



El rol del AIA y BAP en la regeneración y formación de brotes in vitro de tres variedades de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Role of BA and IAA on regeneration and shoot proliferation in vitro of three strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) varieties

Javier J. Gonzales-Arteaga^{1,*}; Juan Rodríguez-Layza¹; Ladislao C. Romero-Rivas¹;
Adelmo Párraga-Quintanilla¹; Julio A. Olivera-Soto²

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Filial Oxapampa, Carretera Central km 3,5, Barrio Miraflores, Oxapampa, Perú.

² Laboratorio de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales, Centro Internacional de Investigación para la Sustentabilidad (CIIS) Lunahuaná, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú.

ORCID de los autores

J. J. Gonzales-Arteaga: <https://orcid.org/0000-0001-6196-707X>

J. Rodríguez-Layza: <https://orcid.org/0000-0003-2663-2674>

L. C. Romero-Rivas: <https://orcid.org/0000-0002-6598-3277>

A. Párraga-Quintanilla: <https://orcid.org/0000-0001-7392-9599>

J. A. Olivera-Soto: <https://orcid.org/0000-0002-3470-1601>

RESUMEN

El objetivo fue determinar la respuesta de tres variedades de fresa *Fragaria x ananassa* Duch. a la aplicación de reguladores de crecimiento: ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el medio de cultivo Murashige Skoog (MS) en la micropropagación de fresa; se utilizó el diseño bloques completos al azar y fueron considerados como tratamientos las variedades de fresa 'Aromas', 'Albión' y 'Camarosa'. El medio MS + 0,5 mgL⁻¹ de BAP+ 0,6 mgL⁻¹ de AIA fue utilizado para la regeneración de yemas en la fase de inicio, MS+0,5 mgL⁻¹ BAP en multiplicación para inducir la proliferación de yemas y MS sin reguladores de crecimiento en enraizamiento. Se determinó que, a los 32 días de cultivo, la combinación de AIA y BAP influye en la regeneración de yemas apicales de las tres variedades con mayor grado en 'Camarosa'; asimismo, en la fase de multiplicación BAP favorece la proliferación de brotes en la variedad 'Albión' con 2,51 brotes por explante, superando significativamente a 'Camarosa' y 'Aromas'; sin embargo, el medio MS sin reguladores produjo mayor desarrollo radicular de la variedad 'Camarosa' con 4,76 cm de longitud.

Palabras clave: micropropagación; yemas de corona; variedades; fenolización; enraizamiento.

ABSTRACT

The objective was to determine the response of three strawberry varieties (*Fragaria x ananassa* Duch.) to the application of two plant growth regulators: indol acetic acid (IAA) and 6-Benzyl aminopurine (BAP) added to Murashige & Skoog médium in strawberry micropropagation. The complete randomized block design was used and three strawberry varieties 'Aromas', 'Albion' and 'Camarosa' were considered as trials. MS médium for shoot regeneration in initial stage was supplemented with BAP 0.5 mgL⁻¹ and IAA 0.6 mgL⁻¹. Shoot proliferation MS médium was supplemented with BAP 0.5 mgL⁻¹ in multiplication stage and MS médium hormone free was used for rooting induction. It was determined that after 32 days of cultivation the combination of IAA and BAP significantly affected shoot regeneration of apical shoot tips of three strawberry varieties. The greatest effect was caused on 'Camarosa'. In addition, results on shoot multiplication using BAP indicated that 'Albion' performed better in shoot proliferation in terms of shoots per explants reaching 2.51 compared to 'Camarosa' and 'Aromas' with significant differences. However rooting médium with no growth regulators improves root development with best response of 'Camarosa' root length reaching 4.76 cm.

Keywords: micropropagation; crown buds; varieties; phenolization; rooting.

1. Introducción

La producción de cultivos de importancia económica, para el mercado local, nacional y externo, requiere contar con genotipos adaptados a cada lugar o región para que puedan soportar las condiciones a las que están sometidos durante los diferentes estados de desarrollo fenológico; esto hace que las investigaciones estén orientadas a lograr suplir estos niveles de exigencias, para una producción exitosa. La biotecnología, a través del cultivo in vitro de tejidos, tiene la ventaja de “multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existen pocos individuos” (Aguirre et al., 2016); ésta, constituye una herramienta para obtener plantas uniformes a partir de un tejido, explante (Mroginski & Roca, 1993); y una alternativa para una propagación rápida, segura y obtener plantas sanas, libres de patógenos.

La propagación vegetativa de la fresa *Fragaria x ananassa* Duch. (Rosaceae) se realiza por medio de estolones o por hijuelos de tallos cortos que conforman la corona, con yemas que producen nuevas coronas (Olivera, 2012). El cultivo in vitro ha sido aplicado para la propagación masiva de plantas de fresa desde los años 80 del siglo pasado y se ha ido mejorando y automatizando con el paso del tiempo en diferentes países donde se han implementado programas propios de producción de plantas de fresa libres de patógenos. En la micropropagación se emplea básicamente Bencil Amino Purina (BAP), una citoquinina activa a concentración de 1,0 mgL⁻¹ para inducir la formación de brotes axilares y sin reguladores de crecimiento para inducir el enraizamiento (Boxus, 1999). El medio de cultivo más utilizado para la micropropagación de fresa es el MS (Murashige & Skoog, 1962), que se menciona en la gran mayoría de ensayos de micropropagación de fresa (Martinelli, 1992).

