa se siembran en el mundo, pero son cinco de día corto las más cultivadas las: Chandler, Tajo, Camarosa y día neutro: Sern y Aromas, son las más que se comercializan en Lima y son las que se recomiendan más para la sierra, en valles interandinos y valles abrigados. Asimismo, las fresas de día neutro, pueden ser sembradas durante todo el año, como ocurre con “Aromas.

En la actualidad la biotecnología ha cumplido un papel importante en el desarrollo de las técnicas *in vitro* de células, tejidos y órganos. Por otro lado, las plantas de fresa procedentes del cultivo de tejidos, producen mayor número de estolones que las plantas propagadas por métodos tradicionales; son más uniformes y sobreviven más en el campo, debido a que poseen un excelente vigor y tienen óptima producción de frutos.

La estrategia para obtener un producto vegetal *in vitro* óptimo, depende de lograr un sistema que permita la selección de material en campo, con excelentes condiciones agronómicas.

En el Perú se han realizado pocos trabajos publicados en micropropagación *in vitro* en fresa; sin embargo, se puede afirmar que dentro de estas investigaciones destaca la tesis de grado de Ñahuinlla (2018), donde se estableció un protocolo de micropropagación *in vitro* (*Fragaria x ananassa* Duch.) para los cultivares Albión, Cristal, Sabrina y Camino Real. Lográndose mayor número brotes, en la fase de multiplicación con el medio MS+ 1mg/L de BAP y MS+ 1mg/L de BAP+ 1mg/L de IBA + 0.1mg/L AG3, y en la fase de enraizamiento se la máxima longitud de raíces con el tratamiento 1/2MS+2mg/L de IBA+0.5g/L con carbón activado.

Sin embargo, existen aspectos que deben ser investigados con el objeto de mejorar la eficiencia de esta técnica; por ello la necesidad de un medio de cultivo *in vitro* con reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación y enraizamiento. Además, realizar la aclimatación de los explant

1.1 Objetivo general

Contribuir al desarrollo apropiado de protocolos de cultivo *in vitro* de fresa.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar efecto de la concentración de dos citoquininas en la etapa de multiplicación *in vitro*.
- Determinar efecto de la concentración de dos Auxina en la etapa de enraizamiento *in vitro*.
- Determinar la mejor fuente nutricional en la etapa de aclimatac

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo

2.1.1 Distribución geográfica y origen

Los cultivares más utilizados en la actualidad son cruzamientos de las especies: *Fragaria vesca*, *Fragaria chiloensis*, *Fragaria virginiana* y *Fragaria grandiflora* (Feriol, 2010). 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) (Bhathia, 2015; Bonet, 2010; Kessel, 2012 y Husaini, 2016). La fresa que actualmente se siembra recibe el nombre genérico de fresa en el Perú y se ha concentrado la siembra en diversas localidades del norte chico de Lima, aunque desde hace dos años el cultivo está creciendo más al norte e incluso en zonas de Arequipa y Cusco (REDAGRICOLA, 2017).

2.1.2 Descripción botánica

Es una planta perenne que pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Rosoideae, posee un rizoma cilíndrico, tallos rastreros que emite ramificaciones de gran longitud llamadas estolones (Tabla 1) (Figura 1). Estos están constituidos normalmente por dos entrenudos y una yema terminal que forma una nueva planta al desarrollarse (Feriol, 2010).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)

REINO	Plantae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Rosaceae
GÉNERO	Fragaria
ESPECIE	Fragaria x ananassa
NOMBRE COMÚN	Fresa
PLOIDÍA	Octoploide
NÚMERO DE CROMOSOMAS	2n=8x=56

FUENTE: Folquer, 1986.

La hoja es compuestas trifoliada con peciolo y presenta en su lamina una mayor densidad estomática que otras especies, por lo que se ve muy afectada cuando son sometidas a un estrés hídrico (Reyes y Zschau, 2012).

La flor es tipo corimbo sus pedúnculos florales están en diferentes puntos del eje y terminan a una misma altura. Además, el cáliz tiene cinco sépalos y estambres insertados en el receptáculo (Feriol, 2010). La parte comestible de la fresa es el receptáculo floral engrosado. Sobre esta se encuentran gran cantidad de semillas, que son los verdaderos frutos y se denominan aquenios. (Clavejo *et al*, 2010).

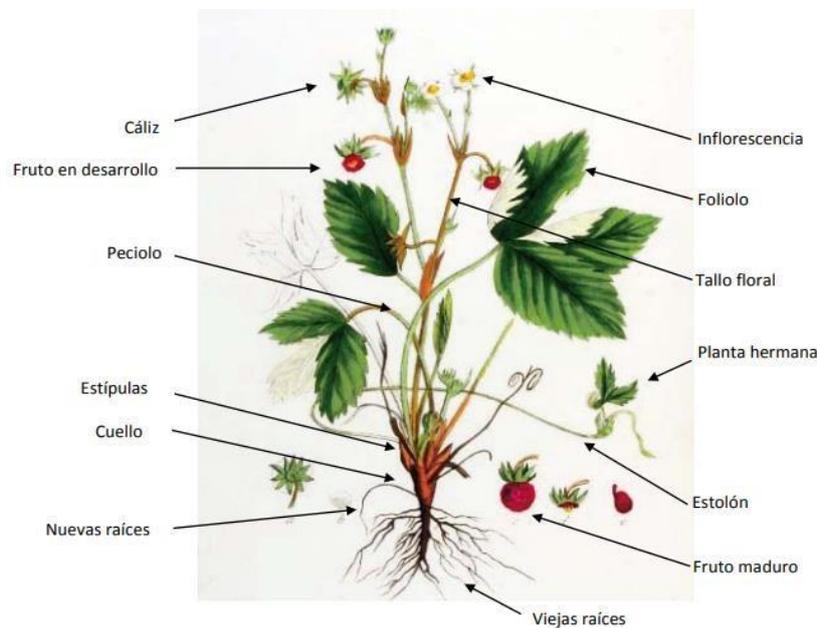


Figura 1: Morfología general de una planta de fresa

FUENTE: Imagen de Kops *et al* (1844)

2.1.3. Reproducción

a. Reproducción Sexual

La reproducción sexual se realiza en especies silvestres y en algunas de sus variedades derivadas de líneas puras de la *Fragaria*. El origen de las variedades híbridas, ocasiona que las plantas obtenidas por semilla no reproduzcan las características de los padres, resultando una segregación de los factores hereditarios, lo que es incompatible con la uniformidad de tipo y calidad exigida por la producción comercial. Por el contrario, en las variedades

híbridas de fruto grande a las que pertenecen todas las variedades comerciales las semillas se utilizan solo en trabajos de mejoramiento, tendientes a la creación de nuevas variedades (Folquer, 1986)

b. Reproducción Asexual

Se realiza en forma vegetativa a través de estolones. Esta fase corresponde a la etapa vegetativa de la fresa, que se caracteriza por la reducción de la cantidad y el tamaño de las flores, con el inicio de la emisión de estolones (Castellón, 2000; Mortesinos, 1993). La propagación en forma asexual presenta un gran riesgo de diseminación de virus, micoplasmas, nemátodos y hongos. Estos problemas se han agudizado por la dificultad de detectar estos patógenos, a la introducción de cultivares susceptibles, al intercambio internacional y a las nuevas técnicas de siembra (Boxus et al., 1977).

2.2 La fresa en el Perú

El Ministerio de Agricultura – DGIA, (2008) citado por Escalante (2015) mencionan que las diversas variedades de fresa se siembran en el mundo, pero son cinco las más cultivadas y las que se comercializan en Lima.

2.2.1 Variedades de día corto

La floración se induce cuando el fotoperiodo es corto (12 horas de luz) y la temperatura fluctúa entre 14 y 18 °C por lo que se trasplanta generalmente en los meses de abril a mayo. En el Perú las más difundidas son:

a. Chandler

Conocida como “Cañetana”. Originaria de la Universidad de California y buena aceptación en el consumo en fresco. Su fruto tiene forma cónica alargada de color rojo intenso y tamaño grande. Puede tener producción continua de agosto hasta fines de enero en la costa y tiene tolerancia al transporte.

b. Tajo

Conocida como “Holandesa” y “Cresta de gallo”, de fruto grande, coloración rojo anaranjada, forma ligeramente redondeada y poco achatada con tendencia a ser lobulado con alto rendimiento y tolerante al transporte.

c. Camarosa

Obtenida por la Universidad de California, es una variedad precoz de elevado rendimiento y con frutos grandes de color rojo intenso, su forma cónica y achatada con buen sabor y firmeza. Por sus mejores características viene reemplazando a la “Chandler” en Estados Unidos.

2.2.2 Variedades de día neutro

Reyes y Zschau (2012) nos dice que el fotoperíodo no influye en la floración; la temperatura o la acumulación de horas frío no inducen a la floración. Además, tienen la ventaja de producir en contra estación (temporada del año contraria a la que venden todos los productores sus cosechas). El Ministerio de Agricultura – DGIA (2008), las variedades de día corto más difundidas son:

d. Sern

Conocida como “Sancho”, obtenido por la Universidad de California. Frutos de forma cónica oblonga, color rojo anaranjado brillante, calibre normal, dureza y pulpa (con corazón lleno) consistente. Puede producir en cualquier época del año. No tiene floración continua, por lo que no se usa en cultivos intensivos.

e. Aromas

Posee alta productividad de hábito erecto con frutos de buen color y calibre muy consistente. Tolera a cambios de temperatura y es un poco más tardío (2 o 3 semanas) en iniciar su fructificación (EUROSEMILLA, 2018). Produce más cantidad de fruta al final de estación (Figura 2).

Las de día neutro, pueden ser sembradas durante todo el año, como ocurre con “Aromas” en la actualidad. Para la sierra, en valles interandinos y valles abrigados se recomienda las variedades de día corto.



Figura 2: Cultivo Aroma

2.3 Importancia económica

Las fresas en el Perú se han incrementado en un 72% las exportaciones alcanzando los U\$ 28.8 millones a un precio promedio de U\$ 1.84 kilo. Destacan las ventas a USA con U\$ 15.3 millones (53%), Canadá U\$ 7.0 millones (24%) y Japón U\$ 2.2 millones (8%) (AGRODATA, 2020).

Según información proporcionada por Miska Farm, en el Perú se siembran de 1,500 a 2,000 ha de fresas, en promedio, cada campaña. 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. “El principal mercado de la fresa es Lima, pero cuando baja su precio se vende a empresas de congelado que la llevan a EE UU y a países europeos (REDAGRICOLA, 2017).

2.4 Micropropagación *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende un conjunto de técnicas las cuales un explante (protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva en condiciones asépticas en un medio de cultivo específico y se incuba en condiciones controladas. Esta técnica se basa en el principio de la totipotencialidad, que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa si se le coloca en condiciones adecuadas (Roca & Mroginski, 1991).

2.4.1 Ventajas de la micropropagación *in vitro*

Las ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación son las siguientes:

- Multiplicación masiva y rápida.
- Obtención de plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias y virus)
- Homogeneidad del material.
- Mayor vigor de las plantas regeneradas.
- Multiplicación durante todo el año.
- Ahorro de espacio con respecto a los sistemas tradicionales de propagación.
- Conservación del material genético en vías de extinción
- Fácil transporte e intercambio de material vegetal.
- Propagación de especies de difícil multiplicación.

2.4.2 Etapas en la micropropagación

Las 5 etapas de la micropropagación *in vitro*, para una especie según Murashige (1974) son:

Etapa 0: Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la modalidad de pretratamiento.

Etapa I: Iniciación o establecimiento aséptico de los explantes que busca garantizar la supervivencia en las nuevas condiciones de cultivo *in vitro*.

Etapa II: Período de multiplicación, donde se desarrollan los brotes o estructuras de multiplicación masiva.

Etapa III: Enraizamiento y trasplante, donde se dan las emisiones radiculares del explante y se prepara el material producido para su supervivencia en condiciones de suelo, para lo cual se debe adaptar las plántulas producidas a condiciones netamente autotróficas.

Etapa IV: Trasplante al suelo y aclimatación de las plántulas, la cual es una etapa crítica.

2.4.3 Factores que influyen en la micropropagación

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación; los más importantes son aquellos dados a conocer por Roca & Mroginski (1991).

- Planta que dona el explante (planta madre).
- El explante
- Asepsia
- Medio de cultivo

Estos factores del cultivo de tejidos, brindan ventajas de la técnica *in vitro* con respecto a otros métodos de propagación vegetativa tradicional, para obtener mejores resultados en especies de difícil de multiplicación.

Para el establecimiento *in vitro* de diferentes especies vegetales se debe elegir, aislar y desinfectar el material, el éxito de esta fase dependerá de las características del explante su estado fisiológico, desarrollo, sanidad y edad. Seguido de la manipulación y esterilización (Serrano y Pinol, 1991). Además, es importante establecer un protocolo para el cultivo de tejidos *in vitro* para las diferentes etapas de micropropagación *in vitro* y así obtener buenos resultados (Resende *et al.*, 2015).

2.4.4 Vitricación

Es un conjunto de desórdenes fisiológicos, anatómicos y morfológicos que presentan los tejidos en condiciones de cultivo *in vitro* (Olmos *et al.*, 2010).

De orden Fisiológicos

- Mayor absorción de agua
- Menor contenido de clorofila
- Capacidad fotosintética y
- Estomas anormales y pocos hipolignificación
- Ausencia de parénquima en empalizada

De orden Anatómicos

- Epidermis, cutículas delgadas
- Grandes espacios intercelulares
- Menor desarrollo del sistema vascular

De orden Morfológicos

- Entrenudos cortos
- Color anormal arrosetamiento
- Hojas más gruesas elongadas y arrugadas
- Tallos de mayor diámetro

Los explantes presentan un aspecto vítreo y transparente, observándose turgencia, fragilidad en hojas y tallos (George & Sherrington, 1984).

2.5 Biorreactores

2.5.1 Sistema de inmersión temporal

El sistema de biorreactores de inmersión temporal, es una técnica que se ha empleado para la micropropagación de diferentes especies. Además, disminuye el manejo manual para la producción (Ziv, 2005). Asimismo, incrementa y reduce los costos de producción (Preil, 2005). Por otro lado, el contacto del explante con el medio de cultivo líquido permite una mayor producción debido a la inmersión en diferente frecuencia, tiempo y en la cantidad de inóculos son los parámetros de importancia en un sistema de inmersión temporal (Castillo *et al.*, 2020).

En la actualidad hay mecanismos que mejoran el control del SIT (Sistema de inmersión temporal), como por ejemplo las electroválvulas, que están conectadas a un compresor automático y mangueras de silicón conectadas a los frascos (secuencia A). Además, poseen un temporizador programable para determinar la frecuencia y la duración de la inmersión del explante en el medio líquido (secuencia B) (Santos *et al.*, 2011). Asimismo, brinda un mayor número de plantas en un mismo espacio o frasco (secuencia C), es decir el volumen de operación permitirá producir más explantes, y finalmente uno de los frascos quedará sin medio de cultivo al haber sido consumido en su totalidad (secuencia D) (Juárez *et al.*, 2011) (Figura 3).

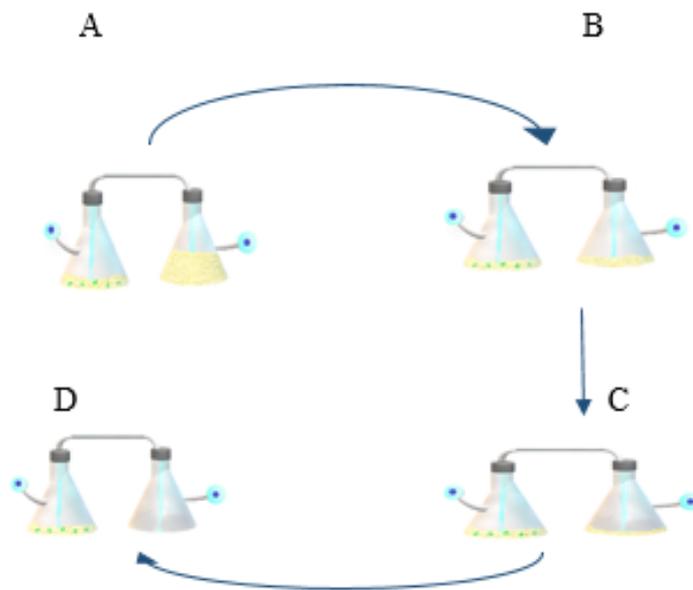


Figura 3: Principios de operación del Sistema de Erlemeyer Gemelos

2.6 Generalidades del medio de cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. El medio de Murashige y Skoog (Tabla 2), ha demostrado que es el adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta, contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores, esenciales para el crecimiento del tejido vegetal (Hurtado y Merino, 1987 ; Murashige y Skoog, 1962).

