

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER  
EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFFECTO DE LAS CITOCININAS EN LA PROPAGACIÓN  
*IN VITRO* DE TRES CULTIVARES DE FRESA (*Fragaria x  
ananassa Duch*)**

**Autor: Bach. Reinerio Puscan Puscan**

**Asesor: Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé**

**Registro: (.....)**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2023**

# AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-H

### AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

#### 1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Puscan Puscan Reinerio  
DNI N°: 77344004  
Correo electrónico: 7734400471@untrm.edu.pe  
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias  
Escuela Profesional: Ingeniería Agrónoma

#### Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): \_\_\_\_\_  
DNI N°: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_  
Facultad: \_\_\_\_\_  
Escuela Profesional: \_\_\_\_\_

#### 2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Efecto de las citocininas en la propagación in vitro de tres cultivares de fresa (Fragaria x androssa Duch)

#### 3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Millones chanamé Carlos Eduardo  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 1690 2744  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0001-7236-6341

#### Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: \_\_\_\_\_  
DNI, Pasaporte, C.E N°: \_\_\_\_\_  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) \_\_\_\_\_

#### 4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

[https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde\\_ford.html](https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html)  
4.00.00 Ciencias Agrícolas 4.04.00 Biotecnología Agrícola

#### 5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

#### 6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC. Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 21 de Julio de 2023

Firma del autor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del autor 2

Firma del Asesor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Asesor 2

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo va dedicado a mis padres, quienes me han brindado su ayuda incondicional a lo largo de mi formación académica. A mis hermanos, por transmitirme su alegría y llenarme de motivación para así alcanzar mis metas. A mis demás familiares y amigos, por su motivación constante y su aporte en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, doy gracias a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida, a mis padres por apoyarme en cada momento, por su motivación constante que me permitieron terminar este trabajo.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, por ser la institución donde realicé mis estudios superiores; a los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma, quienes formaron parte de mi formación profesional.

Al Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, en donde se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

A mi asesor, el Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé, quien me brindó su asesoramiento en todo el proceso de ejecución del trabajo de investigación.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA  
**RECTOR**

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES  
**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA  
**VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA  
**DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



**UNTRM**

**REGLAMENTO GENERAL**

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

### ANEXO 3-L

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x) / Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Efecto de las citocininas en la propagación in vitro de tres cultivares de fresa (Fragaria x ananassa Duch); del egresado Reinerio Puscan Puscan de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias; Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 22 de junio de 2023



Firma y nombre completo del Asesor  
Dr. Carlos Eduardo Millones Chauamé

## JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dr. Jorge Alberto Condori Apfata

**PRESIDENTE**



Ph.D. Ligia Magali García Rosero

**SECRETARIA**



Dr. César Guevara Hoyos

**VOCAL**

# CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-Q

### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Efecto de las citocininas en la propagación in vitro  
de tres cultivares de fresa (Fragaria x ananassa Duch)

presentada por el estudiante ( )/egresado (x) Bach. Reinerio Puscan Puscan

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma

con correo electrónico institucional 773440047L@untram.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 21 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual ( ) al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene \_\_\_\_\_ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 14 de Junio del 2023

[Signature]  
SECRETARIO

[Signature]  
PRESIDENTE

[Signature]  
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....  
.....



# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



**UNTRM**

**REGLAMENTO GENERAL**

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-S

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 05 de Julio del año 2023, siendo las 16:17 horas, el aspirante: Reinerio Puscan Puscan, asesorado por D.Sc. Carlos Eduardo Millonos Chanamo defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: "Efecto de las citocininas en la propagación in vitro de tres cultivos de fresa (Fragaria x ananassa Duch)", para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Jorge Alberto Condoni Apfata

Secretario: Ligio Magali Gorcá Rosero

Vocal: Cesar Guevara Hoyos

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría ()      Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17:10 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

## ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS .....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS.....	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS .....	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS .....	ix
ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN .....	15
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
2.1. Ubicación de la investigación.....	18
2.2. Material biológico .....	18
2.3. Diseño de la investigación.....	18
2.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	20
2.5. Procedimiento .....	21
2.6. Variables evaluadas.....	23
III. RESULTADOS .....	25
3.1. Multiplicación <i>in vitro</i> de los cultivares de fresa.....	25
3.2. Aclimatación <i>ex vitro</i> de los cultivares de fresa .....	28
IV. DISCUSIONES .....	31
V. CONCLUSIONES .....	37
VI. RECOMENDACIONES .....	38
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXO .....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño de los tratamientos para la multiplicación <i>in vitro</i> de los cultivares de fresa.....	<b>18</b>
<b>Tabla 2.</b> Niveles de los factores para la multiplicación <i>in vitro</i> de los cultivares de fresa .....	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Diseño experimental para la multiplicación <i>in vitro</i> de los cultivares de fresa .....	<b>19</b>
<b>Tabla 4.</b> Distribución de tratamientos para la multiplicación <i>in vitro</i> de los cultivares de fresa.....	<b>19</b>
<b>Tabla 5.</b> Diseño de los tratamientos para la aclimatación <i>ex vitro</i> de los cultivares de fresa.....	<b>20</b>
<b>Tabla 6.</b> Diseño experimental para la aclimatación <i>ex vitro</i> de los cultivares de fresa..	<b>20</b>
<b>Tabla 7.</b> Distribución de tratamiento para la aclimatación <i>ex vitro</i> de los cultivares de fresa.....	<b>20</b>
<b>Tabla 8.</b> Comparación de medias de los efectos principales de la inducción de brotes en cultivares de fresa de las variables dependientes número de brotes, numero de raíces y numero de hojas.....	<b>26</b>
<b>Tabla 9.</b> Comparación de medias de los efectos principales en la aclimatación de cultivares de fresa de las variables dependientes número de brotes, número de raíces y número de hojas.....	<b>29</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Preparación de medio cultivo de multiplicación. a) Peso de insumos empleados para el medio de cultivo; b) Ajuste de pH del medio de cultivo; c) Dilución del agente gelificante; d) Colocación de medio de cultivo en los frascos magenta.....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Inducción de brotes en cultivares de fresa. a) Establecimiento <i>in vitro</i> de cultivares de fresa, b) Multiplicación de plántulas de fresa para la obtención de explantes, b) Brotes inducidos de fresa en la 6° semana de cultivo <i>in vitro</i> . ....	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b> Inducción de brotes en cultivares de fresa. a) Número de brotes, b) Número de raíces, c) Número de hojas. Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un $P \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba Tukey. ....	<b>27</b>
<b>Figura 4.</b> Aclimatación de plántulas de cultivares de fresa. a) Preparación de sustrato, b) Siembra en bandeja de plántulas de fresa, c) Crecimiento y desarrollo de plántulas de fresa, d) Plántulas de fresa en la 6° semana del proceso de aclimatación. ....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Aclimatación de plántulas de cultivares de fresa. a) Número de hojas, b) Número de raíces, c) SPAD. Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un $P \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba.....	<b>30</b>

## RESUMEN

En el cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.), se está aplicando técnicas de micropropagación *in vitro*, para obtener plantas libres de enfermedades con altas tasas de multiplicación. Para mejorar la eficacia de los protocolos de micropropagación ya establecidas, se planteó “evaluar el efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de tres cultivares de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)”. Para la multiplicación *in vitro* se empleó sales MS (Murashige y Skoog), suplementado con diferentes combinaciones de citocininas, (BAP + Zeatina trans; KIN + Zeatina trans y 2iP + Zeatina trans). Para la fase de aclimatación, se empleó dos tipos de sustratos (PROMIX; PROMIX + humus de lombriz, en proporción 2:1). En los resultados de multiplicación *in vitro*, se observó que el uso de KIN (1 mg L<sup>-1</sup>) + Zeatina Trans (1 mg L<sup>-1</sup>) indujo mayor número de brotes por explante (18 brotes). El mayor número de hojas y raíces, fue obtenido cuando se empleó BAP + Zeatina (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>). En la fase de aclimatación, el sustrato PROMIX, presentó mejor desarrollo morfológico, presentando mayor número de hojas, mayor número de raíces y mayor valor de índice de clorofila (SPAD). En conclusión, el uso de KIN + Zeatina Trans, resultó ser la mejor combinación de fitohormonas, ya que se logró el mayor número de brotes por explante. El mejor sustrato para la aclimatación de plántulas de fresa, fue el sustrato PROMIX, en el cual se obtuvo el 100% de plantas aclimatadas y además tubo mejor desarrollo morfológico.

**Palabras clave:** *Fragaria × ananassa* Duch; propagación *in vitro*; citocininas; SPAD.

## ABSTRACT

In strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivation, *in vitro* micropropagation techniques are being applied to obtain disease-free plants with high multiplication rates. To improve the efficiency of established micropropagation protocols, it was proposed to "evaluate the effect of cytokinins on the *in vitro* propagation of three strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivars". For *in vitro* multiplication, MS salts (Murashige and Skoog), supplemented with different combinations of cytokinins (BAP + Zeatin trans; KIN + Zeatin trans and 2iP + Zeatin trans) were used. For the acclimatization phase, two types of substrates were used (PROMIX; PROMIX + earthworm humus, in a 2:1 ratio). In the *in vitro* multiplication results, it was observed that the use of KIN (1 mg L<sup>-1</sup>) + Zeatin Trans (1 mg L<sup>-1</sup>) induced a greater number of shoots per explant (18 shoots). The highest number of leaves and roots was obtained when BAP + Zeatin (both 1 mg L<sup>-1</sup>) was used. In the acclimatization phase, the PROMIX substrate showed better morphological development, with a greater number of leaves, a greater number of roots and a higher chlorophyll index value (SPAD). In conclusion, the use of KIN + Zeatin Trans proved to be the best combination of phytohormones, since the highest number of shoots per explant was achieved. The best substrate for acclimatization of strawberry seedlings was the PROMIX substrate, in which 100% of acclimatized plants were obtained and the best morphological development was achieved.

**Key words:** *Fragaria × ananassa* Duch; *in vitro* propagation; cytokinins; SPAD.

## I. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), es un híbrido entre *Fragaria virginiana* × *Fragaria chiloensis*, se obtuvo en Europa, hace más de 300 años (Jhajhra et al., 2018). Es una planta herbácea, de la familia Rosácea; su propagación es asexual por medio de estolones y corona (Félix et al., 2017). La corona es un tejido de tallo comprimido con tejido meristemático, de la cual surgen hojas trifoliadas, tallos, estolones, coronas axilares, inflorescencias y raíces (Kumar et al., 2020).