El éxito del cultivo in vitro, radica en obtener un método de desinfección, que evite la contaminación y la fenolización; el uso de bicloruro de mercurio es un buen agente desinfectante, rápido y sencillo para obtener explantes viables en mayor del 80% comparado al hipoclorito de sodio, pero tiene la desventaja de ser muy tóxico (Bedoya et al., 2016). La inducción de la morfogénesis indirecta, en dos medios con la presencia de auxina AIB favoreció la formación de raíces e indujo al desarrollo de pequeñas raíces secundarias (Gómez-Serrano et al., 2010); por otro lado, KIN en la concentración de 2,0 a 2,5 mgL⁻¹, favoreció mejores brotes en la fase de

establecimiento de *Stevia rebaudiana* (Calderon-Acuña & Montes-Godoy, 2017).

En la medida que se incrementó el contenido de cloro en el rango de 10% a 30% de producto comercial y el tiempo de inmersión de 10 a 30 min, la contaminación ha descendido (Sanchez-Cuevas & Salaverría, 2004). El desarrollo de las vitroplantas, dependen del tipo de explante, si es yema de estolón o de corona, en los primeros se encontraron una respuesta a los 13 días comparado a 28 en yemas de corona y las características propias del explante; además, la concentración y tiempo de exposición al desinfectante; al respecto, se reportaron supervivencia de 80% a 40% con una exposición de 25 y 30 min en la solución desinfectante (Mamani-Sánchez & Murillo-García, 2020).

La micropropagación de yemas apicales de variedades de fresa en medio de cultivo MS (1962) con 1,25 mgL⁻¹ de BA + 1,0 mgL⁻¹ AIA y MS modificado con KIN 1,0 mgL⁻¹ se encontró que el mayor porcentaje de sobrevivencia fue en el primero en 3 variedades, teniendo solamente un 20% de sobrevivencia para 'Camino real' en la tercera siembra (Jiménez & Alvarado, 2014). En el medio MS + vitaminas modificadas + 4,44 µM de BAP y 1,44 µM de GA₃, se obtuvo 70% de explantes establecidos con éxito comparado a otros tratamientos (Ruíz-Anchondo et al., 2018). En la respuesta de micropropagación al medio MS con BAP (0,5-2,5 mgL⁻¹), fue 2,0 mgL⁻¹ como concentración óptima, valores mayor o menor a éste, mostraron brotes más bajos en proliferación (Naing et al., 2019).

El medio MS + BAP solo o combinado con IAA fue esencial para la proliferación y multiplicación de brotes de fresa; se encontró que 3,0 mgL⁻¹ de BAP+0,5 mgL⁻¹ de IAA resultó ser mejor con 16,1 ± 0,29 días en la inducción de brotes y 12,8 ± 0,52 como número máximo de brotes (Rokosa & Mikiciuk, 2017). Explantes de fresa, han sido cultivados en MS con 0,5–2,5 mgL⁻¹ de BAP, KIN (1,0-2,0 mgL⁻¹) y GA₃ (0,1-1,0 mgL⁻¹), donde, se encontró que después de 4 -5 semanas se desarrollaron brotes en 82% de explantes en un número máximo de 7, en la que 2,0 mgL⁻¹ de BAP superó a KIN y AG3 (Badal et al., 2019). En el cultivar 'Winter Dawn' y 'Sweet Charlie' incubados en MS al 75% + 0,5 mgL⁻¹ AB + 0,1 mgL⁻¹ KN, se encontró una diferencia del 15% en la tasa de multiplicación (Dhukate et al., 2021). La multiplicación en el cultivar 'RubyGem', en medio MS suplementado con 1,0 mgL⁻¹ BAP y 0,1 mgL⁻¹ IBA con la adición de nitrato de plata, AgNO₃, 10

mgL⁻¹, fue superior en comparación al testigo, libre de AgNO₃ (Nasir & Abdulhussein, 2022). En fresa, cultivar 'Pharachatán 80' en medio MS con reducción de nitrato de potasio suplementado con BAP, 1,0 mgL⁻¹, favoreció la longitud de brote (Poothong, 2020).

En regeneración y multiplicación de variedades de fresa, han determinado que la concentración de BAP, 1,0 mgL⁻¹ se obtuvo menores resultados seguido de 1,5 mgL⁻¹, con promedios de 11,28 y 10,48 raíces por explante (Mohamed et al., 2018); mientras que, en otro trabajo encontraron 5,0 cm de longitud de raíz en MS con 1,0 mgL⁻¹ de BAP (Monirul-Islam, 2018); en el cv. 'Hadar', en el medio MS suplementado con IBA (1,5 mgL⁻¹) y NAA (1,5 mgL⁻¹), a los 6 días de incubación se obtuvo 80% de enraizamiento (Tung et al., 2021). Existe una gran variación en la respuesta de los genotipos al medio y condiciones micro ambientales, que puede deberse a las especies e intra especie, es frecuente encontrar que a similares condiciones los cultivares respondan de diferente manera (Krikorian, 1993); a pesar de que existe mucha información sobre los medios de cultivo y variedades de este cultivo; aún existe dificultades para la micropropagación a nivel comercial (Valliath & Mondal, 2023). Frente a esto, es necesario que una vez establecido un medio que funcione para un cultivar, sea también probado su comportamiento frente a otras variedades, por ello indujo a realizar la presente investigación de micropropagación a partir de yemas de corona de fresa en las variedades 'Aromas', 'Albió'n' y 'Camarosa'. El objetivo fue determinar la respuesta de las variedades 'Aromas', 'Albió'n' y 'Camarosa' de fresa *Fragaria x ananassa* Duch. en la micropropagación a partir de yemas de corona en medio MS con reguladores de crecimiento.

2. Material y métodos

La investigación de micropropagación en fresa *Fragaria x ananassa* Duch fue realizada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Filial Oxapampa. El diseño utilizado fue Bloques completos al azar (Gutiérrez & de la Vara, 2008); los tratamientos, fueron las variedades de fresa: 'Aromas' (t1), 'Albió'n' (t2) y 'Camarosa' (t3) (Figura 1) y 04 repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por ocho explantes, yemas de corona, en la fase de establecimiento; y, nueve en la de multiplicación y enraizamiento in vitro.

