



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

PRODUCCIÓN DE PLANTA MADRE DE VARIEDADES MEXICANAS DE FRESA A PARTIR DE UN SISTEMA DE BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL

Adonái Jonás Aradillas Tovar

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

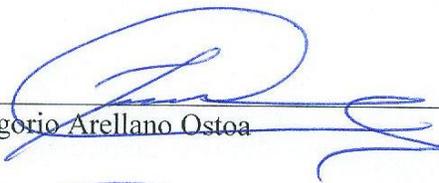
2015

La presente tesis titulada: Producción De Planta Madre De Variedades Mexicanas De Fresa A Partir De Un Sistema De Biorreactor De Inmersión Temporal, realizada por el alumno: Adonái Jonás Aradillas Tovar, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Gregorio Arellano Ostoa

ASESOR



Dr. Guillermo Calderón Zayala

ASESOR



Dr. Eduardo García Villanueva

ASESOR



Dr. F. Víctor Conde Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero del 2015

PRODUCCIÓN DE PLANTA MADRE DE VARIEDADES MEXICANAS DE FRESA A PARTIR DE UN SISTEMA DE BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL

Adonái Jonás Aradillas Tovar, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

México es el quinto productor de fresa a nivel mundial (FAO, 2013). Sin embargo, las principales variedades utilizadas provienen del extranjero. El Colegio de Postgraduados registró dos variedades mexicanas de fresa ante el SNICS con potencial para cubrir la demanda tanto nacional como internacional. Con la propagación y difusión de estas nuevas variedades se pretende mitigar la dependencia de planta madre del extranjero. La micropropagación se ha utilizado para propagar con éxito plantas de esta especie. El presente trabajo tuvo como objetivo mejorar la multiplicación de plantas de dos variedades mexicanas de fresa utilizando la técnica de inmersión temporal (SIT), comparando los resultados con los que se obtienen en sistema tradicional con medios semisólidos (ST). Se utilizaron brotes generados y multiplicados a partir de meristemas de las variedades CP Jacona y CP Zamorana. En la etapa de multiplicación en medio semisólido se utilizó un medio MS (1962) con 6 g L^{-1} de agar y se evaluaron nueve tratamientos con ocho repeticiones con diferentes relaciones hormonales. La mejor relación fue 1.0 mg L^{-1} Benciladenina BA + 0.1 mg L^{-1} de Ácido indol butírico AIB. Este tratamiento se utilizó como base para evaluar la tasa de proliferación en el sistema de inmersión temporal SIT. Para ello se utilizaron biorreactores RITA[®] de 1 L de capacidad, el medio de cultivo fue similar al utilizado en el sistema tradicional sin agar y se evaluó un minuto de inmersión a diferentes intervalos de tiempo (4, y 6 h) y dos minutos (12 h), en seis tratamientos con TRIA y BR. Por RITA[®] se utilizaron diez brotes con 150 mL de medio líquido complementado con 30 g L de sacarosa y cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Para ambos sistemas las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, con 16 h luz. Después de 30 días se evaluó el número total de brotes, tamaño de brotes, el diámetro en la base y brotes sobre hidratados y oxidados. El SIT obtuvo el triple de brotes en comparación con el ST. La concentración de $10 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de TRIA y $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BR, ambos suplementados con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Benciladenina y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ácido indol butírico obtuvieron el mayor número de brotes por explante. Se redujeron la oxidación 22 % y la sobrehidratación 6.66 % con la adición de BR en el SIT el mayor tamaño del brote se reportó en el ST con una media de 2.14 cm para ambas variedades.

Palabras clave: biorreactores, micropropagación, reguladores del crecimiento, variedades de fresa.

**PRODUCERS MOTHER OF MEXICAN VARIETIES OF STRAWBERRY FROM A
SYSTEM OF TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR**

Adonáí Jonás Aradillas Tovar, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Mexico is the fifth largest producer of strawberries worldwide (FAO, 2013). However, the main varieties used are from abroad. Colegio de Postgraduados recently registered two Mexican strawberry varieties with potential to meet both domestic and international demand. Spreading and promoting these new varieties is intended to alleviate dependence on foreign mother plant. Micropropagation methods have been used to multiply plants of this species successfully in other countries. This study aimed to improve growth of plants in two Mexican strawberry varieties using the temporary immersion technique (SIT), comparing the results with those obtained in semisolid media with traditional system (ST). Generated and multiplied shoots were used from meristems from field plants of varieties CP Jacona and CP Zamorana. For the multiplication stage MS semisolid medium (1962) was used with 6 g L⁻¹ agar and nine treatments with eight replications with different hormonal relations were evaluated. The best treatment was 1.0 mg L⁻¹ Benzyladenine BA + 0.1 mg L⁻¹ Indol butyric acid IB. This treatment was used as a basis for assessing the proliferation rate in the temporary immersion system, SIT. RITA[®] bioreactors 1 L of capacity were used; the culture medium was similar to that used in the traditional system without agar and one minute immersion was evaluated at different time intervals (4, and 6 h) and two minutes (12 h) six treatments TRIA and BR. Ten shoots per RITA[®] were used in 150 mL of liquid medium supplemented with 30 g L sucrose and each treatment had three replicates. For both systems the incubation conditions were 25 ± 2 ° C with 16 h light. After 30 days, total number of shoots, shoot size, diameter at the base and oxidized and overhydrated shoots were evaluated. The SIT won the triple outbreaks compared to ST. The concentration of 10 mg·L⁻¹ TRIA and 0.02 mg·L⁻¹ BR, both supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ Benzyl adenine and 0.1 mg·L⁻¹ indole butyric acid obtained the highest number of shoots per explant. Oxidation were reduced 22 % hyperhydration and 6.66 %, with the addition of BR in the SIT. The largest outbreak was reported in ST with an average of 2.14 cm for both varieties.

Keywords: bioreactors, growth regulators, micropropagation, strawberry varieties.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su infinito amor y bendiciones, por permitirme cumplir una meta más en mi vida.

A la población mexicana, que con su trabajo diario hace lo posible que el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, que han financiado parte de mi formación.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por otorgarme la beca para tesis de posgrado.

Al Dr. Gregorio Arellano por su dirección, comprensión y la ayuda brindada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Eduardo García, Dr. F. Víctor Conde y Dr. Guillermo Calderón (integrantes de mi consejo particular) por sus consejos y guías en el desarrollo de esta investigación.

A mis padres Ma. Lucila Tovar M. y Jonás Aradillas M. por motivarme, darme todo su apoyo e interés por verme culminar una meta más en mi vida.

A toda mi familia en especial a mis hermanos Rubí y Luis Ángel, sobrinos Dana, Elían, Maya y Ary, así como a mis tías Ceci y Eva y primos, por estar siempre presentes en cada momento y en el desarrollo de mi vida.

A mis tíos Luis Antonio Tarango y Margarita Aradillas y familia.

A Claudia Berenice E. por todo su apoyo y amistad en este proceso.

A mis amigos Fernando, Javier, Roció, Berenice, Luis A. etc. y compañeros del laboratorio de Fruticultura por su amistad y apoyo en el desarrollo de mi investigación.

DEDICATORIA

Con todo cariño y amor a mis padres Ma. Lucila Tovar M. y Jonás Aradillas M. que siempre hacen todo lo posible para que yo logre mis sueños día a día, por sus consejos y estar conmigo siempre y en especial a mi abuela Ma. Isabel Meléndez Ponce† por estar siempre en mi corazón y por ser un pilar muy importante en mi vida. A cada uno de los integrantes de mi familia, porque me han brindado su apoyo incondicional.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos Generales.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. HIPÓTESIS	18
4. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA.....	19
4.1 La fresa: su producción mundial y nacional	19
4.2 Propiedades nutrimentales y Fisiología de la fresa así como sus métodos de propagación.	20
4.2.1 Propiedades nutrimentales de la fresa	20
4.2.2 Aspectos fisiológicos de la fresa	21
4.2.3 Métodos de propagación en planta de fresa	21
4.3 Biotecnología (cultivo <i>in vitro</i> en fresa)	23
4.3.1 Desinfestación	23
4.3.2 Establecimiento en Semisólidos.....	25
4.4 Multiplicación en medios Semisólidos	28
4.4.1 El uso de fitohormonas en etapa de multiplicación.....	28
4.4.2 El uso de fitohormonas de nueva generación en etapa de multiplicación.....	30
4.5 Uso de Biorreactores de Inmersión Temporal en la multiplicación.....	31

4.5.1 El uso de fitohormonas de nueva generación en etapa de multiplicación SIT.....	33
4.6 Enraizamiento de vitroplántulas provenientes de ST y SIT	33
4.7 Establecimiento en suelo	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 Material vegetal.....	37
5.2 Área de trabajo.....	37
5.3 Desinfestación <i>in vitro</i> en ST	38
5.4 Establecimiento <i>in vitro</i>	38
5.5 Etapa uno de multiplicación <i>in vitro</i>	40
5.6 Etapa de multiplicación subcultivos	41
5.7 Etapa de multiplicación <i>in vitro</i> en el sistema de inmersión temporal SIT.....	42
5.8 Disminución de nitratos para el control de la sobrehidratación en SIT.....	43
5.9 Uso del 1-Triacontanol (TRIA) y Epibrassinolide [®] (BR) para la multiplicación <i>in vitro</i> de fresa en SIT y ST.....	44
5.10 Proceso de enraizamiento <i>in vitro</i> de los brotes generados en SIT	45
5.11 Establecimiento <i>in vivo</i> de los brotes de fresa variedad CP Jacona y CP Zamorana provenientes de los sistemas SIT y ST	46
5.11.1 Etapa de aclimatización.....	47
5.12 Variables de estudio.....	47
5.12.1 Número de brotes	47

5.12.2 Sobrehidratación.....	48
5.12.3 Oxidación	48
5.12.4 Tamaño de la hoja	48
5.12.5 Diámetro de la base del brote	48
5.13 Análisis estadístico	49
5.13.1 Etapa establecimiento <i>in vitro</i> en ST.....	49
5.13.2 Etapa de multiplicación.....	49
5.13.3 Multiplicación Disminución de nitratos para el control de la sobrehidratación en SIT	50
5.13.4 Multiplicación y el uso de reguladores de nueva generación en SIT y ST	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1 Establecimiento <i>in vitro</i> en ST	52
6.1.1 Porcentaje de sobrevivencia y oxidación	52
6.2 Multiplicación <i>in vitro</i> en ST.....	55
6.2.1 Número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas evaluadas por subcultivos y tratamientos.....	55
6.2.2 Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa por subcultivos y tratamientos.....	64
6.3 Multiplicación <i>in vitro</i> en SIT	68
6.4 Disminución de Nitratos en el medio MS en etapa de multiplicación en SIT.....	70

6.4.1 Número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas de fresa en dos tiempos de inmersión y dos tratamientos en la concentración de nitratos en el medio MS...	70
6.4.2 Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa en dos tiempos de inmersión y dos tratamientos en la concentración de nitratos.....	75
6.5 Uso de Reguladores de Nueva Generación en etapa de multiplicación en SIT vs ST	79
6.5.1 Efecto de los Brasinosteroides (BR) sobre el número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas de fresa.....	79
6.5.2 Efecto de BR en el porcentaje de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa	85
6.5.3 Efecto del 1-Triacontanol (TRIA) sobre el número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas de fresa	87
6.5.4 Efecto del (TRIA) en el porcentajes de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa.	94
7. CONCLUSIONES	97
8. LITERATURA CITADA.....	99

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Medio de cultivo para etapa de establecimiento in vitro en ST	39
Cuadro 2. Reguladores de crecimiento utilizados para etapa de establecimiento en ST	40
Cuadro 3. Medio de cultivo para multiplicación in vitro en ST	40
Cuadro 4. Tratamientos utilizados para evaluar la multiplicación in vitro de brotes de dos variedades mexicanas de fresa establecidos a partir de meristemos.....	41
Cuadro 5. Tratamientos utilizados en la comparación de sistemas.	44
Cuadro 6. Porcentaje de sobrevivencia y oxidación de los meristemos de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días del establecimiento in vitro en medio de agar	54
Cuadro 7. Promedio del número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en siete subcultivos en multiplicación in vitro con medio de agar	62
Cuadro 8. Promedio del número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en nueve tratamientos en multiplicación in vitro con medio de agar.....	64
Cuadro 9. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en siete subcultivos en multiplicación in vitro con medio de agar	67
Cuadro 10. Porcentaje de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en nueve tratamientos en multiplicación in vitro con medio de agar.....	67

Cuadro 11. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos tiempos de inmersión en multiplicación in vitro con medio líquido	74
Cuadro 12. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos tratamientos con disminución de nitratos en multiplicación in vitro con medio líquido.....	75
Cuadro 13. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación in vitro en medio líquido y agar con BR.....	82
Cuadro 14. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en tres tratamientos con BR en multiplicación in vitro ..	85
Cuadro 15. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación in vitro con medio líquido y de agar.....	86
Cuadro 16. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días, en tres tratamientos con BR en multiplicación in vitro.....	87
Cuadro 17. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación in vitro con medio líquido y agar con TRIA.....	89
Cuadro 18. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en tres tratamientos con TRIA en multiplicación in vitro	94

Cuadro 19. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación in vitro con medio líquido y agar..... 95

Cuadro 20. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días, en tres tratamientos con TRIA en multiplicación in vitro..... 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Obtención del material vegetal de dos variedades mexicanas de fresa. a) Planta madre de fresa variedad CP Jacona y CP Zamorana, b) Estolones de fresa, C) Desinfestación y disección del material vegetal y d) Siembra de los meristemos de fresa en medio semisólido en etapa de establecimiento. 53

Figura 2. Brote de fresa variedad CP Zamorana obtenido a partir de un meristemo con tiempo de 30 días de ser sembrado en un medio MS semisólido. 53

Figura 3. Multiplicación in vitro en agar de la variedad CP Jacona en 9 diferentes tratamientos en el tercer subcultivo. a) BA (0.5 mg L⁻¹) + AIB (0.25 mg L⁻¹), b) BA (1.0 mg L⁻¹), c) BA (0.25 mg L⁻¹), d) BA (0.5 mg L⁻¹) + AIB (0.5 mg L⁻¹), e) BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹), f) MS sin hormonas (modificado), g) BA (1.0 mg L⁻¹) + ANA (0.1 mg L⁻¹) y h) KIN (0.5 mg L⁻¹) + BA (0.25 mg L⁻¹). 57

Figura 4. Multiplicación in vitro en agar de la variedad CP Zamorana en 9 diferentes tratamientos en el tercer subcultivo. a) BA (0.5 mg L⁻¹) + AIB (0.25 mg L⁻¹), b) BA (1.0 mg L⁻¹), c) BA (0.25 mg L⁻¹), d) BA (0.5 mg L⁻¹) + AIB (0.5 mg L⁻¹), e) BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg

L⁻¹), f) MS sin hormonas (modificado), g) BA (1.0 mg L⁻¹) + ANA (0.1 mg L⁻¹) y h) KIN (0.5 mg L⁻¹) + BA (0.25 mg L⁻¹)..... 58

Figura 5. Multiplicación in vitro en agar de las variedades mexicanas CP Jacona y CP Zamorana en 9 diferentes tratamientos en el tercer subcultivo. a) CP Jacona tratamiento BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.01 mg L⁻¹) y b) CP Zamorana tratamiento BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.01 mg L⁻¹)..... 59

Figura 6. Periodo de estabilización in vitro de los cultivos a partir del subcultivo cinco de dos variedades de mexicanas de fresa 62

Figura 7. Cuarto de incubación SIT comparando tres tiempos de inmersión de 1 min/ 4 horas, 1 min/ 6 horas y 2 min/ 12 horas, etiquetados en la parte frontal del RITA[®], sembrados con explantes de fresa mexicana CP Jacona y CP Zamorana..... 69

Figura 8. Evaluación del número de brotes de fresa mexicana utilizando dos tratamientos con reducción de nitratos en el medio de cultivo MS en SIT. a) Nitratos al 100 % y b) Nitratos al 70 % 72

Figura 9. Porcentaje de sobrehidratación evaluando dos tiempos de inmersión en medio líquido en SIT con brotes de fresa mexicana. a) Tiempo de inmersión de 1 min/ 6 Horas y b) Tiempo de inmersión de 2 min/ 12 horas..... 76

Figura 10. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluados después de 30 días en dos tiempos de inmersión en multiplicación in vitro con medio líquido. Los valores son medias de tres replicas con 120 explantes cada una (Tukey, P ≤ 0.05). 78

Figura 11. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluados después de 30 días en dos tratamientos, con disminución de

nitratos en multiplicación in vitro con medio líquido. Los valores son medias de tres replicas con 120 explantes cada una (Tukey, $P \leq 0.05$). 79

Figura 12. Tamaño del brote evaluando tres tratamientos con BR en SIT utilizando vitroplántulas de fresa mexicana. a) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), b) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}), c) CP Zamorana BR (0.02 mg L^{-1}), d) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), e) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}) y f) CP Jacona BR (0.02 mg L^{-1}). 83

Figura 13. Diámetro del brote evaluando tres tratamientos con BR en SIT utilizando vitroplántulas de fresa mexicana. a) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), b) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}), c) CP Zamorana BR (0.02 mg L^{-1}), d) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), e) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}) y f) CP Jacona BR (0.02 mg L^{-1}). 84

Figura 14. Tamaño del brote evaluando tres tratamientos con TRIA en SIT utilizando vitroplántulas de variedades mexicanas de fresa. a) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), b) CPJ acona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), c) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), d) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), e) CPJ Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) y f) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). 92

Figura 15. Diámetro del brote evaluando tres tratamientos con TRIA en SIT utilizando vitroplántulas de variedades mexicanas de fresa. a) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), b) CPJ acona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), c) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), d) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), e) CPJ Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) y f) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). 92

L⁻¹) + TRIA (5 µg L⁻¹) y f) CP Zamorana BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (10 µg L⁻¹). 93

1. INTRODUCCIÓN

La fresa en la actualidad es considerada un cultivo comercial con áreas de siembra cada vez mayores a nivel mundial y su consumo va en aumento en todo el mundo (Keutgen y Pawelzik, 2008). En años anteriores, en México las plantas madre certificadas provenían principalmente de las Universidades de California y Florida en Estados Unidos de Norteamérica, lo que representa gran dependencia de nuestro país por este concepto; sin mencionar las dificultades para la adquisición de este material así como el cobro de regalías. Con base en la problemática anterior, el Colegio de Posgraduados ha generado nuevas variedades de fresa, entre las que destacan CP Zamorana y CP Jacona, como nuevas variedades mexicanas ya registradas en el catálogo del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). En el cultivo de fresa existen diversos tipos de propagación como lo son por división de coronas, estolones, semillas y por micropropagación *in vitro* que hoy en día es una alternativa viable y es de gran importancia para la producción en masa y en menor tiempo de diversas especies frutales como la fresa, además de obtener plantas libres de cualquier agente patógeno. El cultivo *in vitro* o micropropagación se define básicamente como la propagación clonal de plantas mediante cultivo de tejidos, explantes, etc; en medios de cultivo de composición definida, en condiciones ambientales estériles y controladas (George, 1993). Por otra parte, existe la micropropagación en medio líquido que con el uso de Biorreactores de inmersión temporal tipo RITA[®] han dado buenos resultados como proporcionar un sistema de propagación de plantas rápida y eficaz para muchas especies agrícolas y forestales, la utilización de medios líquidos ayuda a disminuir la manipulación manual intensiva (Ziv, 2005). Por otra parte, aumenta la eficacia en la proliferación de nuevos brotes, como también la calidad del material vegetal entre muchas ventajas más (Etienne y Berthouly, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

- a) Evaluar la multiplicación en dos sistemas de micropropagación, el sistema tradicional y el de inmersión temporal, en dos variedades mexicanas de fresa incorporando diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio.
- b) Establecer un sistema eficiente de propagación *in vitro* de fresa basado en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) logrando el enraizamiento y la aclimatización de las plantas para la producción de planta básica

2.2 Objetivos Específicos

- a) Implementar un sistemas de inmersión temporal automatizado con biorreactores tipo RITA[®] y comparar su eficiencia con el sistema tradicional en semisólido.
- b) Analizar el efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* tanto de uso común como de los llamados de nueva generación en los dos sistemas (líquido y semisólido).
- c) Disminuir el porcentaje de sobrehidratación de los brotes propagados en SIT, mediante el uso apropiado de los nitratos.

3. HIPÓTESIS

Al utilizar el sistema de inmersión temporal se incrementará la tasa de multiplicación *in vitro* y se reducirá el tiempo de cultivo en comparación con el método tradicional con agar, además de ser un método que permite ahorro de mano de obra.

4. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

4.1 La fresa: su producción mundial y nacional

A nivel mundial la fresa se cultiva en más de 60 países, siendo el principal productor Estados Unidos con un millón 115 mil ton al año; seguido por Rusia con 324 mil ton al año y España con 263 mil 900 ton anuales. Encabezando las lista de países exportadores de fresa en el mundo encontramos en primer lugar a España con 207 mil 974 ton, el siguiente lugar lo ocupa Estados Unidos con 103 mil 953 ton (Santoyo y Martínez., 2010).

México hoy en día se ubica en el quinto lugar a nivel mundial (FAO, 2013) con un rendimiento cercano a 41.60 toneladas por hectárea (SIAP, 2012) destacando por su participación en el volumen los estados de Michoacán, Baja California y Guanajuato. Siendo el estado de Michoacán el principal productor de la republica con una producción de 114 784 .00 ton, con un rendimiento promedio de 32.23 t ha⁻¹ generando empleos y divisas muy importantes ya que la fresa ocupa el segundo lugar en importancia entre los frutales que ahí se cultivan (SEDAGRO, 2005), seguido por Baja California que se ubicó en el segundo sitio con una producción de 82 087.60 t, con un rendimiento promedio de 53.20 t ha⁻¹ y Guanajuato con 20 527.30 t, con un rendimiento promedio de 19.99 t ha⁻¹.