Tabla 2: Medio basal Murashige y Skoog (1962)

SOLUCIÓN	REACTIVOS	FORMULACIÓN (mg)
MACRONUTRIENTES	Nitrato de amonio – NHNO_3	1650
	Nitrato de potasio – KNO_3	1900
	Cloruro de calcio dihidratado – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	Sulfato de magnesio heptahidratado – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	Fosfato de potasio monobásico – KH_2PO_4	170
MICRONUTRIENTES	Yoduro de potasio – KI	0.83
	Ácido trioxobórico – H_3BO	6.2
	Sulfato de manganeso monohidratado – $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
	Sulfato de zinc heptahidratado – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	Molibdato de sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	Sulfato de cobre pentahidratado – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado – $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Quelatos de Hierro Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	Etilen diamino tetra acetato- Na_2EDTA	37.3
VITAMINAS Y	My-inositol	100
AMINOÁCIDOS	Ac. Nicótico	0.5
	Piridoxina	0.5
	Tiamina	0.1
	Glicina	2

2.7 Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento son compuestos orgánicos, que en pequeñas cantidades pueden estimular, inhibir, o modificar cualquier proceso fisiológico en las plantas (Devlin, 1980). Intervienen en el desarrollo de las plantas tanto en el crecimiento como en la diferenciación de los órganos, regulando la acción de las sustancias químicas o el crecimiento (Hurtado y Merino, 1987).

Algunos reguladores pueden ser estimulantes a bajas dosis o inhibidores a altas dosis en la planta (Rojas y Ramírez, 1993). Asimismo, para un funcionamiento adecuado de una célula es necesario optimizar las concentraciones de los reguladores de crecimiento en el medio para una propagación *in vitro*. Para estimular la extensión y/o la división celular, depende del tipo de explante y de la especie vegetal (Pierik, 1990).

Las auxinas estimulan a la división de células localizadas en el periciclo, en la zona justo arriba de la zona de elongación, para provocar la formación de raíces laterales. Este fenómeno también se aplica en la formación de raíces adventicias la cual puede ocurrir en varios tejidos donde existan un grupo de células en activa división (Squeo y Cardemil, 2006). Actualmente se reconocen cinco tipos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales (Leopold y Kriedemann, 1975).

1. Promotores del crecimiento: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas.
2. Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
3. Etileno.

2.7.1 Auxinas

El término auxina, proviene del griego “auxein” significa “crecer”, fue aislada desde maíz y hongos e identificada más tarde como ácido indol-3- acético (Thimann, 1977). Son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas.

Debido a que las auxinas influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas. El efecto de la auxina en el desarrollo, es la regulación

del crecimiento radicular el cual es definido desde el desarrollo embrionario (Jenik y Barton, 2005).

Entre las muy numerosas sustancias auxínicas tres han tomado gran importancia en lo que concierne al enraizamiento:

- El AIA (ácido indolacético)
- El AIB (ácido indolbutírico)
- El ANA (ácido naftalenacético)

La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares, sin embargo; presenta inconvenientes, debido a que su molécula se destruye fácilmente por oxidación y es poco estable; además, es relativamente soluble y se descompone rápidamente en los tejidos de la planta (Beaulieu, 1973). Este ácido es comúnmente utilizado para promover la iniciación radicular tanto *in vitro* como *ex vitro* (Torrey, 1976).

Otra fitohormona es el Ácido Indol Butírico (IBA). Fue clasificado inicialmente como una auxina sintética, pero es un compuesto endógeno de la planta, más eficiente que IAA en promover formación de raíces laterales y es usado comercialmente con este propósito (Squeo y Cardemil, 2006). Su actividad auxínica es débil, siendo muy eficaz como estimulante de las raíces, debido a que se desplaza muy poco y se retiene cerca del sitio de aplicación (Tenorio, 1994).

El ácido naftalenacético (ANA) tiene un límite de umbral de su actividad y su grado de toxicidad es pequeño y más activo, pero mucho más fitotóxico; ocasionando generalmente el desarrollo de raíces cortas y gruesas (Beaulieu, 1973). Deben evitarse las concentraciones altas con ANA por el peligro de provocar daños en las plantas; ya que tienden a producir raíces gruesas y atrofiadas.

La mezcla de ANA y AIB ha tenido un mejor resultado, debido a la acción que presentan sobre la rizogénesis y la causa radica en su molécula, facilidad de penetración y rapidez de conducción dentro de la planta (Beaulieu, 1973). La velocidad del ácido naftalenacético fue de 6.7 mm/h, y del ácido indolbutírico 3.2 mm/h (Epstein, 1970).

2.7.2 Giberelina

Las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicas, que están inmersos en procesos de desarrollo vegetales. Asimismo, se hallaron más de 100 giberelinas en las plantas, sólo algunas presentan actividad biológica (Tamura 1990; Malonek *et al.* 2005).

Estimulan fuertemente la división y elongación celular en la porción subapical de los tallos y también en el meristemo intercalar. En la tecnología conducente a la regeneración de plantas *in vitro*, el cultivo de meristemos es una metodología ampliamente utilizada con el objeto de eliminar una serie de patógenos presentes en las plantas madres. El rol en esta técnica es doble: primero los tejidos meristemáticos extraídos (explantes o ápices caulinares de mayor tamaño) requieren de ácido giberélico para poder crecer en esta primera fase, aunque ello requiere además de otras hormonas. En segundo lugar, es posible realizar un tratamiento previo con ácido giberélico a plantas madres con objetivo de estimular previamente su crecimiento, en condiciones de altas temperaturas y humedad, favoreciendo la extracción de ápices igualmente libres de los patógenos (Squeo y Cardemil, 2006).

2.7.3 Citocinina

Las citoquininas generalmente son utilizadas en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos, y en concentraciones altas forman nuevas yemas sobre los callos (Margara, 1988). Además, en cultivo de tejidos, actúan incrementando la rapidez de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser enzimas o proteínas estructurales necesarias para la mitosis (Salisbury y Ross, 1994). Asimismo, comúnmente son utilizadas las purinas substituidas Kinetina (KIN) y Benzilaminopurina (BAP), aunque algunas ureas substituidas como el TDZ, también tienen actividad como citoquinina. Estas estimulan la división celular (Krikorian, 1995).

Su efecto hormonal fue visualizado rápidamente al inducir, en compañía de auxina, diferentes tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco y de otras especies bajo condiciones *in vitro*. Un alto nivel de citocinina versus auxina provocaba la formación de brotes en tejidos derivados de explantes de médula, mientras que con niveles bajos de citocininas y/o conjuntamente niveles altos de auxina, se observaba la formación de masas celulares no organizadas (callos) y la formación de raíces con gradientes mayores de auxina (Skoog & Miller 1965).

Los reguladores sintéticos como Benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) o Thidiazuron (TDZ), son más potentes que las hormonas naturales endógenas (zeatina, trans-zeatina o isopentiladenina), debido no sólo a sus particularidades específicas, sino también a que, salvo algunos reportes contrarios, las artificiales no pueden ser degradadas o metabolizadas por el tejido. El Thidiazuron (TDZ), es considerado uno de los inductores más potentes en la formación de nuevos brotes o embriones somáticos tanto en plantas leñosas como herbáceas (Huetteman & Preece 1993).

2.8 Aclimatación

La aclimatación es una fase importante en la cual la plántula pasa por un proceso de adaptación de calidad de *in vitro* a condiciones ambientales (Agramonte *et al.* 1998). Por ello, es necesario la aplicación de técnicas de adaptación para que alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con luz y sustratos sépticos (Preece & Sutter, 1991).

2.8.1 Sustrato: Premix #3

El sustrato premix 3 está compuesto principalmente a base de musgo *Sphagnum* y vermiculita que facilita el trasplante de plántulas no se dañan debido a sus partículas; mejora la retención de agua y aire, siendo muy importante en la oxigenación para la absorción de agua y nutrientes, su granulometría es fina y brinda óptimas condiciones de temperatura y humedad. Favorece el desarrollo y crecimiento de las raíces. Es un material inocuo, no contiene microorganismos o nemátodos patógenos, ni malas hierbas (Anexo 1).

2.8.2 Solución: Hidropónica la Molina®

La Solución hidropónica La Molina®, es una solución nutritiva de A y B, que puede ser utilizada para producir diferentes cultivos, dando muy buenos resultados en hortalizas de hoja, raíces y frutos. El crecimiento y rendimiento puede ser optimizado usando una formulación específica para cada cultivo (UNALM, 2020).

La solución nutritiva “La Molina” contiene la siguiente concentración de nutrientes (Tabla 3):

Tabla 3: Concentración de nutrientes

MACRO Y	MICRONUTRIENTES
210 ppm K	1.00 ppm Fe
190 ppm N	0.50 ppm Mn
150 ppm Ca*	0.50 ppm B*
70 ppm S*	0.15 ppm Zn
45 ppm Mg*	0.10 ppm Cu
35 ppm P	0.05 ppm Mo

*Incluye las cantidades que aporta el agua

2.8.3 Extracto de algas

Es una enmienda líquida en una suspensión de microalgas que provee materia orgánica al suelo y son producidas en estanques al aire libre, enriquecido con macronutrientes y microelementos con composición total de carbohidratos 48 %, lípidos 22 %, proteína 26%, humedad y volátiles 1%, lípidos totales 22% y contenido de cenizas 3%. Mejora la eficiencia del uso del agua, aumento de carbono y nitrógeno en el suelo, mejora la raíz, tolerancia al estrés y mayor rendimiento (Anexo 2). Análisis mínimos garantizados son el Nitrógeno total 0.3 %, Fosforo soluble 0.3 %, Potasio 0.1 % y materia Orgánica (Derivados de suspensión con 10 % de micro algas).

2.8.4 Medio de cultivo: Murashige y Skoog

El medio de cultivo utilizado fue de Murashige y Skoog por ser el adecuado para una gran variedad de especies. Para este trabajo se utilizaron las combinaciones de macronutrientes y micronutrientes (Tabla 2).

2.9 Antecedentes de reguladores de crecimiento en la micropropagación *in vitro* de *fragaria sp.*

En la tesis de Ñahuinlla (2018), se menciona que para la fase de multiplicación los medios, MS+ 1mg/L de BAP y el medio MS+ 1mg/L de BAP+ 1mg/L de IBA + 0.1mg/L AG3 fueron los mejores, permitieron obtener un mayor número de brotes. Mientras que en la etapa de enraizamiento el tratamiento 1/2MS+2mg/L de IBA+0.5g/L de carbón activado favoreció la máxima longitud de raíces, pero no el máximo número de raíces.

Manosh *et al.* (2007), en su investigación empleo meristemas de estolones provenientes del campo, de la especie (*Fragaria chiloensis* D.) para la producción de plántulas *in vitro* libre de patógenos. Los estolones fueron sometidos a un proceso de desinfección con Hipoclorito de Sodio al 2.5 % durante dos tiempos de exposición 5 y 10 min., se le aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se procedió a realizar el corte de los meristemas y se sembraron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) complementado con 1 mg/L de ácido giberélico (AG3). Después de desarrollados los meristemas, se multiplicaron en un medio complementado con 1 mg/L de BAP, que induce a la formación de yemas axilares, a partir de las cuales se obtuvieron nuevas plántulas que pasaron a la fase de enraizamiento, hasta que lograran desarrollar un sistema radicular bien conformado.

Cuazit y Núñez (2017), investigaron el establecimiento y micropropagación de fresa en un sistema de inmersión temporal. Los mejores tratamientos para la producción de raíz fueron las concentraciones de IBA a 0.15mg/L y 0.3mg/L. Estas resultaron mejores, al ser el regulador de crecimiento, que menos hojas necrosadas presento y mayor número de hojas y raíces obtuvo.

En otro estudio la proliferación del número máximo de brotes se obtuvo con el medio MS+0.5mg/L BAP, el más alto número promedio de brotes fue de 7. Por otro lado, el mejor 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).

Sakila *et al.* (2007), evaluaron el efecto de varios reguladores del crecimiento vegetal en la respuesta *in vitro* de explantes de fresa, resultando el medio MS suplementado con 2,4 D (3 mg/L) y BAP (0.5 mg/L), ser el más eficiente en la formación y el desarrollo de callos. Con las combinaciones de ANA (0.75 mg/L) y BAP (1.5 mg/L), se obtuvieron altos porcentajes de inducción y regeneración de múltiples brotes.

Lal *et al.* (2003), mencionan que los cultivares de Chandler, Oso Grande y Ofra, la regeneración se registra después de 7 semanas y el enraizamiento después de 2 semanas. En los tres cultivares se registró la regeneración en el medio MS+4mg/L BAP, así también el máximo de número de brotes por explante fue $13,8 \pm 3,6$ y en el cultivar Ofra el rango de brotes por explante fue 4 - 36. Además, el máximo de enraizamiento para los tres cultivares fue el medio $\frac{1}{2}$ MS+ 1mg/L IBA.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Lugar de ejecución

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de cultivo de tejidos del “Instituto de Biotecnología”– IBT, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de La Molina, provincia y departamento de Lima.

3.2 Material biológico

Las plantas *in vitro* de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Aroma fueron introducidas a partir de meristemas y conservadas en un medio de mantenimiento, en el laboratorio del Instituto de Biotecnología – UNALM, para este presente ensayo se trabajó a partir de los brotes obtenidos.

a. Condiciones de incubación

- Temperatura: $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 horas oscuridad
- Luminosidad: 3180 lux

b. La ubicación geográfica

Latitud: $12^{\circ}04'46''\text{S}$
Longitud: $76^{\circ}56'46''\text{W}$
Altitud: 243 msnm

3.2.1 Materiales, equipos e insumos

Tabla 4: Materiales, equipos y reactivos utilizados

EQUIPOS DE LABORATORIO	MATERIALES	REACTIVOS
Campana de flujo laminar	Vasos precipitados de 500ml	Sales Murshine & Skoog, 1978
Autoclave	Pipetas de 5 y 10ml	Vitaminas MS
Estufa	Jarra transparente de 2 litros	Sacarosa/ azúcar
Potenciómetro	Varillas de vidrio	Agar
Agitador magnético	Varillas de metal	BAP (Bencil amino purina)
Balanza analítica	Cuchara	IBA (Ácido indol-3-butírico)
cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo	KIN (Kinetina)
Refrigeradora	Frascos ámbar	ANA (Ácido Naftalenacético)
Horno microondas	Papel filtro	Agua destilada
Estereoscopio	Papel aluminio	
pH-metro	Etiquetas	
	Lápiz	
	Tapabocas	
	Mechero de alcohol	
	Placas Petri	
	Gorro	
	Guantes de goma	

3.3 Metodología

El presente estudio comprende desde fase II, III y IV de multiplicación, enraizamiento y aclimatación como observamos en la figura 4.