El fruto de la fresa, es la fruta más consumida a nivel mundial (Jhajhra et al., 2018). Es apreciada sobre todo por sus propiedades organolépticas; por ser una fruta apetecible, de aroma inconfundible, color rojo brillante, y sabor agridulce (Ashrafuzzaman et al., 2013). Es consumida en fresco y también como alimentos transformados, como tartas, helados, batidos y conservas, (Ashrafuzzaman et al., 2013). La fresa, es uno de los frutales más importantes, debido a su alto valor nutricional y una fuente importante de vitaminas del grupo B, vitamina C, muchos antioxidantes y minerales (Giampieri et al., 2014; Badal et al., 2019; Kumar et al., 2020). También, posee compuestos bioactivos que reducen el riesgo cardiovascular y trombosis (Beattie et al., 2005; Ariza et al., 2015). Además, de aportar propiedades antioxidantes, la fresa posee propiedades anticancerígenas (Hannum, 2004).

Los principales países líderes en la producción de fresa son China, Estados Unidos, México, Turquía y Egipto; con volúmenes que superaron el 70% de la producción mundial (Ramírez et al., 2020). En el año 2021, países como España, México, Estados Unidos, Países Bajos y Bélgica, fueron los principales exportadores de fresa en el mundo (León, 2021). Perú se ubicó en el puesto 25 como exportador mundial de fresa en el año 2021, teniendo como principales destinos, Estados Unidos, Canadá, México, Corea del Sur, Japón, China, Reino Unido, Chile, Puerto Rico, y Panamá (León, 2021). En nuestro país se siembran alrededor de 3500 has de fresa, de las cuales la mayor producción se concentra en el Norte Chico de Lima (Barranca, Huaral, Huaura, Huacho) y en menor cantidad en los diversos valles de la sierra (León, 2021).

Las plantas de fresa que se cultivan en el Perú, han resultado ser menos productivas que antes (Redagráfica, 2022), esto puede ser debido a que se sigue empleando la forma convencional de propagación que trae como consecuencia la diseminación de virus, micoplasmas, nemátodos, hongos, lo cual disminuye la productividad (Sánchez & Salaverría, 2004). Asimismo, la infestación acumulada de enfermedades en el cultivo,

puede traer consecuencias negativas, tales como la disminución en rendimiento y pérdida en calidad del fruto; por tanto, se vuelve necesario la renovación de las plantaciones, con el propósito de mantener la productividad (Mamani & Murillo, 2020). Una alternativa para cubrir la demanda de material vegetal con adecuadas características morfológicas y fitosanitarias, para la implementación y/o renovación del cultivo de fresa, es la biotecnología; basándose en el principio de la totipotencia celular, por medio de la micropropagación, es posible cultivar explantes en condiciones asépticas y condiciones controladas (Mamani & Murillo, 2020). Las plantas de fresa de procedencia *in vitro*, han generado mejores resultados en campo; se han registrado que las plantas son más uniformes, desarrollan mayor número de estolones y su rendimiento de frutos se ve incrementado, en comparación con las propagadas por métodos convencionales (Sánchez & Salaverría, 2004; Mamani & Murillo, 2020).

Las plántulas *in vitro*, no sintetizan cantidades necesarias de hormonas para compensar las carencias en sus procesos, por lo que necesariamente se debe suministrar fitohormonas exógenas al medio de cultivo (Suárez, 2020). Dentro de los reguladores de crecimiento empleado en la multiplicación *in vitro* de cultivares de fresa, se encuentran las citocininas, especialmente para la multiplicación de brotes.

Las citocininas, son hormonas que regulan la dominancia apical (Mahmoud et al., 2017); estimulan la división celular, potencian la brotación de yemas laterales, inducen la organogénesis y retardan la senescencia de las hojas (Jordán & Casaretto, 2006). Las citocininas más utilizadas en la multiplicación *in vitro* son: 6-Bencilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN), Isopentiladenina (2iP) y Zeatina (derivados trans y Cis) (Bhojwani & Dantu, 2013). BAP y KIN son citocininas sintéticas, mientras que 2iP y Zeatina son naturales (Jordán & Casaretto, 2006). Los reguladores sintéticos como BAP y KIN, son más potentes que las hormonas naturales (Zeatina y 2iP), debido a sus particularidades específicas o porque los reguladores sintéticos no pueden ser metabolizado por los tejidos de la planta (Jordán & Casaretto, 2006). La KIN favorece la división celular en plantas; generalmente se usan en experimentos de cultivo *in vitro* para inducir la formación de callos junto con auxina y regenerar tejidos de brotes en menor concentración de auxina (Jordán & Casaretto, 2006). Por otro lado, la Zeatina normalmente se presenta en forma de *cis* y *trans*, se utiliza para estimular el crecimiento de brotes laterales. La Zeatina *cis* se describe como débil o no activa en comparación con el Zeatina *trans* (Jordán & Casaretto, 2006). BAP es una de las citocininas más utilizadas en la multiplicación *in*



*vitro*, como 2iP que también cumple la misma función, pero se consideran menos eficaz que la primera (Grattapaglia y Machado, 1998).

En la multiplicación *in vitro* de fresa, BAP es la citocinina más utilizada, pero si bien es cierto, existe más de ellos, como la KIN, 2iP y la Zeatina, que necesitan ser estudiadas con el propósito de generar mejores protocolos para ser empleados de manera eficiente en el cultivo *in vitro* de fresa. Es por ello que se consideró importante “evaluar el efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de tres cultivares de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)” en esta investigación.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación de la investigación

El experimento se instaló en el Laboratorio de Biología, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas “UNTRM”, ubicado en la provincia de Chachapoyas, región Amazonas.

### 2.2. Material biológico

En la presente investigación, se emplearon plántulas de fresa de los cultivares Aroma, Camino Real y Sabrina, establecidas *in vitro* a partir de meristemos en el año 2021, en el Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

### 2.3. Diseño de la investigación

#### A. Multiplicación *in vitro* de los cultivares de fresa

Para evaluar la respuesta a la multiplicación *in vitro* de los cultivares de fresa, se realizó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 3Ax3B, con los factores A: Cultivares de fresa y B: Tipos de citocininas. Se evaluaron 09 tratamientos y 05 repeticiones, donde cada unidad experimental estuvo conformado por un frasco magenta con 05 brotes, teniendo un total de 45 unidades experimentales.

#### Diseño de los tratamientos

**Tabla 1**

*Diseño de los tratamientos para la multiplicación in vitro de los cultivares de fresa*

RÉPLICAS	a1			a2			a3		
	b1	b2	b3	b1	b2	b3	b1	b2	b3
R1	a1b1	a1b2	a1b3	a2b1	a2b2	a2b3	a3b1	a3b2	a3b3
R2	a1b1	a1b2	a1b3	a2b1	a2b2	a2b3	a3b1	a3b2	a3b3
R3	a1b1	a1b2	a1b3	a2b1	a2b2	a2b3	a3b1	a3b2	a3b3
R4	a1b1	a1b2	a1b3	a2b1	a2b2	a2b3	a3b1	a3b2	a3b3
R5	a1b1	a1b2	a1b3	a2b1	a2b2	a2b3	a3b1	a3b2	a3b3

**Nota:** Diseño de los tratamientos 3Ax3B. \*Cultivares = a1: Aroma, a2: Camino Real, a3: Sabrina, \*Tipos de citocinina = b1: BAP + Zeatina trans; b2: KIN + Zeatina trans; B3: 2iP + Zeatina trans.

**Tabla 2***Niveles de los factores para la multiplicación in vitro de los cultivares de fresa*

<b>Niveles</b>	<b>Cultivares de fresa</b>			
A1	Aroma			
A2	Camino Real			
A3	Sabrina			
<b>Dosis de citocininas</b>				
	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	KIN (mg L <sup>-1</sup> )	2iP (mg L <sup>-1</sup> )	Zeatina trans (mg L <sup>-1</sup> )
B1	1,0			1,0
B2		1,0		1,0
B3			1,0	1,0

**Característica de la unidad experimental****Tabla 3***Diseño experimental para la multiplicación in vitro de los cultivares de fresa*

<b>Diseño experimental</b>	<b>Diseño Completamente al Azar</b>
Nº de tratamientos	9
Nº de repeticiones	5
Nº de unidades experimentales	45

**Distribución de los tratamientos****Tabla 4***Distribución de tratamientos para la multiplicación in vitro de los cultivares de fresa*

<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>
R1	R2	R3	R4	R5	R1	R3	R5	R2
R2	R3	R4	R5	R1	R3	R5	R3	R3
R3	R4	R5	R1	R2	R5	R2	R1	R4
R4	R5	R1	R2	R3	R2	R1	R4	R1
R5	R1	R2	R3	R4	R1	R4	R2	R5

**B. Aclimatación ex vitro de los cultivares de fresa**

Para evaluar la respuesta a la aclimatación *ex vitro* de los cultivares de fresa se empleó un DCA con arreglo factorial 3Ax2B, con los factores A: cultivares de fresa y B: tipo de sustrato. Se evaluaron 06 tratamientos y 20 repeticiones, donde cada unidad experimental estuvo conformada por un alveolo con una plántula de fresa, dando un total de 120 unidades experimentales.

## Diseño de los tratamientos

**Tabla 5**

*Diseño de los tratamientos para la aclimatación ex vitro de los cultivares de fresa*

RÉPLICAS	a1		a2		a3	
	b1	b2	b1	b2	b1	b2
R1	a1b1	a1b2	a2b1	a2b2	a3b1	a3b2
R2	a1b1	a1b2	a2b1	a2b2	a3b1	a3b2
R3	a1b1	a1b2	a2b1	a2b2	a3b1	a3b2
...	...	...	...	...	...	...
R20	a1b1	a1b2	a2b1	a2b2	a3b1	a3b2

**Nota:** Diseño de los tratamientos 3Ax2B. \*Cultivares = a1: Aroma, a2: Camino Real, a3: Sabrina, \*Tipos de sustrato = b1: Promix; b2: Promix + humus de lombriz (2:1).

## Característica de la unidad experimental

**Tabla 6**

*Diseño experimental para la aclimatación ex vitro de los cultivares de fresa*

Diseño experimental	Diseño Completamente al Azar
Nº de tratamientos	6
Nº de repeticiones	20
Nº de unidades experimentales	120

## Distribución de los tratamientos

**Tabla 7**

*Distribución de tratamientos para la aclimatación ex vitro de los cultivares de fresa*

T1	T2	T3	T4	T5	T6
R1	R2	R3	R4	R5	R6
R2	R3	R4	R5	R6	R7
R3	R4	R5	R6	R7	R8
R4	R5	R6	R7	R8	R9
...	...	...	...	...	...
R20	R20	R20	R20	R20	R20

## 2.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

El método empleado para la recolección de datos fue a través de mediciones cualitativas y cuantitativas, utilizando un formato de evaluación para cada variable.