4.2 Propiedades nutrimentales y Fisiología de la fresa así como sus métodos de propagación.

4.2.1 Propiedades nutrimentales de la fresa

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una planta perteneciente a la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoidea, tribu Potentilla y género *Fragaria* y es una planta herbácea, también considerada como una fruta de alto placer por excelencia para el gusto del ser humano (Bello y Santos, 1990). Resaltando sus cualidades tanto en el color, aroma y acidez, además de su aporte de vitaminas y minerales (Agencia de Servicios Agropecuarios Poàs, 2007). La fresa es un fruto muy importante por sus amplias características nutraceuticas, sobresaliente por su composición de vitamina A y C, así como taninos, flavonoides, antocianinas, catequina, quercetina, kaempferol y ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico) por nombrar los más importantes (Hannum, 2004). Por otra parte, en otros estudios realizados con animales han demostrado que al hacer dietas, primordialmente ricas en fresas, también pueden tener un excelente potencial para proporcionar ácidos salicílico y elágico, y minerales importantes como P, K, Ca, Na y Fe; además de pigmentos y aceite esencial (Ozcan, y Haciseferogullar, 2007). Es así que estos compuestos presentes en la fresa actuarían como un potente poder antioxidante que para el ser humano ayudaría a disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares y para disminuir la trombosis (Beattie, *et al.*, 2005) y por otro lado, estudios realizados han demostrado en varios sistemas y métodos experimentales la actividad anticancerígena de extractos de fresas (Hannum, 2004; Olsson, 2004).

4.2.2 Aspectos fisiológicos de la fresa

La fresa está caracterizada como una especie de tipo fotosintético C₃. Al ser plantas que utilizan esta vía fotosintética absorben el dióxido de carbono por medio de estomas durante el día y lo utilizan para formación de la glucosa. Las plantas con este tipo de metabolismo de fotosíntesis se desarrollan mejor bajo condiciones frescas, dado que la temperatura óptima para la fotosíntesis es relativamente baja (Gliessman, 2002). La tasa de asimilación de CO₂ en *Fragaria x ananassa* Duch. es de 15 a 25 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ en campo (Hancock, *et al.*, 1989).

La fresa es un fruto no climatérico y es por eso que debe ser cosechada en plena madurez para lograr la máxima calidad en relación con el sabor y color (Cordenunsi *et al.*, 2003). Las antocianinas por su parte son los principales compuestos que contribuyen al color rojo brillante de la fresa (Bodelón, *et al.*, 2010). Los azúcares principales en el fruto de fresa son la sacarosa, glucosa y fructuosa, que representan más del 99% del total de los azúcares de las frutas maduras (Strum *et al.*, 2003). El ácido cítrico es el ácido orgánico principal en el fruto de la fresa y el ácido ascórbico es la forma predominante de la vitamina C (Lee y Kader, 2000). La disponibilidad de agua, las temperaturas nocturnas y diurnas, y la intensidad de la luz del día están relacionadas con el tamaño del fruto de la fresa (Avigdori - Avidov, 1986).

4.2.3 Métodos de propagación en planta de fresa

En la fresa existen diversos tipos de propagación como lo son:

- Por división de coronas: Este método no es muy utilizado ya que particularmente se emplea en variedades que estolonizan escasamente, pero que generalmente producen coronas secundarias. Para esto se es posible utilizar plantas madre de más de un año de edad y es así cuando se han enraizado las coronas secundarias dan origen a nuevas plántulas o hijuelos bien formados con buenas raíces que se utilizarán en nuevas plantaciones.
- Por estolones, siendo el método más utilizado, y consiste en que las plantas madre emitan estolones o guías, mismos que son un tallo delgado, largo, rastrero que se forma a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la base de la corona. Se desarrollan en gran cantidad en épocas de alta temperatura, en el extremo del estolón se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo húmedo emite raíces, lo que origina una nueva planta con idénticos caracteres que la planta madre. Los estolones constituyen el método más fácil de propagación de plantas (López, 2000). Una planta madre puede dar hasta 50 hijas de calidad óptima para ser una nueva planta. Se recomienda con este método dar un máximo desarrollo a las plantas madre para estimular la formación de un mayor número de estolones.
- Micropropagación: La propagación *in vitro* en la actualidad está sustituyendo a los otros métodos, puesto que las plantas son producidas en laboratorios, bajo condiciones especiales, de tal manera que reúnen las mejores condiciones de sanidad, vigor y características genéticas similares a las plantas madre (Ingeniería Agrícola, 2008). En otra parte es importante mencionar que el cultivo *in vitro* se basa en el principio de la

“totipotencia celular”, que nos indica la capacidad de una célula vegetal que puede originar y dar lugar al desarrollo de una planta completa (Pierik, 1990).

La fresa es una planta noble que puede vivir por mucho tiempo, pero su tiempo de producción económicamente rentable se obtiene durante los primeros dos años. En plantaciones de mayor edad, se observa que las plantas se muestran débiles, con bajo rendimiento y frutos de menor calidad, debido a una mayor vulnerabilidad a incidencia de plagas y enfermedades (Agrocadena de fresa, 2007).

4.3 Biotecnología (cultivo *in vitro* en fresa)

El cultivo *in vitro* o micropropagación se define básicamente como la propagación clonal de plantas mediante cultivo de tejidos (explantos) en medios de cultivo de composición definida, en condiciones ambientales estériles y controladas (George, 1993). En la micropropagación es importante conocer los pasos que se deben realizar para que este método de propagación sea exitoso como son: Desinfección, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Siendo el primero y último paso los más importantes. La micropropagación en la actualidad tiene un gran potencial comercial, debido a la velocidad con la que se realiza la propagación de plantas genéticamente homogéneas, y que ofrecen una alta calidad productiva, ya que presentan vigorosidad y se encuentran libres de enfermedades (Amhed *et al.*, 2001).

4.3.1 Desinfestación

Este proceso es de los más importantes y críticos ya que en cultivo *in vitro* es de vital importancia obtener un material vegetal libre de cualquier agente contaminante. Existen variadas técnicas que son utilizadas para el control de la contaminación *in vitro*, tales como el uso de fungicidas y antibióticos en la planta madre, el explante y el medio de cultivo; sin embargo, no se recomienda la adición de antibióticos al medio para controlar la contaminación bacteriana porque no son efectivos en la mayoría de los casos (Pierik, 1987). Pero en sí, algunos autores señalan que su adición es necesaria cuando el tejido tiene infecciones sistémicas y que el material vegetal sufra debilitamiento (Phillips *et al.*, 1981). Ocasionalmente ocurre el ennegrecimiento del tejido, con posterior necrosis del explante. Para evitarlo, se sugiere disminuir la intensidad de la luz, agregar antioxidantes al medio y el explante, subcultivar con frecuencia, incrementar las sales de calcio, reducir el nivel de nitrato en el medio y sumergir el explante en medio líquido por un día (Swartz y Lindstrom, 1986).

4.3.1.1 Desinfestación en explantes de fresa

Para el cultivo de tejidos en fresa se utilizan explantes que pueden provenir de la corona o de los estolones, aunque es más recomendable la extracción y la desinfección de los estolones (Villegas, 1990). Usando la técnica de estolones permite una producción de alta calidad fitosanitaria, ya que es de gran importancia en la obtención y extracción para el cultivo de meristemas. El uso de meristemas ofrece una alta probabilidad de que la producción de plántulas *in vitro* esté libre de patógenos (Manosh *et al.*, 2007).

Diversos protocolos ayudan a tener un mayor control, como es el de desinfectar superficialmente los estolones sumergiéndolos en una solución de alcohol al 70% durante pocos

segundos, y el de cloro comercial al 10% por 10 minutos, para después enjuagar en repetidas ocasiones con agua destilada esterilizada, esto para no dañar el explante. La disección de los estolones consta de extraer con la ayuda de un microscopio estereoscópico e instrumental de disección a los meristemas de 0.2-0.5 mm y aislarlos en un ambiente aséptico, con el auxilio de una campana de flujo laminar. Es importante a cada momento prevenir y cuidar la desecación o cualquier daños físico al meristemo (López e Inoue, 2001). Por otro lado, otros investigadores evaluaron diferentes procedimientos de desinfección en explantes de fresa, empleando tres concentraciones de hipoclorito de sodio (10, 20 y 30 %) en diferentes tiempos de exposición (10, 20 y 30 minutos) y tres tipos de antioxidantes (cisteína 4 g L⁻¹; ácido ascórbico 150 mg L⁻¹; ácido cítrico 150 mg L⁻¹) para controlar la contaminación y la oxidación fenólica en los explantes utilizados (Sánchez y Salaverría, 2004).

Estas investigaciones recomendaron y optaron que con la inmersión de los explantes en una solución de cloro para controlar efectos de contaminación por hongos y bacterias.

4.3.2 Establecimiento en Semisólidos

Al hablar de cultivo *in vitro*, se dice que básicamente consiste en el cultivo sobre un medio nutritivo artificial en condiciones asépticas idóneas para establecer, multiplicar y enraizar cualquier explante que genere una nueva planta. Es así que, las plantas completas o algunas partes de ella (explantes), como pueden ser: semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, pertenecientes a diversas especies vegetales, son cultivados vía cultivo *in vitro*.

Es de gran importancia mencionar que aparte de los explantes antes indicados, también existe el cultivo de meristemas y es de resaltar que los primeros experimentos que utilizaron meristemas, se realizaron con el objeto de eliminar virus en plantas (Morel y Martín, 1952, 1955). Este sistema funcionó en diferentes especies como el caso de propagar varios tipos de orquídeas (Morel, 1964). En el caso de fresa, el cultivo de meristemas también es una gran alternativa. Dichas técnicas nos permiten tener un control en los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo de la planta, como son: división celular, germinación, brotación, enraizamiento, floración y fructificación (Encina *et al.*, 2002). Además de que el cultivo *in vitro* se puede desempeñar como un método importante en el suministro y producción adecuada de vitroplantas a gran escala como material de plantación.

El punto de partida en cultivo *in vitro* es el establecimiento de la especie y una forma de lograr que nuestro explante sobreviva y se mantenga latente, es el uso de agar y altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo, para que esto pueda permitir el almacenamiento y desarrollo durante varias semanas del explante (Tyagi *et al.*, 2007).

Un aspecto importante dentro del establecimiento es el volumen del recipiente de cultivo ya que puede ser determinante para definir la frecuencia de subcultivos posteriores y el almacenamiento óptimo de los explantes (Engelmann. 1991, Keller *et al.*, 2006). En sí, esto permite la optimización en el almacenamiento de diversas especies al utilizar eficientemente al volumen del recipiente según las necesidades de crecimiento del explante (Cousins y Adelberg 2008). En el caso de la fresa se utilizaron tubos de ensaye para que el meristemo sembrado se elongara y

desarrollara en forma adecuada en un lapso de un mes para ser llevada a la etapa de multiplicación.

Es importante indicar que la reducción del crecimiento en cultivo *in vitro* se puede lograr también al disminuir el nivel de oxígeno disponible para los explantes. Sin embargo, bajo esas condiciones de almacenamiento, a menudo aparecen otros problemas donde se desarrollan tejidos hiperhídricos, necróticos y con crecimiento más lento (Engelmann, 1991). La hiperhidricidad o sobrehidratación es un desorden fisiológico en el explante que se caracteriza por la apariencia vidriosa e hinchada en los tejidos, tallos turgentes, acuosos e hipolignificados y órganos translúcidos, verdes, quebradizos y con deformaciones en la cutícula y epidermis (Debergh *et al.*, 1992, Chakrabarty *et al.*, 2003, 2005).

Otro aspecto que también es de importancia, es la contaminación microbiana que es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, ya que esto produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Y puede ser derivada en cuestión a dos orígenes como lo son: microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (Debergh, y Zimmerman., 1991). Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras (George, 1993, Leifert, *et al.*, 1994). Es por eso que al hablar de cultivo *in vitro* o micropropagación en etapa de establecimiento, es un trabajo que comprende como punto principal la completa asepsia.

4.4 Multiplicación en medios Semisólidos

El objetivo principal de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los próximos ciclos y periodos de multiplicación. En esta etapa es conveniente evitar la formación de callo para disminuir los riesgos de la variación somaclonal en los nuevos brotes. Es así que en esta etapa, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento (fitohormonas) como auxinas, giberelinas y citoquininas, etc., así como las condiciones de crecimiento juegan un papel muy importante la multiplicación clonal de los explantes, elongación, producción de brotes y enraizamiento, además para esta etapa de multiplicación el aumento en las concentraciones de citoquinina es muy conveniente (Hartmann y Kester, 1995). Por otra parte, se dice que las auxinas en bajas concentraciones favorecen el crecimiento primario de la planta, además de que estimulan los procesos de multiplicación celular y la formación de raíces adventicias mientras que inhiben el desarrollo de las yemas axilares es por eso el uso de fitohormonas (Salisbury y Ross, 2000).

4.4.1 El uso de fitohormonas en etapa de multiplicación

En si las fitohormonas son compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal en la planta (Wever, 1990). Las fitohormonas vegetales tiene como característica principal que se sintetizan en una parte de la planta y se translocan a otra parte, en donde con concentraciones bajas causan alguna respuesta fisiológica. Es por eso que al hablar de fitohormonas existen interrelaciones hormonales típicas entre los diferentes órganos de la planta como pueden ser las auxinas (AUX) que regulan la diferenciación, las citoquininas (CQ) que son producidas por los frutos jóvenes y

son necesarias para el crecimiento, el ácido giberélico (AG) que controla la división celular en la región subapical, el ácido abscísico (ABA) que se produce en la hojas en respuesta al déficit hídrico cierra los estomas y así reduce la pérdida de agua por la planta, el etileno se acumula en los frutos maduros para inducir la maduración y las auxinas se desplaza hacia la raíz. Ya en su relación directa las auxinas y el ácido giberélico son sintetizadas por las hojas y yemas jóvenes desplazándose por el tallo para controlar la elongación, el ácido giberélico y las citoquininas sintetizadas en las raíces se desplazan hacia las hojas y el tallo para mantener en equilibrio el crecimiento de las raíces y la parte aérea. Es por eso que existe una coordinación hormonal del crecimiento en diferentes partes de una planta (Rost *et al.*, 1979).

El uso de fitohormonas en diferentes especies puede ser de gran ayuda para la propagación como en el caso de agave, que en concentraciones del BA con 1.5 y 1 mg L⁻¹ que donde se registraron la máxima producción de brotes entre 10.5 y 6.1 brotes por explante (Domínguez *et al.*, 2008). En trabajos realizados en frutillas como la frambuesa y con el uso de fitohormonas en un medio de multiplicación MS al 100%, complementado con 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG3), estimula la micropropagación de nuevos brotes del material vegetal (Fiorella y Flores, 2007).

En las primeras investigaciones con fresa se han recomendado concentraciones en un medio óptimo para obtener la mayor tasa de multiplicación en esta etapa, en (*Fragaria chiloensis* var. Huachi) que consiste en un medio de sales minerales de Boxus (1962), suplementados con 30 g L⁻¹ sacarosa, 7.5 g L⁻¹ agar, 0.5 mg AIB + 0.8 mg de GA3 y 2.0 mg de BAP (Coba, 2009). Es así que el número de brotes aumenta a medida que al medio de cultivo se le aumentaba la

concentración del regulador de crecimiento BAP (citoquinina). Las altas concentraciones de citoquininas actúan sobre la elongación de los brotes (Pérez, 1998). El uso adecuado de fitohormonas en cultivo de tejidos, brinda grandes ventajas por mencionar algunos, tanto en el aspecto fenotípico y genético del nuevo brote así como la producción a gran escala que se obtiene entre otros.

4.4.2 El uso de fitohormonas de nueva generación en etapa de multiplicación.

El uso de compuestos que han sido clasificados como fitohormonas recientemente, por ejemplo los Brasinoesteroides (BR), ácido salicílico, jasmonatos, poliaminas, y otros que a pesar de haber demostrado sus efectos estimuladores del crecimiento, aún no son considerados como fitohormonas como el Triacontanol (TRIA) que ha aportado excelentes resultados, en diferentes cultivos de importancia económica (Naeem *et al.*, 2011).

Los Brasinoesteroides se caracterizan por estimular el crecimiento vegetal, aumentar el rendimiento de la producción de biomasa, acelerar la maduración de frutos además promueve y estimula el alargamiento y la división celular (Sakurai y Fujioka, 1993). Por otra parte los Brasinoesteroides son compuestos de estructura esteroideal esto hace que tengan una marcada actividad biorreguladora por lo tanto el modo de acción es similar al de las auxinas, citoquininas y giberelinas (Arteca, 1995). Además fortalecen la resistencia de las plantas a las plagas y a factores de estrés abiótico como la salinidad, la sequía y los cambios bruscos de temperatura, así como a agentes químicos agresivos como plaguicidas y herbicidas, (Mandava, 1988; Sasse, 1992; Fujioka y Sakurai 1997). En varios sistemas, los Brasinoesteroides interactúan en forma sinérgica con las auxinas y promueve la división celular además de que actúa de forma aditiva

con las giberelinas (Mandava, 1988). Es por eso que los Brasinoesteroides son metabolitos vegetales que tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas (Salgado, *et al.*, 2008). En trabajos realizados con Brasinoesteroides en frutales como el plátano en fase de multiplicación combinado con BA presentó indicadores superiores en el crecimiento de las plantas *in vitro* (Jiménez, 2002) en hortalizas como la lechuga estimulo la brotación (Núñez, *et al.*, 2005). Respecto al uso del Triacontanol podemos decir que es un componente natural de las ceras epicuticulares, que aumenta el crecimiento vegetativo (Ries, 1985), por otra parte y de forma individual el uso del Triacontanol favorece mucho en la inducción de nuevas ramificaciones en las plantas en diversas especies (Khan *et al.*, 2007) y en el uso para trabajos referentes al cultivos de tejidos son utilizados para estimular la multiplicación y el mejoramientos de las raíces en diversas especies de cultivos como la manzana, cerezas, etc que con la ayuda de agentes hormonales como el AIB mejora los efectos de Triacontanol (Tantos *et al.*, 2001). Como también en diversas investigaciones el uso del Triacontanol en conjunto con ANA acelerar eficazmente el crecimiento de las raíces en plantas rastreras como la Begonia heracleifolia (Xiao, 1992). Es importante mencionar que el uso de Triacontanol también ayuda en los procesos fisiológicos en las plantas como en el arroz que regula los procesos de la fotosíntesis (Chen, 2002).

4.5 Uso de Biorreactores de Inmersión Temporal en la multiplicación

Al hablar del Sistema de Inmersión Temporal es trabajar bajo el empleo de medios de cultivo líquidos en cultivo *in vitro*, siendo un aspecto tanto primordial como óptimo en la automatización de la micropropagación de diversas especies (Debergh, 1988; Tisserat, 1991; Aitken-Christie, *et al.*, 1995), también favorece el desarrollo de técnicas para la producción a

gran escala. En la actualidad, favorece al desarrollo de métodos para la micropropagación en etapa de multiplicación que utilizan medios líquidos, ya que permiten el escalonamiento de la micropropagación (Eide *et al.*, 2003). Por otra parte, Alvard *et al.*, (1993) dicen que el uso adecuado del medio de cultivo líquido tiene varias ventajas y es considerado una técnica ideal para la producción a gran escala porque reduce las manipulaciones y simplifica el cambio de medio de cultivo. Es por eso que las nuevas alternativas en micropropagación como el SIT también puede generar algunas desventajas como el efecto de sobrehidratación en los explantes y nuevos brotes generados pero con la ayuda de fitohormonas como la Zeatina que está implicada como inductor en la división celular, ruptura de la dominancia apical, nueva formación de órganos en cultivo *in vitro*, floración y desarrollo de cloroplastos, se puede utilizar para bajar la presencia de sobrehidratación de explantes generados en SIT en un medio gelificado (Debnath, 2008). Otro método para resolver ese tipo de problemática ya dentro del sistema es el diseñar nuevos modelos de biorreactores sofisticados y sistemas automatizados, que sigan empleando medios de cultivo líquidos (Tisserat y Vandercook, 1985; Alvard *et al.*, 1993; Akita y Takayama, 1994; Ziv y Shemesh, 1996; Jiménez *et al.*, 1997) esto para disminuir cualquier problema y siga siendo un excelente sistema de micropropagación.

Por eso es importante decir que en diversos trabajos e investigaciones realizadas, se afirma que la calidad de las plantas en diferentes especies frutales *in vitro*, y producidos en sistemas semi-automatizados en inmersión temporal de los nuevos brotes es superior a los obtenidos con el empleo de métodos convencionales (Jiménez *et al.*, 1999).

En el caso de especies similares a la fresa como lo es la frambuesa se probaron los dos sistemas para la micropropagación, el medio semisólido y el medio líquido en inmersión temporal, y los resultados obtenidos para ambos sistemas fueron estadísticamente similares. Los dos presentaron buena brotación y crecimiento, sin embargo las vitroplantas en inmersión temporal se observaron más vigorosas y esto podría presentar ventajas en la etapa de aclimatación. (Fiorella y Flores, 2007). Los tiempos de inmersión en (SIT) pueden ser variados porque depende de la especie y su tiempo de contacto con el medio líquido ya que algunas suelen ser muy turgentes y no es conveniente un contacto repetitivo.

En la actualidad los protocolos propuestos en SIT aumentan la productividad del material propagado en diversas especies, en comparación con los desarrollados en medios de cultivo semisólidos, lo que representa una reducción en los costos de producción al introducir la multiplicación del cultivo en laboratorios de propagación (Santos *et al.*, 2011).

4.5.1 El uso de fitohormonas de nueva generación en etapa de multiplicación SIT.

El uso de fitohormonas de nueva generación como Brasinoesteroides (BR) han generado buenos resultados en la brotación de vitroplántulas en un periodo de 30 días, como es el caso de embriones somáticos de papaya (Posada *et al.*, 2003).