La Población, fue la especie *Fragaria x ananassa* Duch, variedades 'Aromas', 'Albió'n' y 'Camarosa' obtenidas el año 2018 de la Estación Experimental Agraria, INIA Donoso, Huaral, Lima, Perú, desarrolladas bajo las condiciones de invernadero del proyecto, en el distrito de Oxapampa. La muestra estuvo conformada por yemas de corona de las variedades mencionadas, los medios de cultivo en ocho tubos de ensayo de 16x150 mm por unidad experimental en la fase de establecimiento y nueve en las fases de multiplicación y enraizamiento.

En la fase de establecimiento, los explantes fueron obtenidos de plantas manejadas en el invernadero y llevados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, donde fueron lavados con agua de caño por 30 min; posteriormente, se defoliaron, retiraron las raíces y se colocaron en un vaso de precipitados de 1000 mL con jabón líquido 15,0 mgL⁻¹ durante 5 min y seis enjuagues con agua destilada estéril. En la cámara de flujo laminar, se sumergieron en etanol 70% durante 1 min y sumergidas en NaOCl al 2% más 2 gotas de Tween 20 por cada 100 mL (Figura 2), durante 25 min; se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y sumergidas en solución antioxidante de Ácido ascórbico 300 mgL⁻¹ + Ácido cítrico 100 mgL⁻¹ durante 10 min.



Figura 1. Plantas madre de fresa Var. 'Aromas' (a); 'Albió'n' (b) y 'Camarosa' (c).



Figura 2. Explantes de las tres variedades de fresa en proceso de desinfección.

Las yemas de corona se extrajeron cuidadosamente de los explantes, con el uso de

pinzas y bisturí N° 11 bajo un estereoscopio ACCU-SCOPE y sembrados en tubos de ensayo de 16x150 mm, conteniendo 9 mL de medio de establecimiento, con sales y vitaminas MS (Ugale & Barwant, 2020) más BAP 0,5 mgL⁻¹, AIA 0,6 mgL⁻¹, 30 mgL⁻¹ de sucrosa, 9 mgL⁻¹ de agar y pH igual a 5,6, esterilizado previamente en autoclave a 121 °C y 0,1 MPa por 20 min e incubados a 23°C, 60% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas luz, por 32 días, y con luminosidad de 14,02 μmol.m⁻².s⁻¹.

Las variables evaluadas en establecimiento in vitro, fueron presencia de micelios (hongos), colonias de bacterias, fenolización (número de explantes con más del 50% de tejido de color marrón oscuro), sobrevivencia (N° de explantes que mantuvieron el tejido de color verde natural), explantes brotados (N° de explantes por tratamiento con formación de brotes), brotes por explante y longitud de brote (mm). Las lecturas fueron realizadas a los 8 y 18 días después de la inoculación (ddi) en el caso de las variables hongos, bacterias y fenolización. A los 24 y 32 ddi se realizaron las lecturas de las variables explantes brotados (brotamiento), número y longitud de brotes, mientras que la variable sobrevivencia se evaluó a los 8, 18, 24 y 32 ddi.

En la fase de multiplicación, los pequeños brotes, producto del establecimiento in vitro de las yemas de corona, fueron transferidas a tubos de ensayo de 25x150 mm con 12 mL de medio de multiplicación previamente esterilizado, elaborado con sales y vitaminas, MS+BAP 0,5 mgL⁻¹, 30 mgL⁻¹ de sucrosa, 9 mgL⁻¹ de agar y pH igual a 5,6; las yemas fueron incubadas a las mismas condiciones de establecimiento excepto en luminosidad (16,39 μmol.m⁻².s⁻¹), durante 32 días para la proliferación de nuevos brotes. Las variables evaluadas fueron, N° de brotes por explante, longitud de brote (mm) y N° de hojas por explante. Las lecturas fueron realizadas a los 11, 18, 24 y 32 ddi.

En la fase de enraizamiento, los brotes obtenidos de la multiplicación, fueron individualizados en tubos de ensayo de 25x150 mm con 12 mL de medio, elaborado con sales y vitaminas MS, 30 mgL⁻¹ de sucrosa, 9 mgL⁻¹ de agar y pH igual a 5,6 e incubados a las mismas condiciones de establecimiento y multiplicación excepto en luminosidad (18,69 μmol.m⁻².s⁻¹) durante 32 ddi; las vitroplántulas completamente enraizadas fueron trasladadas al invernadero para su aclimatación ex vitro. Las variables evaluadas fueron N° de raíces por vitroplanta y longitud de

raíz (mm) considerada la raíz más larga. Las lecturas fueron realizadas a los 11, 18, 24 y 32 ddi. El procesamiento de datos fue realizado en el software estadístico R v. 4.2.3; para las variables dicotómicas se utilizó la prueba Q de Cochran y comparación múltiple de Dunn, α=0,05; el Anova para determinar significancia; y la prueba de comparación múltiple de Duncan (α = 0,05) para encontrar el mejor tratamiento. Antes de ser procesados fueron transformados con $\sqrt{x+1,0}$, para cumplir con los supuestos de normalidad de Shapiro y homogeneidad de varianzas de Levene.

3. Resultados y discusión

La micropropagación in vitro de fresa *Fragaria x ananassa* Duch. variedades 'Aromas' (t1), 'Albión' (t2) y 'Camarosa' (t3) a partir de yemas de corona, se describe a continuación.