## **2.5. Procedimiento**

### **A. Actividades preliminares**

#### **Preparación de medio de cultivo de establecimiento *in vitro***

En un vaso Beaker de 1 L de capacidad, se vertió 500 mL de agua destilada, se pesó y se agregó 2,2 g de sales MS, 15 g de sacarosa, 0,5 g de ácido ascórbico y 0,5 g de ácido cítrico. Se mezcló la solución con una bagueta hasta disolver completamente los insumos. Con la ayuda del potenciómetro se ajustó el pH a 5,8 (con soluciones NaOH 1N y/o HCl 1N). Se calentó el medio de cultivo en una cocina eléctrica, para luego incorporar 3,0 g de agar como agente gelificante. Por último, se vertió 15 mL de medio en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### **Pretratamiento de desinfección de los explantes de fresa**

Los explantes de corona de los cultivares de fresa (Aroma, Camino real y Sabrina) en estado vegetativo y con buenas características morfológicas y fitosanitarias se recolectaron del vivero del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Los explantes de aproximadamente 5 cm de longitud se sumergieron en una solución acuosa de jabón líquido durante 10 minutos en constante agitación y usando un cepillo se frotó la superficie de los explantes para eliminar las impurezas; luego se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Por último, los explantes se transfirieron a una solución de ácido cítrico (0,5 g L<sup>-1</sup>) y se pasaron a la cámara de flujo laminar.

#### **Desinfección y establecimiento *in vitro* de los cultivares de fresa**

Los explantes de corona, se desinfectaron en alcohol al 70% durante 1 minuto; luego enjuagado con agua destilada estéril, para nuevamente ser desinfectado en lejía comercial Clorox al 15% (4% de NaClO) por 20 minutos. Finalizada la desinfección se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril.

Empleando un estereoscopio, se llevó a cabo el proceso de aislamiento del meristema de 0,5 a 1,5 mm, para ello se utilizó pinzas y bisturí para realizar los cortes; alcohol al 96% para sumergir los materiales (pinzas, bisturís) y flamearlos antes y después de realizar la disección. Una vez aislado los meristemas se sembraron en tubos de ensayo que contenían 15 mL de medio de cultivo, se

taparon y se rotularon con plastic wrap. Por último, se llevaron los meristemos establecidos a la cámara de incubación para su posterior crecimiento y desarrollo.

### **Multiplicación *in vitro* de los explantes en los cultivares de fresa para la obtención de material**

Realizada la etapa de establecimiento *in vitro* de los cultivares de fresa, se emplearon brotes basales para aumentar su número e instalar los experimentos programados, para lo cual se preparó medio de cultivo de multiplicación a base de sales MS al 100%, (4,43 g L<sup>-1</sup>), sacarosa (22,5 g L<sup>-1</sup>), Ácido ascórbico (0,1 g L<sup>-1</sup>), Myo inositol (0,1 g L<sup>-1</sup>), Plant Preservation Mixture (PPM) (1 ml L<sup>-1</sup>), BAP (0,35 mg L<sup>-1</sup>), Zeatina (1,0 mg L<sup>-1</sup>) y Agar (6,5 g L<sup>-1</sup>). El pH del medio se ajustó a 5,8.

#### **B. Multiplicación *in vitro* de los cultivares de fresa**

##### **Preparación de medio de cultivo**

Se empleó MS al 100%, (4,43 g L<sup>-1</sup>), sacarosa (22,5 g L<sup>-1</sup>), Ácido ascórbico (0,15 g L<sup>-1</sup>), Myo inositol (0,1 g L<sup>-1</sup>), PPM (1 mL.L<sup>-1</sup>); se complementó el medio con diferentes dosis de cuatro citocininas (BAP, Zeatina trans, KIN y 2iP), concentraciones que se muestran en la tabla 2. Se ajustó el pH a 5,8 (con NaOH 1N y/o HCl 1N). Se calentó el medio en una cocina eléctrica hasta el punto de ebullición y se incorporó phytigel (1,5 g L<sup>-1</sup>) como agente gelificante. Por último, se vertió 40 mL de medio de cultivo a cada frasco magenta (de 77x77x97mm) y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### **Figura 1**

*Preparación de medio cultivo de multiplicación. a) Peso de insumos empleados para el medio de cultivo; b) Ajuste de pH del medio de cultivo; c) Dilución del agente gelificante; d) Colocación de medio de cultivo en los frascos magenta.*



### **Instalación del experimento para la multiplicación *in vitro* de los cultivares de fresa**

Se seleccionó los mejores plantines que presentaron adecuadas características morfológicas y fitosanitarias; de 4 a 5 hojas verdaderas para los tres cultivares (Aroma, Camino Real y Sabrina). Se cultivaron 5 plantines por magenta en medios de cultivo suplementado con las citocininas (Tabla 2), se sellaron los frascos magenta con Plastic wrap para evitar riesgo de contaminación por hongos y bacterias. Se realizó los registros de identificación (rotulados con fecha y código de tratamiento) y se trasladaron al ambiente de incubación, donde permanecieron durante seis semanas en un área climatizada a 24°C y fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Transcurrido seis semanas, se realizó la evaluación del número de brotes por explante en los tres cultivares.

#### **C. Aclimatación *ex vitro* de los cultivares de fresa**

##### **Preparación de sustrato**

Para la aclimatación de los plantines de fresa, se emplearon dos tipos de sustrato: sustrato tipo 1 (PROMIX) y sustrato tipo 2 (PROMIX + Humus de lombriz; en proporción 2:1). Los sustratos tipo 1 y 2, se humedecieron con agua a capacidad de campo y se llenaron en 6 bandejas de germinación con alveolos, donde cada bandeja germinadora representó un tratamiento.

##### **Selección de los plantines y siembra**

Se extrajeron los mejores brotes de fresas obtenido en la etapa de multiplicación, se separaron de forma individual, se enjuagaron con agua destilada estéril y se sembraron los brotes enraizados en bandejas que contenían sustrato a capacidad de campo. A cada uno de los germinadores, se les colocó el registro de identificación (rotulado con fecha y código de tratamiento). Los germinadores se colocaron dentro de bandejas de plástico con tapa transparente. Se dejó aclimatar por 4 semanas, y se realizó las evaluaciones de las respectivas variables.

#### **2.6. Variables evaluadas**

##### **Número de brotes por explante**

La evaluación de esta variable, se llevó a cabo a las 6 semanas después de la siembra de los brotes en el medio de multiplicación. Se realizó a través de la observación visual de cada tratamiento, en lo cual, se contabilizó los brotes por

explante, que tenían por lo menos un par de hojas verdaderas, y se determinó el promedio por unidad experimental.

$$\text{Nº de brotes} = \frac{\text{Total de brotes}}{\text{Nº de explantes}}$$

### **Número de raíces**

Para evaluar esta variable se realizó por medio de la observación, en la cual se contabilizaron las raíces principales y se determinó el promedio por unidad experimental.

### **Número de hojas verdaderas**

Para evaluar esta variable se realizó por medio de la observación, en la cual se contabilizaron las hojas trifoliadas que estaban completamente formadas y se determinó el promedio por unidad experimental.

### **Índice SPAD**

Para medir esta variable se empleó el instrumento medidor de clorofila Minolta SPAD-502, para lo cual se tomaron medidas en hojas jóvenes para todas las plántulas de los tres cultivares de fresa.



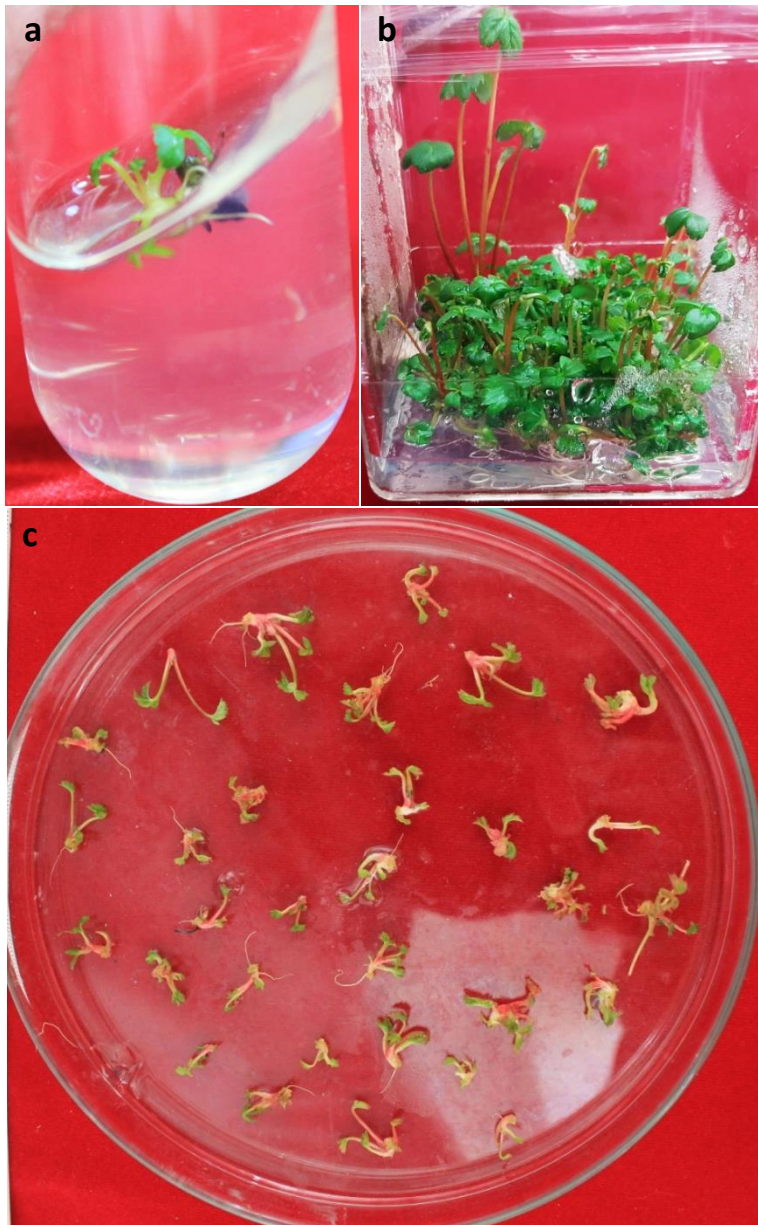
### III. RESULTADOS

#### 3.1. Multiplicación *in vitro* de los cultivares de fresa

Plantas de los cultivares de fresa Aroma, Sabrina y Camino Real, se realizó el establecimiento *in vitro* (Figura 2a) a partir de yemas basales. Una vez instaladas *in vitro* (Figura 2b), se colocaron en medios de crecimiento y desarrollo para la obtención de explantes (Figura 2c).