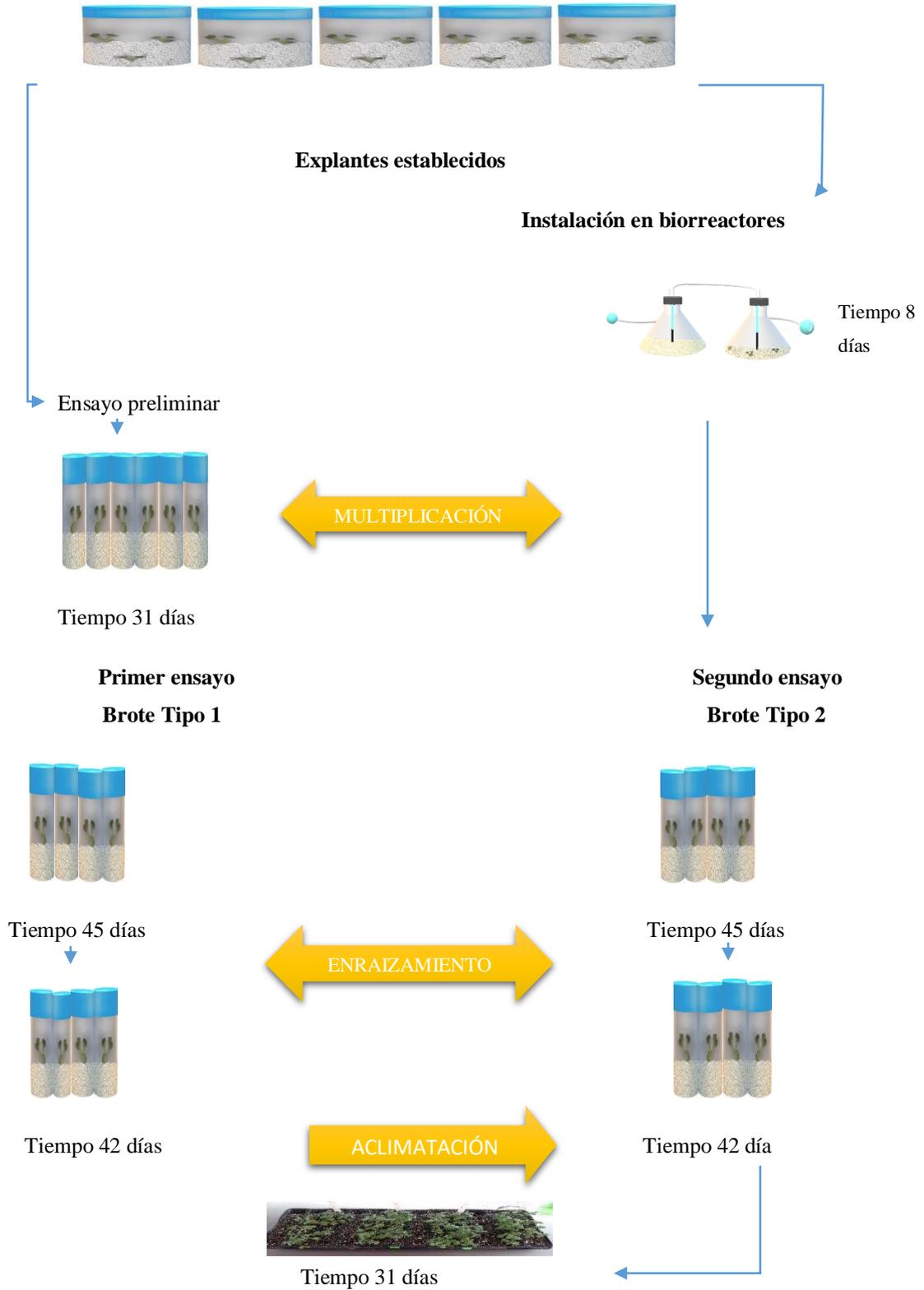


Figura 4: Diagrama de flujo de actividades

3.3.1 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (Tabla 2), fue empleado en pruebas preliminares dando buenos resultados para el cultivo *in vitro* de fresa. El pH del medio de cultivo utilizado 5.7 ± 0.1 , y se adicionó agar 7.2g/L al medio de cultivo (Figura 5). Al finalizar la preparación del medio de cultivo se colocó en la autoclave por 25 min a 121°C, a una presión de 1.5 bar.



Figura 5: Preparación del medio de cultivo

3.3.2 Procedimiento

a. Etapa de Multiplicación

Los brotes se colocaron en los tratamientos de multiplicación (Tabla 5). Se manejó dos tipos de brotes del tipo 1: brotes que no pasaron por un sistema de biorreactores y el brote tipo 2: brotes que pasaron por un sistema de biorreactores, que contenía BAP 0,5mg/L +vitaminas + Ms + 30gr de azúcar en un sistema de inmersión temporal, durante un periodo de 8 días con 250ml de medio de cultivo. Luego los dos tipos de materiales obtenidos se colocaron en sus respectivos tratamientos de multiplicación en tiempos distintos.

Se realizó un ensayo preliminar de multiplicación que duro 31 días, el explante sembrado fue 3 tallos, y se eliminaron las hojas del explante, dejando solo tallos, tomando como referencia la investigación Ñahuinlla, 2018; sin embargo, se realizó mejoras de la selección del explante, debido que el material fenolizaba el medio de cultivo (Figura 6).

Por ello se sembraron brotes que tenían una altura mayor a 0.5 cm con 2 tallos y se eliminaron las hojas. Pero si la altura era menor a 0.5 cm, no se eliminan las hojas. En el caso que el explante tenga 3 tallos se corta todas las hojas a una altura de 0.5 o 1cm (Figura 7), y se sumergió los explantes en cisteína 50 ppm (antioxidante) antes de colocar en los tubos. Esta etapa duro 45 días, y se logró tener un manejo adecuado del material y reducir la fenolización.

Tabla 5: Descripción de tratamientos para la fase de multiplicación

<i>Tratamientos</i>	<i>Multiplicación</i>
<i>T1</i>	MS +BAP 0.5mg/L +azúcar 20gr + Agar
<i>T2</i>	MS +BAP 1.0mg/L +azúcar 20gr + Agar
<i>T3</i>	MS +BAP 1.5mg/L +azúcar 20gr + Agar
<i>T4</i>	MS +BAP 2.0mg/L +azúcar 20gr + Agar
<i>T5</i>	MS +BAP 0.5mg/L + 0.5mg/L KIN + azúcar 20gr + Agar
<i>T6</i>	MS +azúcar 20gr + Agar



Figura 6: Explante fenolizado



Figura 7: Brots sembrados en el medio de cultivo de multiplicación, A: Brots con 2 tallos a una altura de 0.5 cm, B: Brots 2 tallos <0.5 cm con hoja y C: Brots con 3 tallos de 0.5 -1cm> sin hojas

b. Etapa de Enraizamiento

Esta fase se efectuó en condiciones *in vitro* para los dos tipos de explantes, para ello se empleó brotes producidos durante la fase de multiplicación. Se colocó en tubos durante un periodo de 42 días. Se seleccionaron para esta etapa brotes vigorosos con 2 y 3 tallos mayores a 0.5 -1cm y se eliminaron las hojas, sin presencia de raíz para una adecuada evaluación. Finalmente, culminada la etapa se realizó las evaluaciones (Figura 7). La descripción de cada tratamiento de enraizamiento se explica en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6: Descripción de tratamientos para la fase de enraizamiento

<i>Tratamientos</i>	<i>Enraizamiento</i>
T1	MS +ANA 0.1mg/L +azúcar 20gr + Agar
T2	MS +ANA 0.01mg/L +azúcar 20gr + Agar
T3	MS + IBA 0.1mg/L +azúcar 20gr + Agar
T4	MS + IBA 0.01mg/L +azúcar 20gr + Agar
T5	MS + azúcar 20gr + Agar



Figura 8: Explantes colocados a estufa

c. Etapa de Aclimatación

Se seleccionaron los explantes con raíz de la etapa de enraizamiento con una población de 36 vitroplantas, con cuatro tratamientos y 9 repeticiones.

Para la aclimatación de las plantas de fresa se estableció el siguiente protocolo:

- 1) Extraer las plantas de los tubos y lavar las raíces con agua potable, hasta eliminar el medio de cultivo.
- 2) Preparar fungicida Benomil 1g/L y sumergir el explante durante 10min (Figura 9)
- 3) Colocar los explantes en un recipiente con agua destilada para evitar la pérdida de humedad del explante.
- 5) Ubicar las raíces de las plantas en contacto directo con el sustrato, luego cubrir con el sustrato y rotular los tratamientos.
- 6) Asperjar lo explantes para evitar su deshidratación y para mantener la humedad.
- 7) Llevar las plantas a un Microtunel (Figura 10) y regar diariamente. Por otro lado, la primera semana se aplicó las fuentes nutricionales (Tabla 7).
- 8) Adicionalmente, cada semana se realizaron aplicaciones de fungicida con ingrediente activo Benomil 1g/L, se aplicó para prevenir la presencia de fitopatógenos durante los 31 días.

Tabla 7: Descripción de tratamientos para la fase de aclimatación

	<i>Tratamiento</i>	<i>dosis</i>
T1	Sin aplicación	Agua
T2	Solución A y B	A: 5ml/L B :2ml/L
T3	Extracto de algas	1 ml/L
T4	MS	50ml /L

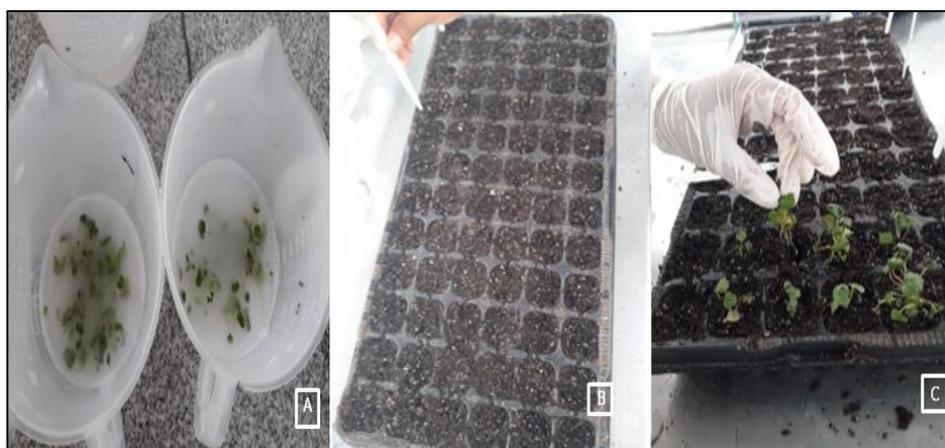


Figura 9: Procedimiento de la siembra de fresa en el invernadero A: El explante sumergido en Benomil, B: Preparación del Almacigo y C: Siembra del explante



Figura 10: Microtunel en el invernadero

3.4 Parámetros de evaluación

3.4.1 Etapa de multiplicación

a. Experimento preliminar de multiplicación

Se realizó con el brote tipo 1 con 3 repeticiones, esta etapa duró un periodo de 4 semanas, y se la evaluó al finalizar el ensayo.

- N° de brotes

b. Multiplicación del brote tipo 1 y 2

Esta etapa duró 45 días del brote tipo 1 con 8 repeticiones y brote tipo 2 con 10 repeticiones por tubo, las evaluaciones se realizaron al finalizar el ensayo y los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Altura de planta (mm)
- N° brotes propagables
- N° brotes no propagables
- Longitud de raíz (mm)
- N° Raíces

- Peso fresco brotes propagables (g)
- Peso fresco hojas (g)
- Peso fresco total (g)
- Peso seco brotes propagables (g)
- Peso seco hojas (g)
- Peso seco total (g)
- Textura de hojas
- Forma de explante
- Vigor de vitroplanta

c. Variables cualitativas para la etapa de multiplicación *in vitro* del cultivar Aroma



Figura 11: Se muestra la diferencia entre dos plantas de fresa crecimiento *in vitro* A: Planta deforme: Presenta alteraciones en la forma y color de sus hoja y B: Planta no deforme: Planta normal

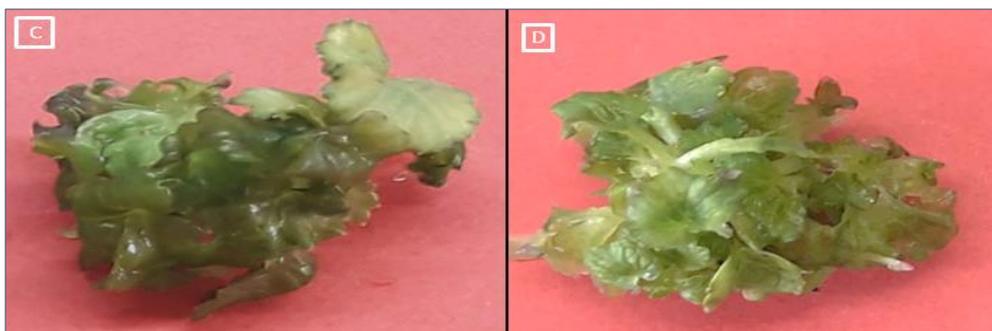


Figura 12: Se muestra la diferencia entre dos plantas de fresa C: Hoja translucida y D: Hoja no translucida



Figura 13: Se muestra la diferencia del vigor entre las tres plantas de fresa de crecimiento *in vitro* E: Verde oscuro, F: Verde claro y G: Verde claro marchito

3.4.2 Etapa de enraizamiento

Esta etapa duro 6 semanas para el brote tipo1 fueron 5 repeticiones y el brote tipo 2 fue 10 repeticiones, y los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Altura de planta (mm)
- Longitud de raíz(mm)
- N° Raíces
- N° Hojas
- Peso fresco hojas (g)
- Peso fresco raíces(g)
- Peso fresco total(g)
- Peso seco hojas (g)
- Peso seco de raíces(g)
- Peso seco total (g)
- Presencia de callos(g)

3.4.3 Etapa de aclimatación

Esta etapa duro un periodo de 4 semanas con 9 repeticiones, las evaluaciones se realizaron al finalizar el ensayo, y los parámetros fueron los siguientes:

Porcentaje de plántulas aclimatadas (%): Incremento de altura de planta (cm): Es la diferencia de la altura final con altura inicial de la plántula.

Incremento de número de hojas (unidades): Es la diferencia del número de hoja final con el número de hoja inicial de la plántula.

Incremento de la longitud de hoja (cm): Es la diferencia de la longitud final con longitud inicial de la plántula.

3.5 Diseño experimental

Para esta investigación se empleó el diseño completamente al azar (DCA) para el brote tipo 1 y 2. Los datos fueron sometidos a dos supuestos, la prueba de normalidad con el test de Anderson – Darling y la prueba de homogeneidad con el test de Bartlett. Luego se realizó un análisis de varianza y finalmente la prueba de comparaciones de Tukey a un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para este análisis se utilizó el software estadístico Minitab 18. Por otro lado, para la etapa de aclimatación se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, como se utilizó en la tesis de Vergara 2018, y se empleó el software InfoStat 2019.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Objetivo 1

Determinación del efecto de la concentración de dos citoquininas en la etapa de multiplicación *in vitro*.

4.1.1 Experimento preliminar de multiplicación

En el ensayo de medios de cultivo de multiplicación se utilizó 6 tratamientos con 3 repeticiones por cada tratamiento. Los resultados del análisis de varianza para el número de brotes se muestran en el Anexo 3, donde el valor de p es menor a 0.05, significa que al menos hay un tratamiento diferente a los demás. La prueba comparativa de tukey, el mejor tratamiento fue T1 con 4.3 número de brotes propagables (Tabla 8).

Tabla 8: Resultado en la formación de brotes, después de los 31 días en la etapa de multiplicación del brote tipo 1

TRATAMIENTOS	NÚMEROS DE BROTES
T1: MS +BAP 0.5mg/L	4.3 A
T2: MS +BAP 1.0mg/L	0.6 B
T3: MS +BAP 1.5mg/L	1.6 AB
T4: MS +BAP 2.0mg/L	2.0 AB
T5:MS +BAP 0.5mg/L + 0.5mg/L KIN	2.3 AB
T6: MS	1.0 B

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

4.1.2 Multiplicación: brote tipo 1

a. Número de brotes

En la multiplicación se obtuvo datos significativos con respecto al número de brotes propagables y no propagables. Los resultados del análisis de variancia se muestran en el Anexo 4 y 5, donde el valor p es menor a 0.05, significa que hay al menos un tratamiento que difiere a los demás (Figura 14).