Establecimiento

No hubo contaminación por hongos; con la prueba Q de Cochran (Tabla 1) se determinó diferencias estadísticas en fenolización y sobrevivencia a los 8 y 18 ddi; mientras que, en contaminación por bacterias no hubo diferencias a los 8 ddi; sin embargo, con la prueba de comparación múltiple de Dunn (α = 0,05) se determinó que el t3 fue superior en las tres variables, excepto a los 18 ddi, que en sobrevivencia fue igual a t2; mientras que a los 24 ddi, la prueba Q de Cochran indica que hay diferencias significativas en brotamiento y sobrevivencia, y a los 32 ddi solo hubo diferencias para sobrevivencia; y con la prueba de Dunn, a los 24 ddi, t3 fue superior e igual a t2, pero a los 32 ddi en brotamiento t1 fue igual a t2, ambos superiores a t3 y en sobrevivencia t3 fue superior e igual a t2; esto evidencia que, las variedades mencionadas presentan diferentes respuestas durante los días de incubación para la fase de establecimiento.

El Anova (Tabla 2), a los 24 ddi, mostró diferencias estadísticas significativas para brotes por explante y diferencias altamente significativas para longitud de brote; mientras que, a los 32 ddi, mostraron diferencias significativas en longitud de brote, y altamente significativas en número de brotes por explante. La prueba de comparación múltiple Duncan (α = 0,05), determinó que, a los 24 y 32 ddi, en las variables evaluadas, 'Camarosa' fue superior a 'Aromas' e igual a 'Albión'; excepto, a los 32 ddi que, en brotes por explante fue superior a las dos variedades; esto demuestra que las tres variedades de fresa (Figura 3), tienen una variación en la respuesta al medio utilizado para esta fase.

Tabla 1

Prueba Q de Cochran y comparación múltiple de Dunn, $\alpha=0,05$, en el establecimiento in vitro de tres variedades de fresa a partir de yemas de corona

ddi	Fuente	Bacterias	Fenolización	Sobrevivencia
8	Repeticiones	32	32	32
	gl	2	2	2
	Valor Q	5,14	7,11	23,68
	p value	0,0764	0,0286	0,0000
	tratamientos	Promedios		
	t1	0,84a	0,69a	0,41 c
	t2	0,81ab	0,69a	0,62 b
	t3	0,66 b	0,44 b	0,88a
18	Repeticiones	32	32	32
	gl	2	2	2
	Valor Q	14,73	16,13	16,13
	p value	0,0006	0,0003	0,0003
	tratamientos	Promedios		
	t1	0,88a	0,59a	0,41 b
	t2	0,88a	0,44ab	0,62a
	t3	0,59 b	0,25 b	0,75a
24	Brotamiento		Sobrevivencia	
	Repeticiones	32	32	
	gl	2	2	
	Valor Q	9,82	9,82	
	p value	0,0074	0,0074	
	tratamientos	Promedios		
	t1	0,38 b	0,38 b	
	t2	0,56ab	0,56ab	
t3	0,75a	0,75a		
32	Repeticiones	32	32	
	gl	2	2	
	Valor Q	5,14	9,82	
	p value	0,0764	0,0074	
	tratamientos	Promedios		
	t1	0,84a	0,38 b	
	t2	0,81a	0,56ab	
	t3	0,66 b	0,75a	

Letras iguales no hay diferencias significativas.

Tabla 2

Cuadrados medios y comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, en el establecimiento in vitro de tres variedades de fresa a partir de yemas de corona

ddi	Fuente de variación	Cuadrados medios			Duncan		
		gl	Brotos explante ⁻¹ (N°)	Longitud de brote (mm)	Trat.	Brotos explante ⁻¹ (N°)	Longitud de brote (mm)
24	Bloques	3	0,0033ns	0,0174ns	t1	1,16 b	1,24 b
	Tratamientos	2	0,0241*	0,0608**	t2	1,23ab	1,38a
	CV%		4,64	5,35	t3	1,31a	1,49a
	Promedio		1,13	1,37			
	Mínimo		1,10	1,18			
	Máximo		1,36	1,55			
32	Bloques	3	0,0052ns	0,0301ns	t1	1,16 b	1,30 b
	Tratamientos	2	1,0428**	0,1076*	t2	1,23 b	1,49ab
	CV%		4,69	8,32	t3	1,36a	1,63a
	Promedio		1,25	1,47			
	Mínimo		1,10	1,18			
	Máximo		1,44	1,78			

Datos transformados $\sqrt[3]{x+1,0}$; **, diferencias altamente significativas; *, diferencias significativas; ns: no significativo; en columnas, letras iguales no hay diferencias significativas.

En la etapa de establecimiento, a los 8 ddi, la variedad 'Camarosa' fue la que mejor respondió al mejor método de desinfección establecido en un experimento anterior en variedad 'Aromas'

(Gonzales-Arteaga et al., 2022), frente a las variedades 'Aromas' y 'Albió'n con un 88% de sobrevivencia, esto demuestra que las variables, presencia de bacterias, fenolización y sobrevi-

vencia, dependen de los genotipos; al respecto, se encontró que sólo el 20% de explantes no fueron contaminados en yemas de corona de fresa de la variedades 'Oso grande' y 'Sweet Charlie' (Mamani-Sánchez & Murillo-García, 2020), con un método de desinfección similar al utilizado en esta investigación; por tanto, se debe tener cuidado en el proceso del pre tratamiento en invernadero. Por otro lado, con la variedad 'Aromas' se utilizó NaOCl al 1,0% por 5 min para desinfección de estolones, en el cual se logró porcentaje más bajo de contaminación (10%) y la mayor tasa de supervivencia (60%) (Neri et al., 2022); este factor de la contaminación, también esta influenciado por el tipo de desinfectante utilizado; donde, en el cultivar de fresa, Chandler, se obtuvo una máxima de contaminación del 69,70%, al utilizar como desinfectante, HgCl₂ al 0,1% más etanol al 70% por 4 min (Kumar et al., 2020).