#### Figura 2

*Inducción de brotes en cultivares de fresa. a) Establecimiento in vitro de cultivares de fresa, b) Multiplicación de plántulas de fresa para la obtención de explantes, c) Brotes inducidos de fresa en la 6° semana de cultivo in vitro.*



En la Tabla 8, se muestra los efectos principales de las variables evaluadas. Referente al número de brotes del factor B: tipo de citocinina, el empleo de KIN + Zeatina Trans influyó en mayor inducción de brotes (18 brotes), siendo la prueba significativa. Los cultivares Aroma y Sabrina registraron mayor número de raíces y hojas, en comparación con el cultivar Camino Real. El empleo de BAP + Zeatina Trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>) registró mayor número de raíces, en tanto, el empleo de BAP o 2iP + Zeatina Trans, el mayor número de raíces fue obtenido cuando se empleó BAP + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>) y registraron mayor número de hojas por plántula en comparación con el uso de KIN + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabla 8**

*Comparación de medias de los efectos principales de la inducción de brotes en cultivares de fresa de las variables dependientes número de brotes, número de raíces y número de hojas.*

<b>Cultivar de fresa</b>	<b>N</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>Número de hojas</b>
Aroma	15	10,89 a	3,56 a	3,78 a
Sabrina	15	10,95 a	2,93 a	3,59 a
Camino Real	15	9,25 a	1,50 b	3,09 b
<b>Tipo de citocinina</b>	<b>N</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>Número de hojas</b>
BAP 1 mg L <sup>-1</sup> + Zeatina 1 mg L <sup>-1</sup>	15	6,43 b	3,90 a	3,78 a
KIN 1 mg L <sup>-1</sup> + Zeatina 1 mg L <sup>-1</sup>	15	17,83 a	1,23 c	3,03 b
2iP 1 mg L <sup>-1</sup> + Zeatina 1 mg L <sup>-1</sup>	15	6,83 b	2,85 b	3,65 a

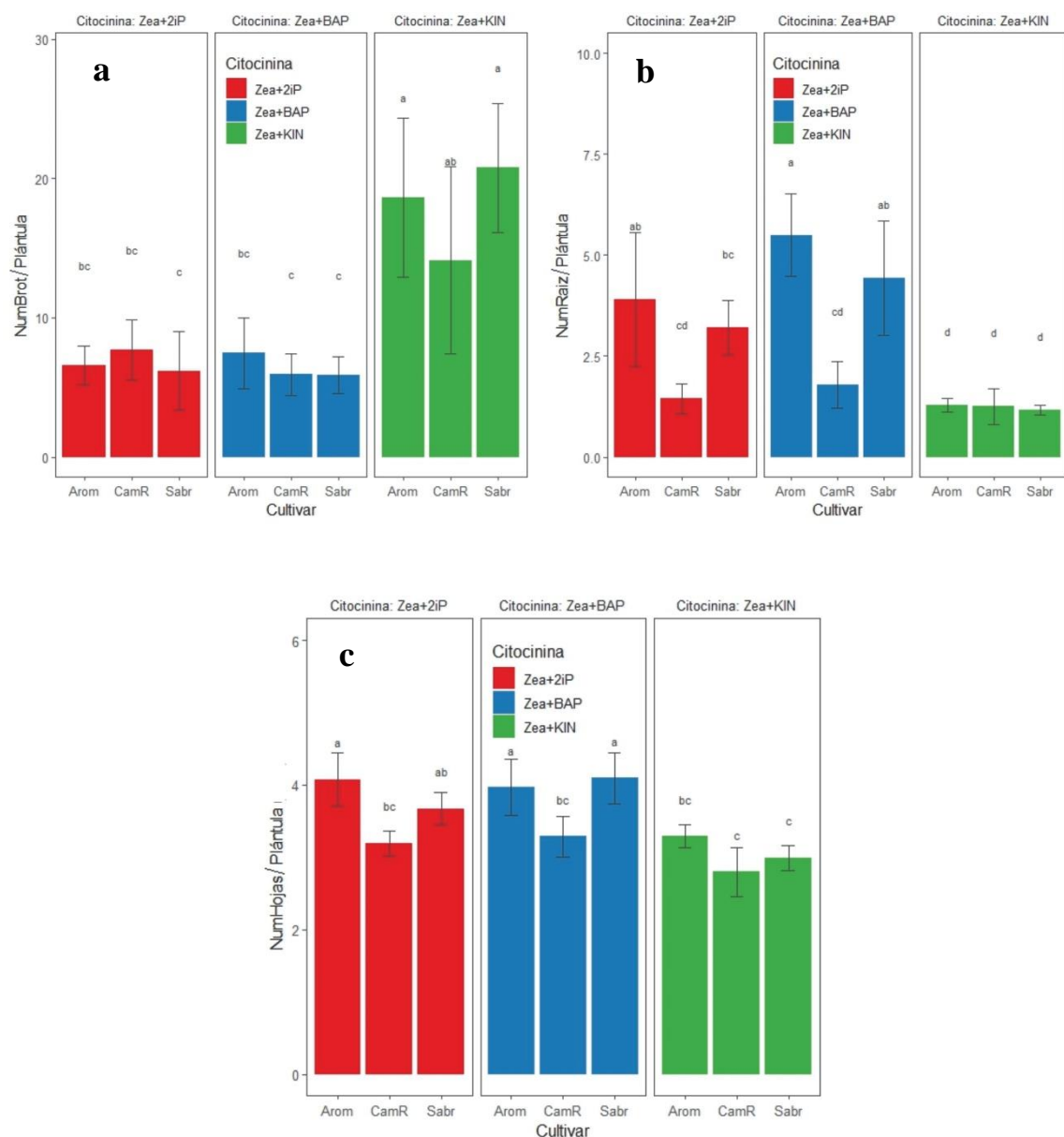
Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un P ≤ 0,05 de acuerdo con la prueba Tukey.

En la Figura 3, se muestra la comparación de medias de las variables evaluadas en la inducción de brotes en tres cultivares de fresa. Concerniente al número de brotes por plántula, el empleo de las citocinina KIN + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>) registraron el mayor número de brotes por explante (21 brotes), siendo significativa la prueba estadística, asimismo, el número de brotes no registró diferencias significativas entre los cultivares de fresa evaluados. El número de raíces de los brotes inducidos, fue diferente en los cultivares en estudio; en el cultivar Aroma, el mayor número de raíces, se indujeron cuando se empleó 2iP + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>) o BAP + Zeatine Trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>); en el cultivar Sabrina, el mayor número de raíces, fue obtenido cuando se

empleó BAP + Zeatine trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>); en tanto, en el cultivar Camino Real, el mayor número de raíces, fue obtenido cuando se empleó BAP + Zeatine trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>). El mayor número de hojas en los tres cultivares de fresa, se registraron cuando se empleó 2iP + Zeatine trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>) o BAP + Zeatine Trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>).

### Figura 3

*Inducción de brotes en cultivares de fresa. a) Número de brotes, b) Número de raíces, c) Número de hojas. Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un  $P \leq 0,05$  de acuerdo con la prueba Tukey.*

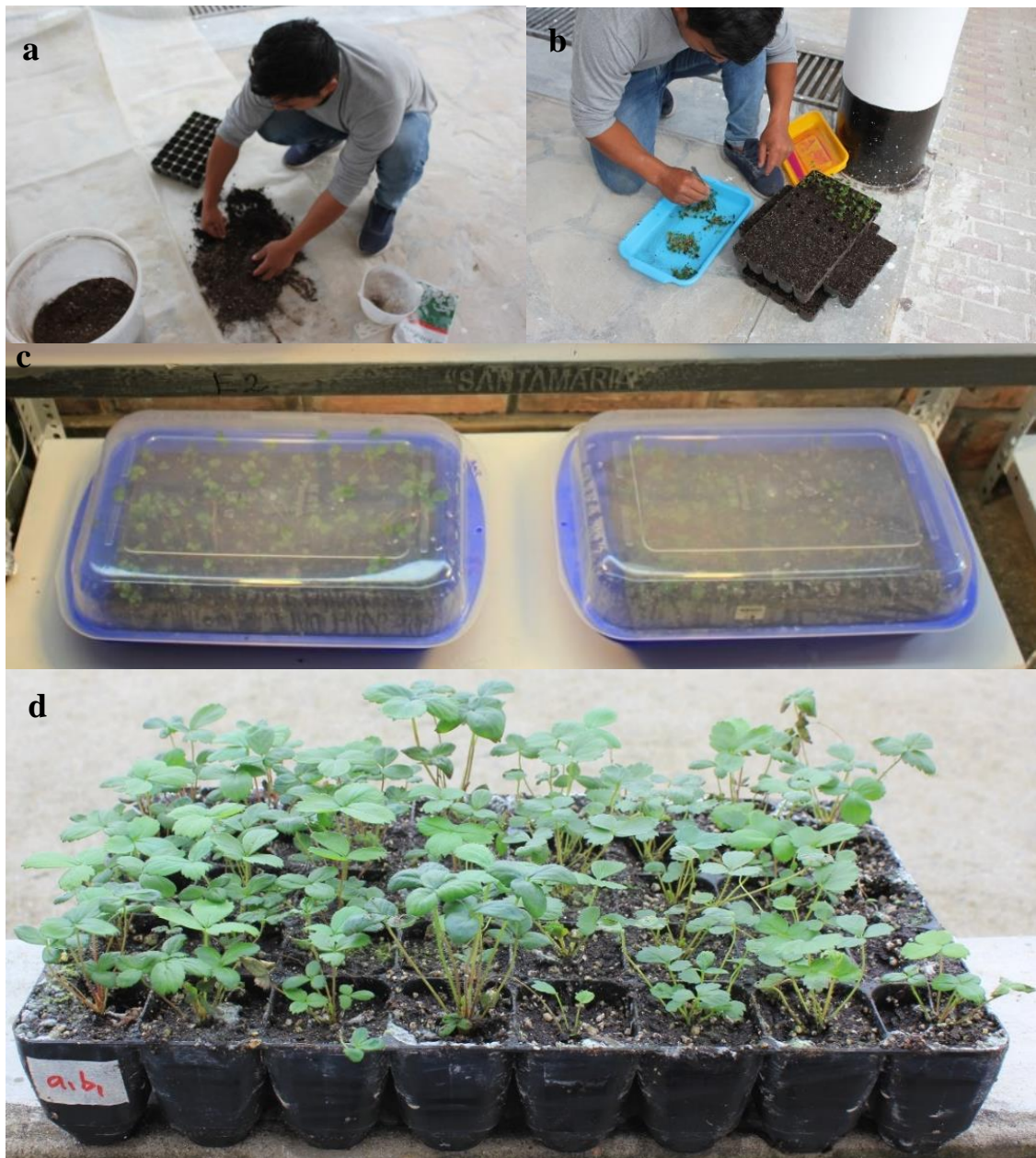


### 3.2. Aclimatación *ex vitro* de los cultivares de fresa

En la etapa de aclimatación de los brotes inducidos en los tres cultivares de fresa, se evaluó dos tipos de sustratos: PROMIX y PROMIX + humus de lombriz (Figura 4a), colocados en las bandejas y siembra de las plántulas (Figura 4b), y colocados en bandejas cubiertas para mantener la humedad (Figura 4c) por un periodo de seis semanas (Figura 4d).