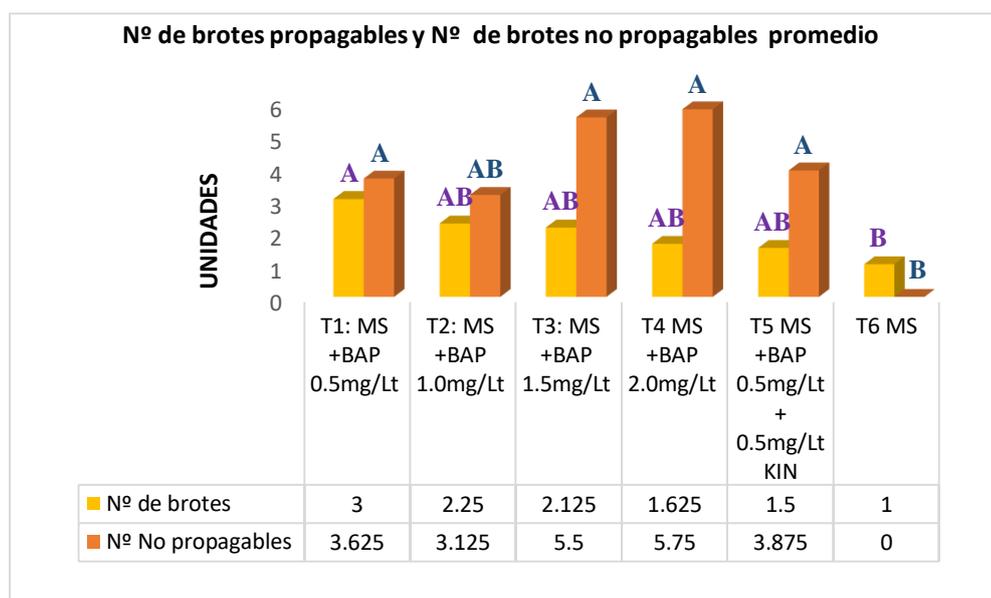


Figura 14: Resultados del número de brotes propagables y no propagables en la etapa de multiplicación del brote tipo 1

En la Figura 14, se detalla, los datos obtenidos para la variable respuesta del número de brotes propagables. Se puede interpretar que los promedios no distan ampliamente entre sí; sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significación de 95 % de confianza, indica diferencias significativas. Los tratamientos T1 (MS +BAP 0.5mg/L), T2 (MS +BAP 1.0mg/L), T3 (MS +BAP 1.5mg/L) y T4 (MS +BAP 2.0mg/L) fueron 3.0, 2.25, 2.12 y 1.62 respectivamente, los resultados muestran valores similares entre los tratamientos. Por otro lado, el tratamiento T5 (MS +BAP 0.5mg/L+ 0.5mg/L KIN) el número de brotes fue menor (1.5) al haber adicionado la KIN, comparado con el tratamiento T1 (MS +BAP 0.5mg/L) que fue mayor (3) a una concentración baja de BAP. Para el caso del tratamiento T6 (MS) se obtuvo el menor número de brotes (1); ya que no se adiciono ningún regulador de crecimiento. El propósito de la etapa de multiplicación es inducir la producción de brotes, y el medio MS (Murashige y Skoog) favorece al desarrollo de hojas y

raíces, mas no a la producción de brotes (Ñahuinlla, 2018). Por otro lado, en la investigación de Ashrafuzzaman *et. al* (2013) el máximo de número de brotes se obtuvo con el medio MS+0.5mg/L BAP. Por ello, el tratamiento T1 es una mejor opción con respetos a los demás tratamientos (T1, T2, T3, T4 y T5); ya que a una menor concentración de BAP, genera similar número de brotes y reduce el costo de producción.

Para la variable número de brotes no propagables, los tratamientos T3 y T4 presentaron los mayores valores, comparado con el tratamiento T1, T2 y T5 que presentaron menores valores. El tratamiento T6 no generó brotes no propagables.

Tabla 9: Respuestas del peso fresco y seco de brotes propagables en la etapa de multiplicación del brote tipo 1

TRATAMIENTOS	PESO FRESCO DE BROTOS PROPAGABLE (g)	PESO SECO DE BROTOS PROPAGABLE (g)
T1: MS +BAP 0.5mg/L	0.028 A	0.009 A
T2: MS +BAP 1.0mg/L	0.024 AB	0.005 B
T3: MS +BAP 1.5mg/L	0.017 B	0.001 B
T4 :MS +BAP 2.0mg/L	0.013 B	0.001 B
T5: MS +BAP 0.5mg/L+ 0.5mg/L KIN	0.016 B	0.001 B
T6: MS	0.015 B	0.003 B

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

Los tratamientos con mayor peso fresco de brotes propagables fue el tratamiento T1 con 0.028 g, y el tratamiento T2 en 0.024 g. Asimismo, el peso seco de brotes fue 0.009 g y 0.005 g respectivamente.

Tabla 10: Respuestas del número y longitud de raíz (mm) en la etapa de multiplicación del brote tipo 1

TRATAMIENTO	NÚMERO	LONGITUD DE RAÍZ (mm)	OBSERVACIÓN
T1: MS +BAP 0.5mg/L	0.0 B	0.0 B	
T2: MS +BAP 1.0mg/L	0.0 B	0.0 B	
T3: MS +BAP 1.5mg/L	0.0 B	0.0 B	Presencia de raíz muy pequeña
T4: MS +BAP 2.0mg/L	0.0 B	0.0 B	Presencia de raíz muy pequeña
T5: MS +BAP 0.5mg/L + 0.5mg/L KIN	0.5 B	9.0 B	Presencia de raíz
T6 :MS	5.0 A	34.7 A	Presencia de raíz larga

*Medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$

En los tratamientos T1 y T2 (Tabla 10), no formaron raíces, fueron tratamientos que favorecen para la proliferación de los brotes propagables. Por otro lado, los tratamientos T3, T4, T5 y T6 promovieron la formación de raíces sobre todo el T6 (su medio de cultivo libre de hormona exógena (citoquinina), formo raíz y no brotes. Figueroa (2015) citado por Tombion et al. (2020) menciona que las citoquininas son las que intervienen en la organogénesis vegetal e inducen a la formación de hojas y brotes.

Tabla 11: Respuestas de peso fresco y seco de la hoja en la etapa de multiplicación del brote tipo 1

TRATAMIENTOS	ALTURA (mm)	PESO FRESCO DE HOJA (g)	PESO SECO DE HOJA (g)	PESO FRESCO TOTAL (g)	ISO SECO TOTAL (g)
T1: MS +BAP 0.5mg/L	16.250 AB	0.262 AB	0.037 A	0.414 AB	0.133 A
T2: MS +BAP 1.0mg/L	15.125 AB	0.251 B	0.029 B	0.308 B	0.043 D
T3: MS +BAP 1.5mg/L	15.500 AB	0.345 A	0.027 B	0.593 A	0.071 BC
T4 :MS +BAP 2.0mg/L	11.500 B	0.367 A	0.020 B	0.505 AB	0.054 CD
T5 :MS +BAP 0.5mg/L + 0.5mg/L KIN	21.000 A-B	0.307 AB	0.044 A	0.711 A	0.115 AB
T6: MS	23.625 A	0.067 C	0.023 B	0.092 B	0.034 D

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

Con respecto a la altura del explante, evaluación a los 45 días destaco el tratamiento T6 testigo (23.6 mm), le sigue T5 (21.0 mm), T1 (16.2 mm), T3 (15.5 mm), T2 (15.1 mm) y por último T4 (11.5 mm). Los tratamientos T6 y T5 presentaron una mayor altura e indujeron un menor número de brotes propagables y a la vez generaron un menor número de brotes propagables comparado con los tratamientos T1, T2, T3 y T4 que tienen una menor altura e inducen mayores brotes propagables. De todas ellas, T1 fue el que dio los mejores resultados (Figura 14) y con un peso seco total mayor de 0.133 g, seguido del tratamiento T5 con 0.115 g.

b. Variables cualitativas evaluadas en la etapa de multiplicación *in vitro* del brote tipo 1

Color

El color está asociado al vigor de los explantes. Se observó que el color verde oscuro (VO) disminuye conforme aumenta la concentración del BAP, mientras que el verde claro (VC) aumenta conforme la concentración de BAP incrementa en el brote tipo 1 (Tabla 12).

El tratamiento T6 presento el mayor valor de color verde oscuro más intenso (87%). En este tratamiento no hubo brotes propagables; probablemente a una mayor producción de clorofila una menor producción de brotes. Mientras que el tratamiento T1 presenta el mayor valor para el verde claro (87 %) y concentra el mayor número de brotes propagables. Por otro lado, el tratamiento T5 con el color verde oscuro (VO) (40 %) y el verde claro (VC) (60 %) dio mejores resultados (Figura 13), probablemente debido a la adición de la KIN. La variable verde claro marchito (VCM) en los tratamientos T1, T5 y T6 fue nulo el valor, comparado con los tratamientos T2, T3 y T4 que resultaron con el mismo valor de 25%. Este tipo de color de explante no generan brotes propagables; ya que el material se oxida o necrosa.

Deformación de explante

El tratamiento con menor deformación (DF) de explante fue T6 testigo con 0%, seguido del tratamiento T1 con 37%. Así mismo, la deformación (DF) aumento con el incremento de la concentración de BAP como se observó en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 (Figura 11). El tratamiento T5 contiene KIN, la cual genero el aumento de la deformación del explante, obteniendo como resultado un 75%.

Hoja translucida

Por otro lado, el tratamiento T6 presento el mayor valor para hoja no translucida (NT) igual a 100%, mientras que el tratamiento T1 presento el menor valor igual a 63% (Figura 12). De acuerdo con los resultados obtenidos se puede decir que los brotes muestran mejor color y forma de hoja en los tratamientos con la más baja concentración de BAP 0.5 mg /L. A pesar que este tratamiento originó vitrificación conocida como translucidez, y disminuyó gran parte de los individuos que iniciaron la etapa, estas fueron las que originaron mejor número de brotes.

Tabla 12: Porcentaje (%) de variables cualitativas del material tipo 1

	VO	VC	VCM	NDF	DF	NT	T
T1	13	87		63	37	63	37
T2	13	62	25	50	50	75	25
T3		75	25	37	63	75	25
T4		75	25	50	50	87	13
T5	40	60		25	75	87	13
T6	87	13		100		100	

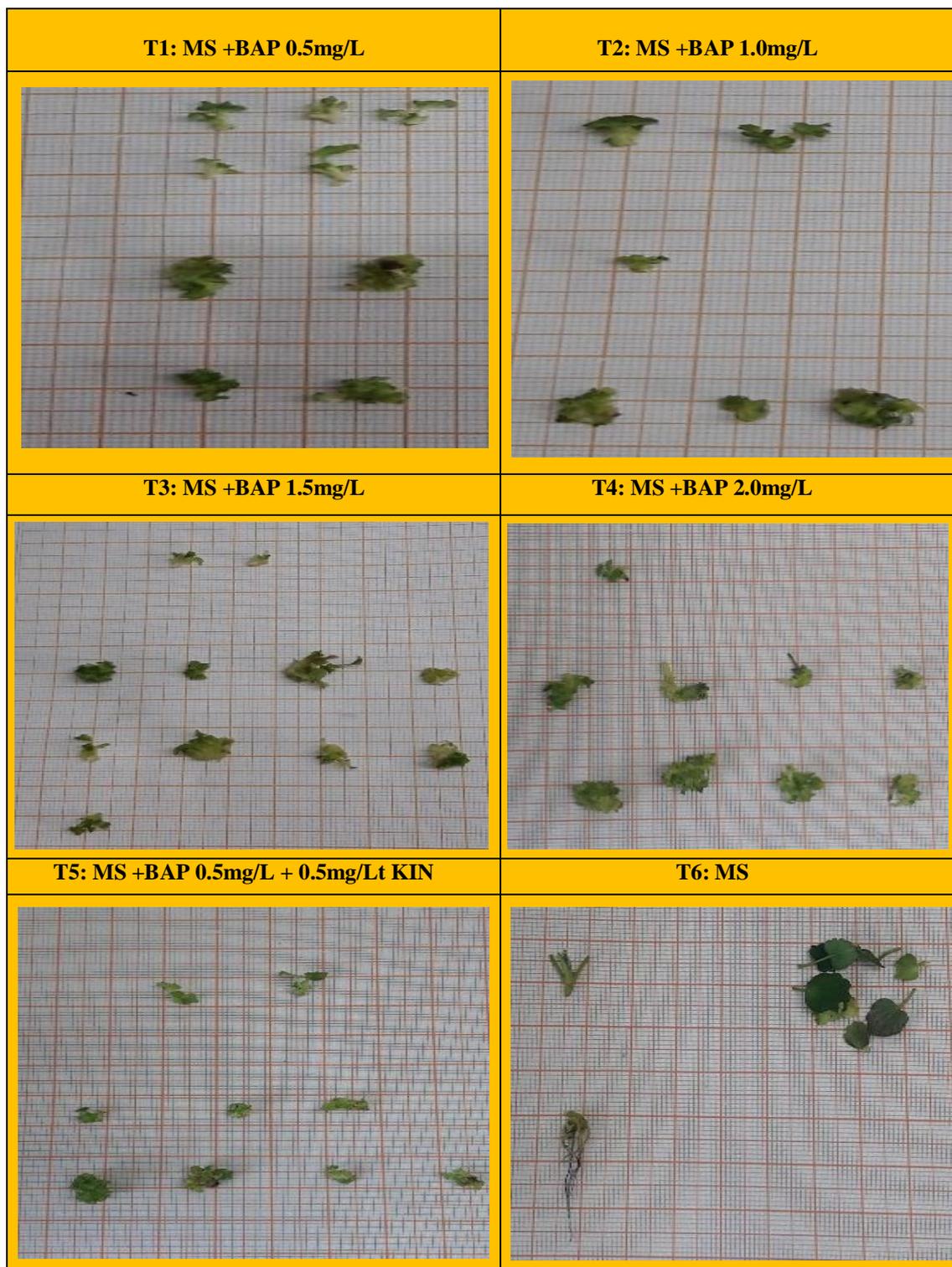


Figura 15: Brotes propagables de los tratamientos en la etapa de multiplicación *in vitro* del brote tipo 1

4.1.3 Multiplicación: brote tipo 2

Para el brote tipo 2 los brotes se colocaron en los tratamientos de multiplicación, y se evaluaron las variables cualitativas y cuantitativas, que se describirán a continuación:

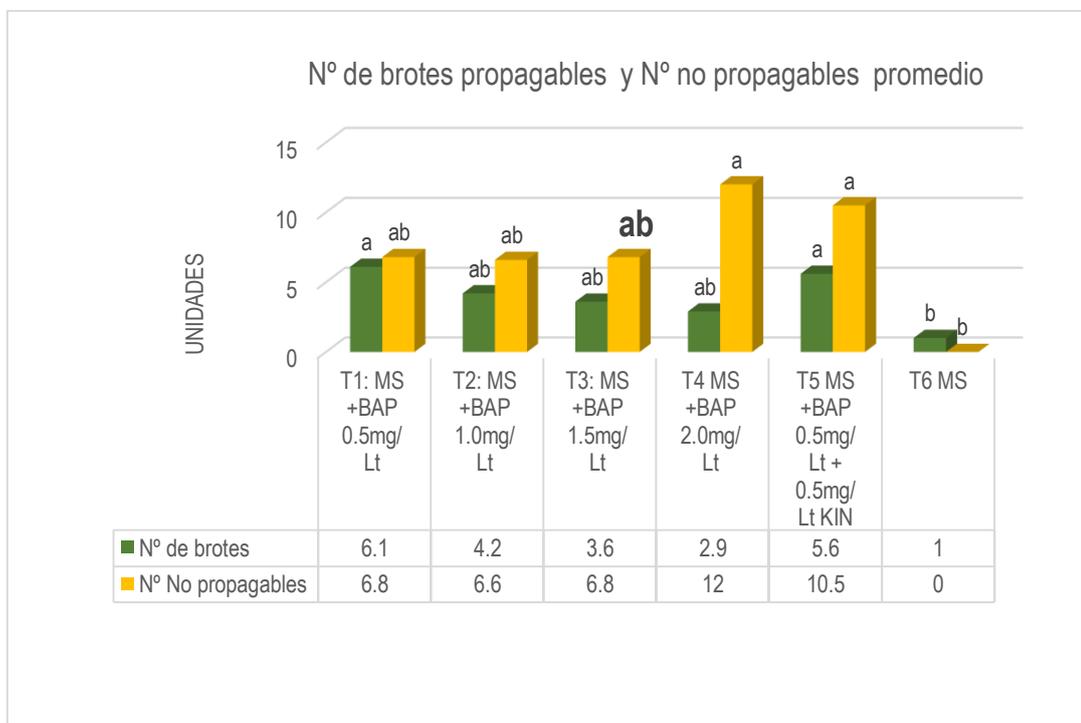


Figura 16: Resultados del número de brotes propagables y no propagables en la etapa de multiplicación del brote tipo 2

En la Figura 16, se detalla, los datos obtenidos para la variable respuesta del número de brotes propagables. Se puede interpretar que los promedios no distan ampliamente entre sí; sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significación de 95 % de confianza, indica la existencia de diferencias significativas.