4.6 Enraizamiento de vitroplántulas provenientes de ST y SIT

Esta es la etapa final del cultivo *in vitro*, en donde se emplean medios esenciales de enraizamiento con el fin de formar un sistema radical adecuado que alimente y ayude a la planta

en condiciones *in vivo*, aspecto que depende de esta etapa objetivamente de acuerdo a las necesidades de la especie vegetal empleada que le brinde un mejor resultado (Roca y Mroginski., 1993).

En algunas especies no es necesaria esta etapa puesto que en la fase de multiplicación ya desarrollan raíces de buen tamaño debido a una concentración adecuada de auxinas tanto exógenas como endógenas de la planta (Castillo, 2004). Muchas de las veces las raíces generadas en la etapa de multiplicación no son de buena calidad para el momento de ser llevadas a condiciones *ex vitro*.

4.7 Establecimiento en suelo

La etapa del establecimiento de la micropropagación comercial como industria tiene sus comienzos en las décadas de los 70 y 80 y desde entonces se han logrado significativos avances en el cultivo de plantas y células *in vitro* (Jones y Sluis., 1991). La aclimatización es la etapa final de un protocolo de micropropagación. Durante esta etapa las plantas deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales que tienen los invernaderos y por último al campo. El mal funcionamiento de las relaciones hídricas, así como el deficiente desarrollo del sistema fotosintético son las principales causas de la poca supervivencia alcanzada en esta fase (Preece y Sutter., 1991). Pero con un cuidado gradual de las plantas y material adecuado se pueden lograr buenos resultados de supervivencia. Arellano y González (1985), señalan que en la etapa de establecimiento de fresa, es necesaria una fase de microambiente, que proporcione una alta humedad relativa para lograr la aclimatización adecuada y así asegurar un mayor porcentaje de supervivencia y el mejor microambiente fue el formado con la cubierta de polietileno

transparente, que fue el que proporciono una mayor sobrevivencia del 89 % y la mejor calidad de la planta.

Las plantas enraizadas o sin enraizar, se sacan del recipiente de cultivo, se lavan para retirar cualquier residuo como el de agar, y se trasplantan a una mezcla de tierra esterilizada, en macetas pequeñas. Inicialmente se debe proteger las plantas colocándolas en sombra, con alta humedad relativa o bajo niebla. Pueden necesitarse varios días para que se formen nuevas raíces (Hartmann y Kester, 1995). Boucherin y Bron (1994) señalan que las raíces nacidas *in vitro* son extremadamente frágiles y colocadas en contacto con un sustrato, mueren. Es necesario esperar la formación y el crecimiento de nuevas raíces para que la planta se nutra.

Al hablar de vitroplantas generadas en SIT se pueden mencionar a las bromelias, plantas ornamentales que con el uso de Brasinoesteroide MH5 aumentan la supervivencia y calidad de los brotes en la etapa de aclimatación, además de promover la calidad morfológica de las mismas, lo cual se tradujo en un mayor número de raíces y número de hojas (Capote, *et al.*, 2009). Los Brasinoesteroides se caracterizan por producir la estimulación del crecimiento vegetal, el aumento de los rendimientos y la producción de biomasa en diferentes cultivos y el aceleramiento de la maduración de la cosecha, además de atenuar los efectos del estrés ambiental (Núñez, 1999; González, *et al.*, 2005). Otro factor importante de vitroplántulas de diversas especies provenientes del SIT es un porcentaje alto de masa fresca, para ser empleados como material vegetal de plantación directo en campo, ya que le brinda una mayor resistencia al brote como en plantas de name (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de los microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal (Cabrera, *et al.*, 2010).

Al hablar de la aclimatación en la fresa podemos mencionar que las plántulas de fresa provenientes de *in vitro* o ST, necesitan un periodo de entre tres a cuatro semanas para adaptarse a las condiciones ambientales de un invernadero y reanudar su crecimiento (Oliveira, *et al.*, 2000). Para plantas de ocumo blanco generadas en SIT provenientes del décimo subcultivo, que fueron llevadas a invernadero con una altura de 5 y 6 cm, sembradas en bandejas de germinación plásticas bajo condiciones de cámara húmeda con una temperatura de 25 °C, 75 % de humedad relativa y con un sustrato de harina lavada y abono de río (2:1), bajo estas condiciones no es necesario el uso de auxinas para promover la formación de raíces adventicias en esta especie (Vilchez, *et al.*, 2011). Por otro lado, en vitroplántulas, el contenido de clorofilas totales garantiza un buen resultado a la exposición de la luz solar, y por su parte, hace que el crecimiento de las plántulas sea menos dependiente de las actividades agrotécnicas en esta fase de aclimatación (Rodríguez, *et al.*, 2000). En general, las plantas *in vitro* presentan un contenido total de clorofilas comparable al de las plantas cultivadas en condiciones *ex vitro* en condiciones similares de luz (Donnelly, *et al.*, 1998).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para esta investigación fueron estolones de fresa de las variedades mexicanas CP Jacona y CP Zamorana, proporcionadas por el área de Fruticultura del Colegio de Postgraduados. La descripción de las variedades es como sigue:

CP-Zamorana: altamente productiva de frutos grandes, de calidad y firmeza superior; producción precoz, con altos porcentajes de fruta con calidad de exportación; adecuada para consumo en fresco por su gran balance en sabor (Calderón *et al.*, 2009).

CP-Jacona: fruto grande y firme de excelente sabor, adecuado para consumo en fresco; altamente productiva con altos porcentajes de fruto con calidad de exportación; producción precoz (Calderón *et al.*, 2009).

5.2 Área de trabajo

La primera parte de la investigación se realizó en el laboratorio de cultivo *in vitro* de frutales, ubicado en el edificio de Genética “Dr. José D. Molina Galán”. La segunda parte de la investigación fue realizada en el edificio de laboratorios generales en el laboratorio de inmersión temporal, y la tercera parte se realizó en el área de invernaderos de cristal en la sección de Fruticultura, dentro de las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

5.3 Desinfestación *in vitro* en ST

En este trabajo, se utilizaron plantas madre de fresa de las variedades mexicanas CP Jacona y CP Zamorana, provenientes del área de invernaderos, así como de campo donde se extrajeron 50 estolones por variedad para ser llevados a la etapa de desinfestación, la cual consistió en someter los estolones en un proceso de lavado y agitación por 10 min. a 250 revoluciones por minuto con jabón líquido. Después fueron tratados con fungicida (Captan®) y bactericida (Agry – gent plus 806®) 1 g L⁻¹ por un tiempo de 15 min a 250 revoluciones por minuto para ambos productos, sumergiéndolos después en una solución de alcohol al 70 % durante 5 segundos y de cloro comercial al 20 % por 10 minutos en agitación a 250 revoluciones, y por último enjuagar los estolones cuatro veces con agua destilada esterilizada, esto ya dentro de la campana de flujo laminar para la disminución de efectos contaminantes.

5.4 Establecimiento *in vitro*

Para la etapa de establecimiento, se procedió a realizar la disección de los estolones para poder obtener y aislar los meristemos aproximadamente de 0.2-0.5 mm de longitud en un ambiente de completa asepsia, dentro de una campana de flujo laminar y con la ayuda de un estereoscopio marca Zeizz® (López e Inoue, 2001), que fueron sembrados en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado (Cuadro 1) con agar. Se sembraron 50 meristemos por variedad, uno por tubo de ensaye de 15 x 100 mm y para estimular el desarrollo del tejido el medio fue suplementado con diferentes reguladores de crecimiento (Cuadro 2). Las condiciones de incubación fueron 25 ± 2°C, con 16 horas luz por 8 horas de oscuridad y una intensidad luminosa de 47.3 μmol m⁻²·s⁻¹. Después de 30 días se evaluó el porcentaje de oxidación y la sobrevivencia.

Cuadro 1. Medio de cultivo para etapa de establecimiento *in vitro* en ST

Nutriente	Concentración
Macronutrientes	mM
Nitrato de amonio	20
Nitrato potasio	18
Nitrato de calcio	1.5
Sulfato de magnesio	1.5
Fosfato de potasio	1.2
Micronutrientes	μM
H ₃ BO ₃	100
MnSO ₄ 4H ₂ O	100
ZnSO ₄ 7H ₂ O	30
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.1
Quelatos	μM
FeSO ₄ 7H ₂ O	2.72
EDTA	1
Vitaminas	mg L⁻¹
Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Ácido ascórbico	100
Sacarosa	30 g L ⁻¹
Agar	7 g L ⁻¹
pH	5.7

Cuadro 2. Reguladores de crecimiento utilizados para etapa de establecimiento en ST

Tratamientos	Concentración
1	BA (0.05 mg L ⁻¹) y AIB (0.05 mg L ⁻¹) + Ácido cítrico (AC) (1 g L ⁻¹)
2	BA (0.05 mg L ⁻¹) y AIB (0.05 mg L ⁻¹)

5.5 Etapa uno de multiplicación *in vitro*

Para iniciar la etapa de multiplicación se tomaron los brotes generados a partir de los meristemos de cada variedad que tuvieran un tamaño aproximado de 1.5 cm y con buena apariencia o vigor y fueron sembrados en un medio Murashige y Skoog (1962) modificado en agar (Cuadro 3).

Cuadro 3. Medio de cultivo para multiplicación *in vitro* en ST

Nutriente	Concentración
Macronutrientes	mM
Nitrato de amonio	15
Nitrato potasio	15
Nitrato de calcio	3
Sulfato de magnesio	1.5
Fosfato de potasio	1.2
Micronutrientes	μM
H ₃ BO ₃	100
MnSO ₄ 4H ₂ O	100
ZnSO ₄ 7H ₂ O	30
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.1
Vitaminas	mg L⁻¹
Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Ácido ascórbico	100
Quelatos	μM
FeSO ₄ 7H ₂ O	2.72
EDTA	1
Agar	30 g L ⁻¹
azúcar	7 g L ⁻¹
pH	5.7

Durante esta primera etapa de multiplicación se utilizó BA (1.0 mg L^{-1}) + ANA (0.1 mg L^{-1}), para estimular la brotación e incrementar el número suficiente con el propósito de evaluar diferentes tratamientos de reguladores. Las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2^\circ \text{C}$, con 16 horas luz por 8 horas de oscuridad y una intensidad luminosa de $47.3 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Después de 30 días se evaluó el número de brotes, tamaño de brotes, diámetro en la base del brote, porcentaje de oxidación y la sobrevivencia con 50 unidades experimentales por tratamiento y variedad.

5.6 Etapa de multiplicación subcultivos

Para el segundo subcultivo en etapa de multiplicación se utilizaron 216 brotes del tratamiento multiplicación etapa uno, para ser sembrados en nueve diferentes tratamientos (Cuadro 4). Para el ST multiplicación etapa subcultivos las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con 16 horas luz por 8 horas de oscuridad y una intensidad luminosa de $47.3 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Después de 30 días se evaluó el número de brotes, tamaño de brotes, el diámetro en la base, porcentaje de oxidación y el porcentaje de sobrehidratación.

Cuadro 4. Tratamientos utilizados para evaluar la multiplicación *in vitro* de brotes de dos variedades mexicanas de fresa establecidos a partir de meristemos

Tratamientos	Concentración
1	BA (0.5 mg L^{-1}) y AIB (0.25 mg L^{-1}), (Acosta-Rodríguez, 1993)
2	BA (1.0 mg L^{-1}), (Abrego-Aranda, 1988)
3	BA (0.25 mg L^{-1}), (Propuesto)
4	BA (0.5 mg L^{-1}) y AIB (0.5 mg L^{-1}), (Mejía-Muños, 1984)
5	BA (1.0 mg L^{-1}) y AIB (0.1 mg L^{-1}), (Propuesto)
6	MS sin hormonas (modificado), (Propuesto)
7	BA (1.0 mg L^{-1}) y ANA (0.1 mg L^{-1}), (Propuesto)
8	KIN (0.5 mg L^{-1}) y BA (0.25 mg L^{-1}), (Propuesto)
9	BA (0.5 mg L^{-1}) y AIB (0.01 mg L^{-1}), (Propuesto)

La evaluación de cada etapa y subcultivo se hizo mensual cada tratamiento consto de 12 repeticiones cada uno, dando un total de 108 unidades experimentales por variedad. La unidad experimental estuvo compuesta por un explante en un tubo de ensaye. El experimento se repitió siete veces en el tiempo.

5.7 Etapa de multiplicación *in vitro* en el sistema de inmersión temporal SIT

Una vez lograda la estabilidad de los cultivos se procedió a seleccionar el mejor tratamiento según los resultados obtenidos en las variables evaluadas en multiplicación para ST, que sirvió para establecer los cultivos de la variedades mexicanas de fresa CP Jacona y CP Zamorana en medio líquido utilizando biorreactores de inmersión temporal, y como punto de partida el tratamiento, que consistió en un medio de cultivo MS (1962) modificado al 100 %, sin agar con un pH de 5.7 adicionado con hormonas BA (1.0 mg L^{-1}) y AIB (0.1 mg L^{-1}) para ambas variedades, ya que fue el que mejor número de brotes y apariencia fenotípica se obtuvieron en repetidas evaluaciones en agar. Este tratamiento se utilizó como base para evaluar la tasa de proliferación en el SIT y así realizar la comparación. La siembra de los explantes se realizó en cámaras de flujo laminar por condiciones de completa asepsia. Para ello se utilizaron biorreactores tipo RITA[®] de 1 L de capacidad, donde fueron sembrados diez brotes de aproximadamente 1.5 cm por variedad con 150 mL de medio líquido complementado con 30 g L^{-1} de sacarosa donde posteriormente fueron llevados a una cámara de incubación y la evaluación consistió en obtener el mejor tiempo entre intervalos de inmersión de un minuto cada (4, y 6 horas) y dos minutos cada (12 horas) regulados y controlados por un TIMER. Por cada intervalo de tiempo se sembraron dos RITAS[®] por variedad realizándose tres replicas en el tiempo. Para este sistema las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con 16 horas luz por 8 de oscuridad

y una intensidad luminosa de $47.3 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Después de 30 días se evaluó el número total de brotes, tamaño de brotes, el diámetro en la base, porcentaje de la oxidación y brotes sobrehidratados.

5.8 Disminución de nitratos para el control de la sobrehidratación en SIT

Una vez que se logró obtener el mejor tratamiento de multiplicación se procedió a realizar el experimento con la disminución de nitratos en el medio de cultivo MS donde se utilizaron explantes de fresa de las variedades CP Jacona y CP Zamorana, para la etapa de multiplicación en SIT se utilizó un medio de cultivo Murashige y Skoog, (1962) modificado, en la concentración de nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$), nitrato de potasio (KNO_3) y se sustituyó el cloruro de calcio (CaCl_2) por nitrato de calcio ($\text{Ca} (\text{NO}_3)_2$) al 70%, comparándolo con la concentración normal de sales al 100%. Se usó un solo tratamiento complementado con las hormonas de crecimiento BA (1.0 mg L^{-1}) y AIB (0.1 mg L^{-1}). Utilizando el sistema de inmersión temporal SIT, se sembraron dos RITAS[®] con diez explantes cada uno y un tamaño de 1.5 cm por variedad, con intervalos de tiempo de un minuto cada (4 y 6 horas) y dos minutos cada (12 horas). Las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con 16 horas luz por 8 horas de oscuridad y una intensidad luminosa de $47.3 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, para registrar y observar efectos de sobrehidratación y demás evaluaciones antes mencionadas en los brotes sembrados en un periodo de 30 días, realizándose tres replicas en el tiempo.

Una vez identificado los resultados obtenidos en cuanto a los tiempos de inmersión evaluados y el efecto de la concentración de los nitratos en el SIT se escogió el que mostró mejores efectos en cuanto a las variables evaluadas y se recomendó el tiempo de inmersión de 2 minutos cada 12

horas y la concentración de nitratos al 70% en el medio de cultivo MS (1962), complementado con las hormonas BA (1.0 mg L^{-1}) y AIB (0.1 mg L^{-1}).

5.9 Uso del 1-Triacontanol (TRIA) y Epibrassinolide® (BR) para la multiplicación *in vitro* de fresa en SIT y ST

Comparación de las hormonas de nueva generación para observar la eficiencia de cada una de ellas en la etapa de multiplicación *in vitro* en SIT y ST. Los tratamientos evaluados fueron dos tipos de reguladores de crecimiento de nueva generación: 1-Triacontanol y el Epibrassinolide® en diferentes concentraciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos utilizados en la comparación de sistemas.

Tratamientos
1-Triacontanol
1.- $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de TRIA + BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1})
2.- $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de TRIA + BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1})
3.- $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de TRIA + BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1})
Epibrassinolide®
1.- BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1})
2.- BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1})
3.- BR (0.02 mg L^{-1})

Cada tratamiento fue realizado un medio de cultivo MS (1962) modificado al 70 % en la concentración de nitratos, sin agar, utilizándose dos RITAS® de 1 L de capacidad por variedad CP Jacona y CP Zamorana, con diez explantes de aproximadamente 1.5 cm, con 150 mL de medio líquido complementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, en condiciones de incubación en SIT

fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con 16 h luz por 8 de oscuridad, para una etapa de evaluación mensual. Para realizar una comparación se sembraron brotes de fresa en medio con agar utilizando los mismos tratamientos en el sistema tradicional, se utilizó un medio de cultivo MS (1962) modificado, con agar 7 g L^{-1} complementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, donde se sembraron 20 explantes en cuatro frascos Gerber por cada variedad y tratamiento con hormonas TRIA y BR. En cada evaluación por tratamiento se anexó un testigo que solo consistía en un tratamiento con hormonas BA (1.0 mg L^{-1}) y AIB (0.1 mg L^{-1}) para ambos sistemas de micropropagación. Las condiciones de incubación fueron también de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con 16 horas luz por 8 de oscuridad y una intensidad luminosa de $47.3 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Después de 30 días se evaluó el número de brotes, tamaño de brotes, el diámetro en la base, porcentaje de oxidación así como el porcentaje de sobrehidratación. Se aplicaron seis tratamientos con dos repeticiones cada uno, dando un total de 12 unidades experimentales por variedad. La unidad experimental constó de diez explantes por RITA[®]. El experimento se repitió tres veces en el tiempo.

5.10 Proceso de enraizamiento *in vitro* de los brotes generados en SIT

De acuerdo a la etapa de enraizamiento de los brotes generados en SIT se utilizó solo un tratamiento que consistió en un medio semisólido Murashige y Skoog, (1962) modificado con un 100 % de sus macrosales adicionado con agar, con un pH 5.7 suplementado con 1-Triacontanol con una concentración de $2 \mu \text{ L}^{-1}$ para la regeneración de raíces en brotes generados en sistema de inmersión temporal. Las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con 16 horas luz por 8 horas de oscuridad por un periodo de 15 días.

5.11 Establecimiento *in vivo* de los brotes de fresa variedad CP Jacona y CP Zamorana provenientes de los sistemas SIT y ST

Para esta etapa se procedió a la utilización de nuevos brotes de fresa generadas en cultivo *in vitro* variedad CP Jacona y CP Zamorana generadas en los sistemas de micropropagación SIT y ST para ser llevadas a el área de invernaderos donde fueron sembradas en charolas de 49 tubetes de 11.5 centímetros de largo por tres centímetros de ancho. Previamente el sustrato correspondió a una mezcla que consistió en 2:1 v/v agrolita y peat moss, para obtener una buena oxigenación y distribución del agua. Posteriormente la mezcla del sustrato se procedió a humedecerlo con Captan[®] (2.0 g L⁻¹) para después ser llenado cada tubete.

Una vez preparadas las charolas y los tubetes con su respectivo sustrato se llevó acabo la siembra de las nuevas plantas, que con la ayuda de unas pinzas se realizó un orificio adecuado en el sustrato para que la planta no sufriera de daños al momento de ser sembrada en el tubete y fueron sembradas diez por variedad y tratamiento con una tamaño de entre 3 a 4 centímetros cada una, provenientes de los sistemas SIT y ST. Después fueron regadas con una solución nutritiva compuesta con macronutrientes y micronutrientes con la ayuda de un atomizador para no dañar el brote, en un periodo de los primeros 15 días para después ser regadas con agua corriente tres veces por semana y aplicación de fertilizante una vez al mes. Al cabo de tres meses se procedió a evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las plantas sembradas por cada tratamiento en condiciones de invernadero.

5.11.1 Etapa de aclimatización

El proceso de la aclimatización, de las plantas provenientes de los sistemas SIT y ST sembradas en tubetes, fue realizada cubriendo la planta con un vaso de plástico transparente de siete centímetros de largo y 4.5 centímetros de ancho esto para evitar y controlar efectos de deshidratación o contaminación de la planta, y en forma gradual en de un periodo de 15 días se procedió a realizarle orificios al vaso de plástico en la parte superior y al paso de un mes se le hicieron orificios casi en la totalidad al vaso de plástico transparente ya en el tiempo de un mes y medio se retiró por completo el vaso de plástico. Esto fue con la finalidad de que las plantas entraran en contacto con el medio ambiente en forma gradual.

Una vez aclimatadas las plantas se dejaron en los tubetes por un periodo de 30 días, para después ser transferidas a vasos de unicel de mayor tamaño y diámetro esto para que las plantas obtuvieran un mayor desarrollo, así como una mayor distribución de sus raíces en el sustrato. Se hicieron dos riegos por semana después del trasplante a los vasos con un flujo abundante, esto para evitar la deshidratación de las plantas además de suministrar fertilizantes cada mes.

5.12 Variables de estudio

5.12.1 Número de brotes

Consistió en evaluar el número de brotes por explante y por tratamiento de cada uno de los experimentos realizados, tomando en cuenta principalmente el tamaño del brote.

5.12.2 Sobrehidratación

Consistió en observar la turgencia de los explantes por tratamientos tomando en cuenta el parámetro por presencia o ausencia.

5.12.3 Oxidación

Consistió en la observación de los explantes enfocado en la parte basal con un parámetro por presencia o ausencia de oxidación.

5.12.4 Tamaño de la hoja

En esta variable se midió el tamaño de la hoja de la parte basal a la hoja más grande con un parámetro de 1.5, 2.0 y 2.5 cm. Rango adecuado y de calidad del explante para su desarrollo *in vitro*.