**Figura 4**

*Aclimatación de plántulas de cultivares de fresa. a) Preparación de sustrato, b) Siembra en bandeja de plántulas de fresa, c) Crecimiento y desarrollo de plántulas de fresa, d) Plántulas de fresa en la 6<sup>o</sup> semana del proceso de aclimatación.*



En la Tabla 9, se muestra los efectos principales de las variables evaluadas. Referente al número de hojas, los cultivares Aroma y Sabrina, registraron el mayor número de hojas en comparación con el cultivar Camino Real, asimismo, el empleo de sustrato PROMIX registró el mayor número de hojas, siendo ambas pruebas significativas. En cuanto al número de raíces, los cultivares Aroma y Sabrina registraron el mayor número de raíces en comparación con el cultivar Camino Real, siendo la prueba significativa, en tanto, el empleo de diferentes sustratos no influyó en un mayor número de raíces, siendo la prueba no significativa. El índice de clorofila (SPAD) el cultivar Camino Real, registró el mayor valor de índice de clorofila, en comparación con los cultivares Aroma y Sabrina, siendo la prueba significativa, en tanto, el empleo de diferentes sustratos no influyó en un mayor número de raíces, siendo la prueba no significativa.

**Tabla 9**

*Comparación de medias de los efectos principales en la aclimatación de cultivares de fresa de las variables dependientes número de brotes, número de raíces y número de hojas.*

<b>Cultivar de fresa</b>	<b>N</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>SPAD</b>
Aroma	40	6,53 a	7,45 a	33,37 b
Camino Real	40	5,80 b	4,83 b	39,24 a
Sabrina	40	6,23 a	6,33 a	34,22 b
<b>Tipo de sustrato</b>	<b>N</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>SPAD</b>
PROMIX	60	6,60 a	6,45 a	36,24 a
PROMIX + HUMUS (2:1)	60	5,77 b	5,95 a	34,98 a

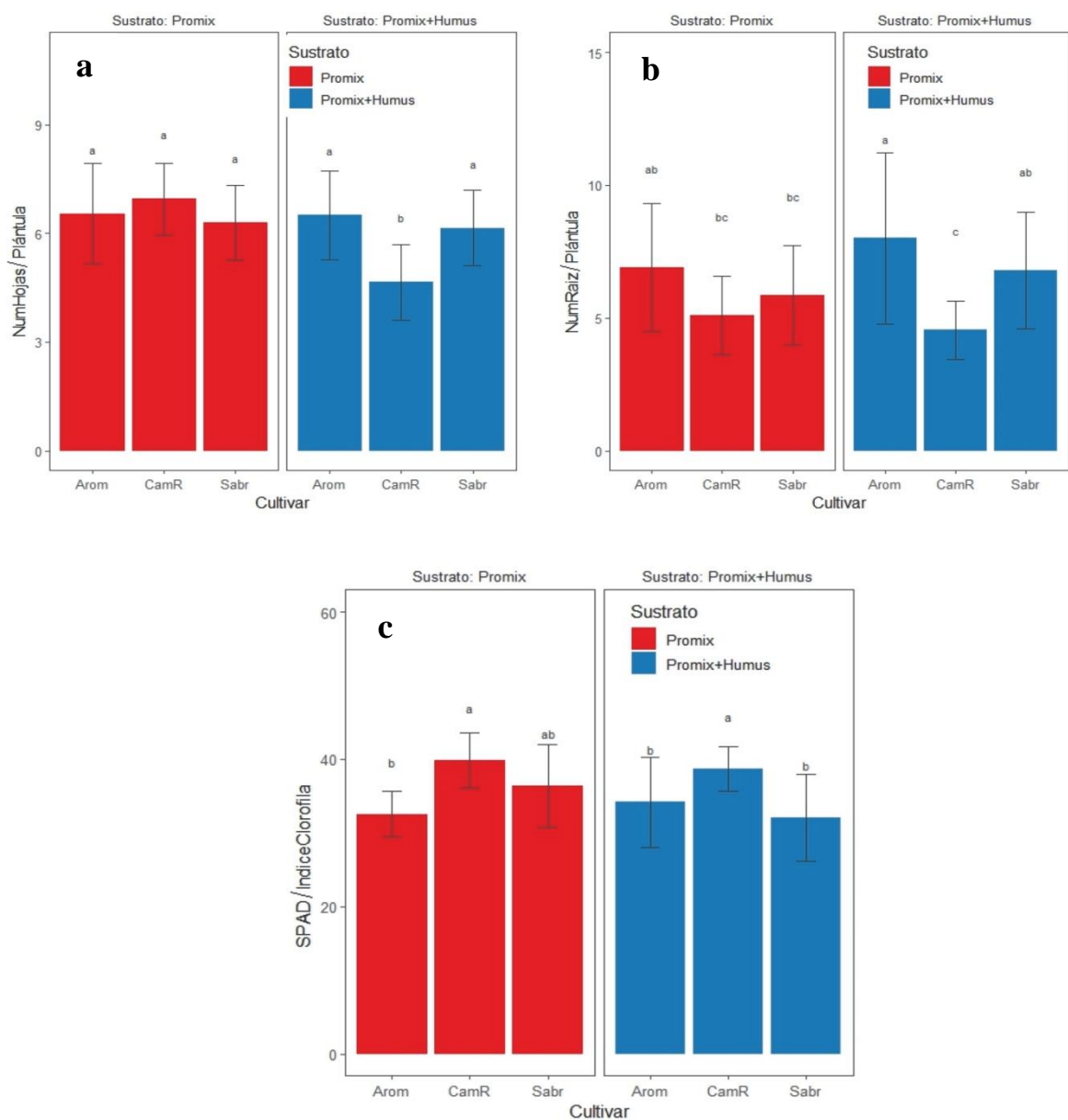
Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un  $P \leq 0,05$  de acuerdo con la prueba Tukey.

En la Figura 6, se muestra la comparación de medias de las variables evaluadas en la etapa de aclimatación de brotes en tres cultivares de fresa. Concerniente al número de hojas los cultivares Aroma y Sabrina, no mostraron diferencias significativas al emplear los dos tipos de sustratos, en tanto, en el cultivar Camino Real, el empleo de sustrato PROMIX registró mayor número de hojas, en comparación cuando se empleó sustrato PROMIX + Humus de lombriz. La respuesta del número de raíces fue diferente en los cultivares de fresa evaluados, el cultivar Aroma, no mostró diferencias significativas al emplear ambos sustratos, el cultivar Camino Real registró mayor número de raíces cuando se empleó el

sustrato PROMIX en comparación con el sustrato PROMIX + Humus de lombriz, en tanto el Cultivar Sabrina registró mayor número de raíces cuando se empleó sustrato PROMIX + Humus de lombriz, en comparación cuando se empleó sustrato PROMIX, siendo las pruebas significativas.

### Figura 5

*Aclimatación de plántulas de cultivares de fresa. a) Número de hojas, b) Número de raíces, c) SPAD. Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un  $P \leq 0,05$  de acuerdo con la prueba.*



## IV. DISCUSIONES

### 4.1. Multiplicación *in vitro* de los cultivares de fresa

Todos los explantes instalados en la etapa de multiplicación formaron raíces, pero el medio de cultivo suplementado con BAP + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>) o 2iP + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>), promovieron un mejor desarrollo del sistema radicular, además presentaron mayor número de hojas. Se han descrito efectos parecidos en la investigación de Neri et al., (2022) en la propagación *in vitro* de fresa cultivar aroma, donde registraron formación de raíces en el proceso de multiplicación; además demostraron que el uso de Zeatina (1 mg L<sup>-1</sup>) promueven un mejor desarrollo del sistema radicular. En estudios preliminares en cultivo *in vitro* de fresa, ya se había registrado presencia de raíces en la etapa de multiplicación; por lo que en el experimento ya no se realizó la etapa III (enraizamiento) del cultivo *in vitro*, si no que se extrajeron los mejores brotes enraizados obtenidas en la etapa de multiplicación y se sembraron en sustratos para su aclimatación. Se podría afirmar que fresa no necesita pasar por la etapa III del cultivo *in vitro*, ya que forman raíces en el medio de cultivo donde son transferidos para la inducción de brotes, es decir el proceso de multiplicación y enraizamiento ocurren simultáneamente (Castillo, 2004). Este puede ser importante al momento de optimizar costos de producción y reducir el tiempo de obtención de material vegetal de procedencia *in vitro*. El elevado costo de producción de plantas *in vitro* puede ser un factor limitante para las pequeñas empresas viveristas.