Los tratamientos T1, T2, T3 y T4 resultaron semejantes para el número de brotes propagables con concentraciones de BAP. Asimismo, de acuerdo con Aremu et al. (2016) citado por Olivera et al. (2017), la adición de BAP incrementa la formación de brotes porque las citoquininas inducen a la formación de yemas axilares (Figura 17). Contrario con el tratamiento T6 sin regulador de crecimiento, que difiere con los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5, ya que no formaron brotes propagables, siendo T6 un tratamiento no favorable para la etapa de multiplicación.

En consecuencia, se recomienda el tratamiento T1: BAP 0.5 mg /L, ya que obtuvo valores similares de número de brotes propagables. Pero a baja concentración de BAP reduciendo los costos de producción.

Por otro lado, el número de brotes no propagables resultaron valores similares entre los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5. Pero difieren significativamente con el tratamiento T6.

Tabla 13: Respuestas del peso fresco y seco de brotes propagables para la etapa de multiplicación del brote tipo 2

TRATAMIENTOS	PESO FRESCO DE BROTOS PROPAGABLES (g)	PESO SECO DE BROTOS PROPAGABLES (g)
T1: MS +BAP 0.5mg/L	0.177 A	0.029 A
T2: MS +BAP 1.0mg/L	0.122 A	0.007 B
T3: MS +BAP 1.5mg/L	0.128 A	0.010 A B
T4: MS +BAP 2.0mg/L	0.092 A	0.002 C
T5: MS +BAP 0.5mg/L+ KIN 0.5mg/L	0.159 A	0.007 B
T6 :MS	0.104 A	0.009 AB

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

De acuerdo a la prueba de comparación de Tukey (Tabla 13) no existe diferencia estadística significativa para peso fresco de brotes propagables.

Tabla 14: Respuestas del número de raíz y longitud de raíz (mm) en la etapa de multiplicación del brote tipo 2

TRATAMIENTOS	NÚMERO DE RAÍZ	LONGITUD DE RAÍZ (mm)	OBSERVACIÓN
T1: MS +BAP 0.5mg/L	0.0 B	0.0 B	
T2: MS +BAP 1.0mg/L	0.0 B	0.0 B	
T3: MS +BAP 1.5mg/L	0.0 B	0.0 B	Presencia de raíz muy pequeña
T4: MS +BAP 2.0mg/L	0.0 B	0.0 B	Presencia de raíz muy pequeña
T5: MS +BAP 0.5mg/L + KIN 0.5mg/L	2.5 A	25.2 A	Presencia de raíz
	4.5 A	43.5 A	Presencia de raíz larga

*Medias con las diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0.05$

En la Tabla 14 se muestra la diferencia en el número y longitud de raíces en la etapa de multiplicación. Se observa que los tratamientos T1 y T2 no formaron raíz, lo cual es adecuado para esta etapa. Por otro lado, los tratamientos T3 y T4 formaron raíces muy pequeñas. Los tratamientos T5 y T6 formaron raíces, siendo esta reacción no adecuada para la etapa de multiplicación porque la actividad metabólica se concentra en el crecimiento, desarrollo de la hoja y raíz, y no en la producción de brotes como se dio estudio realizado por Ñahuinlla, (2018).

Tabla 15: Respuestas del peso fresco y seco total en la etapa de multiplicación del brote tipo 2

TRATAMIENTOS	ALTURA (MM)	PESO FRESCO DE HOJA (g)	PESO SECO DE HOJA (g)	PESO FRESCO TOTAL (g)	PESO SECO TOTAL (g)
T1: MS +BAP 0.5mg/L	18 B	0.457 BC	0.061 AB	1.242 B	0.107 BC
T2: MS +BAP 1.0mg/L	18.7 AB	0.478 BC	0.062 AB	0.984 B	0.096 BC
T3: MS +BAP 1.5mg/L	19 AB	0.237 C	0.025 B	0.771 B	0.140 AB
T4: MS + BAP 2.0mg/L	26.2 AB	0.853 A	0.058 AB	3.071 A	0.202 A
T5: MS + BAP 0.5mg/L + 0.5Mg/L KIN	28.8 AB	0.702 AB	0.070 A	2.455 A	0.178 AB
T6: MS	31.4 A	0.311 C	0.040 AB	0.566 B	0.0611 C

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

Con respecto a la altura del explante, evaluada a los 45 días de iniciado el proceso, destaco el T6 testigo (31.4 mm), le sigue T5 (28.8 mm), T4 (26.2 mm), T3 (19 mm), T2 (18.7 mm) y por último T1 (18 mm). En el presente experimento, el tratamiento T6, con mayor altura no genero brotes, y el tratamiento T1 con menor altura genero el mayor número de brotes propagables. Por otro lado, para la característica del peso seco total, el tratamiento T2, T3, T4 y T5 resultaron valores similares. Pero difieren con el tratamiento T1 y T6.

a. Variables cualitativas para la etapa de multiplicación del brote tipo 2

Color

El tratamiento T6 (Tabla 16) presenta el color verde oscuro (VO) en 90 % y verde claro (VC) en 10 %, seguido del tratamiento T5 verde oscuro (VO) en 40 % y verde claro (VC) en 60 % (Tabla 16). Anteriormente se mencionó que explantes con mayor porcentaje de color verde oscuro no produce brotes propagables como se dio en el T6. Por otro lado, los tratamientos T1 y T2 ambos resultaron con el mismo valor verde oscuro (VO) del 30 %, seguido del verde claro (VC) en 60%, y un verde claro marchito (VCM) en 10 %. A pesar que los tratamientos T1 y T2 resultaron con un verde oscuro bajo, produjeron brotes sobre todo el tratamiento T1 que origino el mayor número de brotes propagables.

Deformación de Explante y hoja translucida

El tratamiento T6 presenta el mayor valor para explante no deforme (NDF) y hoja no translucida (NT) igual a 100 %, seguido del tratamiento T1 explante no deforme (NDF) y hoja no translucida (NT) ambas variables con un mismo valor del 90 % como se observa en la Tabla 16. Estos tratamientos T1 y T6 muestran mejor calidad del explante en forma y color de hoja; ya que este genera número de brotes propagables.

Tabla 16: Porcentaje (%) de variables cualitativas del brote tipo 2

	VO	VC	VCM	NDF	DF	NT	T
T1	30	60	10	90	10	90	10
T2	30	60	10	70	30	70	30
T3		75	25	50	50	50	50
T4		75	25	70	30	50	50
T5	40	60		40	60	40	60
T6	90	10		100		100	



Figura 17: Brotes propagables de los tratamientos en la etapa de multiplicación *in vitro* del brote tipo 2

4.2 Objetivo 2

Determinación del efecto de la concentración de dos Auxina en la etapa de enraizamiento *in vitro*.

4.2.1 Enraizamiento: brote tipo 1

a. Evaluación de hoja

Los análisis de variancia se muestran en los Anexos 26, 27,28 y 29. Los valores p de cada variable analizada mostraron que son menores de 0.05, excepto las variable número de hoja, fue mayor a 0.05, siendo no significativo. Posteriormente se hizo la prueba comparativa de Tukey (Tabla 17).

Tabla 17: Diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la formación de hojas del brote tipo 1

TRATAMIENTOS	ALTURA (mm)	1 ^a HOJAS	PESO FRESCO HOJA (g)	PESO SECO HOJA(g)
T 1: MS +ANA 0.1mg/L	8.24 B	5.4 A	0.111 C	0.019 B
T2 : MS +ANA 0.01mg/L	11.90 AB	6.8 A	0.547 A	0.018 B
T3: MS + IBA 0.1mg/L	22.37 AB	7.2 A	0.343 A	0.021 B
T4: MS + IBA 0.01mg/L	23.12 A	8.4 A	0.304 A	0.033 A
T5: MS	21.20 AB	6.2 A	0.262 B	0.032 A

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

No se observaron diferencias significativas de los tratamientos para el número de hoja promedio. Para la variable altura el T4 obtuvo la mayor altura (23.12 mm) con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T5. Por otro lado, la variable peso fresco de hoja no tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos T2, T3 y T4 y el menor valor resulto el tratamiento T1.

b. Evaluación de raíz

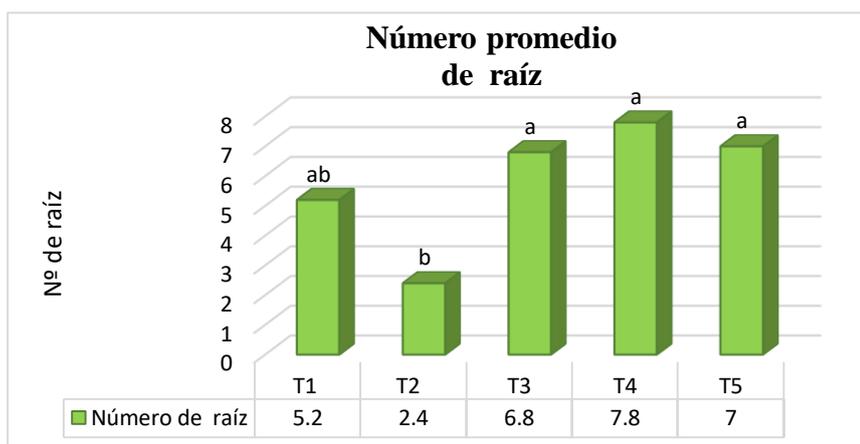


Figura 18: Respuesta del número de raíces en la etapa de enraizamiento del brote típico

En la Figura 18 se observa que los tratamientos de enraizamiento no tienen el mismo efecto en comportamiento, aun nivel de significancia de 95 % de confianza (Anexo 30).

El en tratamiento T1: ANA 0.1mg/L, número de raíz fue 5.2 y formo callosidad, mientras que el tratamiento T2: ANA 0.01mg/L fue menor igual a 2.4 y no formo callosidad. Indicando que, a una mayor concentración de ANA, aumenta el número de raíz y forma callosidad. En efecto las auxinas en el enraizamiento, promueven a bajas concentraciones e inhiben a altas concentraciones formando callosidad (Uribe et. al, 2012).

Por otro lado, los tratamientos T3: IBA 0.1mg/L y T4: IBA 0.01mg/L, no resultaron con diferencias estadísticas significativas entre sí; sin embargo, el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T4 a una menor concentración de IBA. Además, se conoce que la planta de fresa responde mejor a los reguladores de IBA para la generación del número de raíces (Cuazitl y Núñez, 2017).

En el caso del tratamiento T5: MS se observa que el número de raíz fue 7 y no difiere estadísticamente con los tratamientos T3 y T4. Se puede decir que los tratamientos con IBA y medio Murashige y Skoog (MS), produjeron mejores resultados en la producción de raíces.

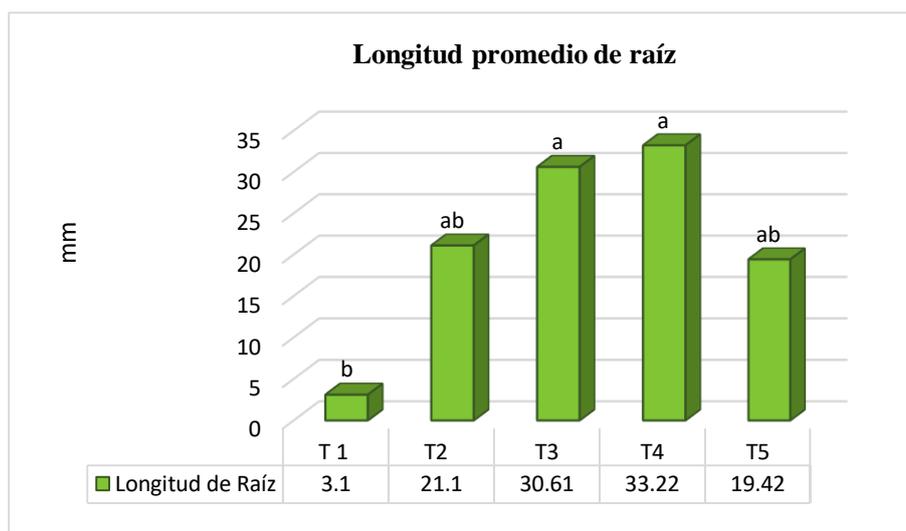


Figura 19: Respuesta de la longitud de raíz en la etapa de enraizamiento del brote tipo 1

En la Figura 19 se observa que los tratamientos de enraizamiento no tienen los mismos efectos en el comportamiento, aun nivel de significancia de 95 % de confianza (Anexo 31).

El tratamiento T1: ANA 0.1mg/L tiene una longitud de raíz de 3.1 mm en comparación con el tratamiento T2: ANA 0.01mg/L que resulto mayor con 21.1 mm. Estos resultados muestran que al disminuir la concentración de ANA aumenta la longitud de la raíz.

Los tratamientos T3: IBA 0.1mg/L y T4: IBA 0.01mg/L, presentaron los valores más alto de longitud de raíz de 30.6 mm y 33.2 mm respectivamente; sin embargo, no se observó diferencias significativas entre estos tratamientos. Se podría señalar que el regulador IBA comparado con el ANA favorece la longitud de raíz. Un resultado similar se observó en el estudio realizado por Ñahuinlla, (2018) donde el regulador IBA tuvo un mayor efecto en la formación de la longitud de raíz.

El tratamiento T5: MS sin regulador, formó raíces probablemente por la presencia auxina en los tejidos dando como resultado una la longitud de raíz de 19.4 mm, siendo menor que los tratamientos T2, T3 y T4; destacando este último tratamiento.

Tabla 18: Diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la formación de raíces del brote tipo 1

TRATAMIENTOS	PESO FRESCO RAÍCES (g)		PESO SECO RAÍCES (g)		PESO FRESCO TOTAL (g)		PESO SECO TOTAL (g)	
T1: MS +ANA 0.1mg/L	0.010	C	0.002	C	0.122	C	0.020	B
T2 : MS+ANA0.01mg/L	0.013	BC	0.002	C	0.168	C	0.022	B
T3: MS + IBA 0.1mg/L	0.050	A	0.005	A	0.394	A	0.046	A
T4: MS + IBA 0.01mg/L	0.025	B	0.004	B	0.329	AB	0.037	AB
T5: MS	0.018	BC	0.003	BC	0.281	B	0.029	AB

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

El mayor peso fresco y seco de raíz se encontró en el tratamiento T3: IBA 0.1 mg/L con 0.050 g y 0.005 g respectivamente, seguido del tratamiento T4: IBA 0.01 mg/L con peso fresco y seco de raíz 0.025 g y 0.004 g respectivamente. Y el menor peso fresco de raíz fue el tratamiento T1: ANA 0.1 mg/L de 0.010 g y peso seco de raíz de 0.002 g (Figura 20).