5.12.5 Diámetro de la base del brote

En esta variable se midió el diámetro de la parte basal de los brotes con la ayuda de una hoja milimétrica y se tomó un parámetro de 0.3, 0.4 y 0.5 cm. Rango adecuado y de calidad del explante para su desarrollo *in vitro*.

5.13 Análisis estadístico

Para el estudio estadístico de esta investigación se utilizó un diseño factorial completamente al azar, utilizando el paquete SAS (The SAS System for Windows 9.0.)

5.13.1 Etapa establecimiento *in vitro* en ST

Se aplicaron dos tratamientos con 25 repeticiones cada uno dando un total de 50 unidades experimentales por variedad. La unidad experimental estuvo compuesta de un explante. Para analizar las variables porcentaje sobrevivencia y porcentaje de oxidación, se utilizó un ANOVA con una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados con la función $\arccos X^{1/2}$.

5.13.2 Etapa de multiplicación

5.13.2.1 Multiplicación uno en ST

Se aplicó un tratamiento con 50 repeticiones, tomando 50 explantes provenientes de la etapa de establecimiento, dando un total de 50 unidades experimentales por variedad. La unidad experimental estuvo compuesta por un explante. Para analizar las variables, se utilizó un ANOVA con una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$).

5.13.2.2 Multiplicación por subcultivos en ST

Se aplicaron nueve tratamientos con 12 repeticiones cada uno, dando un total de 108 unidades experimentales por variedad. La unidad experimental estuvo compuesta por un explante. El experimento se repitió siete veces en el tiempo. Para analizar las variables número de brotes, tamaño del brote, diámetro de la base del brote, porcentaje de oxidación y sobrehidratación, se utilizó un ANOVA con una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados con la función $\arcsen X^{1/2}$.

5.13.3 Multiplicación Disminución de nitratos para el control de la sobrehidratación en SIT

Se aplicaron dos tratamientos con una repetición cada uno, dando un total de cuatro unidades experimentales por variedad. La unidad experimental consto de diez explantes por RITA[®]. El experimento se repitió tres veces en el tiempo. Para analizar las variables número de brotes, tamaño del brote, diámetro de la base del brote, porcentaje de oxidación y sobrehidratación, se utilizó un ANOVA con una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados con la función $\arcsen X^{1/2}$.

5.13.4 Multiplicación y el uso de reguladores de nueva generación en SIT y ST

Para el análisis estadístico del SIT se utilizó un diseño completamente al azar. Se aplicaron tres tratamientos, con dos repeticiones cada uno por variedad y regulador de crecimiento. La unidad experimental consto de 10 explantes por RITA[®]. Para el ST se aplicaron tres tratamientos con

cuatro repeticiones cada uno por variedad y tratamiento. Se utilizó un ANOVA para analizar las variables número de brotes, tamaño del brote, diámetro de la base del brote, porcentaje de oxidación y sobrehidratación y cuando hubo significancia se utilizó la prueba de Tukey para la separación de medias ($P \leq 0.05$). Las variables expresadas en porcentajes, para su análisis fueron previamente transformados con la función $\arccos X^{1/2}$. Se utilizó el paquete SAS System for Windows 9.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento *in vitro* en ST

6.1.1 Porcentaje de sobrevivencia y oxidación

En la etapa de establecimiento se realizó una disección de meristemas como se muestra en la Figura 1, donde se encontró que su porcentaje de sobrevivencia de los meristemas en las dos variedades de fresa mexicana CP Jacona y CP Zamorana (Figura 2) fue del 96 %. No se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con relación a la aplicación del ácido cítrico así como con el porcentaje de sobrevivencia entre variedades, ni entre tratamientos (Cuadro 6). Encina *et al.*, (2002), indicaron que el cultivo de meristemas en plantas de fresa es una gran alternativa, ya que nos permiten tener un control en los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo de la planta, como son: división celular, brotación, etc. Boxus (1974) menciona que actualmente la técnica de cultivo de meristemas *in vitro*, está siendo utilizada por la mayor parte de los países productores en fresa, uno de los principales motivos es para la obtención de plantas libres de virus. Morel (1964) menciona que la siembra de meristemas también funciona exitosamente en diferentes especies para la propagación de varios tipos de orquídeas.



Figura 1. Obtención del material vegetal de dos variedades mexicanas de fresa. a) Planta madre de fresa variedad CP Jacona y CP Zamorana, b) Estolones de fresa, C) Desinfestación y disección del material vegetal y d) Siembra de los meristemos de fresa en medio semisólido en etapa de establecimiento.



Figura 2. Brote de fresa variedad CP Zamorana obtenido a partir de un meristemo con tiempo de 30 días de ser sembrado en un medio MS semisólido.

En cuanto a la variable porcentaje de oxidación se observó que para la variedad CP Zamorana no existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para la presencia o ausencia del ácido cítrico (AC), en comparación con la variedad CP Jacona, donde se aprecia que con AC tiene mayor porcentaje de

oxidación con un 84 % (Cuadro 6), según los resultados obtenidos el AC aumenta la presencia de oxidación en plantas de la fresa, resaltando que produce mayor vigor que las que no estuvieron expuestas al ácido. Sánchez y Salaverría (2004) utilizaron AC para contrarrestar efectos de oxidación complementada con ácido ascórbico (AA) para la etapa de establecimiento y obteniendo resultados del 50% de sobrevivencia en cultivo *in vitro* de fresa. Por otra parte Sánchez *et al.*, (2001) mencionan que otra alternativa para lograr buenos resultados de sobrevivencia y libres de oxidación en especies como el pimentero en etapa de establecimiento, es con la adición de diferentes agentes antioxidantes como el Polivinil pirrolidona (PVP) al 0,5 y 1,0 g L⁻¹ en presencia de luz. George (1996) indicó que en la etapa de establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, se ven afectadas en gran medida, por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*. Murillo *et al.*, (1985) señalan que el utilizar un antioxidante como el AC en la etapa de desinfestación del material, es el más indicado para lograr un buen establecimiento de meristemas y yemas intermedias de estolones en fresa.

Cuadro 6. Porcentaje de sobrevivencia y oxidación de los meristemas de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días del establecimiento *in vitro* en medio de agar

Ácido cítrico	Sobrevivencia (%)		Oxidación (%)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
Con^Z	96.00 ± 20.00 a	96.00 ± 20.00 a	84.00 ± 37.41 a	80.00 ± 40.82 a
Sin^Y	92.00 ± 27.68 a	96.00 ± 20.00 a	52.00 ± 50.99 b	68.00 ± 47.60 a

^Z BA (0.05 mg L⁻¹) y AIB (0.05 mg L⁻¹) + Ácido cítrico (AC) (1 gr L⁻¹), ^Y BA (0.05 mg L⁻¹) y AIB (0.05 mg L⁻¹). Los valores son medias de una réplica de 100 explantes. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

6.2 Multiplicación *in vitro* en ST

6.2.1 Número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas evaluadas por subcultivos y tratamientos

Durante la etapa de multiplicación por subcultivos en la variable número de brotes, se observó que durante los primeros cuatro subcultivos hubo una fluctuación del número de brotes por explante en ambas variedades, que oscilaron entre 4 y 7 brotes; sin embargo, a partir del subcultivo cinco se observó que el número de brotes por explante se estabilizó, ya que en los subcultivos posteriores estuvieron entre 4 y 5 brotes por explante, encontrándose una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) (Cuadro 7). Esto se puede deber a que al principio en los subcultivos los explantes sembrados aprovechan al máximo la absorción de los nutrientes y eso provocó un mayor número de brotes, y una vez adaptados los explantes en el medio de cultivo y a los tratamientos ocurrió una estabilización del número de los brotes. Hartmann y Kester (1995) señalan que en la etapa de multiplicación el aumento en las concentraciones de citoquinina es muy conveniente para poder lograr el mayor número de brotes y mayor número de sobrevivencia en diversas especies. Por otra parte, Mejía (1984) menciona que el uso de tubos de ensaye en etapa de multiplicación de alguna manera afecta la proliferación de las yemas axilares en explantes de fresa, ya que conforme se incrementa la densidad de brotes, el espacio va siendo limitado.

Con base en la etapa de multiplicación por tratamientos podemos observar un aspecto diferente entre tratamientos en cada una de las imágenes de las Figuras 3, 4 y 5, en la variable número de brotes se observa que los tratamientos uno y dos tienen el mayor número de brotes con valores

que van para CP Jacona de 6.18 a 6.88 brotes por explante y para CP Zamorana de 6.01 a 5.84 brotes por explante (Cuadro 8). Esto se puede deber a que los tratamientos con BA en concentraciones que van de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ inducen un mayor número de brotes en los explantes de fresa. Abrego (1988) indico que en etapa de multiplicación en explantes de fresa variedad “Fresno” el tratamiento con BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.5 mg L⁻¹) reporto un mayor número de brotes. Vieitez y Vieitez (1980) también mencionaron que en algunas especies principalmente forestales a concentraciones de 1 ó 2 mg L⁻¹ de BA se obtiene el máximo número de brotes en material juvenil, pero concluyeron que la concentración óptima para la proliferación se encuentra entre 0.1 - 0.5 mg L⁻¹. Por otra parte, Mogollón *et al.*, (2004) señalaron que se logró una alta tasa de multiplicación clonal *in vitro* de *Ananas comosus* ‘Queen Australia’, con la combinación de BA 1.0 mg L⁻¹ + ANA 0.01 mg L⁻¹ adicionada en medio líquido con agitación en cultivo *in vitro*. Villegas (1990) señala que encontró una respuesta diferencial en el número de brotes por explante, entre portainjertos de vid, al evaluar diferentes concentraciones de Ca (NO₃)₂.



Figura 3. Multiplicación *in vitro* en agar de la variedad CP Jacona en 9 diferentes tratamientos en el tercer subcultivo. a) BA (0.5 mg L^{-1}) + AIB (0.25 mg L^{-1}), b) BA (1.0 mg L^{-1}), c) BA (0.25 mg L^{-1}), d) BA (0.5 mg L^{-1}) + AIB (0.5 mg L^{-1}), e) BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), f) MS sin hormonas (modificado), g) BA (1.0 mg L^{-1}) + ANA (0.1 mg L^{-1}) y h) KIN (0.5 mg L^{-1}) + BA (0.25 mg L^{-1}).

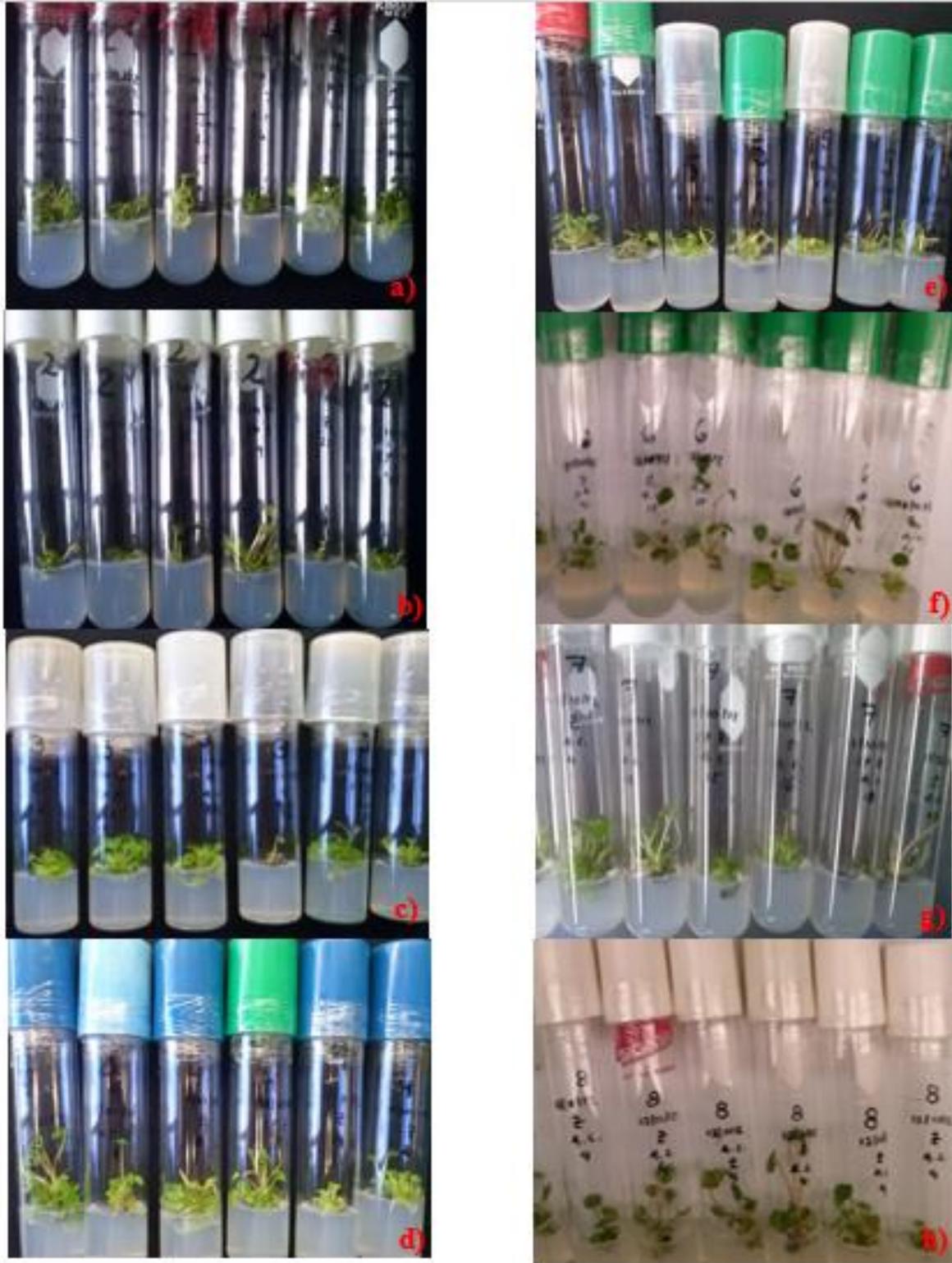


Figura 4. Multiplicación *in vitro* en agar de la variedad CP Zamorana en 9 diferentes tratamientos en el tercer subcultivo. a) BA (0.5 mg L^{-1}) + AIB (0.25 mg L^{-1}), b) BA (1.0 mg L^{-1}), c) BA (0.25 mg L^{-1}), d) BA (0.5 mg L^{-1}) + AIB (0.5 mg L^{-1}), e) BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), f) MS sin hormonas (modificado), g) BA (1.0 mg L^{-1}) + ANA (0.1 mg L^{-1}) y h) KIN (0.5 mg L^{-1}) + BA (0.25 mg L^{-1}).

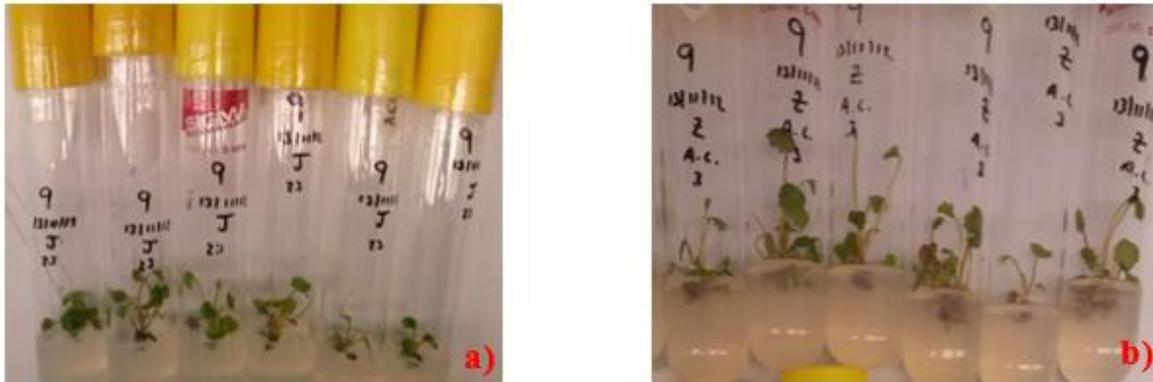


Figura 5. Multiplicación *in vitro* en agar de las variedades mexicanas CP Jacona y CP Zamorana en 9 diferentes tratamientos en el tercer subcultivo. a) CP Jacona tratamiento BA (0.5 mg L^{-1}) y AIB (0.01 mg L^{-1}) y b) CP Zamorana tratamiento BA (0.5 mg L^{-1}) y AIB (0.01 mg L^{-1}).

Para la variable tamaño del brote por subcultivos se observó que los brotes de mayor tamaño se encontraron en el subcultivo cuatro y cinco para CP Jacona de 1.94 y 1.97 cm y CP Zamorana mostró tamaños de 2.02 y 1.98 cm con una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) (Cuadro 7). Como se mencionó anteriormente, esto se puede deber a que en los subcultivos cuatro y cinco los explantes y brotes generados aprovechaban en su totalidad los nutrientes del medio de cultivo y esto generó un mayor desarrollo en los brotes, así como ocurrió con la variable número de brotes. Mejía (1984) comentó que el uso de tubos de ensaye afecta el desarrollo de los brotes en etapa de multiplicación *in vitro* de explantes de fresa. Por otra parte, Vieitez y Vieitez (1980) indicaron que en etapa de multiplicación el BA a concentraciones de 1 o 2 mg L^{-1} afecta la elongación de los explantes y ocasiona el arrosetamiento de los explantes en algunas especies, principalmente en forestales. Contrastando en especies como la fresa, que es una herbácea, en la que la cantidad de BA a 1.0 mg L^{-1} no afecta al tamaño de los nuevos brotes en esta etapa. Uribe y Cifuentes (2004) señalan que la elongación o tamaño de los explantes en cultivo *in vitro*, se ve fuertemente afectado por el tiempo de permanencia o exposición en el mismo medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados de la variable tamaño del brote por tratamiento, se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el tratamiento seis que consistió en un MS sin hormonas (modificado), ya que para ambas variedades se obtuvo el mayor tamaño por brote que fue de 2.19 cm para CP Jacona y de 2.24 cm en CP Zamorana (Cuadro 8). Esto se puede deber a que los explantes estuvieron expuestos a un tratamiento en un medio de cultivo MS al 100 % sin fitorreguladores, que promovieran brotes y así los explantes sólo tendieron a desarrollarse como se observa más adelante en el Cuadro 16 en el tratamiento con BR (0.02 mg L^{-1}) donde se observa que a menor número de brotes, mayor es el tamaño de ellos. Uribe (2010) menciona que al modificar las sales minerales en el medio de cultivo de fresa de las variedades Camarosa y Camino Real *in vitro* puede repercutir en el tamaño de los brotes, este mismo efecto observaron con la variación de la cantidad de sacarosa para la etapa de multiplicación. George (1996), señala que una proporción auxina-citoquinina balanceada mantiene las células en un estado indiferenciado, mientras que una proporción alta de citoquinina a auxina promueve un aumento en el desarrollo de brotes y una proporción baja de la misma promueve el desarrollo de raíces. Arredondo (2000) señala que para obtener una mayor longitud en cultivo *in vitro*, es necesario que el medio de cultivo sea suplementado con una menor concentración de citoquininas, ya que con esto se logra disminuir la división celular y favorecer la elongación del tejido por la acción de las auxinas, lo que concuerda con Kyte y Kleyn (1996) quienes indicaron que al usar una mayor concentración de citoquininas en el medio de cultivo, se induce la formación de brotes más pequeños. Calderón y Rotella (1998) determinaron en trabajos realizados *in vitro*, que con una baja concentración de citoquininas o en ausencia de éstas en el medio de cultivo, se consigue una mayor elongación. Villegas (1990) señala que el tamaño del brote en portainjertos de vid no

se modifica significativamente al añadir $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pero mencionó que puede suceder que a mayores concentraciones haya mayor longitud.

Con base en los resultados obtenidos en la variable diámetro de la base del brote por subcultivos, se observa que el mayor diámetro se encontró en el subcultivo dos para las variedades CP Jacona y CP Zamorana con valores de 0.39 y 0.41 cm, respectivamente, con una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) (Cuadro 7). Lo anterior se puede deber a que los explantes sembrados y brotes generados obtuvieron un mayor diámetro al principio de los subcultivos, debido a que pueden ocurrir una mayor absorción de nutrientes al iniciar el contacto del medio con los explantes.

En el Cuadro 8 referente al diámetro de la base del brote por tratamiento los resultados demostraron una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para el tratamiento uno ya que obtuvo los valores más altos en cuanto al diámetro de la base para las dos variedades de 0.38 cm. Esto se puede deber a que estuvieron expuestos los explantes y nuevos brotes a un tratamiento con hormonas de crecimiento como el BA que promueven el desarrollo de los brotes.