En la sobrevivencia, 'Camarosa' fue superior a 'Aromas', pero igual a 'Albión', en contraste a fenolización, que fue la variedad 'Aromas' mayor a 'Camarosa' e igual a 'Albión', esto es explicada por que estas dos variables se contraponen, cuando la fenolización es expresada, ésta es un proceso irreversible, por tanto el explante llega al colapso total; "los compuestos afectan el crecimiento y sobrevivencia de los explantes, oxidando los tejidos y llevando a la necrosis y muerte del mismo" (Ruiz-Anchondo et al., 2018). En número de brotes por explante, 'Camarosa' fue superior a 'Aromas' y 'Albión', estos resultados concuerdan con el trabajo realizado al comparar las variedades de fresa 'Oso Grande' y 'Sweet Charlie', que respondieron de diferente manera al medio de cultivo MS+BAP a diferentes concentraciones, la mejor respuesta en N° de brotes fue a 0,5 mgL⁻¹ de BAP para la primera y a 1,0 mgL⁻¹ para 'Sweet Charlie' (Mamani-Sánchez & Murillo-García, 2020); sin embargo, utilizando el medio de cultivo MS y mayor concentración de citoquinina y auxina, en una combinación de 5,0 mgL⁻¹ de BAP + 1,0 mgL⁻¹ de AIA obtuvieron mayor sobrevivencia de explantes en cuatro variedades de fresa 'Winter Dawn', 'Camarosa', 'Chandler' y 'Festival' (Dutta, 2022); esto, se debería a las diferencias de cada genotipo que responde de diferente manera bajo la influencia de los componentes del medio de cultivo.

Multiplicación y enraizamiento

En multiplicación, el Anova (Tabla 3), a los 11 ddi ha mostrado diferencias estadísticas significativas entre las variedades en la variable número de

brotes por explante; mientras que, a 18 y 24 ddi las diferencias fue altamente significativas en todas las variables evaluadas; y a los 32 ddi, las diferencias fueron significativas para número y longitud de brotes, y altamente significativas para la variable número de hojas por explante (Figura 4). Por otro lado, para enraizamiento, a los 11y 18 ddi determinó diferencias altamente significativas en número y longitud de raíces, y a los 24 ddi mostraron diferencias altamente significativas para número y significativas en longitud de raíces; asimismo, significativa a los 32 ddi para ambas variables.

La prueba de comparación múltiple Duncan ($\alpha = 0,05$), Tabla 4, en multiplicación, determinó que, hubo mayor número de brotes en la variedad 'Albión' a los 18, 24 y 32 ddi; por otro lado, a los 11 ddi no hubo diferencias significativas en longitud de brote y numero de hojas por explante para las tres variedades; sin embargo, a los 24 y 32 ddi en las mismas variables 'Camarosa' y 'Albión' fueron iguales y superiores estadísticamente a 'Aromas', excepto en longitud de brote a los 18 ddi donde 'Camarosa' fue superior a las variedades 'Albión' y 'Aromas'. En enraizamiento, la prueba de comparación múltiple Duncan ($\alpha = 0,05$), en N° de raíces igualaron en comportamiento 'Camarosa' y 'Albión' a los 11, 18, 24 y 32 ddi y ambas fueron superiores a 'Aromas'; por otro lado, la longitud de raíces fue superior la variedad 'Camarosa' a 'Albión' y 'Aromas' a los 11 ddi; sin embargo, a los 18 y 24 ddi 'Camarosa' y 'Albión' fueron iguales estadísticamente, pero ambas superiores a 'Aromas' y a los 32 ddi fue superior a 'Albión' y 'Aromas' (Figura 5), estas últimas sin diferencias significativas entre ellas.

Con respecto a la organogénesis del vástago de los explantes de las tres variedades de fresa; 'Albión' y 'Camarosa' fueron superiores con respecto a 'Aromas'. En la fase de multiplicación de las variedades de fresa, en brotes por explante, 'Albión' y 'Camarosa' respondieron mejor al medio MS+0,5 mgL⁻¹ BAP comparado a 'Aromas' a los 11 ddi; pero, a los 18, 24 y 32 ddi, 'Albión' superó a ambas variedades.

Esto indicaría que la concentración de BAP utilizada, favorece la expresión temprana de brotes por explante, donde 'Albión' tuvo mejor respuesta entre las variedades en estudio.

Por otro lado, en la multiplicación de fresa cv. 'Aromas' utilizando medio de cultivo MS suplementado con BAP 0,5 mgL⁻¹, obtuvieron 2,69 brotes en promedio, solo superado por el tratamiento con Zeatina (Neri et al., 2022).

Tabla 3

Cuadrados medios, coeficiente de variación (CV) y valores descriptivos, en la multiplicación y enraizamiento in vitro de tres variedades de fresa a partir de yemas de corona

ddi	Fuente de variación	gl	Multiplicación			Enraizamiento	
			Brotos explante ⁻¹ (N°)	Longitud de brote (mm)	Hojas explante ⁻¹ (N°)	Raíces por vitroplanta (N°)	Longitud de raíz (mm)
11	Bloques	3	0,0556*	0,0118ns	0,0351ns	0,0095ns	1,0956ns
	Tratamientos	2	0,0479*	1,0286ns	0,0624ns	0,3475**	1,6801**
	CV%		6,96	6,98	11,75	7,41	16,44
	Promedio		1,38	1,70	1,17	1,39	1,88
	Mínimo		1,09	1,52	1,00	1,05	1,11
	Máximo		1,62	1,85	1,50	1,71	2,77
18	Bloques	3	0,0115ns	0,0010ns	0,0318ns	0,0152ns	0,0831ns
	Tratamientos	2	0,3075**	0,6728**	0,5284**	0,5429**	2,7280**
	CV%		5,64	5,78	8,45	11,37	11,28
	Promedio		1,66	2,43	1,66	1,79	3,14
	Mínimo		1,31	1,90	1,16	1,22	1,65
	Máximo		2,08	2,83	2,16	2,30	4,21
24	Bloques	3	0,0064ns	0,0141ns	0,0303ns	0,0079ns	0,0479ns
	Tratamientos	2	0,5037**	1,2177**	0,7678**	0,3221**	0,9022*
	CV%		8,35	11,51	11,56	7,38	7,67
	Promedio		1,84	2,83	2,08	2,15	3,95
	Mínimo		1,37	1,97	1,34	1,66	2,94
	Máximo		2,32	3,49	2,61	2,52	4,53
32	Bloques	3	0,0073ns	0,0617ns	1,0326ns	0,0052ns	0,0805ns
	Tratamientos	2	0,5758*	1,1673*	1,0379**	0,3584*	0,6637*
	CV%		13,02	12,79	10,66	8,12	6,00
	Promedio		2,08	3,00	2,32	2,54	4,33
	Mínimo		1,56	2,10	1,49	2,03	3,60
	Máximo		2,68	3,69	2,86	2,97	4,99