Por otro lado, en la inducción de brotes en los tres cultivares de fresa (Aroma, Camino real y Sabrina), Sabrina fue el que obtuvo mayor número de brotes por explante (21 brotes), seguido por Aroma (19 brotes) y Camino real (14 brotes) en medio suplementado con KIN + Zeatina trans (ambos 1 mg L<sup>-1</sup>). De la siguiente investigación se puede afirmar que la combinación de estas citocininas, es adecuada para la multiplicación *in vitro* de los tres cultivares de fresa. De la investigación de Neri et al., (2022), en la multiplicación *in vitro* de fresa aroma, el empleo de (1 mg L<sup>-1</sup>) Zeatina, no es eficiente para ser considerado un protocolo de micropropagación, ya que según sus reportes, solo lograron obtener (4,20 ± 0,86 brotes), lo cual es muy bajo en comparación a los resultados obtenidos en nuestra investigación para el mismo cultivar. Puede ser el caso de que Zeatina necesita actuar en combinación con

otras fitohormonas para potenciar sus efectos o emplear Zeatina en su forma trans solo o en combinación con KIN, ya que fue la mejor combinación para la multiplicación de brotes; además algunos autores afirman que zeatina en su forma trans es más potente, en comparación de *cis* Zeatina o Zeatina (Jordán & Casaretto, 2006).

El número de raíces y número de hojas de los brotes inducidos, fue diferente en los cultivares en estudio. La respuesta de estos cultivares, podría estar relacionado con la capacidad de regeneración, determinado por el genotipo (Pierik, 1990 citado por Mamani & Murillo, 2020). También se puede afirmar, que no solo depende del potencial de regeneración de cada cultivar, sino también, a la concentración y tipo de citocinina empleada. No todos los cultivares de fresa responden de manera similar a los medios de inducción, las respuestas en número de brotes varían significativamente (Villegas, 1990 citado por Mamani & Murillo, 2020). Esto concuerda con los resultados de Hernández et al., (2017), que durante la multiplicación de tres cultivares de fresa (portola, albión y camino real) con  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, obtuvo datos muy diversos, con resultados de (4, 3 y 8) brotes por explante respectivamente. Del mismo modo, empleando la misma concentración de BAP, Ashrafuzzaman et al., (2013), registró una media de 7 brotes por explante, para el cultivar BARI Strawberry-1. obteniendo también mayor número de hojas con una media de (5) en la misma concentración de BAP.

Dentro de la etapa de multiplicación *in vitro*, BAP es la citocinina más empleado, ya sea solo o en combinación con otras fitohormonas; en el cultivar Chandler,  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, la mayor inducción encontrada, fue de  $(6,3 \pm 0,15)$  brotes (Diengngan et al., 2014); para el cultivar Camarosa, el mayor número de brotes por explante  $(14,5 \pm 0,50)$ , se observaron en el medio que contenía  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> (Tanziman et al., 2012); para los cultivares Oso Grande y Sweet Charlie, en los medios que contenían  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, el mayor número de brotes encontrado, fue  $(10,6 \text{ y } 7,4)$  respectivamente, para el segundo sub cultivo (Mamani & Murillo, 2020); con las concentraciones de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP+ $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  KIN, el mayor número de brotes encontrados, fue de  $10,1 \pm 0,33$  (Sakila et al., 2007); con la concentración de KIN  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , BAP  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  y GA<sub>3</sub>  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  la máxima multiplicación de brotes registradas, fue 5,43 brotes (Kaur et al., 2005). Por otro lado, la citocinina “Zeatina”, hay escasos estudios sobre el uso de esta citocinina



en la multiplicación *in vitro* de fresa; puede deberse a su elevado costo en el mercado. De los pocos estudios, podemos encontrar las investigaciones de Neri et al., (2022), que en la multiplicación *in vitro*, empleando  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de Zeatina, la mayor inducción de brotes fue de  $(4,20 \pm 0,86)$  y además obtuvo mejores explantes con buen sistema radicular y mayor número de hojas  $(17,13 \pm 2,80)$ .

Para mejorar los estudios actuales podría ser importante el empleo de Zeatina trans en combinación con otras fitohormonas, ya que, en los resultados de la investigación, se obtuvieron buenos resultados en cuanto al número de brotes con medio MS suplementado con KIN + Zeatina trans. Del mismo modo, Haddadi et al., (2010), ha confirmado la importancia del TDZ para promover un alto número y porcentaje de formación de brotes en fresa, ya sea solo o actuando sinérgicamente con BAP, debido a que la presencia de TDZ y BAP son capaces de romper la dominancia apical y por lo tanto se produce la inducción de yemas laterales.

La baja inducción de brotes generado por los reguladores de crecimiento, puede deberse a que necesitan actuar sinérgicamente con otras fitohormonas para potenciar sus efectos (Neri et al., 2022). En la investigación de Sakila, BAP y Kinetina interactúan significativamente, ya que se obtuvieron mayor número de brotes que actuando por separado. En fitohormonas que son costosas como la Zeatina, sería recomendable trabajar en combinación con otros reguladores para así mejorar la eficiencia de los protocolos ya establecidos. Su elevado costo, pueda que sea un factor limitante para ser considerado un protocolo de micropropagación, ya que se busca obtener protocolos que sean eficientes y no muy costosos a la vez; y además una de las ventajas que se busca con el cultivo *in vitro* es la propagación masiva y rápida, lo que conlleva a encontrar un buen protocolo de multiplicación. Para obtener protocolos que sean eficiente en la inducción de brotes sería recomendable encontrar la dosis y la combinación adecuada de citocininas, aunque en la siguiente investigación, en donde se trabajó con diferentes citocininas, BAP, Kinetina y 2iP actuando cada uno cinérgicamente con Zeatina, se obtuvo buenos resultados, sobre todo pudiendo resaltar que Kinetina + Zeatina fue la mejor combinación de citocininas para la inducción de brotes.

#### **4.2. Aclimatación *ex vitro* de los cultivares de fresa**

Durante la aclimatación, las plántulas deben presentar sistema radicular bien desarrollado (Dewir et al., 2015); de tal manera que le permita asimilar de manera correcta el agua y los nutrientes. En la siguiente investigación se empleó para la aclimatación, plantas con un buen sistema radicular, lo que nos permitió conseguir una supervivencia del 100% de plantas aclimatadas. El sustrato PROMIX fue ideal para conseguir estos resultados, debido a sus componentes a base de turba de musgo, perlita, vermiculita, agentes humectantes, además cuenta con una formulación a base de fertilizantes. Su alta capacidad de aire y agua y buenas características de drenaje fueron ideales para aclimatar cultivares de fresa; las características físicas de este sustrato permiten que las plántulas de fresa no se deshidraten. Los plantines enraizados, suelen ser muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el logro o fracaso va depender del proceso de aclimatación (Castillo, 2004). Hay muchas técnicas empleadas por investigadores durante la aclimatación de plántulas de fresa, como, por ejemplo, empleando bandejas de germinar, colocándolos dentro de recipientes transparentes y cubiertas de tal manera que se simule un miniinvernadero, como lo que se empleó en la siguiente investigación. Hernández et al., (2017) durante el proceso de aclimatación, aplicó una estrategia interesante, colocó los brotes enraizados en una base plástica, simulando un sistema hidropónico flotante, cambiando de agua diariamente durante 15 días, y luego transfiriéndolas a sustrato a base de lombricomposta y agrolita, en una proporción de 1:1. Esta metodología le permitió aclimatar de forma rápida y sin estrés por pérdida de humedad. En los diferentes métodos de aclimatación, además de encontrar un sustrato adecuado, es importante adecuar las plántulas en un ambiente controlado de tal manera que no se pierdan por deshidratación. Otras técnicas que se suma a lo antes mencionado es realizar riegos frecuentes, manteniendo el sustrato a capacidad de campo, como las realizada por Haddadi et al., (2010), en sustrato a base de perlita, vermiculita y fibra de coco en proporción (2:1:2), además realizando riego con solución de Hoagland (solución hidropónica), obtuvo una supervivencia del 90% en el cultivar Camarosa. Por otro lado, Dhukate et al., (2021) en su estudio, en la aclimatación obtuvo una supervivencia del 95% para los cultivares Sweet Charlie' y 'Winter Dawn', en sustrato cocopeat.

En cuanto al índice de clorofila, los cultivares de fresa sembrados en sustrato PROMIX, presentaron valores favorables (36,24 SPAD) para su crecimiento y desarrollo; en los cultivares estudiados, el cultivar Sabrina registró el mayor valor de índice de clorofila. La cantidad de clorofila que está presente en las hojas puede variar según el cultivar, periodo vegetativo y abonado (Karele, 2001), y estrés hídrico (Bauerle et al., 2004). Varios investigadores recomiendan emplear el medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para la medición del estado nutricional de una planta con relación al contenido de nitrógeno. En la investigación de Neri et al., (2022), en la aclimatación de fresa, de cultivar Aroma, el índice de clorofila de plantas cultivadas en sustrato que contenía compost + turba + ácido húmico, presentaron valores de (40,69 SPAD), estos valores de índice de clorofila fueron superiores a los que se encontró en la investigación empleando PROMIX en el mismo cultivar. Esto puede estar relacionado directamente con el momento de evaluación de la variable, estado de la hoja evaluada (hoja joven, hoja adulta) y sustrato empleado.

Diversos trabajos presentan rangos de lectura de clorofila (SPAD) con el propósito de diagnosticar los niveles de nitrógeno en los cultivares; por ejemplo, un rango entre 35,2 y 42,2 es ideal para el cultivo de papa, Silva et al. (2009) citado por Ribeiro et al., (2015). En cultivo de fresa hidropónica Gómez, (2011), registró lecturas SPAD entre 54,4 y 56,2, entre 75 y 135 días de trasplante. De igual manera, se han registrado valores SPAD, en otro cultivo hidropónico de fresa, con 38,5 a 49,5 SPAD para hojas jóvenes y viejas, en diferentes sustratos (50% turba de coco + 50% perlita) (Ahmadizadeh et al., 2012).

El índice de clorofila es un indicador del contenido de nitrógeno en la planta y cuanto mayor sea la dosis de nitrógeno mayor será la eficiencia fotosintética de la planta, y con esto, mayor será el índice SPAD (Ribeiro et al., 2015). Por el contrario, si en las plantas aclimatadas, se observa que el índice SPAD es bajo, estará directamente relacionado con el tipo de sustrato empleado, de hecho al ser inadecuado puede ocasionar estrés hídrico, trayendo como consecuencia cambios en el sistema fotosintético y la disminución de los niveles de clorofila (Tembe et al., 2017). El nitrógeno tiene una función esencial en el crecimiento vegetativo de las plantas, sus funciones son de tipo estructural y osmótico (Mixquitla et al., 2020).