Cuadro 7. Promedio del número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en siete subcultivos en multiplicación *in vitro* con medio de agar

Subcultivos	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
2	5.09±3.16b	4.79±3.05b	1.86±0.45abc	1.86±0.44bc	0.39±0.09a	0.41±0.10a
3	5.40±3.67ab	4.75±2.86b	1.82±0.49abc	1.89±0.42bc	0.35±0.08c	0.36±0.06bc
4	6.04±4.05a	6.63±4.26a	1.94±0.38ab	2.02±0.26a	0.36±0.05bc	0.37±0.03bc
5	4.07±2.52c	4.87±2.98b	1.97±0.29a	1.98±0.25ab	0.38±0.05ab	0.39±0.02b
6	4.11±2.93c	4.08±2.18b	1.74±0.44c	1.83±0.28c	0.34±0.07cd	0.36±0.04c
7	4.25±2.67c	4.03±2.16bc	1.80±0.49bc	1.79±0.50c	0.32±0.08d	0.32±0.08d
8	4.08±2.58c	3.74±2.13c	1.77±0.47bc	1.90±0.40bc	0.34±0.07cd	0.37±0.03bc

Los valores son medias de ocho réplicas de 216 explantes. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

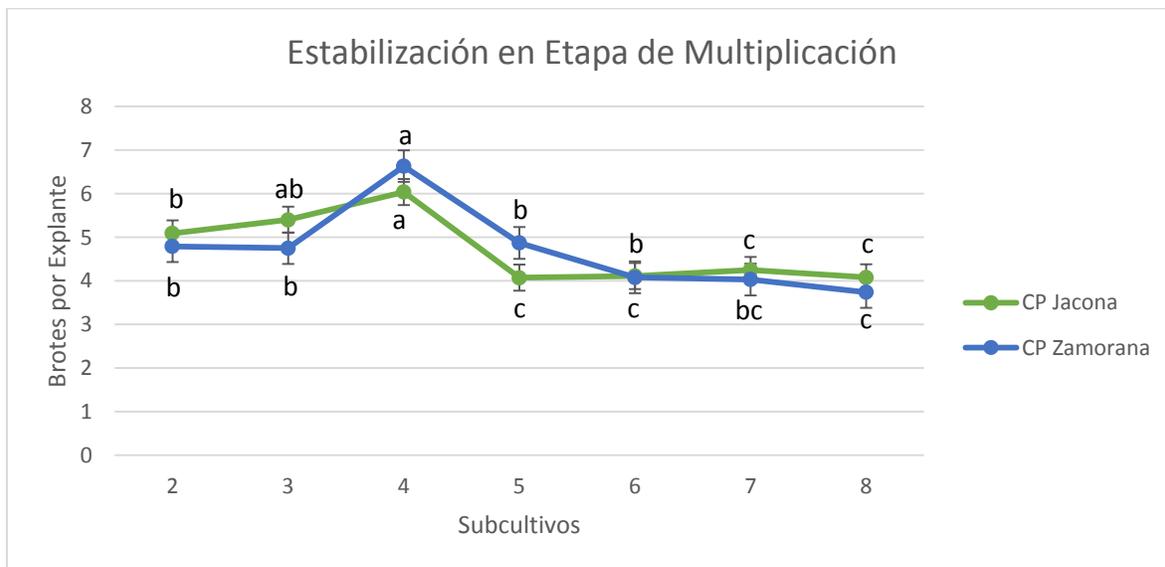


Figura 6. Periodo de estabilización *in vitro* de los cultivos a partir del subcultivo cinco de dos variedades de mexicanas de fresa

Hartmann *et al.*, (1990) indicaron que por lo general lleva de cinco a seis meses lograr una estabilización en el cultivo *in vitro*. En el caso del cultivo *in vitro* de fresa de las dos variedades mexicanas (CP Jacona y CP Zamorana), el periodo de la etapa de estabilización se llevó a partir del quinto subcultivo mensual (Figura 6) con un promedio de 4 brotes por explante. Corredoira *et al.*, (2011) señalan que en investigaciones realizadas con aliso, la estabilización de los cultivos tuvo lugar entre 5 y 12 meses del inicio del experimento, teniendo un crecimiento uniforme y altamente predecible. González *et al.*, (2007) mencionaron que una vez observada la estabilización *in vitro* de los cultivos de árboles de castaño, a partir del sexto mes con elevadas tasas de multiplicación (caracterizada por brotes abundantes y crecimiento normal del callo), los explantes fueron trasplantados a frascos de mayor tamaño. Por otro lado, McCown y McCown, (1987) mencionan que el cultivo de brotes estabilizados son una excelente fuente de células, tejidos y órganos, que pueden ser utilizados en otros procedimientos complejos, además una vez estabilizada la tasa de crecimiento y la multiplicación de los brotes en el cultivo *in vitro* puede ser optimizada la fase de producción. Martínez y Arena (1997) señalan que en *Nothofagus pumilio* el periodo de estabilización se encontró entre el cuarto y sexto mes del cultivo y se mantuvieron en un tratamiento compuesto de BTM (10 y 20 μM) 2iP de BA (0.05 μM) en cultivo *in vitro*. Ortiz *et al.* (2006) indicaron que en investigaciones realizadas en Lenga, se mantuvieron los brotes en un medio de cultivo L&D adicionado con caseína y putrescina en el medio de cultivo. La utilización de esta formulación logró iniciar y estabilizar los cultivos *in vitro* de 40 clones de Lenga. El proceso tuvo una duración aproximada de cuatro a cinco meses.

Cuadro 8. Promedio del número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en nueve tratamientos en multiplicación *in vitro* con medio de agar

Tratamiento	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
	1 ^Z	6.18±3.17a	6.01±3.30a	1.96±0.22b	1.92±0.20bc	0.38±0.04a
2 ^Y	6.88±4.75a	5.84±3.65a	1.72±0.37de	1.83±0.19bcd	0.36±0.07abc	0.38±0.05a
3 ^X	4.55±2.93b	6.23±3.42a	1.79±0.55bcde	1.97±0.25b	0.34±0.10bc	0.37±0.04a
4 ^W	4.43±2.95b	3.86±2.87cd	1.91±0.38bcd	1.83±0.52bcd	0.37±0.07ab	0.36±0.10ab
5 ^V	4.65±2.78b	5.26±3.12ab	1.74±0.18cde	1.78±0.18cd	0.37±0.04ab	0.37±0.03ab
6 ^U	1.55±1.54d	1.40±1.20e	2.19±0.65a	2.24±0.54a	0.33±0.10c	0.34±0.08b
7 ^T	3.83±2.48bc	3.41±2.53d	1.70±0.35e	1.70±0.47d	0.35±0.07abc	0.37±0.10ab
8 ^S	4.63±2.83b	4.15±2.34bcd	1.94±0.21bc	1.93±0.26bc	0.37±0.07ab	0.39±0.05a
9 ^R	3.13±2.75c	4.59±2.61bc	1.73±0.50de	1.84±0.30bcd	0.34±0.09bc	0.37±0.06ab

^Z BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.25 mg L⁻¹), ^Y BA (1.0 mg L⁻¹), ^X BA (0.25 mg L⁻¹), ^W BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.5 mg L⁻¹), ^V BA (1.0 mg L⁻¹) y AIB (0.1 mg L⁻¹), ^U MS sin hormonas (modificado), ^T BA (1.0 mg L⁻¹) y ANA (0.1 mg L⁻¹), ^S KIN (0.5 mg L⁻¹) y BA (0.25 mg L⁻¹) y ^R BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.01 mg L⁻¹). Los valores son medias de siete réplicas de 1296 explantes. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

6.2.2 Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa por subcultivos y tratamientos

En los resultados en etapa de multiplicación por subcultivos se puede ver que en la variable porcentaje de oxidación se observa una diferencia significativa (P ≤ 0.05), ya que el subcultivo siete presenta el mayor porcentaje de brotes oxidados con valores para CP Jacona de 68.85 % y para CP Zamorana de 65.74 % (Cuadro 9). George (1996) menciona que con frecuencia para

erradicar los efectos de la oxidación es necesario subcultivar al inicio de la siembra, a intervalos de uno a siete días, requiriéndose, normalmente, entre cinco y seis subcultivos en especies que sufren severos efectos de oxidación.

Con base en los resultados obtenidos en etapa de multiplicación por tratamiento podemos observar que en la variable porcentaje de oxidación se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) ya que el tratamiento cuatro compuesto por BA (0.5 mg L^{-1}) y AIB (0.5 mg L^{-1}) presentó el mayor porcentaje de brotes oxidados para ambas variedades con valores para CP Jacona de 76.38 % y para CP Zamorana de 66.66 % (Cuadro 10). Sugimura y Salvaña (1988) mencionan que en cultivo *in vitro* existe el problema de oxidación y proponen la inclusión de agentes antioxidantes como por ejemplo el Carbón Activado (CA) al medio de cultivo tiene un papel preponderante en la disminución de este problema. Las concentraciones de carbón activado que se han ocupado durante la proliferación van de entre 0.5 y 10 g L^{-1} , siendo más frecuentes las dosis de 2.0 y 3.0 g L^{-1} dependiendo la necesidad de la especie.

Los resultados observados para la etapa de multiplicación por subcultivos para el porcentaje de sobrehidratación donde los brotes presentaban características como hojas vidriosas y transparentes como un exceso de turgencia, se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para el subcultivo tres ya que presentó el valor más alto en la variedad CP Jacona con un porcentaje del 16.66 % y el subcultivo dos para la variedad CP Zamorana con un porcentaje del 15.74 % (Cuadro 9). Esto se puede deber a que los explantes sembrados en los primeros subcultivos absorben una mayor cantidad de nutrientes que les ofrece el medio. Arellano (1994) señala que la sobrehidratación es un desorden fisiológico y puede involucrar al calcio y potasio,

además del amonio durante la proliferación *in vitro* de vid. Por otra parte, Ziv *et al.*, (1987) aseguran que al incrementar el calcio en el medio de cultivo y disminuir el amonio, han podido resolver la sobrehidratación de los tejidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la etapa de multiplicación por tratamientos para porcentaje de sobrehidratación se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para el tratamiento siete ya que presentó el valor más alto en la variedad CP Jacona con un porcentaje del 25 % y el tratamiento nueve para la variedad CP Zamorana con un porcentaje del 19.44 % (Cuadro 10). Pedroza *et al.* (1997) señalaron que en experimentos realizados en estaticas (*Limonium sinuatum* Mill.), la presencia de sobrehidratación se eliminó completamente al utilizar concentraciones de agar en un 0.7 % en el medio de cultivo MS. Harazy *et al.* (1985) mencionan que la aparición de síntomas anormales como oxidación y vitrificación ha sido controlada parcialmente al subcultivar los explantes a un medio básico según la formulación MS (1962) y suplementado con 0.6 y 1.2 mg L⁻¹ de BA. Gaspar (1995) señala que existe una deficiente diferenciación celular que acompaña la vitrificación.

Cuadro 9. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en siete subcultivos en multiplicación *in vitro* con medio de agar

Subcultivos	Oxidación (%)		Sobrehidratación (%)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
2	44.44±49.92bc	49.07±50.22abc	6.48±24.73bc	15.74±36.58a
3	37.96±48.75c	38.88±48.97c	16.66±37.44a	14.81±35.69ab
4	50.00±50.23bc	57.40±49.67ab	13.88±34.74ab	5.55±23.01bc
5	57.40±49.67ab	47.22±50.15bc	5.55±23.01bc	6.48±24.73abc
6	49.07±50.22bc	48.14±50.19abc	6.48±24.73bc	2.77±16.51c
7	68.85±46.66a	65.74±47.67a	0.92±9.62c	14.81±35.69ab
8	63.34±48.87ab	60.98±50.03ab	4.99±15.68bc	5.29±25.12bc

Los valores son medias de ocho réplicas de 216 explantes. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 10. Porcentaje de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en nueve tratamientos en multiplicación *in vitro* con medio de agar

Tratamiento	Oxidación (%)		Sobrehidratación (%)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
1 ^Z	56.94±49.86a	61.11±49.09ab	5.55±23.06b	6.94±25.59ab
2 ^Y	31.94±46.95b	44.44±50.03abc	13.88±34.82ab	15.27±36.22ab
3 ^X	30.55±46.38b	36.11±48.36c	9.72±29.83b	9.72±29.83ab
4 ^W	76.38±42.76a	66.66±47.47a	8.33±27.83b	4.16±20.12b
5 ^V	65.27±47.94a	58.33±49.64abc	6.94±25.59b	11.11±31.64ab
6 ^U	56.94±49.86a	40.27±49.38bc	1.38±11.78b	2.77±16.54b
7 ^T	58.33±49.64a	61.11±49.09ab	25.00±43.60a	12.50±33.30ab
8 ^S	25.00±43.60b	38.88±49.09bc	2.77±16.54b	8.33±27.83ab
9 ^R	59.72±49.38a	52.77±50.27abc	1.38±11.78b	19.44±39.85a

^Z BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.25 mg L⁻¹), ^Y BA (1.0 mg L⁻¹), ^X BA (0.25 mg L⁻¹), ^W BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.5 mg L⁻¹), ^V BA (1.0 mg L⁻¹) y AIB (0.1 mg L⁻¹), ^U MS sin hormonas (modificado), ^T BA (1.0 mg L⁻¹) y ANA (0.1 mg L⁻¹), ^S KIN (0.5 mg L⁻¹) y BA (0.25 mg L⁻¹) y ^R BA (0.5 mg L⁻¹) y AIB (0.01 mg L⁻¹). Los valores son medias de siete réplicas de 1296 explantes. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.3 Multiplicación *in vitro* en SIT

Con base al experimento en multiplicación *in vitro* en SIT que se realizó utilizando tres tiempos de inmersión temporal que fueron 1 min/ 4 horas, 1 min/ 6 horas y 2 min / 12 horas (Figura 7), todos en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado al 100% suplementado con el tratamiento de BA (1.0 mg L^{-1}) y AIB (0.1 mg L^{-1}), para los explantes de fresa CP Jacona y CP Zamorana, se evaluaron el número de brotes y porcentaje de sobrehidratación. Los resultados obtenidos para el tiempo de inmersión de 1 min/ 4 horas en la variable respuesta número de brotes oscilaron en un promedio de 1 brote por explante para CP Jacona y 2 brotes por explante para CP Zamorana, mientras que para el porcentaje de sobrehidratación los valores obtenidos fueron 65 % para CP Jacona y 88 % para CP Zamorana. Para el tiempo de inmersión de 1 min / 6 horas en la variable número de brotes los valores fueron de 2.4 brotes por explante para CP Jacona y 3 brotes por explante para CP Zamorana y el porcentaje de sobrehidratación fue de 40 % para CP Jacona y un 45 % para CP Zamorana. En cuanto al tiempo de inmersión de 2 min / 12 horas para la variable número de brotes, los valores fueron de 4.3 brotes por explante para CP Jacona y 3.5 brotes por explante para CP Zamorana y el porcentaje de sobrehidratación fue de 58 % para CP Jacona y 63 % para CP Zamorana. Con base en estos resultados se optó por tomar para la siguiente fase del experimento los tiempos de inmersión de 1 min / 6 horas y 2 min / 12 horas , porque se registraron los valores más bajos para el porcentaje de sobrehidratación en el tiempo de 1 min / 6 horas y el mayor número de brotes por explante para el tiempo de 2 min / 12 horas y se descartó el tiempo de 1 min/ 4 horas ya que fue en ese tiempo donde se obtuvieron el menor número de brotes por explante y el mayor porcentaje de sobrehidratación. Fiorella y Flores (2007), señalan que en pruebas preliminares realizadas en medio líquido se observaron principios de sobrehidratación y oxidación leve en algunas vitroplantas en frambuesa, factores

que pueden haber influido en el porcentaje de brote por individuo, e indican que esos síntomas pueden sugerir que el periodo y frecuencia de inmersión fue mayor al requerido por la especie.



Figura 7. Cuarto de incubación SIT comparando tres tiempos de inmersión de 1 min/ 4 horas, 1 min/ 6 horas y 2 min/ 12 horas, etiquetados en la parte frontal del RITA[®], sembrados con explantes de fresa mexicana CP Jacona y CP Zamorana.

Para el establecimiento del experimento se determinó la reducción de los nitratos para evitar los niveles de sobrehidratación en los explantes de fresa, ya que como menciono Reyes (1992) menciono que para *Malus robusta* la adición de nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$), favoreció la formación del número de brotes, así como el tamaño, de igual manera observó que al incrementar la concentración de amonio en el medio de cultivo MS se aumentó el contenido de agua en los tejidos, lo que ocasionó daño a los brotes.

6.4 Disminución de Nitratos en el medio MS en etapa de multiplicación en SIT

6.4.1 Número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas de fresa en dos tiempos de inmersión y dos tratamientos en la concentración de nitratos en el medio MS

Con base a la etapa de multiplicación evaluando los dos mejores tiempos de inmersión temporal, en la disminución de nitratos en el medio Murashige y Skoog, (1962) modificado en la concentración de nitrato de amonio NH_4NO_3 , nitrato de potasio KNO_3 y nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al 70 %, comparándolo con la concentración normal de sales al 100 %, se observó que para la variable número de brotes en el tiempo de inmersión de 2 min/ 12 horas se obtuvo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), ya que fue el que obtuvo el mayor número de brotes para las dos variedades, CP Jacona de 5.95 y CP Zamorana de 6.60 brotes por explante, y para el tiempo de inmersión de 1 min/ 6 horas se obtuvieron también con diferencia significativa pero con menor número de brotes con valores para CP Jacona 3.88 y CP Zamorana 4.70 brotes por explante (Cuadro 11). Existió un tercer tiempo de inmersión de 1 min/ 4 horas donde se observó entre 1 y 2 brotes por explante y se descartó casi de inmediato por la poca brotación, cuando los explantes tienen un mayor contacto con el medio durante el transcurso del día, menor será el número de brotes y mayor será el tamaño y la sobrehidratación. Eide *et al.* (2003) señalaron que el SIT favorece el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala y en la actualidad, favorece al desarrollo de métodos para micropropagar especies que utilizan medios líquidos, ya que permiten el escalonamiento del proceso. Vilchez (2011), menciona que la variación de los intervalos de tiempos de inmersión cortos o distantes depende de las necesidades de la especie, en el caso de la raíz comestible ocumo blanco, el tiempo de inmersión de 5 min/ 4 horas y 10 min/ 4 horas produjo el mayor número de brotes para esta especie. Alvard *et al.*, (1993),

indicaron que la duración o tiempo de la inmersión del explante es probablemente el factor que merece mayor atención en el diseño de sistemas de cultivo basado en la inmersión temporal. Berthouly y Etienne (2005) señalan la existencia de un periodo de adaptación de las especies que se trabajan en SIT cuando se emplean bajas frecuencias de inmersión, debido a un estrés causado por la desecación de los brotes entre cada inmersión, que posteriormente es recuperado ya que cada especie responde de manera diferente. Fiorella y Flores (2007) mencionan que el uso del medio líquido también ha obtenido buenos resultados en mora de castilla *Rubus glaucus* y otras especies de mora, elevando la tasa de multiplicación.

Durante la etapa de multiplicación en SIT se decidió disminuir la concentración de los nitratos al 70 % para disminuir los efectos del nitrógeno en la sobrehidratación y así aumentar el número de brotes, en los resultados obtenidos se observa que en la variable número de brotes con el tratamiento al 70 % de nitratos (Figura 8 b) se obtuvo el mayor número de brotes con valores que van para CP Jacona de 5.53 y 7.95 brotes por explante, y para el tratamiento al 100 % de nitratos (Figura 8a), se obtuvieron valores de 4 brotes por explante, respectivamente (Cuadro 12). Esto puede ser debido a la concentración de los nitratos en un medio de cultivo MS al 100 % provoca una mayor sobrehidratación en los brotes y eso produce una menor brotación. Reyes (1992) encontró que la mejor fuente para la multiplicación de brotes y tamaño de *Malus robusta* fue el nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) y también observó que al incrementar la concentración de amonio en el medio de cultivo MS se aumentó el contenido de agua en los tejidos, lo que ocasionó daño a los brotes. Por otra parte, Parada y Villegas (2009), señalan que para la etapa de multiplicación de brotes en la especie Híbrido Almendro x Durazno H1 con el medio WPM que tiene niveles bajos de nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) más la adición de BA produjo el máximo número de

brotos y el mayor tamaño sin problemas de sobrehidratación. Por otro lado, Singha *et al.* (1990) mencionaron que se observó una reducción en el número de brotes proliferados de *Cydonia oblonga* cultivada *in vitro*, a medida que se aumentaban las concentraciones de calcio en el medio de cultivo. Margara (1988) menciona que probablemente con una mayor concentración de algunos elementos en el medio de cultivo MS, como, por ejemplo el nitrógeno y el potasio, tienden a inducir una acción estimulante sobre la formación de yemas y vitrificación. Sin embargo, Pierik (1990) señala que es importante señalar que el efecto de las sales minerales depende exclusivamente de la especie utilizada.



Figura 8. Evaluación del número de brotes de fresa mexicana utilizando dos tratamientos con reducción de nitratos en el medio de cultivo MS en SIT. a) Nitratos al 100 % y b) Nitratos al 70 %.

Con base en la variable respuesta tamaño del brote evaluando, dos tiempos de inmersión en SIT con reducción de los nitratos en el medio de cultivo MS al 70 %, se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, pero el tiempo de inmersión de 2 min/ 12 horas obtuvo el mayor tamaño por brote con valores para CP Jacona de 2.00 cm y CP Zamorana de 2.06 cm (Cuadro 11). Salazar y Hoyos (2007) señalan que una densidad de siembra baja en SIT sería inadecuada porque se subutilizarían los recipientes de cultivo y se ocasionaría pérdida de medio de cultivo, por otro lado si se opta por una alta densidad de siembra se podría generar un crecimiento limitado de los brotes y una baja en su proliferación. Fiorella y Flores (2007)

mencionan que la densidad de siembra por RITA[®] es otro factor por considerar, ya que en trabajos realizados con frambuesa utilizaron diez explantes por recipiente; sin embargo comentan desconocer estudios previos de la aplicación del sistema de inmersión temporal en frambuesa, que aporten información al respecto y concluyen que el tamaño alcanzado por las hojas y los ejes sugiere que una densidad muy alta podría causar problemas de autosombreo entre las vitroplantas, lo que dificultaría su desarrollo. Es por eso que en este experimento se utilizó un número razonable que constó de 10 explantes de fresa por recipiente, para obtener un buen rendimiento en la generación de nuevos brotes, así como un buen desarrollo y no influir un estrés por competencia de nutrientes en los explantes, esto para no generar una pérdida en los medios de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados. Vilchez (2011) señala que con la densidad de 9 brotes por recipiente en ocumo se obtuvo el máximo valor de brotes totales, y una densidad de entre 6 y 12 brotes por recipiente se obtuvieron el mayor tamaño de brotes. Esto sugiere que con dicha densidad se logró mayor eficiencia para la multiplicación *in vitro* de Ocumo en SIT tipo RITA[®].