Datos transformados $\sqrt[3]{x + 1,0}$; **, diferencias altamente significativas; *, diferencias significativas; ns: no significativo.



Figura 3. Explantes de fresa Var. 'Aromas'; 'Albión' y 'Camarosa' en medio de establecimiento



Figura 4. Explantes de fresa Var. 'Aromas'; 'Albión' y 'Camarosa' en medio de multiplicación

Tabla 4

Comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, en la multiplicación y enraizamiento in vitro de tres variedades de fresa a partir de yemas de corona

ddi	Tratamiento	Multiplicación			Enraizamiento	
		Brotos explante ⁻¹ (N°)	Longitud de brote (mm)	Hojas explante ⁻¹ (N°)	Raíces por vitroplanta (N°)	Longitud de raíz (mm)
11	t1	1,28 b	1,63a	1,03a	1,06 b	1,21 c
	t2	1,50a	1,79a	1,21a	1,48a	1,91 b
	t3	1,37ab	1,67a	1,28a	1,62a	2,51a
18	t1	1,45 b	1,98 c	1,24 b	1,38 b	2,25 b
	t2	1,98a	2,52 b	1,86a	1,89a	3,31a
	t3	1,56 b	2,79a	1,88a	2,10a	3,87a
24	t1	1,54 b	2,24 b	1,57 b	1,82 b	3,45 b
	t2	2,23a	2,92a	2,36a	2,25a	3,98a
	t3	1,73 b	3,33a	2,30a	2,36a	4,40a
32	t1	1,78 b	2,42 b	1,73 b	2,22 b	3,95 b
	t2	2,51a	3,10a	2,62a	2,59a	4,28 b
	t3	1,95 b	3,49a	2,60a	2,81a	4,76a

Datos transformados $\sqrt[3]{x + 1,0}$; en columnas, letras iguales no hay diferencias significativas.



Figura 5. Respuesta de explantes de fresa Var. 'Aromas', 'Albió' y 'Camarosa' al medio de enraizamiento in vitro.

La respuesta depende del genotipo y la disponibilidad de los nutrientes y regulador de crecimiento utilizado en el medio (Krikorian, 1993); esto evidencia la variación en el proceso fisiológico de la respuesta de los explantes de las tres variedades; sin embargo, la variedad 'Camarosa', a los 24 y 32 ddi fue mayor a 'Aromas' e igual a 'Albió' en la variable longitud de brote y N° de hojas. Referente a esta última variable, se ha encontrado "en cuanto a hojas nuevas, el tratamiento TDZ a 0,5 mgL⁻¹ dio mayor número de hojas, seguido por el tratamiento IBA a 0,15 mgL⁻¹ sin diferencias significativas entre los tratamientos para las variedades de fresa 'Douglas' y 'Carlsbad'" (Cuazitl & Núñez, 2017). Estos resultados fueron similares con los encontrados en la presente investigación en la que 'Camarosa' fue estadísticamente igual a 'Albió' a los 24 y 32 ddi. donde se podría decir que 'Camarosa' y 'Albió' tienen una mejor respuesta morfogénica frente a 'Aromas' en el medio de cultivo MS+0,5 mgL⁻¹ de BAP. Sin embargo, en la fase de multiplicación de fresa Var. 'Ottoman strawberry' obtuvieron mejor resultado de formación de brotes en medio MS adicionado con una combinación de BAP 0,5 mgL⁻¹ + AIB 0,1 mgL⁻¹ logrando en promedio 10,8 brotes/explante (Dogan et al., 2021).

También, se obtuvo mayor número de brotes en medio MS y una combinación de 5,0 mgL⁻¹ de BAP + 1,0 mgL⁻¹ de AIA para cuatro variedades de fresa, alcanzando hasta 7 brotes por planta (Dutta, 2022); asimismo, en la variedad 'Fortuna', en medio MS + 0,5 mgL⁻¹ de BAP, produjo 8,31 brotes por explante y una longitud de 1,34 cm en un periodo de 13 ddi (Lawand et al., 2022).

En la etapa de enraizamiento, 'Camarosa' y 'Albió' respondieron mejor al medio MS (sales +

vitaminas) a los 18 y 24 ddi; sin embargo, a los 32 ddi 'Camarosa' ha superado en longitud de raíz a las dos variedades mencionadas, esto explica que las células se diferencian de acuerdo con la combinación y expresión de genes en el genoma (Azcón-Bieto & Talón, 2013) de una variedad.

Por otro lado, con respecto al medio de cultivo, esto interpretaría que el enraizamiento no depende en gran medida del efecto de los reguladores de crecimiento, es suficiente las hormonas endógenas residuales del explante, más bien tendría respuesta a la concentración de los nutrientes en el medio de cultivo. Esto se corrobora en un ensayo de enraizamiento in vitro de fresa donde se evaluó el efecto de bajas concentraciones de IBA utilizando medio de cultivo MS, donde se logró mayor número de raíces por planta (4,86) con IBA 0,2 mgL⁻¹ y mayor longitud de raíces (3,11 cm) con IBA 1,0 mgL⁻¹ (Howlader et al., 2016).