Para la aclimatación *ex vitro* es importante que los brotes tengan hojas bien desarrolladas, ya que realizaran fotosíntesis para que las plántulas tengan una fuente de energía que les permita generar más raíces y así poder asimilar de manera eficiente los nutrientes presentes en el sustrato. El contenido de clorofila de las hojas, está relacionado con el nivel de nitrógeno; y este está relacionado con la producción de clorofila, sin la cual las plantas no serían capaces de realizar fotosíntesis. Es por eso que, si el nivel de nitrógeno es bajo, la actividad fotosintética será baja también; en muchos casos se presenta clorosis en las hojas de plantas aclimatando, lo cual es un claro indicador de deficiencia nutricional. En la aclimatación *ex vitro* de los tres cultivares de fresa, no se observaron clorosis en las hojas, lo que se puede deducir que sus niveles de clorofila (SPAD) fueron adecuadas. Aunque no se sabe aún a ciencia cierta cuál es el rango adecuado de índice de clorofila que debe tener las plantas de fresas aclimatadas.

## V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la fase de multiplicación, describen un protocolo eficaz para la propagación *in vitro* de fresa. El uso de KIN ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + Zeatina Trans ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), resultó ser la mejor combinación de fitohormonas, ya que se logró el mayor número de brotes por explante. De hecho, el cultivar Sabrina obtuvo la mejor respuesta, obteniéndose una media de (21 brotes), seguido por Aroma (19 brotes) y Camino Real (14 brotes).

En la fase de aclimatación, se obtuvo una supervivencia del 100% de plantas aclimatadas. El sustrato PROMIX, demostró ser el mejor sustrato para la aclimatación de fresa, lo cual produjo mejor desarrollo morfológico, presentando mayor número de hojas, mayor número de raíces y mayor valor de índice de clorofila (SPAD).

## **VI. RECOMENDACIONES**

Realizar investigaciones en la etapa de multiplicación *in vitro*, con otros cultivares de fresa, empleando la misma y/o diferentes concentraciones de KIN + Zeatina trans.

Se recomienda, continuar esta investigación, llevando las plantas aclimatadas a campo definitivo y evaluar rendimiento aplicando diferentes dosis de fertilización.

Se recomienda continuar esta investigación, llevando las plantas aclimatadas a un sistema hidropónico.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadizadeh, M., Ebrahimi, R., & Ebrahimi, F. (2012). Effect of Different Substrates on Herbaceous Pigments and Chlorophyll Amount of Strawberry in Hydroponic Cultivation System. *J. Agric. & Environ. Sci*, 12(2), 154–158. [https://www.academia.edu/download/34241771/Ebrahimi\\_et\\_al.\\_1.PDF](https://www.academia.edu/download/34241771/Ebrahimi_et_al._1.PDF)
- Ariza, M., Martínez, E., Domínguez, P., Medina, J., Miranda, L., & Soria, C. (2015). Effects of harvest time on functional compounds and fruit antioxidant capacity in ten strawberry cultivars. *Journal of Berry Research*, 5(2), 71–80. <https://doi.org/10.3233/JBR-150090>
- Ashrafuzzaman, M., Faisal, S., Yadav, D., Khanam, D., & Raihan, F. (2013). Micropropagation of Strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 38(3), 467–472. <https://doi.org/10.3329/bjar.v38i3.16973>
- Badal, M., Shoyeb, M., Sarkar, R., Rahman, M., & Rahman, S. (2019). Clonal Propagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) through In vitro Runner Tip Culture through Incorporation of Growth Hormones. *Biotechnology Journal International*, 22(4), 1–9. <https://doi.org/10.9734/bji/2018/v22i430063>
- Bauerle, W., Weston, D., Bowden, J., Dudley, J., & Toler, J. (2004). Leaf absorptance of photosynthetically active radiation in relation to chlorophyll meter estimates among woody plant species. *Scientia Horticulturae*, 101(1–2), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.09.010>
- Beattie, J., Crozier, A., & Duthie, G. (2005). Potential Health Benefits of Berries. *Current Nutrition & Food Science*, 1(1), 71–86. <https://doi.org/10.2174/1573401052953294>
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). Plant Tissue Culture: An Introductory Text. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas*. [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf)
- Dewir, Y., Mahrouk, M., Murthy, H., & Paek, K. (2015). Micropropagation of *Cattleya*:

- Improved in vitro rooting and acclimatization. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 56(1), 89–93. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0108-z>
- Dhukate, M., Kher, M., Vadawale, A., & Giri, P. (2021). Protocol for micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) cv. ‘Sweet Charlie’ and ‘Winter Dawn.’ *Environmental and Experimental Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.22364/eeb.19.01>
- Diengngan, S., Murthy, B., & Mahadevamma, M. (2014). Effective decontamination and regeneration protocol for in vitro culture of strawberry cv . Chandler. *Journal of Horticultural Sciences*, 9(2), 126–130. <https://jhs.iihr.res.in/index.php/jhs/article/view/181>
- Félix, R., López, Y., & Miguel, A. (2017). *Micropropagación de tres variedades de Fragaria x ananassa (“portola”, “albión” Y “camino real”)*. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/article/view/225/206>
- Gómez, H. (2011). *Sistemas De Producción De Fresa De Altas Densidades*. <http://193.122.196.39:8080/xmlui/handle/10521/506>
- Haddadi, F., Aziz, M., Saleh, G., Rashid, A., & Kamaladini, H. (2010). Micropropagation of strawberry cv. camarosa: Prolific shoot regeneration from in vitro shoot tips using thidiazuron with n6-benzylamino-purine. *HortScience*, 45(3), 453–456. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.3.453>
- Hannum, S. M. (2004). Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408690490263756>
- Jhajhra, S., Dashora, L., Singh, J., Bhatnagar, P., Kumar, A., & Arya, C. (2018). In-vitro Propagation of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), 3030–3035. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.353>
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. <https://www.academia.edu/download/31848275/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Karele, I. (2001). Chlorophyll content distribution in leaves, stems, and ears in winter



- wheat. *Plant Nutrition*, 720–721. [https://doi.org/10.1007/0-306-47624-x\\_349](https://doi.org/10.1007/0-306-47624-x_349)
- Kaur, R., Gautam, H., & Sharma, D. (2005). A low cost strategy for micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cv. Chandler. *Acta Horticulturae*, 696(Table 1), 129–133. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.696.22>
- Kumar, M., Patel, S., Rajbhar, Y., Kumar, V., Azad, C., Yadav, L., Kumar, J., Singh, B. P., Yadav, A., & Singh, P. (2020). Studies on the effect of different surface sterilization agents under in-vitro culture of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) variety “Chandler.” ~ 1833 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(6), 1833–1835. [www.phytojournal.com](http://www.phytojournal.com)
- León Carrasco, J. (2021). *El 99 % de las exportaciones peruanas de fresas son congeladas y solo el 1 % son frescas*. Agraria.Pe. <https://agraria.pe/noticias/el-99-de-las-exportaciones-peruanas-de-fresas-son-congeladas-29106>
- Mahmoud, K., Najar, A., Jedid, E., Jemai, N., & Jemmali, A. (2017). Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of New Sciences*, 47(2), 2564–2576. <https://rkks.eu/agri-biotech/69-volume-47/384-tissue-culture-techniques-for-clonal-propagation,-viral-sanitation-and-germplasm-improvement-in-strawberry-fragaria-x-ananassa-duch.html>
- Mamani, B., & Murillo, R. (2020). Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassz* Duch.) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69–78. [http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n1/v7n1\\_a10.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n1/v7n1_a10.pdf)
- Mixquititla, G., Villegas, O., Andrade, M., Sotelo, H., & Cardoso, A. (2020). Crecimiento, rendimiento y calidad de fresa por efecto del régimen nutrimental. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1337–1348. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2329>
- Neri, J., Meléndez, J., Tejada, J., Vilca, N., Huaman, E., Oliva, M., & Goñas, M. (2022). An Optimized Protocol for Micropropagation and Acclimatization of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Variety ‘Aroma.’ *Agronomy*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy12040968>
- Ramírez, L., Caamal, I., Pat, V., Martínez, D., & Pérez, A. (2020). Análisis de los

- indicadores de competitividad de las exportaciones de fresa mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(4), 815–827. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342020000400815](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342020000400815)
- Redagrícola. (2022). *Fresa , granada , cereza y pitahaya son las frutas con mayor potencial exportador* Redagrícola. <https://www.redagricola.com/pe/fresa-granada-cereza-y-pitahaya-son-las-frutas-con-mayor-potencial-exportador/>
- Ribeiro, A., Katz, I., De Pádua, A., Andres, R., & Uribe, M. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *IDESIA*, 33, 97–106. <https://www.scielo.cl/pdf/idesia/v33n2/art12.pdf>
- Sakila, S., Ahmed, M., Roy, U., Biswas, M., Karim, R., Razvy, M., Hossain, M., Islam, R., & Hoque, A. (2007). Micropropagation of Strawberry ( *Fragaria X ananassa* Duch .) A Newly Introduced Crop in Bangladesh. *Ameriacaan-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2(2), 151–154. <https://www.academia.edu/download/38542017/15.pdf>
- Sánchez, M, & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 21–26. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221549>
- Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In *Fondo editorial, Universidad de Cordoba*. <https://core.ac.uk/download/pdf/288339333.pdf>
- Tanziman, A., Karim, R., Karim, M., Ahmad, S., Islam, R., & Hossain, M. (2012). Effects of different hormones on in vitro regeneration of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) *International Journal of Biosciences (IJB)*. *Int. J. Biosci.*, 2(10), 86–92. <https://www.academia.edu/download/52294878/Ara>
- Tembe, K. O., Chemining'wa, G., Ambuko, J., & Owino, W. (2017). Effect of water stress on yield and physiological traits among selected African tomato (*Solanum lycopersicum*) land races Kenneth. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 10(2), 78–85. <http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/15>

**ANEXO**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO “MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE LOS CULTIVARES DE FRESA”**

**ANOVA Factorial 3A x 3B bajo un diseño DCA**

**El Sistema SAS**

**El procedimiento GLM**

**Variable Dependiente: Número de Brotes**

<b>Analysis of variance</b>					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	27.18189468	3.39773683	12.92	<.0001
Error	36	9.46738509	0.26298292		
Corrected Total	44	36.64927977			

Variable	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Num Brot Mean
Número de brotes	0.741676	16.17634	0.512819	3.170176

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	0.40891311	0.20445656	0.78	0.4671
B	2	24.84640493	12.42320246	47.24	<.0001
A*B	4	1.92657663	0.48164416	1.83	0.1441

**El sistema SAS**

**El procedimiento GLM**

**Prueba de Scheffe para Numero Brotes**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	0.262983
Critical Value of F	3.25945
Minimum Significant Difference	0.4781

NOTA: Esta prueba controla la tasa de error de tipo I en el experimento.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	3.259	15	a1
A	3.2136	15	a2
A	3.0379	15	a3

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.