Figura 20: Etapa de enraizamiento del brote tipo 1, T1: MS +ANA 0.1mg/L, T2: MS +ANA 0.01mg/L, T3: MS + IBA 0.1mg/L, T4: MS + IBA 0.01mg/L y T5: MS

4.2.2 Enraizamiento: brote tipo 2

Evaluaciones: altura (mm), número de raíz, longitud de raíz (mm), peso seco de hoja (g), peso fresco y seco de raíz (g), y por último peso seco total (g), las cuales fueron significativas con un p valor menor 0.05. Por otro lado, variables números de hoja, peso fresco de hoja y

peso fresco total (Anexos 37, 38 y 44), fue mayor a 0.05 las cuales fueron no significativos. Posteriormente se hizo la prueba comparativa de Tukey a las variables.

a. Evaluación de hoja

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 19, no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos para el número de hojas. Por otro lado, la variable altura obtuvo el valor más alto con el tratamiento T5 (27.7 mm) con peso fresco y seco de hoja de 0.516 g y 0.059 g respectivamente. Asimismo, la menor altura lo obtuvo el tratamiento T3: MS + IBA 0.1mg/L (8.98 mm) con peso fresco y seco de hoja de 0.283 g y 0.035 g respectivamente.

Tabla 19: Diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la formación de hojas del brote tipo 2

TRATAMIENTOS	ALTURA (MM)	N° HOJAS	PESO FRESCO DE HOJAS (g)	PESO SECO DE HOJAS (g)
T 1 : MS +ANA 0.1mg/L	11.63 A-B	5.3 A	0.235 A	0.033 B
T 2 : MS +ANA 0.01mg/L	17.40 A-B	6.8 A	0.469 A	0.060 A
T3: MS + IBA 0.1mg/L	8.98 B	4.1 A	0.283 A	0.035 B
T4: MS + IBA 0.01mg/L	19.19 A-B	6.6 A	0.457 A	0.051 AB
T5: MS	27.79 A	6.8 A	0.516 A	0.059 A

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

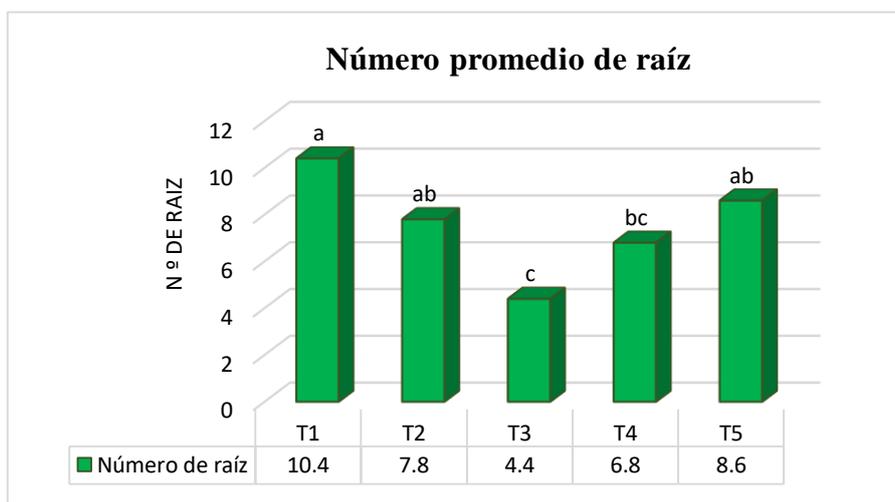


Figura 21: Respuesta del número de raíces en la etapa de enraizamiento del brote tipo 2

En la Figura 21, se detalla, los datos obtenidos para el número de raíces. Se puede interpretar que los promedios no distan ampliamente entre sí; sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significación de 95 % de confianza, indica la existencia de diferencias significativas.

Los tratamientos T1, T2 y T5 no difieren estadísticamente entre ellas; sin embargo, son los que mayores valores generaron para el número de raíces. Por otro lado, el tratamiento T1: ANA 0.1mg/L formo callosidad a comparación del tratamiento T2: ANA 0.01mg/L, que no formo callosidad. Esto indica que no se debería adicionar niveles altos de regulador de crecimiento. Quintero *et al.*, (2003) obtuvo resultados similares al encontrar que a medida que aumenta la dosis en ANA aumenta el número de raíces y la formación de la callosidad. De acuerdo con Sharmin *et al.* (2014) citado por Olivera *et al.* (2017), las auxinas intervienen en la formación de raíces lo cual explicaría la formación de callos y raíces en concentraciones de ANA 0.1 mg /L. Pero para esta etapa de enraizamiento no es convenientes la formación de callosidad.

En el tratamiento T3: IBA 0.1mg/L el número raíz fue 4.4 y el tratamiento T4: IBA 0.01mg/L fue 6.8, siendo este tratamiento el que genero el mayor número de raíz con una menor concentración de IBA. Por otra parte, el tratamiento T5: MS testigo, el explante genero la formación de raíz sin ningún regulador de crecimiento en el medio, siendo este el segundo mejor tratamiento; ya que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T1. Pero este formo callo de textura dura, que no se puede separar fácilmente en pequeños fragmentos dificultando su posterior manejo para la aclimatación (Lallana y Lallana, 2003). Por lo tanto, T5 sería el mejor tratamiento para la generación del número de raíces por el menor costo y por no presentar callo duro como origina en el tratamiento T1.

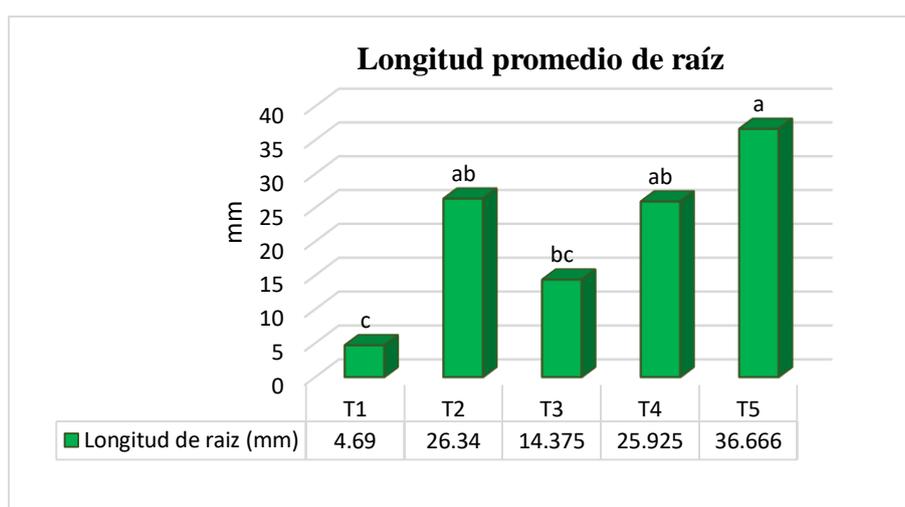


Figura 22: Respuesta de la longitud de raíces en la etapa de enraizamiento del brote tipo 2

En la figura 22 se observa para la longitud de raíz, el efecto de los tratamientos de enraizamiento no tiene el mismo comportamiento, a un nivel de significación de 95 % de confianza (Anexo 41).

El tratamiento T1: ANA 0.1mg/L presenta una longitud de raíz de 4.6 mm, mientras que en el tratamiento T2: ANA 0.01mg/L fue 26.34 mm, siendo este el mayor valor a una menor concentración de ANA.

El efecto del IBA en la longitud de la raíz aumenta conforme la concentración de IBA disminuye, como se observó en los tratamientos T3: IBA 0.1mg/L y T4: IBA 0.01mg/L que resultaron con 14.4 mm y 25.9 mm respectivamente. Por otro lado, el tratamiento T5: MS testigo presento la mayor longitud de raíz de 36.7 mm. Resultados similares fueron reportados Félix, López, y Alvarado (2018), con los mejores resultados de enraizamiento con el medio de cultivo MS, y precisan que no es necesario el uso de reguladores de crecimiento vegetal en esta etapa. Finalmente, para el brote tipo 2 el mejor tratamiento fue T5 medio de Murashige y Skoog con una buena longitud comparado con los demás tratamientos.

Tabla 20: Diferentes tratamientos de enraizamiento *in vitro* en la formación de raíces en el brote tipo 2

TRATAMIENTOS	PESO FRESCO RAÍCES (g)		PESO SECO RAÍCES (g)		PESO FRESCO TOTAL (g)		PESO SECO TOTAL (g)	
T 1 : MS +ANA 0.1mg/L	0.027	C	0.004	C	0.262	A	0.037	B
T2 : MS +ANA 0.01mg/L	0.056	B	0.008	B	0.526	A	0.068	A
T3: MS + IBA 0.1mg/L	0.069	AB	0.009	B	0.359	A	0.043	B
T4: MS + IBA 0.01mg/L	0.096	A	0.012	A	0.554	A	0.064	A
T5: MS	0.062	B	0.011	A	0.578	A	0.070	A

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

En la Tabla 20 el tratamiento T4: IBA 0.01mg/L acumuló mayor peso fresco y seco de raíz de 0.096 g y 0.012 g respectivamente. Ahora bien, en el tratamiento T1: ANA 0.1mg/L, presenta el menor peso fresco y seco de raíz igual a 0.027 g y 0.004g respectivamente. Debido a la formación del callo que probablemente; provocó el agotamiento de nutrientes (Lallana y Lallana, 2003). No se observaron diferencias significativas de los tratamientos para el peso fresco total.



Figura 23: Etapa de enraizamiento brote tipo 2, T1: MS +ANA 0.1mg/L, T2: MS +ANA 0.01mg/L, T3: MS + IBA 0.1mg/L, T4: MS + IBA 0.01mg/L y T5: MS

4.3 Objetivo 3

Determinación de la mejor fuente nutricional en la etapa de aclimatación

4.3.1 Porcentaje de sobrevivencia

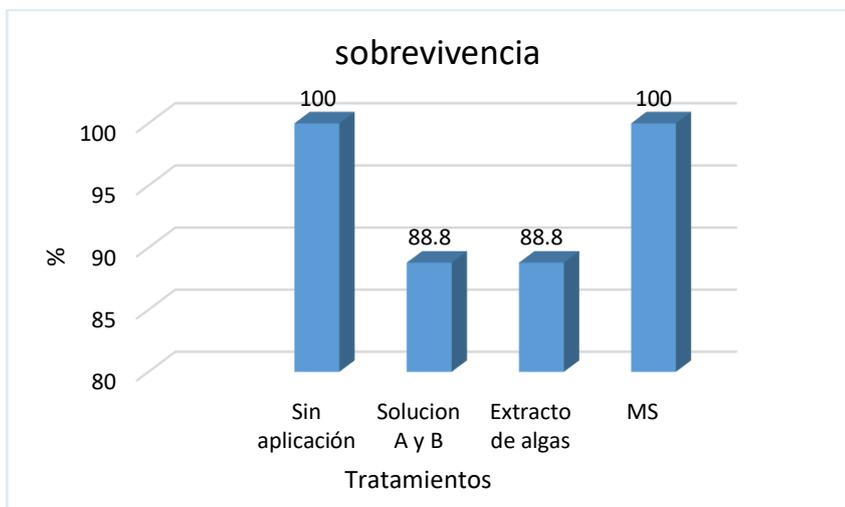


Figura 24: Porcentaje de sobrevivencia (%) por tratamiento en la fase de aclimatación

Tabla 21: Resultados de la aclimatación de un 1 mes

Tratamientos	N° plantas aclimatadas	N° plantas sobrevivientes	Porcentaje de plantas vivas (%)
T1 Testigo	9	9	100
T2 Solución Ay B	9	8	88
T3 Extracto de algas	9	8	88
T4 MS	9	9	100

Los parámetros se evaluaron al final del periodo de aclimatación (Figura 24). Se observó en los tratamientos T1 y T4 son los que obtuvieron el mayor valor de 100 % de supervivencia. Según Debnath (2005) citado por Valencia et al., (2019) para alcanzar una alta supervivencia y adaptación se debe mantener la humedad relativa de 90-95%. La razón se debe que los explantes *in vitro* presentan una cutícula delgada y una baja densidad estomática, lo cual las hace susceptibles a la deshidratación.

Por otro lado, Sánchez et al., (2012) afirman: “Es fundamental que las plántulas sean de buena calidad, porque de ello depende el porcentaje de supervivencia. Para esto se deben seleccionar las plántulas salidas de laboratorio que presenten un buen desarrollo foliar y radicular” (p. 51).

Además, el manejo que se dio en la aclimatación fue de una sola fase en el invernadero de malla sombra del 50 %, y dentro de ella un Microtunel de plástico la cual puede ser replicada a una gran escala.

Asimismo, para el cultivar Aroma el efecto de la concentración de las aplicaciones de los nutrientes (soluciones A y B, Extracto de algas y MS), no causó efectos nocivos y plántulas muertas. Además, alcanzo altos valores de supervivencia de plántulas (Tabla 21).

4.3.2 Incremento de altura (δh)

Se obtuvo como respuesta un valor $-p$ de 0.001, que explica que existen diferencias significativas entre los tratamientos nutricionales para el incremento de altura de plántula a un nivel del 95% de confianza entre los tratamientos nutricionales. Los resultados indican que el incremento de altura durante la aclimatación fue mayor a 0.5cm (Anexo 46).

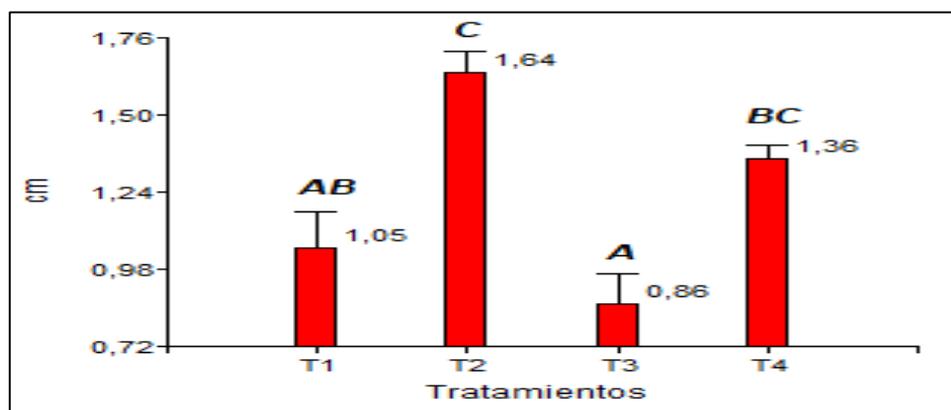


Figura 25: Resultados de medias del incremento de la altura en la fase de aclimatación

A las cuatro semanas de aclimatación, las plántulas en el tratamiento T2 (Solución A y B) mostraron el mayor incremento en 1.64 cm, siendo la altura promedio final de 3.6 cm, mientras el tratamiento T3 (Extracto de algas) tuvo el menor incremento de altura de 0.86 cm y se observó una altura promedio final de 2.96 cm (Figura 25).

4.3.3 Incremento en el número de hojas (δ #h)

Se obtuvo como respuesta un valor p de 0.039 es decir, existen diferencias significativas entre los tratamientos nutricionales para el incremento en número de hojas a un nivel de 95% de confianza (Anexo 47). Los resultados indican que el incremento de hojas durante la aclimatación fue igual o mayor a 1 unidad.