En forma similar, en otro ensayo de enraizamiento in vitro con medio MS con la variedad 'Sweet Charlie' se obtuvieron mejores resultados sin reguladores o utilizando bajas concentraciones de IBA de 0 a 1,0 mgL⁻¹ logrando longitud de raíces superiores a 4,5 cm y más de 10 raíces por planta (Madumali et al., 2021).

Por otro lado, se ha determinado en las variedades 'Oso Grande' y 'Sweet Charlie', el medio MS diluido a 50% y 75% promovió un buen desarrollo de raíces y de follaje" (Mamani-Sánchez & Murillo-García, 2020); como resultado de un ensayo de enraizamiento in vitro de fresa cv. 'Winter Star' en concentración de sales del 50% de MS suplementado con IBA 1,5 mgL⁻¹ se obtuvo mayor número y longitud de raíces en comparación con el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento; además indujo la formación de raíces en menor número de días (Mehta et al., 2021). Asimismo, en la variedad 'Nikte' con MS suplementado con 30 gL⁻¹ de sacarosa, 7 gL⁻¹ de agar + 0,2 mgL⁻¹ de BAP, produjo 4,3 raíces por vitroplanta y una longitud de 2,8 cm, superior a otros tratamientos utilizados (Valencia et al., 2019); mientras que, en la variedad 'Chandler', en MS al 50% + 1,0 mgL⁻¹ de IBA se obtuvo 5,8 brotes por vitroplanta y 1,0 mgL⁻¹ de tidiazuron + 2,0 mgL⁻¹ de kinetina no indujo a la formación de raíces (Irshad et al., 2023). En la presente investigación, el medio MS fue sin dilución y que posteriores trabajos se podría disminuir la concentración y así se reduciría el monto de inversión en la micropropagación de estas tres variedades.

4. Conclusiones

Las variedades de fresa *Fragaria x ananassa* Duch. 'Aromas', 'Albión' y 'Camarosa' respondieron de manera diferente al método de desinfección; y en la fase de establecimiento, 'Camarosa' tuvo mejor respuesta a número y longitud de brotes por explante comparada a 'Aromas' y 'Albión'; en la multiplicación, la variedad 'Albión' respondió mejor frente a 'Aromas' y 'Camarosa' en número de brotes, 'Camarosa' y 'Albión' presentaron mejor respuesta en longitud de brote y N° de hojas por explante. En enraizamiento, 'Camarosa' y 'Albión' tuvieron una mejor respuesta que 'Aromas' en N° de raíces por vitroplanta, sobresaliendo 'Camarosa' en longitud de raíces comparada a ambas variedades.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección del Instituto Central de Investigación – Vicerrectorado de Investigación - de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión (UNDAC) por el financiamiento del proyecto "Desarrollo de protocolos en la propagación in vitro de Orquídeas y cultivos de importancia económica para la provincia de Oxapampa", a través del cual se realizó el presente trabajo como parte de sus objetivos. También expresan su agradecimiento a Ing. Marilyn C. Enciso Waller; Bach. Odalyz L. Zúñiga Salcedo e Ing Mayra Y. Monago Curi por el soporte técnico brindado.