**El sistema SAS**  
**El procedimiento GLM**  
**Prueba de Scheffe para el Número de Brotes**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	0.262983
Critical Value of F	3.25945
Minimum Significant Difference	0.4781

NOTA: Esta prueba controla la tasa de error de tipo I en el experimento.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	4.2203	15	b2
B	2.6799	15	b3
B	2.6104	15	b1

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.

<b>Número de Brotes</b>			
Cultivar	Citocinina	NumBrot_mean	sd Tukey
<chr>	<chr>	<dbl> <dbl>	<chr>
1 Sabr	Zea+KIN	20.8	4.63 a
2 Arom	Zea+KIN	18.6	5.72 a
3 CamR	Zea+KIN	14.1	6.73 ab
4 CamR	Zea+2iP	7.7	2.18 bc
5 Arom	Zea+BAP	7.46	2.55 bc
6 Arom	Zea+2iP	6.6	1.39 bc
7 Sabr	Zea+2iP	6.2	2.79 c
8 CamR	Zea+BAP	5.94	1.51 c
9 Sabr	Zea+BAP	5.88	1.32 c

**ANEXO 2**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO “MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE LOS CULTIVARES DE FRESA”**

**ANOVA DCA Número de raíces en el cultivo *in vitro* de fresa.**

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Dependent Variable: Número de Raíz**

<b>Analysis of variance</b>					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	7.80901704	0.97612713	19.64	<.0001
Error	36	1.78961389	0.04971150		
Corrected Total	44	9.59863093			

Variable	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NumRaiz	Mean
Número de raíz	0.813555	12.98121	0.222961	1.717565	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	2.36629220	1.18314610	23.80	<.0001
B	2	4.18972180	2.09486090	42.14	<.0001
A*B	4	1.25300303	0.31325076	6.30	0.0006

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Prueba de Scheffe para Número de Raíz**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	0.049711
Critical Value of F	3.25945
Minimum Significant Difference	0.2079

NOTA: Esta prueba controla la tasa de error de tipo I en el experimento.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	1.94586	15	a1
A	1.80288	15	a2
B	1.40395	15	a3

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Prueba de Scheffe para Número de Raíz**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	0.049711
Critical Value of F	3.25945
Minimum Significant Difference	0.2079

NOTA: Esta prueba controla la tasa de error de tipo I en el experimento.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	2.04905	15	b1
B	1.79109	15	b3
C	1.31256	15	b2

Las medias con la misma letra no difieren significativamente.

Número de raíces			
Cultivar <chr>	Citocinina <chr>	NumRaiz_mean <dbl> <dbl>	sd Tukey <chr>
1 Arom	Zea+BAP	5.50	1.02 a
2 Sabr	Zea+BAP	4.42	1.42 ab
3 Arom	Zea+2iP	3.90	1.65 ab
4 Sabr	Zea+2iP	3.21	0.664 bc
5 CamR	Zea+BAP	1.79	0.568 cd
6 CamR	Zea+2iP	1.45	0.373 cd
7 Arom	Zea+KIN	1.29	0.176 d
8 CamR	Zea+KIN	1.25	0.433 d
9 Sabr	Zea+KIN	1.16	0.123 d

### ANEXO 3

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO “MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE LOS CULTIVARES DE FRESA”

ANOVA DCA Número de hojas en el cultivo *in vitro* de fresa.

**Número de hojas**  
**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Dependent Variable: Número de Hojas**

Analysis of variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	9.35479111	1.16934889	14.12	<.0001
Error	36	2.98192000	0.08283111		
Corrected Total	44	12.33671111			

Variable	R-Square	Coeff Var	Root MSE	NumHojas Mean
Número de hojas	0.758289	8.257047	0.287804	3.485556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	3.75949778	1.87974889	22.69	<.0001
B	2	4.88781778	2.44390889	29.50	<.0001
A*B	4	0.70747556	0.17686889	2.14	0.0964

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Scheffe's Test for NumHojas**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	0.082831
Critical Value of F	3.25945
Minimum Significant Difference	0.2683

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	3.7780	15	a1
A	3.5867	15	a2
B	3.0920	15	a3

Means with the same letter are not significantly different.

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Scheffe's Test for NumHojas**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	0.082831
Critical Value of F	3.25945
Minimum Significant Difference	0.2683

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	3.7827	15	b1
A	3.6480	15	b3
B	3.0260	15	b2

**Número de hojas**

Cultivar <chr>	Citocinina <chr>	NumHojas_mean <dbl> <dbl>	sd Tukey <chr>
1 Sabr	Zea+BAP	4.10	0.353 a
2 Arom	Zea+2iP	4.08	0.370 a
3 Arom	Zea+BAP	3.97	0.388 a
4 Sabr	Zea+2iP	3.67	0.223 ab
5 Arom	Zea+KIN	3.29	0.164 bc
6 CamR	Zea+BAP	3.29	0.287 bc
7 CamR	Zea+2iP	3.19	0.177 bc
8 Sabr	Zea+KIN	2.99	0.180 c
9 CamR	Zea+KIN	2.80	0.333 c

**ANEXO 4**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO “ACLI MATACIÓN EX VITRO DE LOS CULTIVOS DE FRESA”**

**ANOVA Factorial 3A x 2B bajo un diseño DCA**

**B. Aclimatación  
Número de hojas  
The SAS System  
The GLM Procedure  
Dependent Variable: NumHojas**

<b>Analysis of variance</b>					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	63.7666667	12.7533333	9.94	<.0001
Error	114	146.2000000	1.2824561		
Corrected Total	119	209.9666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NumHojas Mean
0.303699	18.31465	1.132456	6.183333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	10.61666667	5.30833333	4.14	0.0184
B	1	20.83333333	20.83333333	16.24	0.0001
A*B	2	32.31666667	16.15833333	12.60	<.0001

**The SAS System  
The GLM Procedure  
Scheffe's Test for NumHojas**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	114
Error Mean Square	1.282456
Critical Value of F	3.07585
Minimum Significant Difference	0.6281

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	6.5250	40	a1
B A	6.2250	40	a3
B	5.8000	40	a2

Means with the same letter are not significantly different.



**The SAS System  
The GLM Procedure  
Scheffe's Test for NumHojas**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	114
Error Mean Square	1.282456
Critical Value of F	3.92433
Minimum Significant Difference	0.4096

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	6.6000	60	b1
B	5.7667	60	b2

Means with the same letter are not significantly different.

Número de hojas				
Cultivar	Sustrato	NumHojas_mean	sd	Tukey
<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<chr>
1 CamR	Prom	6.95		0.999 a
2 Arom	Prom	6.55		1.39 a
3 Arom	PrHum	6.5		1.24 a
4 Sabr	Prom	6.3		1.03 a
5 Sabr	PrHum	6.15		1.04 a
6 CamR	PrHum	4.65		1.04 b

**ANEXO 5**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO “ACLIMATACIÓN EX VITRO DE LOS CULTIVOS DE FRESA”**

**ANOVA DCA Número de raíces en la aclimatación de fresa**

**Número de raíces  
The SAS System  
The GLM Procedure  
Dependent Variable: NumRaices**

Analysis of variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	162.9000000	32.5800000	6.98	<.0001
Error	114	532.3000000	4.6692982		
Corrected Total	119	695.2000000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NumRaices Mean
0.234321	34.85251	2.160856	6.200000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	138.7500000	69.3750000	14.86	<.0001
B	1	7.5000000	7.5000000	1.61	0.2076
A*B	2	16.6500000	8.3250000	1.78	0.1728

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Scheffe's Test for NumRaices**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	114
Error Mean Square	4.669298
Critical Value of F	3.07585
Minimum Significant Difference	1.1984

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	7.4500	40	a1
A	6.3250	40	a3
B	4.8250	40	a2

Means with the same letter are not significantly different.

**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Scheffe's Test for NumRaices**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	114
Error Mean Square	4.669298
Critical Value of F	3.92433
Minimum Significant Difference	0.7815

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	6.4500	60	b2
A	5.9500	60	b1

Means with the same letter are not significantly different.

<b>Número de raíz</b>			
Cultivar <chr>	Sustrato <chr>	NumRaiz_mean <dbl> <dbl>	sd Tukey <chr>
1 Arom	PrHum	8	3.23 a
2 Arom	Prom	6.9	2.43 ab
3 Sabr	PrHum	6.8	2.19 ab
4 Sabr	Prom	5.85	1.87 bc
5 CamR	Prom	5.1	1.48 bc
6 CamR	PrHum	4.55	1.10 c

## ANEXO 6

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO “ACLI MATACIÓN EX VITRO DE LOS CULTIVOS DE FRESA”

#### ANOVA DCA Índice SPAD en aclimatación de fresa

**SPAD**  
**The SAS System**  
**The GLM Procedure**  
**Dependent Variable: SPAD**

<b>Analysis of variance</b>					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1031.025417	206.205083	9.07	<.0001
Error	114	2592.990500	22.745531		
Corrected Total	119	3624.015917			
		R-Square	Coeff Var	Root MSE	SPAD Mean
		0.284498	13.39263	4.769227	35.61083
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	805.7901667	402.8950833	17.71	<.0001
B	1	48.0067500	48.0067500	2.11	0.1490
A*B	2	177.2285000	88.6142500	3.90	0.0231

**The SAS System  
The GLM Procedure  
Scheffe's Test for SPAD**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	114
Error Mean Square	22.74553
Critical Value of F	3.07585
Minimum Significant Difference	2.645

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	39.243	40	a2
B	34.220	40	a3
B	33.370	40	a1

Means with the same letter are not significantly different.

**The SAS System  
The GLM Procedure  
Scheffe's Test for SPAD**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	114
Error Mean Square	22.74553
Critical Value of F	3.92433
Minimum Significant Difference	1.7249

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	36.2433	60	b1
A	34.9783	60	b2

Means with the same letter are not significantly different.

<b>SPAD</b>			
Cultivar <chr>	Sustrato <chr>	SPAD_mean <dbl>	sd Tukey <dbl> <chr>
1 CamR	Prom	39.8	3.79 a
2 CamR	PrHum	38.7	2.97 a
3 Sabr	Prom	36.4	5.65 ab
4 Arom	PrHum	34.2	6.13 b
5 Arom	Prom	32.5	3.06 b
6 Sabr	PrHum	32.1	5.87 b