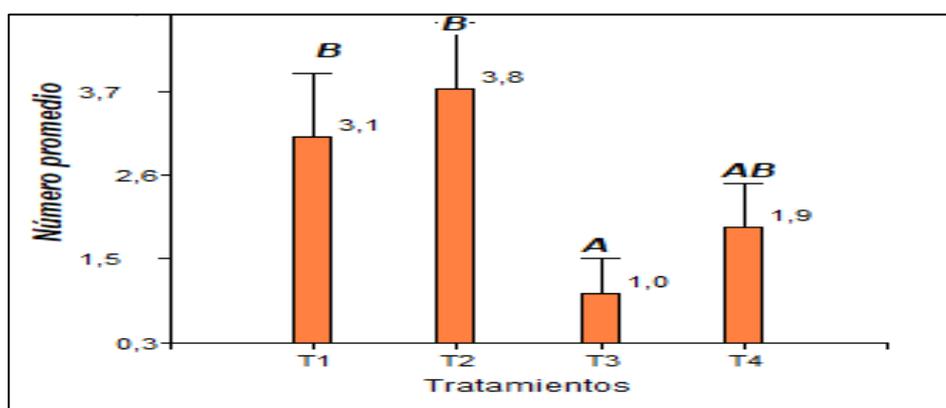


Figura 26: Resultados de medias del incremento del número de hojas en la fase de aclimatación

El tratamiento T2 (Solución A y B) tuvo un incremento de 3 a 4 unidades y el tratamiento T1: Testigo (agua destilada) un incremento de 3 unidades y por lo tanto no hubo diferencia significativa entre estos valores. Esto puede deberse a que el sustrato utilizado tenía macro y micronutrientes que contribuyeron en la generación de las nuevas hojas. Asimismo, Espinosa *et al.*, (2019) explica que la emisión de las nuevas hojas en las plantas a condiciones *ex vitro* causa crecimiento y desarrollo, ya que estas tendrán capacidad fotoautotrófica. Finalmente, el promedio final del número de hojas de los tratamientos T1, T2 fueron 10 y 12 unidades, respectivamente.

4.3.4 Incremento de longitud de hoja (δ l)

Se obtuvo como un valor p de 0.8595 que indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos nutricionales para el incremento de longitud de foliolo a un nivel del 95% de confianza (Anexo 48).

Tabla 22: Comparación de medias del incremento de longitud de hoja de la fase de aclimatación

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Longitud de foliolo (cm)	T1	9	1,01	0,39	0,96	0,76	0,8595
Longitud de foliolo (cm)	T2	9	1,13	0,46	1,24		
Longitud de foliolo (cm)	T3	9	0,98	0,35	0,98		
Longitud de foliolo (cm)	T4	9	1,10	0,41	1,18		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En los tratamientos realizados no hubo diferencias estadísticas significativas para el incremento de longitud de foliolo. Asimismo, la longitud de foliolo final promedio de los tratamientos T1, T2, T3 y T4, fueron 2.03, 2.08, 1.9 y 2.05 cm respectivamente.

De acuerdo con estos resultados obtenidos las fuentes nutricionales no tuvieron un efecto significativo en la longitud de hoja, número de hoja con excepción de la altura en el tratamiento T2 (Solución A y B) la cual presento incremento para esta característica.

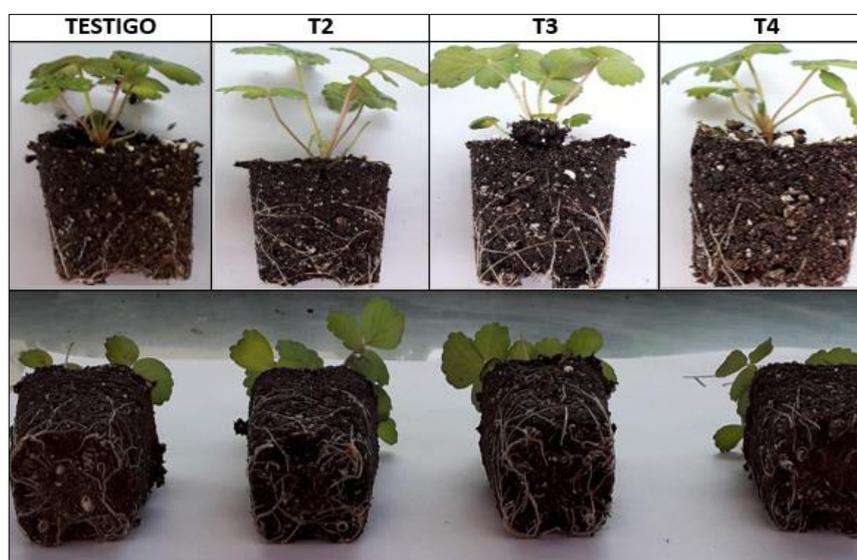


Figura 27: Plántulas de fresa cv. Aroma aclimatadas a los 31 días

V. CONCLUSIONES

- En la fase de multiplicación, el cultivar Aroma del brote tipo 2 resulto mejor que el brote tipo 1. Además, la BAP influyo en la generación de nuevos brotes. Por ello, se recomienda la menor concentración de BAP: 0.5 mg/L; ya que obtuvo brotes de mejor calidad.
- En la fase de enraizamiento in vitro, el brote tipo 2 resulto mejor que el brote tipo 1. Asimismo, se recomienda el tratamiento T5: MS (Murashigue y skoog); ya que obtuvo una mejor respuesta en la formación del número y longitud de raíz, sin regulador de enraizamiento reduciendo los costos de producción.
- En la fase de aclimatación las fuentes nutricionales empleadas no tuvieron efectos significativos en las variables evaluadas.

VI. RECOMENDACIONES

- En el manejo del explante no se debe realizar cortes innecesarios al explante; ya que el material se estresa y oxida el medio de cultivo impidiendo su crecimiento.
- Utilizar explantes vigorosos para la etapa de enraizamiento.
- Realizar estudios (de altura, número de hoja, longitud de hoja, número de raíz etc.) con otras fuentes nutricionales a otras dosis.
- Realizar estudios agronómicos en campo del material obtenido a partir de explantes in vitro.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., Jiménez F. y Rodríguez, A. (1998). Aclimatización. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Sta. Clara, Villa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 193-206.
- AGRODATA. (2020). Fresas Perú exportación 2019. Diciembre [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://www.agrodataperu.com/wp-content/uploads/2020/01/00FRESAS1.png>
- Ashrafuzzaman, Faisal, Yadav AND Khanam. (2013). Micropropagation of strawberry (Fragaria ananassa) through runner culture. Bangladesh Journal of Agricultural Research. Recuperado: <https://www.banglajol.info/index.php/BJAR/article/view/16973>.
- Bhatia, S. (2015) .Micropropagation. En Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical science. Oxford : Elsevier.
- Beaulieu, R. (1973). Reguladores de crecimiento ed. Oikos-Tau S.A. Barcelona, España. 235p.
- Bonet, J. (2010). Desarrollo y Caracterización de herramienta genómicas en Fragaria diploide para la mejora del cultivo de fresa. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Boxus, P., Quoirin M, AND Laine M. (1977). Large Scale Propagation of Strawberry Plants from Tissue Culture. In: J. Reinert, and P. S. Bajaj (EDS). Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. New York. p 131-206.

- Castellón, Y. (2000). Efecto de la Fertilización Orgánica con nutrigrow con Concentraciones diferentes en Cultivo Hidropónico en Frutilla (*Fragaria virginiana*) en condiciones Controladas (Tesis de pregrado). U.M.S.A. La Paz, Bolivia.
- Castillo, A., Moreno A. y García, M. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173- 182.
- Clavejo, R., Beltrán, A. y LLauger, R. (2010). Apuntes sobre el cultivo de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). *Citrifruit*, julio-diciembre, vol. 27, no. 1, p. 67-70.
- Cuazitl M. y Núñez H. (2017). Establecimiento y micropropagación de fresa (*fragaria x ananassa duch.*) en un sistema de inmersión temporal. *Jóvenes de la Ciencia*, 3(2).8589. Recuperado: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1679>
- Debnath, (2005). Strawberry Sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 41(5):671-676. DOI: 10.1079/IVP2005688.
- Epstein, E. (1970). Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism y transport. *Physiol Plant.* 88: 382- 389.
- Escalante A. (2015) “Aplicación de un recubrimiento comestible de goma de tara (*Caesalpinia spinosa* Molina Kuntze) sobre fresas (*Fragaria ananassa* cv. Aromas) para prolongar su conservación (Tesis para obtener el título el grado de magister scientiae en tecnología de alimentos, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1854/J11.E74-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Espinosa A., Silva J., Arevich M. y Romero D. (2019,01). Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *SciELO*. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942019000100023.

- Eurosemilla.(2018).Cultivo de Aroma. Recuperado:
<http://www.eurosemillas.com/es/variedades/fresa/item/22-aromas.html>
- Félix, R., López, Y. y Alvarado M. (2018). Micropropagación de tres variedades de *Fragaria x ananassa* (“PORTOLA”, “ALBIÓN” Y “CAMINO REAL”). Recuperado de:
<http://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/article/view/225> Vol. 2(1).
- Feriol, X. (julio-diciembre, 2010). Propiedades nutritivas y otras curiosidades de la fresa. *Citrifruit* .vol. 27, no. 1, 72-74.
- Folquer, F. (1986). La frutilla o fresa. Ed rev. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio del Sur S.A. pp. 62-122.
- George, E. & Sherrington, P. (1984). Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, Basingstoke, pp. 709.
- Huetteman, C. y Preece, J. (1993). Thidiazuron, a potent cytoquinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 33, 105-119.
- Hurtado D. y Merino M. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas S.A. México. 232 p.
- Husaini, A. and Neri, D. (2016). Strawberry: Growth, Development and Diseases. Consultado el 28 de Abril del 2018. 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=0ahUKEwizr
- Jenik PD & MK Barton. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132: 3577-3585.
- Juárez, A., Manjarrez, E. y Barrón, H. (2011). Diseño de un biorreactor de inmersión temporal para la micropropagación de *Aztekium hintonii*. *Experiencias Nacional México D.F.* 13 p.

- Kessel, A. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 34-41. (Línea). Consultado: 29 de abril de 2018.
 Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362012000300005&lng=es&tlng=es.
- Krikorian, A. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. En: *Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrech, Boston, London. pp. 774-79. Lijalad, C. 1993.
- Lal, Murari, Sharma and Hegde. (2003). Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Department of Horticulture, CCS Haryana Agricultural University, Hisar, India. Recuperado: <http://arccjournals.com/journal/indian-journalofagriculturalresearch/ARCC2956>.
- Lallana, V. y Lallana M. (2003). *Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal - Edición digital*. p:84
- Leopold, C. y Kriedemann. (1975). *Plant growth and development*. Editorial Me. Graw-Hill. U: S. A. 640 p.
- Malonek S., Bomke E., Bornberg B., Rojas M.; Hedden P.; Hopkins P.; & Tudzynski B. (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66: 1296-1311.
- Manosh, K. B., Islam, R. y Hossain. (2007). Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus cultura. *Plant Cell Tissue Orlan Cultvol*.
- Margara, J. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 27-30, 71-118.

MINAG. (2008). Estudio de la fresa en el Perú y el mundo. Dirección general de información Agraria. Lima. 1-23. (En línea). Consultado: 29 de Abril del 2018. Disponible en:

http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/estudio_fresa.pdf

Montesinos, J. (1993). Manejo de huertos de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch) en la décima región. Ed. rev. Argentina. s.e. 12 p.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev. Plant Physiol* 25. Pp: 135- 166.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15. Pp: 473- 497.

Ñahuinlla, M. (2018). Optimización del protocolo de micropropagación in vitro con cuatro cultivares de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.

Olivera P., Espinoza R., y Tamariz C. (2017, SET, 24). Multiplicación in vitro y embriogénesis somática de *perezia pinnatifida* (asteraceae) planta medicinal andina. *Revista peruana de biología.* Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332017000300014

Preece J. & Sutter E. (1991). Acclimation of micropropagated plants to the greenhouse and field. *Kluwer Acad.* p. 71-93

Preil, W. (2005). General introduction: A personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. pp. 1-18. In: A. K. Hvostel-Eide and W. Preil (eds.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation.* Springer. Dordrecht, The Netherlands

Quintero I.; Polo J., Jarma A. y Espitia A. (OCTUBRE, 2003). El efecto del ácido naftalenacético (ANA) en el medio de cultivo sobre el enraizamiento in vitro de tres

cultivares de ñame (*Dioscorea* sp.). Recuperado de:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/575/1112>.

Redagricola. (2017). El cultivo se expande en el Perú: La hora de las fresas. Frutales.
Recuperado: <http://www.redagricola.pe/la-hora-las-fresas/>

Resende C., Bianchetti E., Oliveira, Aline M., Braga, Virgínia F. & Peixoto, P. (2015). *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemicspecies of Brazilian Campos Rupestres. *Rev. Ciênc. Agron.* 46 (3):582-589.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150041>.

Reyes M. y Zschau B. (2012). Frutilla, consideraciones económicas manejo. Instituto de investigaciones agrícolas INIA Raihuen. Boletín INIA-N° 252. Villa Alegre. 153 Pp.

Roca, W. y Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura (Fundamentos y Aplicaciones). CIAT. Colombia. Pp.: 20- 36.

Rojas, G. y Ramirez, H. (1993). Control hormonal del desarrollo de las plantas. Ed. Limusa, S.A. México. p. 13-87.

Sakila, S., Ahmed, M., Roy, U., Biswas, M., Karim, R., Razvy, M., Hossain, M., Islam, R. y Hoque, A. (2007). Micropropagation of Strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). A Newly Introduced Crop in Bangladesh, *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, vol. 2, no. 2, p. 151-154.

Salisbury, F. y Ross C. (1994). Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamerica S.A., México DF. 759 p.

Sánchez R., Saavedra H., y Mauricio R. (2012). Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Palmas*. 33(4), 41-51. Recuperado de publicaciones.fedepalma.org

- Santos, A., Cabrera M., Gómez R., López J., Raya A., Basail M., y Medero V. Beovides Y. (2011). Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga “Viequera”(Xanthosoma spp.). Rev. Colomb. Biotecnol. 13: 97-106.
- Serrano, M. y Pinol, T. (1991). Biotecnología vegetal. Editorial Síntesis S.A. España. Pp: 50- 70.
- Skoog F. y Miller. (1965) .Citoquininas. Ciencia 148: 532 –533.
- Squeo, F. y Cardemil, L. (2006). Fisiología Vegetal: Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas .Ediciones Universidad de La Serena. La Serena. Chile.
- Tamura S. (1990). Historical aspects of gibberellins. En: Gibberellins. Takahashi N, BO Phinney & J Macmillan Eds. Springer-Verlag, New York. pp 1-8.
- Thimann, K. (1977). Hormone action in the whole life of plants. Amherst: University of Massachusetts Press.
- Tenorio, U. (1994). Efecto de tres dosis de 2,4-D y cuatro dosis de AIB en el enraizamiento de estacas de vainilla (*Vanilla fragans* mes) en Tingo Maria (Tesis pregrado). Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
- Tombion L., Kato A. y Soto M. (2020, 07,27). Protocolo de regeneración de calibrachoa var. pampa salmón inta a partir de meristemas apicales. Scielo. Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0719-38902020000200304&script=sci_arttext.
- Torrey, J. (1976). Root Hmmones and Plant Growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 27. Pp: 439-459.
- UNALM.Hidroponia.(2020).Soluciónhidropónica.Recuperado:http://www.lamolina.edu.pe/hidroponia/sol_presentacion.htm

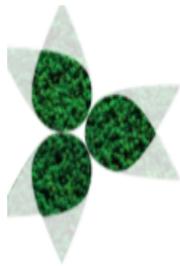
- Uribe M.,Ulloa J., Delaveau C., Sáez K, Muñoz F. y Cartes P. (2012).Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser.Guayana Bot. 69(1): 105-112.
- Valencia M., Escobedo D., Febronio L., y Gonzáles E., (2019). Aclimatación ex vitro de plántulas de *Fragaria x ananassa* Duch.Enero –Febrero. Vol. 10, no 1, 91 – 100.
- Vergara, C. (2018). Micropropagación de *Cedrela lilloi* C. DC. (cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de embriones cigóticos germinados in vitro"(tesis de pregrado).Lima - Perú.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 81: 277-285. doi: 10.1007/ s11240-004-6649-y.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Ficha técnica de sustrato premix 3.