De acuerdo a los resultados obtenidos para la variable tamaño del brote por tratamiento con la disminución de nitratos, se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, el tratamiento con la reducción al 70 % de nitratos en el medio de cultivo MS, obtuvo el mayor tamaño por brote con valores para CP Jacona de 1.89 cm y CP Zamorana de 1.99 cm (Cuadro 12). Fiorella y Flores (2007) mencionan que en el caso de especies similares a la fresa, como lo es la frambuesa, se utilizó el medio líquido en sistema de inmersión temporal, con una frecuencia de inmersión utilizada de 12 horas por un periodo de 2 minutos en un medio de cultivo MS completo, complementado con BA (2.0 mg L^{-1}) + ácido giberélico (AG_3) (1 mg L^{-1}) + ácido

ascórbico (100 mg L^{-1}) y 30 g L^{-1} de sacarosa, con un pH de 5.5 y los brotes generados en este sistema y en ese tiempo de inmersión se observaron con mayor vigor y esto podría presentar ventajas en la etapa de aclimatación. Por otra parte, Burch y McGaw (1993) señalan que el incremento endógeno de citoquininas produce cambios en el incremento del crecimiento del brote o en el desarrollo de la senescencia de las hojas.

Con base en los resultados obtenidos en la variable diámetro de la base del brote, obtenidos por tiempos de inmersión y con la disminución de nitratos, se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, pero el tiempo de inmersión de 2 min/ 12 horas obtuvo el mayor diámetro de la base con valores de 0.37 cm para ambas variedades (Cuadro 11).

De acuerdo con el Cuadro 12, los resultados obtenidos para el diámetro de la base del brote por tratamiento en la disminución de nitratos en el MS en SIT, los resultados demostraron una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para la variedad CP Zamorana, ya que obtuvo los valores más altos en cuanto al diámetro de la base para los dos tratamientos con valores de 0.36 cm al 70 % y 0.34 cm al 100 % y para la variedad CP Jacona el diámetro fue de 0.33 cm para ambos tratamientos.

Cuadro 11. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos tiempos de inmersión en multiplicación *in vitro* con medio líquido

Tiempos de inmersión	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
1min/6horas	3.88±2.70b	4.70±3.24b	1.60±0.70b	1.71±0.67b	0.28±0.13b	0.33±0.12b
2min/12horas	5.95±2.34a	6.60±4.22a	2.00±0.22a	2.06±0.35a	0.37±0.05a	0.37±0.07a

Los valores son medias de tres replicas con 120 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 12. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos tratamientos con disminución de nitratos en multiplicación *in vitro* con medio líquido

Tratamientos	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
70 %	5.53±2.28a	7.95±3.64a	1.89±0.16a	1.99±0.19a	0.33±0.04a	0.36±0.05a
100 %	4.30±2.99b	3.35±2.39b	1.71±0.76b	1.78±0.76b	0.33±0.14a	0.34±0.14a

Los valores son medias de tres replicas con 120 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.4.2 Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa en dos tiempos de inmersión y dos tratamientos en la concentración de nitratos

Los resultados obtenidos durante la etapa de multiplicación con la disminución de nitratos y en dos tiempos de inmersión, podemos observar que la variable porcentaje de oxidación mostro una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), ya que la variedad CP Zamora presenta el mayor nivel de brotes oxidados para los dos tiempos de inmersión, con valores que van para el tiempo de 1 min/ 6 horas con un 50 % y para el tiempo de 2 min/ 12 horas con un 68.33 % (Figura 10).

Los resultados obtenidos en la de multiplicación y con disminución de nitratos por tratamientos, se puede observar que en la variable porcentaje de oxidación existió una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para la variedad CP Zamorana, ya que con los dos tratamientos se presentaron los mayores valores de oxidación, de 48.33 % para el tratamiento al 70 % y del 70 % para el tratamiento al 100 %, en cuanto a la concentración de nitratos en el medio MS se refiere (Figura 11). Autores como Anderson (1975) indica que los altos niveles de potasio (K) en el medio de cultivo MS acentuó la oxidación en los brotes de *Rhododendron*. El oscurecimiento no fue

evidente cuando se redujo el KNO_3 a la mitad de su concentración normal. También, Hohtola (1988), menciona que los explantes de *Pinus sylvestris* se oscurecieron y necrosaron cuando se cultivaron en un MS normal al 100%. George (1996) y Cassells y Curry (2001) determinan que la oxidación de los tejidos con frecuencia es más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro, lo que implica que el mismo puede ser causado por el uso inapropiado de alguno de los nutrientes empleados en el medio de cultivo. Con frecuencia la oxidación es menor en un medio diluido que en uno alto en sales, como el MS.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa de multiplicación con dos tiempos de inmersión y disminución de nitratos en SIT, para la variable porcentaje de sobrehidratación (Figura 9), se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), para la variedad CP Zamorana, ya que presentó los valores más altos en los dos tiempos de inmersión con un porcentaje del 38.33 % para el tiempo de 1 min/6 horas y 53.33 % en el tiempo de 2 min/12 horas, y para la variedad CP Jacona se obtuvo un porcentaje del 33.33 % para los dos tiempos (Figura 10).



Figura 9. Porcentaje de sobrehidratación evaluando dos tiempos de inmersión en medio líquido en SIT con brotes de fresa mexicana. a) Tiempo de inmersión de 1 min/ 6 Horas y b) Tiempo de inmersión de 2 min/ 12 horas.

Con base en los resultados obtenidos para la etapa de multiplicación por tratamiento con disminución de nitratos en SIT, en la variable porcentaje de sobrehidratación se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), para ambas variedades respectivamente. El tratamiento al 100 % de nitratos en el medio de cultivo MS presentó los valores más altos de brotes sobre hidratados, para CP Jacona con un porcentaje del 41.66 % y para la variedad CP Zamorana con un porcentaje del 65 % (Figura 11), esto se puede deber a que los nitratos inducen el engrosamiento y sobrehidratación de los brotes en un medio de cultivo MS. Pérez y Burgos (2000) mencionan que un factor importante es el medio de cultivo utilizado, ya que en especies como *Prunus* son sensibles a altas concentraciones de nitratos de amonio en el medio de cultivo. Debergh *et al.* (1988), Villegas (1990) y Debergh *et al.* (1992), señalaron que la sobrehidratación, tiene diversas causas y los síntomas característicos no son idénticos en todas las plantas, estos pueden ser evitados si se controla la composición del medio de cultivo, la calidad del brote y las condiciones ambientales. Singha *et al.* (1990) indicaron que la sobrehidratación se puede reducir si se incrementan las concentraciones de calcio en el medio de cultivo, sin embargo lo anterior puede ser un efecto directo y ocurrir un crecimiento del explante que está cambiando simultáneamente. Chu *et al.*, (1993) evaluaron el efecto del medio líquido sobre el crecimiento de rosa miniatura *in vitro*, obteniendo una reducción en la sobrehidratación, al mantener en flote los explantes sobre el medio de cultivo, durante dos semanas, mejorando así la transpiración y de esta manera disminuyó la sobrehidratación de los tejidos. Kevers y Gaspar (1986), Pasqualetto *et al.* (1988) y Zimmerman *et al.* (1988), señalaron que se ha encontrado un mayor contenido de potasio en tejidos sobrehidratados en especies como el clavel, manzano y petunia, por otro lado el uso del calcio en una alta concentración produjo sobrehidratación en los tejidos en manzano, y en bajas concentraciones de calcio provocó efectos de sobrehidratación en

especies como petunia y clavel. Arellano (1994), señala que un factor importante que puede inducir el porcentaje de sobrehidratación en vitroplántulas de vid, es el hecho de que la mayoría de los brotes crecieron o se desarrollaron inmersos en medio líquido, además que a mayor concentración de calcio en el medio de cultivo, se disminuye la sobrehidratación en brotes de vid, mostrando de esta manera que en los medios con calcio se presentó un 23 % de sobrehidratación en comparación del tratamiento que no contenía al calcio con un 31 %.

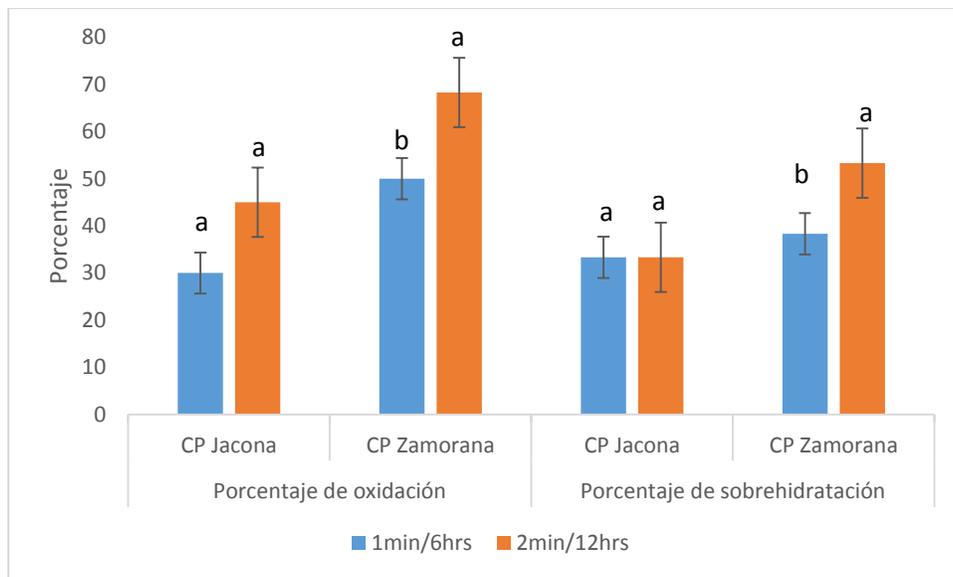


Figura 10. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluados después de 30 días en dos tiempos de inmersión en multiplicación *in vitro* con medio líquido. Los valores son medias de tres replicas con 120 explantes cada una (Tukey, $P \leq 0.05$).

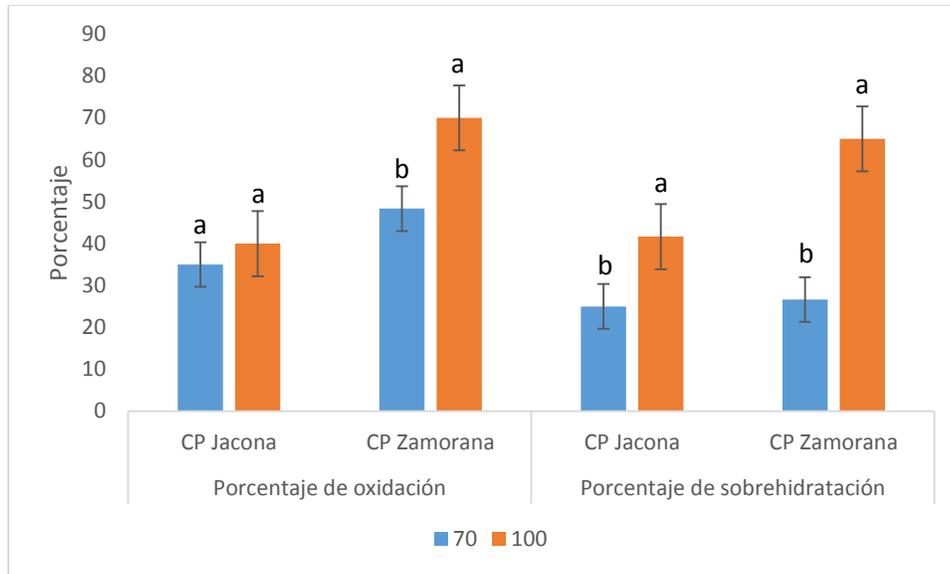


Figura 11. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluados después de 30 días en dos tratamientos, con disminución de nitratos en multiplicación *in vitro* con medio líquido. Los valores son medias de tres replicas con 120 explantes cada una (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.5 Uso de Reguladores de Nueva Generación en etapa de multiplicación en SIT vs ST

6.5.1 Efecto de los Epibrassinolide® (BR) sobre el número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas de fresa

En esta etapa se utilizó el mejor tratamiento de multiplicación en semisólidos, incorporando tres tratamientos adicionales con BR para ST y para el SIT se evaluaron los mismos tratamientos con la reducción al 70 % de nitratos del MS (1962), con el mejor tiempo de inmersión evaluado de 2 min/ 12 horas. Para la etapa de multiplicación comparando los sistemas de micropropagación SIT y ST usando la hormona de crecimiento de nueva generación BR, se observó que en la variable número de brotes ambas variedades obtuvieron diferencia significativa ($P \leq 0.05$), donde el sistema SIT fue el que obtuvo la mayor brotación para CP Jacona de 5.08 y CP Zamorana de 5.12 brotes por explante, mientras que para el sistema ST

mostro un menor número de brotes con valores para CP Jacona 2.30 y CP Zamorana 2.28 brotes por explante (Cuadro 13). Sakurai y Fujioka (1993) mencionan que en diferentes cultivos de importancia económica, los Brasinoesteroides se caracterizan por estimular el crecimiento vegetal, aumentar el rendimiento de la producción de biomasa, acelerar la maduración de frutos, y además promueve y estimula el alargamiento, así como inducir la división celular. Preil (2005), señala que el uso de medios de cultivos líquidos es una buena alternativa para reducir los costos en el material utilizado y optimiza la automatización de la micropropagación en las especies. Por otra parte, algunos investigadores como Pérez *et al.* (1998) y Adelberg *et al.* (2007) indican que al utilizar el método de ST en un protocolo de micropropagación, la fase de multiplicación, de cualquier especie, resulta ser la más costosa debido al uso de agentes gelificantes y mano de obra especializada. Pérez *et al.* (1998) señalan que los resultados obtenidos en diversas investigaciones favorecen la elección de medios de cultivo líquidos para el establecimiento de un protocolo más sencillo, eficiente y rentable en la fase de multiplicación; ya que la exclusión del agar o cualquier otro agente gelificante en los medios de cultivo puede disminuir hasta un 60% los costos del medio. Por otra parte, el uso de medios líquidos abre la posibilidad de la automatización de la micropropagación.

Los resultados obtenidos para el tamaño del brote en ambos sistemas, demuestran que el sistema ST fue el que obtuvo el mayor tamaño por brote para ambas variedades con valores que son para CP Jacona de 2.14 cm y CP Zamorana de 2.11 cm, mientras que en el SIT se observaron valores para CP Jacona de 2.07 cm y CP Zamorana de 2.08 cm. Ambos sistemas presentaron un tamaño mínimo de 2 cm (Cuadro 13), lo cual puede ser debido a que si hay menor número de brotes en ST, mayor será el desarrollo en los nuevos brotes. Albany *et al.* (2005) señalaron que el cultivo

en sistema de inmersión temporal promueve un mayor desarrollo de los brotes y son homogéneos, que en algunos casos puede llegar a ser excesivo. Vilchez (2011), indica que la mayor altura de los nuevos brotes en especies como en el ocumo fue en los SIT tipo RITA[®] esto pudo ser producto de una mayor disponibilidad de los nutrientes. Por su lado, Smith y Spoomer, (1995) mencionan que la absorción de los nutrientes se encuentra reprimida en los medios de cultivo semisólidos en un sistema tradicional. El tamaño de los nuevos brotes de fresa generados en SIT desde el punto de vista práctico la altura antes mencionadas es la recomendable, ya que facilita su fácil manejo y a que el número de brotes es mucho mayor y su tamaño es homogéneo. Así mismo, Pérez *et al.* (1998) mencionaron que al existir un mayor número de brotes en los recipientes de micropropagación se genera un mayor estrés en el brote, debido a la competencia por nutrientes y solo tiende a desarrollarse. Etienne y Berthouly (2002) destacaron que la densidad de explantes como el tamaño del explante es un factor determinante en un protocolo de micropropagación, pero que ha sido poco estudiado en sistemas de inmersión.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la variable diámetro de la base del brote comparando los dos sistemas de micropropagación SIT y ST con el uso del BR, se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para la variedad CP Jacona, pero ambos sistemas mostraron los valores más altos para el diámetro de la base pero en diferente variedad, para el ST la variedad CP Jacona con 0.38 cm y para el SIT la variedad CP Zamorana con 0.37 cm (Cuadro 13).

Cuadro 13. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación *in vitro* en medio líquido y agar con BR

Sistema	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
SIT	5.08±3.44a	5.12±3.40a	2.07±0.25b	2.08±0.23a	0.36±0.04b	0.37±0.04a
ST	2.30±1.29b	2.28±1.54b	2.14±0.30a	2.11±0.36a	0.38±0.05a	0.36±0.08a

Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Para la etapa de multiplicación por tratamientos, usando la hormona de crecimiento de nueva generación BR comparando los sistemas de micropropagación SIT y ST, se puede observar que, en la variable número de brotes con el tratamiento T2 BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}) se observa que se tiene el mayor número de brotes con valores que van para CP Jacona de 5.06 y para CP Zamorana de 5.35 brotes por explante y el menor número de brotes se encontró en el tratamiento T3 BR (0.02 mg L^{-1}) donde se obtuvieron valores de 1.36 brotes por explante para ambas variedades, respectivamente, (Cuadro 14). Mandava (1988) indicó que en varios sistemas la utilización de los Brasinoesteroides interactúan en forma sinérgica con las auxinas, y promueve la división celular además de que actúa de forma aditiva con las giberelinas.

De acuerdo con los resultados para la variable tamaño del brote por tratamiento (Figura 12), el tratamiento T3 BR (0.02 mg L^{-1}), registró una diferencia en el mayor tamaño por brote con valores para CP Jacona 2.34 cm y CP Zamorana 2.33 cm (Cuadro 14). Salgado *et al.* (2008) señalaron que los Brasinoesteroides son metabolitos vegetales que tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas. Núñez *et al.* (2005) mencionaron que en trabajos realizados con Brasinoesteroides en frutales como el plátano en fase de multiplicación

combinado con BA, presentó indicadores superiores en el crecimiento de las plantas *in vitro*. Jiménez (2002) menciona que en hortalizas, como la lechuga, el uso de Brasinoesteroides estimuló la brotación.

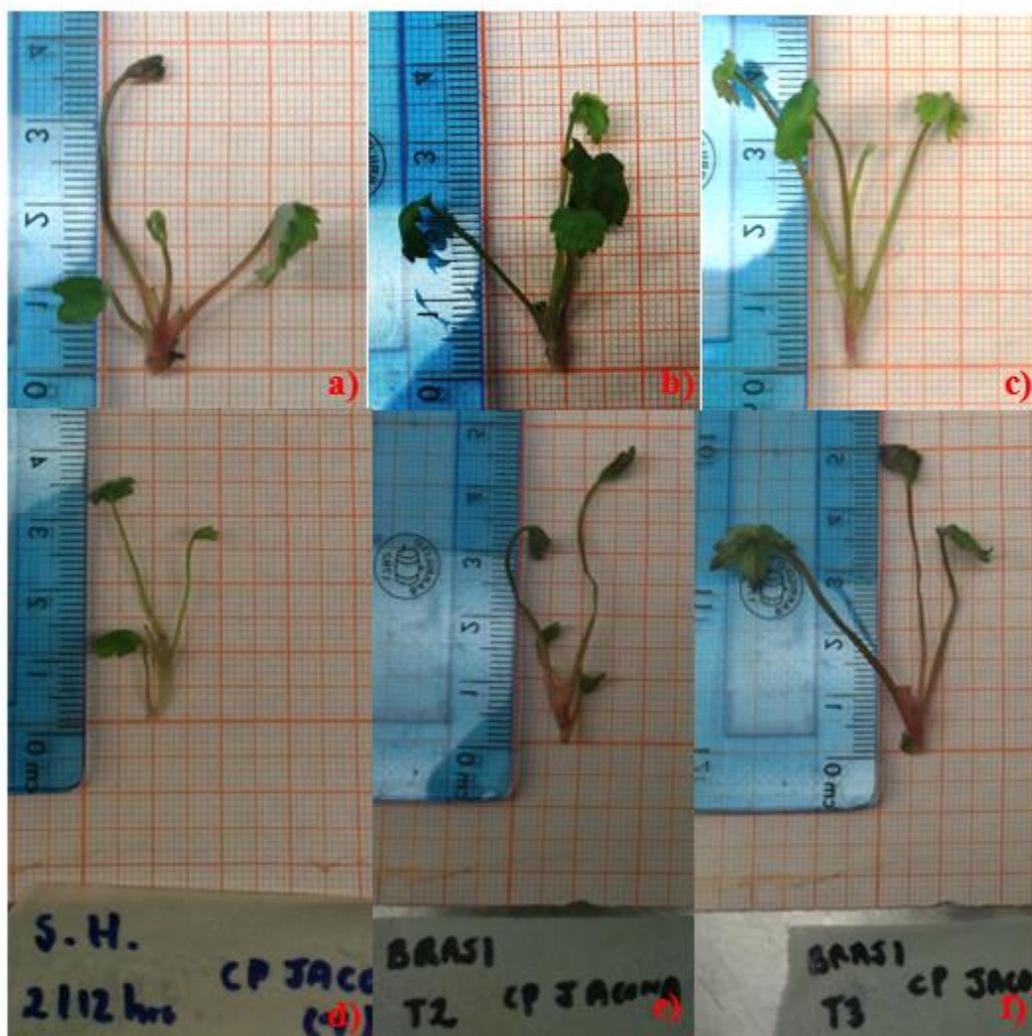


Figura 12. Tamaño del brote evaluando tres tratamientos con BR en SIT utilizando vitroplántulas de fresa mexicana. a) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), b) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}), c) CP Zamorana BR (0.02 mg L^{-1}), d) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), e) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}) y f) CP Jacona BR (0.02 mg L^{-1}).

Para el diámetro de la base del brote por tratamiento, los resultados demostraron que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, como se muestra en la Figura 13,

donde el tratamiento T1 BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) obtuvo el mayor valor para la variedad CP Zamorana con 0.38 cm , los demás tratamientos con valores de entre 0.36 a 0.37 cm (Cuadro 14).



Figura 13. Diámetro del brote evaluando tres tratamientos con BR en SIT utilizando vitroplántulas de fresa mexicana. a) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), b) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}), c) CP Zamorana BR (0.02 mg L^{-1}), d) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), e) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}) y f) CP Jacona BR (0.02 mg L^{-1}).