Referencias bibliográficas

- Aguirre, G., Pierre, J., & Leigue, L. (2016). *Aplicaciones del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos*.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2.a Ed.). Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Badal, N. U., Shoyeb, M., Sarkar, A., Rahman, S., & Rahman, S. M. (2019). Clonal Propagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) through In vitro Runner Tip Culture through Incorporation of Growth Hormones. *Biotechnology Journal International*, 22(4), 1–9. <https://doi.org/10.9734/bji/2018/v22i430063>
- Bedoya, J. C., Sánchez, C. Y., Bermudez, S. M., & Ramirez, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo In vitro de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38–46. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)38-46](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)38-46)
- Boxus, P. (1999). Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In R. D. Hall (Ed.), *Methods in molecular biology Plant Cell Culture Protocols* (Vol. 111, pp. 103–114). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:103>
- Calderon-Acuña, H. O., & Montes-Godoy, M. E. (2017). Propagación in vitro de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): un edulcorante natural a partir de segmentos nodales. *Anuario de Investigación*, 6(1), 383–389.
- Cuazitl, M. F., & Núñez, H. G. (2017). Establecimiento Y micropropagación de Fresa (*Fragaria X Ananassa* Duch.) en un sistema de inmersión temporal (SIT). *Jóvenes En La Ciencia*, 3(2), 85–89.
- Dhukate, M. R., Kher, M. M., Vadawale, A. V., & Giri, P. (2021). Protocol for micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cv. 'Sweet Charlie' and 'Winter Dawn'. *Environmental and Experimental Biology*, 19(1), 1–6. <https://doi.org/10.22364/eeb.19.01>
- Dogan, S., Sahin, M., & Kaya, O. (2021). Researches on the Reproduction of "Ottoman Strawberry" with Tissue Culture. *Alinteri Journal of Agricultural Sciences*, 36(1), 27–32. <https://doi.org/10.47059/alinteri/v36i1/ajas21005>
- Dutta, C. (2022). Effect of Different Plant Growth Regulators on In-vitro Regeneration in Varieties of Strawberry. *International Journal of Environment and Climate Change*, 12(11), 1178–1187. <https://doi.org/10.9734/IJECC/2022/v12i1131095>
- Gómez-Serrano, G., Cristiani-Urbina, E., & Villegas-Garrido, T. L. (2010). Establecimiento de protocolos para la propagación in vitro de plantas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (Compositae), colectadas en la sierra de Guadalupe. *Polibotánica*, 30, 89–110.
- Gonzales-Arteaga, J. J., Romero-Rivas, L. C., Rodríguez-Layza, J., & Párraga-Quintanilla, A. (2022). Establecimiento in vitro de *Fragaria x ananassa* var. Aroma a partir de yemas de corona. *Manglar*, 19(4), 301–308. <https://doi.org/http://doi.org/10.57188/manglar.2022.038>
- Gutiérrez, H., & de la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2da.ed.). McGraw Hill.
- Howlader, P., Kumar, S., & Robbani, M. (2016). In vitro plantlets regeneration of Strawberry through runner tip culture. *Bangladesh Hort*, 2(2), 51–57.
- Irshad, M., Rukh, S., Nabi, G., Israr, M., Ali, S., Munsif, F., Suhail, M., Mohammad, S., & Rizwan, H. M. (2023). Fruits of micropropagated Strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants exhibited higher antioxidant metabolites as compared to in vivo grown plants. *Pakistan Journal of Botany*, 55(2), 727–737. [https://doi.org/10.30848/PJB2023-2\(40\)](https://doi.org/10.30848/PJB2023-2(40))
- Jiménez, J. I., & Alvarado, E. (2014). Evaluación de dos medios de cultivo en la micropropagación de fresa (*Fragaria X ananassa* DUCH). *Jóvenes En La Ciencia*, 1(1), 91–97.
- Krikorian, A. d. (1993). Propagación clonal in vitro. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (pp. 46–245).
- Kumar, M., Rajbhar, Y. P., Kumar, V., Yadav, L., Kumar, J., Singh, B. P., & Yadav, A. (2020). Studies on the effect of different surface sterilization agents under in-vitro culture of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) variety "Chandler." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(6), 1833–1835.
- Lawand, L. S. S., Nagar, M., Mohamed, M. H., Ragab, M. E., & Badr, L. A. (2022). Effect of Some Plant Growth Regulators on The Multiplication Stage of Strawberry In Vitro. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 60(4), 1199–1206. <https://doi.org/10.21608/assjm.2022.284362>
- Madumali, H. K. C., Abeythilakarathana, P. D., & Seran, T. H. (2021). Rooting performance of in vitro microshoots of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) as influenced by plant growth regulators. *Agrieast*, 15(2), 69–73. <https://doi.org/10.4038/agrieast.v15i2.79>
- Mamani-Sánchez, B., & Murillo-García, R. A. (2020). Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69–78.
- Martinelli, A. (1992). Micropropagation of Strawberry. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Vol. 18, pp. 354–370). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mehta, G., Godara, A., Sharma, A., & Kumar, R. (2021). Effect of plant growth regulators on rooting behaviour of in vitro strawberry cv. Winter Star. *The Pharma Innovation Journal*, 10(4), 866–869.
- Mohamed, F. H., Elwan, W. M. W., Abdoun, M. I. E., & Hussein, M. A. A. (2018). Multiplication and regeneration potential in strawberry genotypes using different in vitro culture methods and growth regulators. *Hortscience J. Suez Canal*, 7(2), 47–54. <https://doi.org/10.21608/hjsc.2018.59126>
- Monirul-Islam, M. (2018). *Micropropagation of Strawberry (Fragaria x ananassa Duch.)* (Tesis Magister). Sher-E-Bangla Agricultural University, Dhaka, Bangladesh.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1993). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (pp. 19–40). CIAT.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

- Naing, A. H., Kim, S. H., Chung, M. Y., Park, S. K., & Kim, C. K. (2019). In vitro propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars. *Plant Methods*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0421-0>
- Nasir, S. M., & Abdulhussein, A. M. A. (2022). Effects of AgNO₃ in combination with some plant growth regulators on micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). *Kufa Journal for Agricultural Sciences*, 14(1), 33–40.
- Neri, J. C., Meléndez-Morí, J. B., Tejada-Alvarado, J. J., Vilca-Valqui, N. C., Huaman-Huaman, E., Oliva, M., & Goñas, M. (2022). An optimized protocol for micropropagation and acclimatization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Variety 'Aroma.' *Agronomy*, 12(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040968>
- Olivera, J. (2012). Cultivo de Fresa. In *Inia -Minagri*.
- Poothong, S. (2020). Optimization of minerals and plant growth regulators for micropropagation of strawberry "Pharatchan 80." *Naresuan Phayao Journal*, 13(2), 5–17.
- Rokosa, M., & Mikiciuk, M. (2017). In vitro regeneration of *Fragaria* plants. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 16(5), 145–158. <https://doi.org/10.24326/asphc.2017.5.15>
- Ruiz-Anchondo, T., Adriano-Martínez, J., Carrillo-Castillo, T., Parra-Quezada, R. Á., Ojeda-Barrios, D. L., & Hernández-Rodríguez, A. (2018). Establecimiento in vitro de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(4), 799–812. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i4.1397>
- Sanchez-Cuevas, M. C., & Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.
- Tung, H. T., Thuong, T. T., Cuong, D. M., Luan, V. Q., Hien, V. T., Hieu, T., Nam, N. B., Phuong, H. T. N., Van The Vinh, B., Khai, H. D., & Nhut, D. T. (2021). Silver nanoparticles improved explant disinfection, in vitro growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145(2), 393–403. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02015-4>
- Ugale, Y., & Barwant, M. (2020). Invitro multiplication of crateva Adansoni on Murashige and Skoog medium (MS). *IASET*, 9(3), 33–38.
- Valencia, M. C., Escobedo, D., Diaz, L. F., & Gonzales, E. (2019). Ex vitro acclimation of *Fragaria x ananassa* Duch seedlings. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(1), 91–100.
- Valliath, A. S., & Mondal, R. (2023). Micropropagation of Strawberry Crop (*Fragaria ananassa*): A Review. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, BJAP-529, 1–4. <https://doi.org/10.18805/bkap529>