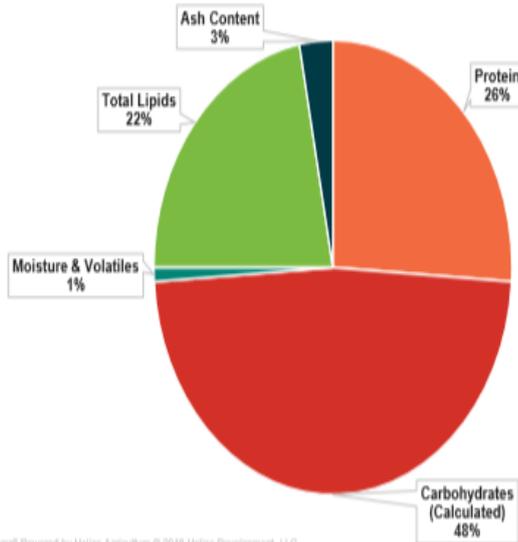
FICHA TÉCNICA			
SUSTRATO PREMIX 3			
	Revisado: 18/11/2019		
IMPORTANCIA:	El sustrato <i>PREMIX 3</i> está compuesto principalmente a base de musgo Sphagnum y vermiculita, su granulometría es fina y brinda óptimas condiciones de temperatura y humedad constante. Se recomienda para una exitosa germinación.		
DESCRIPCIÓN:	Favorece el desarrollo y crecimiento de las raíces. La adición de la vermiculita facilita el trasplante de plantines no se dañan debido a sus partículas; mejora la retención de agua y aire, siendo muy importante la oxigenación para la absorción de agua y nutrientes. Es un material inocuo, no contiene microorganismos o nemátodos patógenos, ni malas hierbas. Es un excelente aislante térmico.		
APLICACIONES:	En la elaboración de semilleros, almácigos, producción de plantines en bandejas y esquejes bajo sanidad controlada. Especialmente para hortalizas y ornamentales. Se recomienda humedecer previo al llenado para lograr un mayor volumen total. La cantidad de agua que se agrega es de 37-40L por cada 100L de sustrato, siendo el riego de manera gradual o pulverizado. Al añadir agua, la superficie del sustrato tiene que permanecer granulosa y estable, pero sin compactación, luego dejar descansar el material un mínimo de dos horas antes de llenar las bandejas.		
CARACTERÍSTICAS	DETALLES		
Procedencia	CANADÁ		
Composición	Turba rubia de musgo Sphagnum canadiense, vermiculita, caliza dolomítica, agentes humectantes y fertilizantes.		
Apariencia	Sustancia orgánica natural marrón claro a oscuro.		
Olor	Leve a olor de tierra		
Solubilidad en agua	No corresponde		
pH	5.5 ±0.3(en agua)		
Conductividad eléctrica	0.75 dS/cm		
Granulometría	Superfina/ 0-3mm		
Densidad	0.13- 0.16 g/cm ³		
Capacidad de agua	45- 65%		
Capacidad de aire	10- 20%		
Retención de agua	45- 55%		
Elementos en ppm	NO ₃ -N: 25-100	Mg: 30-100	Mn: 0.01- 0.1
	NH ₄ -N: 0-15	SO ₄ : 80-140	Mo: 0.001-0.02
	P: 1-20	B: 0.01- 0.2	
	K: 25- 100	Cu: 0.01- 0.05	
	Ca: 40- 140	Fe: 0.3-1.1	
Volumen expandido del fardo	Fardo de 200L		
Peso del fardo	32 kg aprox.		
<p>Recomendaciones: Al añadir agua, la superficie del sustrato tiene que permanecer granulosa y estable, pero sin compactación. Las recomendaciones de uso se han de entender como indicativas y se deben adecuar a las condiciones "in situ". Esta información se suministra de buena fe, es precisa y confiable según mejor conocimiento, pero debe considerarse solo como una guía en la selección del producto no como garantía de funcionamiento. • MARUPLAST INTERNACIONAL E.I.R.L. declina toda responsabilidad por resultados obtenidos mediante el uso de esta información.</p>			
<p>MARUPLAST INTERNACIONAL EIRLTDA Departamento Técnico</p>			

ANEXO 2: Ficha técnica del producto Phycoterra de extracto de algas.



PRODUCT BREAKDOWN

AVERAGE MICROALGAE COMPOSITION



MACRONUTRIENTS N-P-K
(% of Sample)

Nitrogen (N)	≥ 0.30
Phosphorus (P)	≥ 0.30
Potassium (K)	≥ 0.10

MICRONUTRIENTS

Calcium	0.01-0.10%
Iron	10 – 100 ppm
Magnesium	0.0075-0.035%
Manganese	1-10 ppm
Zinc	1-10 ppm
Chloride	40 – 200 ppm
Sodium	0.01-0.1%
Sulfur	0.01-0.1%
Boron	0.2-2 ppm

Phycoterra® Powered by Heliae Agriculture © 2018 Heliae Development, LLC

December 7, 2018 2



COMMON APPLICATIONS

- GROUND PREP
- ROOT DIP and DRENCHING
- IN-LINE DRIP APPLICATION
- OVERHEAD IRRIGATION OR DIRECT SPRAY AFTER SEEDING
- FURROW APPLIED or SHANKED INTO THE SEED FURROW
- SIDE-DRESSED / BANDED
- FOLIAR



Phycoterra® Powered by Heliae Agriculture © 2018 Heliae Development, LLC

December 7, 2018 3



ANEXO 3: ANVA de número de brotes propagables para ensayo preliminar multiplicación del brote tipo 1.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	2,361	0,4722	3,27	0,043	
Error	12	1,733	0,1444			
Total	17	4,094				

Cv:19

ANEXO 4: ANVA del número de brotes propagables para la segunda multiplicación del brote tipo 1

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	1,942	0,3883	2,90	0,025	
Error	42	5,625	0,1339			
Total	47	7,567				

cv: 19

ANEXO 5: ANVA del número de brotes no propagables en la vitroplanta en la segunda multiplicación del brote tipo 1

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	26,48	5,2960	7,68	0,000	
Error	42	28,95	0,6893			
Total	47	55,43				

cv:22,8

ANEXO 6: ANVA de peso fresco propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
TRATAMIENTO	5	0,000313	0,000063	4,48	
Error	30	0,000419	0,000014		
Total	35	0,000731			

Cv 19,4

ANEXO 7: ANVA del peso seco propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
TRATAMIENTO	5	0,02304	0,004608	5,21	0,001
Error	30	0,02654	0,000885		
Total	35	0,04958			

Cv : 2.8

***Transformación de datos Raíz C +1**

ANEXO 8: KRUSKAL WALLIS del número de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.

Variable	N	Media	Mediana	H	P
Número de raíz 6	0.00	0.00	0.00	17.03	<0.0001
Número de raíz 6	0.00	0.00	0.00		
Número de raíz 6	0.00	0.00	0.00		
Número de raíz 6	0.00	0.00	0.00		
Número de raíz 6	0.50	0.50	0.50		
Número de raíz 6	5.00	5.00	5.00		

ANEXO 9: KRUSKAL WALLIS de la longitud de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del material tipo 1.

Variable	N	Media	Mediana	H	P
Longitud de raíz 6	0.00	0.00	16.81	<0.0001	
Longitud de raíz 6	0.00	0.00			
Longitud de raíz 6	0.00	0.00			
Longitud de raíz 6	0.00	0.00			
Longitud de raíz 6	9.00	2.00			
Longitud de raíz 6	34.70	35.50			

ANEXO 10: ANVA de la altura de vitroplanta (mm) para la segunda multiplicación del brote tipo 1.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	118,3	23,659	3,98	0,005	
Error	42	249,6	5,944			
Total	47	367,9				

cv: 15,4

ANEXO 11: ANVA del peso fresco de hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,00816	0,001633	3,11	0,022	
Error	30	0,01573	0,000524			
Total	35	0,02389				

cv: 8,5

ANEXO 12: ANVA de peso seco de hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,003360	0,000672	18,33	0,000	
Error	30	0,001100	0,000037			
Total	35	0,004460				
Cv 20,14						

ANEXO 13: ANVA de peso fresco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación sin del brote tipo 1.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,03590	0,007181	7,12	0,000	
Error	30	0,03024	0,001008			
Total	35	0,06614				
Cv 7,3						

ANEXO 14: ANVA Peso seco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 1.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,005284	0,001056	15,34	0,000	
Error	30	0,002067	0,000068			
Total	35	0,007351				
cv:11						

ANEXO 15: ANVA de número de brotes propagables de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	1,732	0,34640	4,33	0,002	
Error	54	4,322	0,08004			
Total	59	6,054				
Cv 7,2						

ANEXO 16: ANVA de número de brotes no propagables de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	8,641	1,7282	4,13	0,003	
Error	54	22,581	0,4182			
Total	59	31,222				
Cv :9,0						

ANEXO 17: ANVA de peso fresco de brotes propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del material tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,002477	0,000495	1,79	0,145	
Error	30	0,008309	0,000277			
Total	35	0,010787				
Cv: 12,7						

ANEXO 18: ANVA de peso seco de brotes propagable (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,000024	0,0000048	4,84	0,002	
Error	30	0,000030	0,0000010			
Total	35	0,000054				
cv 8,8						

ANEXO 19: KRUSKAL WALLIS de número de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Variable	N	Media	Mediana	H	P
Número de raíz 6	6	0.00	0.00		23.43<0.0001
Número de raíz 6	6	0.00	0.00		
Número de raíz 6	6	0.00	0.00		
Número de raíz 6	6	0.00	0.00		
Número de raíz	6	3.673.50			
Número de raíz	6	4.504.00			

ANEXO 20: KRUSKAL WALLIS de longitud de raíz de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Variable	N	Media	Mediana	H	P
Longitud de raíz	6	0.00	0.00	23.7	<0.0001
Longitud de raíz	6	0.00	0.00		
Longitud de raíz	6	0.00	0.00		
Longitud de raíz	6	0.00	0.00		
Longitud de raíz	6	25.17	28.00		
Longitud de raíz	6	43.5	50.00		

ANEXO 21: ANVA de altura (mm) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	118,1	23,624	2,65	0,033	
Error	54	482,2	8,929			
Total	59	600,3				

cv: 12,6

ANEXO 22: ANVA de peso fresco hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,115	0,02300	4,83	0,002	
Error	30	0,142	0,00473			
Total	35	0,257				

cv 13,5

ANEXO 23: ANVA de peso seco de hoja (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
TRATAMIENTO	5	0,001528	0,000306	3,66	0,011	
Error	30	0,002507	0,000084			
Total	35	0,004035				

cv:17,24

ANEXO 24: ANVA de peso fresco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
tratamiento	5	4,981	0,99613	16,41	0,000
Error	30	1,821	0,06069		
Total	35	6,801			
Cv: 16,2					

ANEXO 25: ANVA de peso seco total (g) de la vitroplanta para la segunda multiplicación del brote tipo 2.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
tratamiento	5	0,01174	0,002348	5,89	0,000
Error	30	0,01194	0,000398		
Total	35	0,02368			
Cv: 15					

ANEXO 26: ANVA Altura (mm) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	16,39	4,097	4,05	0,015
Error	20	20,26	1,013		
Total	24	36,64			
CV: 5,8					

ANEXO 27: ANVA Número de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,9767	0,2442	0,96	0,449
Error	20	5,0733	0,2537		
Total	24	6,0500			
CV: 7,4					

ANEXO 28: ANVA Peso fresco de hoja (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,03831	0,009578	3,89	0,017
Error	20	0,04929	0,002464		
Total	24	0,08760			

CV: 15,8

ANEXO 29: ANVA Peso seco de hoja (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,000324	0,000081	7,36	0,001
Error	20	0,000220	0,000011		
Total	24	0,000544			

cv : 13

ANEXO 30: ANVA de Número de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamientos	4	9,690	2,4225	14,30	0,000
Error	20	3,388	0,1694		
Total	24	13,078			

Cv: 7,0

ANEXO 31: ANVA de longitud de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamientos	4	47,92	11,980	4,15	0,013
Error	20	57,74	2,887		
Total	24	105,66			

CV : 7,9

ANEXO 32: ANVA Peso fresco de raíz (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,000192	0,000048	4,8	0,007
Error	20	0,000200	0,000010		
Total	24	0,000392			

CV: 13,3

ANEXO 33: ANVA del peso seco de raíz (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,007407	0,001852	6,30	0,002
Error	20	0,005875	0,000294		
Total	24	0,013281			

cv :16,3

*** Transformación de datos Raíz C +1**

ANEXO 34: ANVA de peso fresco Total (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,02513	0,006282	3,86	0,018
Error	20	0,03256	0,001628		
Total	24	0,05769			

CV: 15,5

ANEXO 35: ANVA de Peso seco total (g) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo 1.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,000236	0,000059	5,88	0,003
Error	20	0,000201	0,000010		
Total	24	0,000437			

cv 10,1

ANEXO 36: ANVA Altura (mm) de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	11,03	2,7569	3,10	0,039	
Error	45	39,99	0,8892			
Total	49	51,02				

CV: 5,5

ANEXO 37: ANVA del número de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	3,64	0,910	1,51	0,216	
Error	45	27,11	0,603			
Total	49	30,75				

cv 13,1

ANEXO 38: ANVA peso fresco de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	0,02173	0,005432	1,20	0,342	
Error	45	0,20410	0,004535			
Total	49	0,22583				

cv: 17

ANEXO 39: ANVA del peso seco de hoja de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	0,001362	0,000340	4,90	0,002	
Error	45	0,003128	0,000070			
Total	49	0,004490				

Cv:17,4

ANEXO 40: ANVA Número de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento brote tipo 2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	19,76	4,9400	9,82	0,000	
Error	45	22,64	0,5031			
Total	49	42,40				
Cv :9,3						

ANEXO 41: ANVA Longitud de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	64,07	16,017	8,48	0,000	
Error	45	85,04	1,890			
Total	49	149,11				
Cv: 7						

ANEXO 42: ANVA del peso fresco raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	0,004364	0,001091	17,90	0,000	
Error	45	0,002790	0,000062			
Total	49	0,007154				
Cv : 12,5						

ANEXO 43: ANVA del peso seco de raíz de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Tratamiento	4	0,01131	0,002826	4,52	0,004	
Error	45	0,02815	0,000626			
Total	49	0,03946				
Cv 2,2						

*** Transformación de datos Raíz C +1**

ANEXO 44: ANVA de peso fresco total de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento brote tipo2.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,01525	0,003812	0,75	0,572
Error	45	0,23010	0,005113		
Total	49	0,24535			
Cv: 14,6					

ANEXO 45: ANVA del peso seco total de la vitroplanta para la etapa de enraizamiento del brote tipo2.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	4	0,001412	0,000353	4,14	0,006
Error	45	0,003834	0,000085		
Total	49	0,005246			
Cv: 16					

ANEXO 46: Prueba de Kruskal Wallis para variable altura en la etapa de aclimatación.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Altura (cm)	T1	9	1,050,36	1,10	24,21	<0,0001	
Altura (cm)	T2	9	1,640,22	1,60			
Altura (cm)	T3	9	0,860,29	1,00			
Altura (cm)	T4	9	1,360,21	1,30			

Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p > 0,05$)

ANEXO 47: Prueba de Kruskal Wallis para la variable del número de hojas en la etapa de aclimatación.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Número de hojas	T1	9	3,11	2,62	2,00	8,08	0,0391
Número de hojas	T2	9	3,78	2,68	4,00		
Número de hojas	T3	9	1,00	1,41	0,00		
Número de hojas	T4	9	1,89	1,762,00			

Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p > 0,05$)

ANEXO 48: Prueba de Kruskal Wallis para la variable de longitud de foliolo en la etapa de aclimatación.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Longitud de foliolo (cm)	T1	9	1,01	0,39	0,96	0,76	0,8595
Longitud de foliolo (cm)	T2	9	1,13	0,46	1,24		
Longitud de foliolo (cm)	T3	9	0,98	0,35	0,98		
Longitud de foliolo (cm)	T4	9	1,10	0,411,18			

Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p > 0,05$)