Cuadro 14. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en tres tratamientos con BR en multiplicación *in vitro*

Tratamiento	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
T1 ^Z	4.65±2.82a	4.40±2.65b	1.99±0.23b	1.98±0.19b	0.37±0.05a	0.38±0.08a
T2 ^Y	5.06±3.10a	5.35±3.32a	1.98±0.19b	1.98±0.33b	0.37±0.04a	0.36±0.06a
T3 ^X	1.36±0.60b	1.36±0.60c	2.34±0.24a	2.33±0.23a	0.37±0.04a	0.36±0.04a

^Z BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹), ^Y BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + BR (0.02 mg L⁻¹) y ^X BR (0.02 mg L⁻¹). Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

6.5.2 Efecto de BR en el porcentaje de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa

En los resultados para la variable porcentaje de oxidación se observa una diferencia significativa (P ≤ 0.05), para ambas variedades. El sistema que presenta el mayor porcentaje de brotes oxidados fue el ST donde la variedad CP Jacona presentó un 50 % y la variedad CP Zamorana un 51.11 % (Cuadro 15). Esto se puede deber al momento de disectar los explantes de la parte basal y ser trasplantados en el medio semisólido, y estar en contacto permanente provoca un oscurecimiento en el explante.

En los porcentajes de sobrehidratación se observa una diferencia significativa (P ≤ 0.05) para la variedad CP Jacona, donde el sistema SIT fue el que presentó mayor porcentaje de sobrehidratación con un 6.66 % para ambas variedades (Cuadro 15).

Cuadro 15. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación *in vitro* con medio líquido y de agar

Sistemas	Porcentaje de oxidación		Porcentaje de sobrehidratación	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
SIT	23.33±42.53b	24.44±43.21b	6.66±25.08 ^a	6.66±25.08a
ST	50.00±50.28a	51.11±52.45a	0.00±0.00b	2.22±14.82a

Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Para los tratamientos utilizados con la hormona de nueva generación BR, en ambos sistemas para el caso de oxidación, se observó que el tratamiento T1 BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) fue el que reportó mayores niveles de oxidación para ambas variedades, con valores para CP Jacona de 55 % y CP Zamorana de 65 % y el que menor nivel de oxidación se obtuvo para el tratamiento T3 BR (0.02 mg L⁻¹), con valores para CP Jacona de 21.66 % y CP Zamorana de 15 % (Cuadro 16). Esto puede ser debido a que el uso de Epibrassinolide[®] por sí solo, y complementado, con otras hormonas de crecimiento en el medio de cultivo reduce los niveles de oxidación. Brisson *et al.* (1988) mencionan que en el cultivo de *Chrysosplenium americanum* se produjo el oscurecimiento de brotes cuando se utilizó Bencil-aminopurina (BA), para evitar el problema estos investigadores sustituyeron la BA por su ribósido (BAR) y este cambio redujo a la mitad el número de explantes oscurecidos. Se puede decir que la aparición de la oxidación en plantas de fresa se deba al uso del BA en cultivo *in vitro*. Por otra parte, Cañas y Benbadis (1988) evitaron los problemas de oxidación, en callos de olivo, al sustituir el 2,4-D por el Ácido indol butírico AIB. En este caso, al utilizar AIB con BR se observa notoriamente que los efectos de oxidación se reducen considerablemente en cada sistema de micropropagación.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los tratamientos compuestos con BR en ambos sistemas, para la variable porcentaje de sobrehidratación no se observa diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ninguna variedad, pero el tratamiento T2 fue el que registró un mayor porcentaje de sobrehidratación con valores para CP Jacona un 6.66 % y para CP Zamorana un 8.33 %. No hubo diferencias significativas entre tratamientos en la variable porcentaje de sobrehidratación (Cuadro 16).

Cuadro 16. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días, en tres tratamientos con BR en multiplicación *in vitro*

Tratamientos	Porcentaje de oxidación		Porcentaje de sobrehidratación	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
T1 ^Z	55.00±50.16a	65.00±48.09a	0.00±0.00a	1.66±12.90a
T2 ^Y	33.33±47.53b	33.33±50.97b	6.66±25.15a	8.33±27.87a
T3 ^X	21.66±41.54b	15.00±36.00b	3.33±18.10a	3.33±18.10a

^Z BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹), ^Y BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + BR (0.02 mg L⁻¹) y ^X (0.02 mg L⁻¹). Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.5.3 Efecto del 1-Triacontanol (TRIA) sobre el número, tamaño y diámetro del brote de dos variedades mexicanas de fresa

Los resultados para la etapa de multiplicación comparando dos sistemas de micropropagación SIT y ST usando la hormona de crecimiento de nueva generación TRIA, se observó que en la variable número de brotes, ambas variedades obtuvieron diferencia significativa ($P \leq 0.05$), donde el sistema SIT fue el que obtuvo el mayor número de brotes para CP Jacona de 7.12 y CP Zamorana de 7.04 brotes por explante, y el sistema ST obtuvo el menor número de brotes con

valores para CP Jacona 2.46 y CP Zamorana 2.53 brotes por explante (Cuadro 17). Esto se puede deber a que el uso de 1-Triacontanol complementado con otras hormonas de crecimiento en el medio de cultivo líquido, estimula la brotación con inmersiones en intervalos de tiempo adecuados como el de 2 min/ 12 horas. Vilchez (2011) señala que el cultivo en sistema de inmersión temporal tipo RITA[®] en la fase de multiplicación favoreció el crecimiento y la proliferación de los brotes en especies como el ocumo blanco. Por otra parte, Alvard *et al.* (1993) mencionan que la micropropagación en SIT implica una reducción en los costos de producción, el coeficiente de multiplicación se incrementan, se encuentra un mejor porcentaje de enraizamiento y supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatización, comparada con la micropropagación convencional. Sin embargo, Boxus *et al.* (1984) indicaron que al utilizar el ST *in vitro*, la fresa demuestra que las plantas obtenidas son más uniformes, presentan un mayor número de estolones, tienen mayor sobrevivencia en campo y el rendimiento de frutos se incrementa en un 24% respecto de las plantas propagadas por el método tradicional. Por otra parte, Swartz y Lindstrom (1986) señalan que las plantas de fresa generadas en micropropagación son fenotípicamente idóneas y sobreviven más en el campo.

Durante el análisis de los resultados para el tamaño del brote, no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las variedades, pero en el sistema SIT se obtuvo el mayor tamaño por brote para ambas variedades con valores para CP Jacona de 2.02 cm y para CP Zamorana de 2.04 cm, presentando un tamaño homogéneo en los brotes generados en SIT y para el ST se observaron valores para CP Jacona de 1.90 cm y CP Zamorana de 2.01 cm (Cuadro 17). Fiorella y Flores (2007) señalan que en trabajos realizados con frambuesa compararon ambos sistemas de micropropagación con las mismas condiciones, obteniendo como resultado que el sistema de

inmersión temporal mostró un promedio de longitud por explante 2.15 cm mayor al sistema de medio semisólido 1.90 cm.

Con base en la variable diámetro de la base del brote con el uso de TRIA, se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para la variedad CP Zamorana, donde el sistema SIT fue el que presento los valores más altos para el diámetro de la base para ambas variedades, para CP Jacona con 0.37 cm y para CP Zamorana con 0.38 cm (Cuadro 17).

Cuadro 17. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación *in vitro* con medio líquido y agar con TRIA

Sistema	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
SIT	7.12±3.30a	7.04±2.64a	2.02±0.35a	2.04±0.16a	0.37±0.06a	0.38±0.04a
ST	2.46±1.23b	2.53±1.11b	1.90±0.52a	2.01±0.39a	0.35±0.08a	0.36±0.07b

Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

El uso del TRIA en la multiplicación no presentó diferencia en los tres tratamientos pero si entre sistemas, sin embargo el tratamiento con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ fue el que tiene el mayor número de brotes con valores que van para CP Jacona de 5.03 y para CP Zamorana de 4.81 brotes por explante, no se observó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las dos variedades y tratamientos (Cuadro 18). Khan *et al.* (2007) menciona que el uso del Triacontanol favorece mucho en la inducción de nuevas ramificaciones en las plantas en diversas especies. Santos *et al.* (2001) indicaron que el uso de Triacontanol en trabajos referentes al cultivo de tejidos, son utilizados para estimular la multiplicación en diversas especies de cultivos como la manzana, cerezas, etc., que con la ayuda

de agentes hormonales como el AIB mejora los efectos del Triacantanol. Fraternali *et al.* (2002) señalan que el uso del Triacantanol en varias concentraciones en etapa de multiplicación *in vitro* de *Bupleurum fruticosum* L. mostró buenos resultados en diversas variables evaluadas, pero la concentración de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Triacantanol en un medio de cultivo MS, fue el que obtuvo el mayor número de brotes de esta especie. Santos *et al.* (1999) mencionan que el tratamiento de Triacantanol con una concentración de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ fue el que mejor resultado obtuvo para la etapa de multiplicación en *Melissa officinalis* L. en cultivo *in vitro*. Fraternali *et al.* (2003) observaron que en investigaciones realizadas en *Thymus mastichina*, utilizando la hormona de Triacantanol en la fase de multiplicación con una concentración de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ resultó ser la concentración óptima para proliferar esta especie.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la variable tamaño del brote por tratamiento, no se observó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, como se aprecia en la Figura 14, pero el tratamiento de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtuvo el mayor tamaño por brote con valores para CP Jacona 2.04 cm y CP Zamorana 2.10 cm (Cuadro 18). Ries (1985), menciona que la hormona de Triacantanol es un componente natural de la cera epicuticular, que tiene la función de aumentar el crecimiento vegetativo en los brotes. Por su parte, Chen (2002) menciona que es importante el uso de Triacantanol, ya que también ayuda en los procesos fisiológicos en las plantas como en el arroz que regula los procesos de la fotosíntesis. Houtz *et al.* (1985) señalan que en investigaciones realizadas en *Chlamydomonas* y con el tratamiento donde se usaba la hormona de Triacantanol en una concentración de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ fue el que mejores resultados mostró para el estímulo en el aumento del crecimiento celular así como también ayuda a la asimilación fotosintética de CO_2 . Khandaker *et al.* (2013) mencionaron que el uso del Triacantanol en

concentraciones de 1.0 y 2.5 mg L⁻¹ estimula el crecimiento, mejora la floración, y mejora la calidad de las plantas de *Bougainvillea glabra* var. “Elizabeth Angus” en macetas. Fraternali *et al.*, (2003), observaron que el uso del Triacontanol tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de plántulas micropropagadas de *Thymus mastichina*, obteniendo los brotes más largos en una concentración de 20 µg L⁻¹ Triacontanol en el medio de cultivo. En otra investigación Fraternali *et al.* (2002) mencionan que el uso del Triacontanol con una concentración de 10 µg L⁻¹ en el medio de cultivo, para *Bupleurum fruticosum*, fue la concentración óptima para obtener los brotes con mayor tamaño. Por otro lado, Naeem *et al.*, (2011), indicaron que el Triacontanol también puede ser utilizado en aplicaciones foliares mejorando significativamente el crecimiento y los valores del rendimiento global del cultivo, como también mejora la fotosíntesis y otros atributos fisiológicos con una concentración de Triacontanol (10⁻⁶ M) en la especie *Mentha arvensis* L. Confirmando lo antes mencionado, Naeem *et al.* (2011) mencionan que el Triacontanol aplicado en concentraciones nanomolares mejora el crecimiento de la planta y las actividades fisiológicas en diversos grupos de plantas, y una alternativa muy importante es la aplicación foliar del Triacontanol, porque ha demostrado ser una técnica adecuada para mejorar el crecimiento, el rendimiento y la calidad de varios cultivos, incluyendo hortalizas, cultivos hortícolas, medicinales y plantas aromáticas.



Figura 14. Tamaño del brote evaluando tres tratamientos con TRIA en SIT utilizando vitroplántulas de variedades mexicanas de fresa. a) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), b) CPJ acona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), c) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), d) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), e) CPJ Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) y f) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).

Los diámetros basales presentes en las plantas de fresa sembradas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de TRIA, al igual que en el caso del BR, no se encontraron diferencias significativas, para ambas variedades (Figura 15); sin embargo, el tratamiento de $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ fue el que mayor valor tuvo para la variedad CP Zamorana con 0.38 cm ; los demás tratamientos oscilaron con valores de entre 0.35 a 0.37 cm respectivamente (Cuadro 18). Esto se

puede deber a que los explantes en SIT se encuentran con un mayor intercambio gaseoso lo que hace que la planta sea más autótrofa.



Figura 15. Diámetro del brote evaluando tres tratamientos con TRIA en SIT utilizando vitroplántulas de variedades mexicanas de fresa. a) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), b) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \mu\text{g L}^{-1}$), c) CP Jacona BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), d) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), e) CPJ Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) y f) CP Zamorana BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Cuadro 18. Número, tamaño y diámetro del brote de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en tres tratamientos con TRIA en multiplicación *in vitro*

Tratamiento	N° de brotes		Tamaño del brote (cm)		Diámetro de la base del brote (cm)	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^Z	4.55±3.92a	5.05±3.40a	1.89±0.54a	2.00±0.16a	0.37±0.08a	0.38±0.04a
5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^Y	4.80±3.32a	4.50±2.65a	1.95±0.42a	1.98±0.35a	0.37±0.07a	0.37±0.06a
10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^X	5.03±2.95a	4.81±3.03a	2.04±0.34a	2.10±0.34a	0.35±0.06a	0.37±0.06a

^Z BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (2 $\mu\text{g L}^{-1}$), ^Y BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) y ^X BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

6.5.4 Efecto del (TRIA) en el porcentajes de oxidación y sobrehidratación de dos variedades mexicanas de fresa.

En la variable porcentaje de oxidación se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades y sistemas, donde el sistema que presenta el mayor porcentaje de brotes oxidados con valores que van para CP Jacona de 70 % y para CP Zamorana de 75.55 % es el sistema ST. En el caso del SIT el porcentaje de oxidación se encuentra por debajo del 50 % para ambas variedades (Cuadro 19).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la etapa de multiplicación, comparando los sistemas de micropropagación SIT y ST, suplementando la hormona de crecimiento TRIA en el medio de cultivo, en la variable porcentaje de sobrehidratación se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, donde el sistema SIT fue el que presento mayor porcentaje de sobrehidratación con un 34.44 % para CP Jacona y 24.44 % para CP Zamorana (Cuadro 19).

Cuadro 19. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días en dos sistemas de micropropagación en multiplicación *in vitro* con medio líquido y agar

Sistemas	Porcentaje de oxidación		Porcentaje de sobrehidratación	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
SIT	40.00±49.26b	31.11±46.55b	34.44±47.78 ^a	24.44±43.21a
ST	70.00±46.08a	75.55±43.21a	0.00±0.00b	0.00±0.00b

Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas en columnas son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Los tratamientos con TRIA utilizados demostraron que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, pero se observó que el tratamiento con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ fue el que reporto mayores niveles de oxidación para ambas variedades con valores para CP Jacona de 65 % y para CP Zamorana de 63.33 % y el que menor nivel de oxidación obtuvo fue el tratamiento con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ con valores para CP Jacona de 48.33 % y CP Zamorana de 50 % (Cuadro 20).

Para la sobrehidratación de las plantas usadas en los diferentes tratamientos, se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para ambas variedades, donde el tratamiento con $2 \mu\text{g L}^{-1}$ fue el que registro un mayor porcentaje de sobrehidratación para la variedad CP Jacona un 31.66 % y para CP Zamorana un 23.33 %, para los tres tratamientos el porcentaje de sobrehidratación no se obtuvieron resultados significativos (Cuadro 20).

Cuadro 20. Porcentajes de oxidación y sobrehidratación de los explantes de dos variedades mexicanas de fresa, evaluadas después de 30 días, en tres tratamientos con TRIA en multiplicación *in vitro*

Tratamientos	Porcentaje de oxidación		Porcentaje de sobrehidratación	
	CP Jacona	CP Zamorana	CP Jacona	CP Zamorana
2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^Z	51.66±50.39a	46.66±50.30a	31.66±46.91a	23.33±42.65a
5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^Y	65.00±48.09a	63.33±48.59a	10.00±30.25b	5.00±21.97b
10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^X	48.33±50.39a	50.00±50.42a	10.00±30.25b	8.33±27.87b

^Z BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (2 $\mu\text{g L}^{-1}$), ^Y BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) y ^X BA (1.0 mg L⁻¹) + AIB (0.1 mg L⁻¹) + TRIA (10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Los valores son medias de tres replicas con 180 explantes cada una. Medias con letras distintas encolumnas son significativamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

7. CONCLUSIONES

- El ácido cítrico como antioxidante no tuvo efecto en disminuir la oxidación en los tejidos en la etapa de establecimiento, con resultados para el tratamiento con AC donde CP Jacona obtuvo el 84 % y CP Zamorana el 80 % y sin AC el 52 % para CP Jacona y para CP zamorana el 68 %, pero generó mayor vigor en los brotes en el ST.
- El mejor tratamiento en el ST fue el que contenía un medio de cultivo MS modificado con una concentración hormonal de BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}), ya que ofreció los mejores rendimientos en las variables evaluadas como número, tamaño y diámetro del brote así como en el porcentaje de sobrehidratación en las dos variedades mexicanas de fresa.
- El sistema de inmersión temporal es más eficiente para promover el número de brotes obteniendo hasta el triple de brotes en comparación al sistema tradicional.
- La reducción de nitratos al 70 % en el medio de cultivo MS en el SIT tiene la ventaja de aumentar el número de brotes por explante, disminuye el efecto de la sobrehidratación con un porcentaje de nitratos al 70 % para CP Jacona fue del 25 % y para CP Zamorana del 26.66 % y con el 100 % CP Jacona obtuvo 41.66 y CP Zamorana 65 %, además aumenta el tamaño y diámetro de los brotes.

- Los mejores tratamientos en SIT fueron el que contenía un medio de cultivo MS al 70% en nitratos, con una concentración hormonal de BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + BR (0.02 mg L^{-1}) y BA (1.0 mg L^{-1}) + AIB (0.1 mg L^{-1}) + TRIA ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) ya que ofreció lo mejores rendimientos en las variables evaluadas como el número, tamaño y diámetro del brote, así como el porcentaje de la sobrehidratación, en las dos variedades mexicanas de fresa, en un tiempo de inmersión de 2 minutos cada 12 horas.
- La adición de BR en los tratamientos evaluados en el SIT redujeron los niveles de oxidación en los brotes.

8. LITERATURA CITADA

- Abrego, A. J. L. 1988.** Diferenciación de brotes adventicios *in vitro* a partir de plántulas de fresa (*Fragaria vesca*) cultivar “Fresno”. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Escuela de biología. Morelia, Michoacan, 1988.
- Acosta, R. M. C. 1993.** Efecto del $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ en la micropropagación de fresa y su relación en la aclimatización con base en su capacidad fotosintética. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Centro de Fruticultura. Montecillo, México.
- Adelberg, J., J. Naylor A. and M. Tascan. 2007.** Larger Plants From Liquid-Based Micropropagation: A Case Study With *Hydrangea quercifolia* Bartr. ‘Sikes Dwarf’. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 57: 1-10.
- Agencia de Servicios Agropecuarios Poàs. 2007.** Agrocadena de Fresa, Dirección Regional Central Occidental, 13p.
- Agrocadena de fresa. 2007.** Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección Regional Central Occidental. Alajuela, Grecia, 2007. p. 7-8.
- Aitken, C., J., Kozai T. and Takayama S. 1995.** Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. En: Aitken Christie, J, Kozai T y MA Smith (Eds). Automation and environment control in plant tissue culture, pp. 1-18 Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Akita, M. and Takayama S. 1994.** Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid médium surface level control. Plant Cell Report 13: 184-187.
- Albany, N., E. Jiménez, J. Vilchez, L., García, M. de Feria and N. Pérez. 2005.** Use of growth retardants for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems (p. 213-224). En: Hvoslef-Eide A. y W. Preil (eds.). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Dordrecht: The Netherland Springer.
- Alvard, D., Cote F. and Teisson C. 1993.** Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effests of temporary immersion. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 32: 55-60.
- Amhed, Z., Akhter, F., Haque, S., Banu, H., Rahman M. and Faruquzzaman, M. 2001.** Novel Micropropagation System. *OnLine Journal of Biological Sciences* 1 (11): 1106-1111. Disponible en: <<http://www.ansinet.org/fulltext/jbs/jbs1111106-1111.pdf>> (14/06/05).

- Anderson, J. 1975.** Propagation of rhododendrons by tissue culture. I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Combined Proceedings International Plant Propagator's Society 25: 129-135.
- Arredondo, A. 2000.** Establecimiento de cadenas proliferativas y enraizamiento *in vitro* de *Juglans regia* L. a partir de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 2000. 55 p.
- Arellano O. G. 1994.** Absorción del calcio durante la proliferación *in vitro* de vid cv. Málaga Blanca. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Programa de Fruticultura del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad.
- Arellano, O. G. y González B. S. 1985.** Efecto del recipiente, intensidad de luz y microambiente en el establecimiento a suelo de *Fragaria x ananassa* Duch. Y *Prunus cerasifera* obtenidas *in vitro*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuatitlan Izcalli, Estado de Mexico. 122p
- Arteca, R. N. 1995.** Brassinosteroids. En: David, J D (Ed) Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, pp 206-213, Kluwer Academic Press.
- Avigdor A. H. 1986.** Strawberry. In: S. P. Monselise (ed). Fruit set and development. CRS Press. Boca Raton, Mg, Florida. USA. pp: 419-448.
- Beattie, J., Crozier, A. and Duthie, G. 2005.** Potential health benefits of berries. Current Nutrition and Food Science, 2005, vol. 1, p. 71-86.
- Bello, J. L. y Santos, A. 1990.** Imagen del fresón en el consumidor. Especial Huelva: 27-29.
- Berthouly, M., and H. Etienne. 2005.** Temporary immersion system a new concept for use liquid medium in mass propagation. p. 165-195. En: Hvoslef-Eide A. y W. Preil. (Eds.). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. First edition. Dordrecht, The Netherland. Springer.
- Bodelón, G. O., M. Blanch, M.T. Sánchez B., M. I. Escribano, C. Merodio. 2010.** The effects of high CO₂ levels on anthocyanin composition, antioxidant activity and soluble sugar content of strawberries stored at low non-freezing temperature. Food Chem. 122: 673-678.
- Boxus, P. H. 1974.** The production of Strawberry Plants by *in Vitro* Micropropagation. J. Hort. Sci. 49, 209-210 (1974).
- Boxus, P., M. Quoirin, and M. Laine. 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.

- Boxus, P., C. Damiano and E. Brasseur. 1984.** Strawberry. In: P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, and Y. Yamada (EDS). Handbook of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol 3. Macmillan. New York. p. 453-486.
- Brisson, L., Ibrahim, R., rideau, M. 1988.** Tissue culture of *chrysosplenium americanum* and its potential for flavonoid production. Plant Cell Reports 7:130-133.
- Burch, L. y B. McGaw. 1993.** Fisiología y Bioquímica Vegetal. In: Azcon-bieto, J., M. Talon. Madrid, España: McGraw-Hill., 1993, p. 319-325.
- Cabrera, J. M., Gómez K. R., Rayas C. A., Deferia, M., López T. J., Medero V. V., Basail P. M., Rodríguez R. G. y Santos P. A. 2010.** Evaluación en campo de plantas de name (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de los microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal. Revista Colombiana de Biotecnología, July, 2010, Vol.12 (1), p.47 (10).
- Calderón, B. X. y A. Rotella. 1998.** Establecimiento *in vitro* de *Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kostermans (Lauraceae). Información Tecnológica, 1998, Vol. 9, N° 5, p. 269-275.
- Calderón, Z. G. y R. Vega del R. 2009.** Variedades Mexicanas y Cultivares Comerciales Extranjeros de Fresa. Pp. 56-60. In: Cano, M. R., A. E. Becerril- Román, G. Calderón Z., A. López J. y C. Saucedo V. (Editores). 2009. II Simposium Nacional de Producción Forzada de Frutales y I Curso Nacional de Producción Forzada de Durazno y Frutillas. Colegio de Postgraduados. México, 147 p.
- Cañas, L. and Benbadis, A. 1988.** *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Science 54: 65-74.
- Cassells, A. and Curry, R. 2001.** Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 145-157.
- Castillo, A. 2004.** Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Extraído el 25 de diciembre del 2012 del sitio web INIA: <http://www.inia.org.uy>.
- Capote, I., Escalona M., Daquinta G. M., Pina D., González J. L. y Aragón C. 2009.** Efecto del análogo de Brasinoesteroide (MH5) en la aclimatación de los brotes de *Vriesea* propagados en sistemas de inmersión temporal. Revista Ciencia y Tecnología. , Vol. 2, N°. 1, 2009, págs. 29-33.
- Chakrabarty, D., Hahn E. J., Yoon Y.J and Paek K. Y. 2003.** Micropropagation of apple rootstock M.9 EM LA using bioreactor. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78:605-609.

- Chakrabarty, D., Park S. Y., Ali M. B., Shin K.S. and Paek K. Y. 2005.** Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology* 26:377-388.
- Chen, X., Yuan H., Chen R., Zhu L., Du B., Weng Q. and He G. 2002.** Isolation and Characterization of Triaccontanol-Regulated Genes in Rice (*Oryza sativa* L.): Possible Role of Triaccontanol as a Plant Growth Stimulator. *Oxford Journals Life Sciences Plant and Cell Physiology*. Volume 43, Issue 8 Pp. 869-876.
- Chu, C. Y., Knight, S. L. and Smith, M. A. L. 1993.** Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. "Minima"). *Plant Cel. Tiss. Org. Cult.* 32:329-334.
- Coba, Z. M. A. 2009.** Rescate de *Fragaria chiloensis* var. Huachi especie de frutilla en peligro de extinción, a través de la técnica de cultivo *in vitro* utilizando meristemos y hojas. Escuela politécnica del ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí.
- Cordenunsi, B. R., Nascimento J. R. O. and Lajolo F. M. 2003.** Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. *Food Chem.* 83; 167-173.
- Corredoira, E., Janeiro V. L. y San José C. M. 2011.** Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación del aliso con vistas a su conservación. Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural. Recursos Rurais (2011) nº 7: 49-57.
- Cousins, M. M. and Adelberg, J. 2008.** Short-term and long-term time course studies of tumeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93:283-293.
- Debergh, P. 1988.** Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. En: Kozai T (Ed) *Horticulture in High Technology Era. International Symposium on High Technology in Protected Cultivation*, pp. 45-57.
- Debergh, P. and Zimmerman, R. 1991.** *Micropropagation Technology and Application*. Ed. Kluwer Academic Publishers. 1991, 484 p.
- Debergh, P., Aitken-Christie J., Cohen D.; Grout B., von Arnold S., Zimmerman R. and Ziv M. 1992.** Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:135-140.
- Debnath, S. C. 2008.** Developing a scale – up system for the *in vitro* multiplication of TDZ – induced strawberry shoots using a bioreactor.
- Domínguez, R. M. S., Alpuche S. A. G., Vasco M. N. y Molphe B. E. P. 2008.** Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Dpto. de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940. 20100, Aguascalientes, Ags. México.

- Donnelly, D. J., Vidaver, W. E. and Lee, K. 1998.** The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 4, p. 43-50.
- Eide, C., Munster, P. H., Heyerdahl, R., Lyngved, O. A. S. Olsen. 2003.** Liquid Culture Systems for Plant Propagation. *ISHS Acta Horticulturae 625: XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations*. Disponible en: http://www.actahort.org/books/625/625_18.htm.
- Encina, C. L., Padilla, I. M., Cazorla, J. M., Mercado, V. I. y Caro, E. 2002.** Mejora Biotecnológica del Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). *Fruticultura*, 2002, vol. 21, no. 241, p. 25-28.
- Engelmann, F. 1991.** *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Etienne, H. and Berthouly M. 2002.** Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult.*; 69:215–231. doi: 10.1023/A:1015668610465.
- Fiorella, J. C. y Flores D. M. 2007.** Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*. Vol. 20-3 – 2007.
- Fraternale, D., Giamperi L., Ricci D. and Rocchi M. B. L. 2002.** Micropropagation of *Bupleurum fruticosum*: The effect of triacontanol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 135–140, 2002. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Fraternale, D., Giamperi L., Ricci D., Rocchi M.B.L., Guidi L., Epifano F. and Marcotullio M.C. 2003.** The effect of triacontanol on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. Istituto di Botanica e Orto Botanico ‘Pierina Scaramella’ Facolta` di Farmacia, Universita` degli Studi di Urbino, via Bramante 28, Urbino, PU 61029, Italy, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 87–97.
- Fujioka, S. and A. Sakurai 1997.** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol Plant*. 100:710-715.
- Gaspar, T. 1995.** The concept of cáncer *in vitro* plant cultures and the implication to hormones and hyperhydricity. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. Vol. 1 N° 3:126 – 136.
- George, E. F. 1993 a.** Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1. 2nd. Ed., ExegeticsLtd, 1993, 130-143p.
- George, E. F. 1993 b.** Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology (2nd ed) (George, E. F. ed). Exegetics Ltd. Edington, Wilts, pp 575.

- George, E. 1996.** Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- Gliessman, R. S. 2002.** Agroecología: procesos ecológicos en la agricultura sostenible. Editorial AGRUCO-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 359 p.
- González O. J. L., Córdoba A., Aragón C. E., Pina. D., Rivas, M. y Rodríguez, R. 2005.** Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plántulas de FHIA-18 expuestas a un estrés térmico. Infomusa 14(1): 18-23.
- González, O. M., Ortiz N. A. y Benedetti R. S. 2007.** Avances biotecnológicos en castaño multiplicación in vitro de árboles superiores. Ciencia e Investigación Forestal - Instituto Forestal / Chile. Volumen 13, Numero 2. 2007 1227.
- Hancock, J. F., J. A. Flore, and G. J. Galletta. 1989.** Gas exchange properties of strawberry species and their hybrids. Sci. Hort. 40: 139-144.
- Hannum, S. M. 2004.** Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, vol. 44, p. 1-17.
- Harazy, A., Leshem, B. and Cohen, A., 1985.** *In vitro* propagation of statice as an aid in breeding. Hortscience 20 (3): 361 -362.
- Hartmann, H. T., Kester D. E. and Davies R. F. T. 1990.** Plant propagation. Principles and practices. Quinta edición. Editorial regents / Prentice hall. Estados Unidos de América. 482 Pp.
- Hartmann, T. y Kester, V. 1995,** Propagación de Plantas. CECSA. México.
- Hohtola, A. 1988.** Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15: 211-222.
- Houtz, L. R., Ries K. S. and Tolbert N. E. 1985.** Effect of Triacantanol on Chlamydomonas' Stimulation of growth and photosynthetic CO₂ assimilation. Department of Horticulture (R.L.H., S.K.R.), Department of Biochemistry (N.E.T.), Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824. Plant Physiol. (1985) 79, 357-364.
- Ingeniería Agrícola, 2008.** La frutilla manejo básico del cultivo. <http://www.ingenieriaagricola.cl>. Contáctenos por e-mail a info@ingenieriaagricola.cl.
- Jiménez, E., Capote A., Pérez N., Chávez M., Quiala E., de Feria M., Barbón R., y Pérez J. C., 1997.** Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en sistemas de inmersión temporal. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas, p.7. Ciego de Ávila, Cuba.

- Jiménez, E., Pérez N., de Feria M., Barbón R., Capote A., Chávez M., Quiala E. and Pérez J. C. 1999.** Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23.
- Jiménez, T. F. A., Ramírez A. D. y Agramonte P. D. 2002.** Empleo del BIOBRAS-6 en la micropropagación del cultivar de plátano FHIA -21 (AAAB). *Biotecnología vegetal* Vol. 2, No. 3: 131-136.
- Jones, J. y Sluis C. 1991.** Marketing of micropropagated plants. In Deberg P. and Zimmerman R, (ed), Mac Millan New York p: 141-54.
- Keller, E.R.J., Senula A., Leunufna S. and Grübe M., 2006.** Slow growth storage and cryopreservation — tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29:411-417.
- Keutgen, A. J and E. Pawelzik. 2008.** Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chem.* 107: 1413-1420.
- Kevers, C. and Gaspar, T. 1986.** Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water contents, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiol. Veg.* 24:647-653.
- Khan, R., Masroor A. M. K., Singh M., Nasir S., Naeem M., Siddiqui M. H. and Mohammad F. 2007.** Gibberellic acid and triacontanol can ameliorate the opium yield and morphine production in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science.* Volume 57, Issue 4. Pages 307-312.
- Khandaker, M. M., Faruq G., Rahman M. M., Sofian A. M., and Boyce N. A. 2013.** The Influence of 1-Triacontanol on the Growth, Flowering, and Quality of Potted *Bougainvillea* Plants (*Bougainvillea glabra* var. ‘‘Elizabeth Angus’’) under Natural Conditions. Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.
- Kyte, L. and J. Kleyn. 1996.** Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. 3^a ed. U.S.A. Portland: Timber Press. 1996. 240 p.
- Lee, S. K. and A. A. Kader. 2000.** Soil fumigation and runner plant production: A synthesis of four years of strawberry nursery field trials. *Sci. Hortic.* 35: 642-646.
- Leifert, C., Morris, C. E. and Waites, W. M. 1994.** Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1994, vol. 13, p. 139-183.
- López, G. P. E. y Inoue K. 2001.** Obtención y multiplicación de plantas de fresa libres de virus. Secretaria de agricultura ganadería y desarrollo rural pesca y alimentación. Instituto

nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Zacatepec, Morelos, México.

- McCown, D. D. and McCown, B. H. 1987.** North American Hard-woods. In: Bonga, J. M.; Durzan, D. J., eds. Cell and tissue culture in forestry, Vol. 3. Case histories: Gymnosperms, angiosperms, and palms. Dordrecht, the Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers: 247-260.
- Mandava, N. B. 1988.** Plant growth-promoting brassinosteroids. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:23-52.
- Manosh, K. B., Islam, R. and Hossain, M. 2007.** Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus cultura. Plant Cell Tissue Organ Cult., 2007, vol. 90, p. 49-54.
- Margara, J. 1988.** Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 1988. 232 p.
- Martínez, P. G. y Arena M. 1997.** Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. Bosque 18 (2): 43-50.
- Mejía, M. J. M. 1984.** Contribución al cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México.
- Mogollón, N., Díaz J. G. y Hernández N. 2004.** Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". Posgrados de Agronomía. Programa de Horticultura. Unidad de Biotecnología. Decanato de Agronomía. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2004, 21 Supl. 1: 15-21.
- Morel, G. 1964.** Tissue culture- a new means of clonal propagation in orchids. American Orchid Society Bulletin. 33: 473-478.
- Morel, G. and Martín, C. 1952.** Guérison de dahias atteints d'une maladie á virus. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 235:1324-1325.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for growth and bioassays with tobacco Tissue Culture, Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murillo, R. E., Solórzano V. D. y Barrientos P. F. 1985.** Propagación clonal *in vitro* de material diferencial de plantas de fresa. Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas. Vol. 1, N° 2 Agosto de 1985.

- Naeem, M., Masroor M., Khan A. and Moinuddin. 2011 a.** Triacantanol: a potent plant growth regulator in agricultura. *Journal of Plant Interactions*, 7:2, 129-142.
- Naeem, M., Masroor M., Khan A., Moinuddin., Idrees M. and Aftab T. 2011 b.** Triacantanol-mediated regulation of growth and other physiological attributes, active constituents and yield of *Mentha arvensis* L. *Plant Growth Regul* (2011) 65:195–206.
- Nuñez, M. 1999.** Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la Agricultura. *Cultivos Tropicales* 20 (3): 63-72.
- Núñez, M.; Siquiera, W. J., Hernández, M. M., Zullo, M. A. T., Robaina, C. y Coll, F. 2005.** Efecto del Biobras-6 y el MH-5 en la inducción de callos y brotes de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Cultivos Tropicales* 25 (4): 5-9.
- Oliveira, C. E., Normann K. A., Bergamaschi H. and Schüür D. R. E. 2000.** Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro, durante a aclimatização ex vitro Evaluation of the growth of strawberry plants during ex vitroacclimatization. *Horticultura Brasileira*, 2000, Vol.18 (3), p.188.
- Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, A. and Duan, R. D. 2004.** Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, p. 7264-7271.
- Ortiz, O., Sabja, A. y Koch, L. 2006.** Protocolo de micropropagación de lenga. En: cultivo *in vitro* de lenga (*Nothofagus pumilio*). Editado por Braulio Gutierrez. INFOR. CHILE. 76 p.
- Ozcan, M. and Haciseferogullar, H. 2007.** The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, vol. 78, p.1022-1028.
- Parada, P. D. M. y Villegas M. A. 2009.** Propagación *in vitro* del Híbrido Almendro X Durazno H1. Programa de recursos genéticos y productividad – Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo Mexico.
- Pasqualetto, P. L., Wergin, W. P. and Zimmerman, R. H. 1988.** Changes in structure and elemental composition of vitrified leaves of “Gala” apple *in vitro*. *Acta Hort.* 227:352-357.
- Pedroza, J., Angarita A. y Corchuelo G. 1997.** Control de la vitrificación en la micropropagación de Estaticé (*Limonium sinuatum* Mill.) cv. Midnight blue. *Agronomía Colombiana* 1997. Volumen XIV, No.; Pág.22-27.
- Pérez, J. 1998.** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba 391 p.

- Pérez, J., E. Jiménez y D. Agramante. 1998.** Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: J. Pérez (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Phillips, R., S. M. Arnott, and S. E. Kaplan. 1981** Antibiotics in Plant Tissue Culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant culture of *Helianthus tuberosus*. *Plant Science Letters* 21: 235-240.
- Pierik, R. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi- Prensa, España. pp: 15-18, 49-52, 67-80, 109-120.
- Pierik, R. L. M. 1987.** *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 343 p.
- Posada, P. L., Gómez K. R. y Reyes M. 2003.** Empleo Sistemas de Inmersión Temporal en la multiplicación y germinación de embriones somáticos de banano cultivar Gran Enano (AAA) y papaya var. Maradol Rojo. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, No. 3: 143 – 147.
- Preeces, J. E. and Sutter, E. G. 1991.** Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En *Micropropagation*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.
- Preil, W. 2005.** General introduction a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* cultura (pp. 1-20). En: A. Hvoslef-Eide y W. Preil. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht: The Netherland Springer.
- Reyes, S. M. I. 1992.** Efecto de la fuente y concentración de amonio sobre la proliferación *in vitro* de portainjertos de manzano. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Edo de México. 73 p.
- Ries, S. K. 1985.** Regulation of plant growth with triacontanol. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2:239–285.
- Roca, W. y Mroginski, L. 1993.** Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: Roca, W., Mroginski, L. (Publicación original, 1991).
- Rodríguez, R., Escalona M., Rodríguez Y., Cid M. J. L. y González O. J. L. 2000.** Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 2000, Vol.21 (3), p.51.
- Rost, T. L., y T. Elliot W. 1979.** Botánica: breve introducción a la biología vegetal. New York: Wiley. Pages 155-170.
- Sakurai, A. and Fujioka, S. 1993.** The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids plant growth regul. pp. 147-159. Springer. Dordrech.

- Salazar, R. y R. Hoyos. 2007.** Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 60: 3907-3921.
- Salisbury, F. y Ross, C. 2000.** Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. España: Thomson editores Paraninfo.
- Sánchez, M. C., Anés R. J. y Cedeño J. R. 2001.** Efecto de varios antioxidantes en la sobrevivencia de explantes de pimentero (*Pipernigrum* L.). Acta Científica Venezolana 52 (Sup. 3): 58.
- Sánchez, M. C. y Salaverría, J. L. 2004.** Control de la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa. UDO Agrícola, 2004, vol. 4, no. 1, p. 21-26.
- Santos, P. A., Cabrera J. M., Gómez K. R., López T. J., Rayas C. A., Basail P. M., Medero V. V. y Beovides G. Y. 2011.** Multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal del clon de malanga "Viequera" (*Xanthosoma* spp.). Revista Colombiana de Biotecnología, 2011, Vol.13 (2), p.97.
- Santoyo, J., J. A. y C. O. Martínez A. 2010.** Paquete tecnológico para la producción de fresa. Fundación Produce Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
- Secretaría de Desarrollo Agropecuaria de Michoacán. 2005.** Estadísticas agropecuarias de Michoacán. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable. Morelia, Michoacán, México.
- Singha, S., Townsend, E. C. and Oberly, H. G. 1990.** Relationship between calcium and agar on vitrication and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*. Plant Cel. Tiss. Org. Cult. 23:135-142.
- Smith, M. and L. Spoomer. 1995.** Vessels, gels, liquid media and support systems (pp. 145-163). En: J. Aitken-Christie, T. Koza y M. A. Smith (eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. The Netherland: Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
- Strum, K., D. Koron, and F. Stampar. 2003.** The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. Food Chem. 83: 417-422.
- Sugimura, Y. and Salvaña, M. 1988.** Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. Canadian Journal of Botany 67: 272-274.
- Swartz, H. J. and Lindstrom, J. T. 1986.** Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985: Commercialization of the technique. En: R. H. Zimmmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag and R. H. Lawson (EDS). *Tissue culture as a plant production system*

for horticultural crops. Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht (Netherlands), 1986, p. 201-220.

- Tantos, A., Á. Mészáros., T. Farkas., J. Kissimon and G. Horváth. 1999.** The effect of Triacontanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. Plant Cell Reports 19:88-91 pp.
- Tantos, A., Á. Mészáros., T. Farkas., J. Szalai and G. Horváth. 2001.** Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. Plant Cell Reports (2001) 20:16–21.
- Tisserat, B. 1991.** Automated Systems. En: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. High-Tech and Micropropagation I, Springer-Verlag, Berlin. pp. 419-431.
- Tisserat, B. and Vandercook C. E. 1985.** Development of an automated plant culture system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 5: 107-117.
- Tyagi, R.K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z. and Tyagi, H. 2007.** Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43:51-58.
- Uribe, M. M. y Cifuentes G. L. 2004.** Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. Departamento de Ciencias Básicas, Unidad Académica Los Angeles, Universidad de Concepción, Casilla 341, Los Angeles, Chile. *Bosque*, Vol. 25 N° 1, 2004, pp. 129-135.
- Uribe, T. A. 2010.** Conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de tres variedades de fresa (*Fragaria x ananassa Duch.*). Tesis. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Parasitología.
- Vietez, A. M. and Vietez E. 1980.** Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 1980, Vol. 50, p. 127-130.
- Villegas, M, A. 1990.** Micropropagación de fresa (*Fragaria x ananassa Duch.*) *In: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales.* FAO. Roma. P 91-95.
- Vilchez, J., Albany N., Martínez L., Molina M., Pirela C., Molina M., Alvarez C. y Chirinos J. 2011.** Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2011, Vol.XIII (1), p.94.
- Wever, J., R. 1990.** Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura, Editorial Trillas, Séptima reimpresión. Pp. 9-40.

- Xiao, H. F. Z. 1992.** Physiological Effect of Triacontanol (TA) on Differentiation and Dedifferentiation of Cells in Tissue Culture. Department of Biology. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition).
- Ziv, M., Shwarts, A. and Fleminger, D. 1987.** Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Sci.* 52: 127 -134.
- Ziv, M. and Shemesh D. 1996.** Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactors culture. *In vitro Cell. Dev Biol. Plant.* 32: 31-36.
- Ziv, M. 2005.** Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tiss Org Cult.*; 81:277–285. doi: 10.1007/s11240-004-6649-y.
- Zimmerman, T. W., Rogers, S. M. D. and Cobb, B. G., 1988.** Physiological differences between normal and vitreous petunias grow *in vitro*. *HortSci.* 23:780.