

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE DOS VARIEDADES DE
FRUTILLA (*Fragaria ananassa* Duch.) PARA SU
MICROPROPAGACIÓN EN DIFERENTES
MEDIOS DE CULTIVO**

BEATRIZ MAMANI SÁNCHEZ

LA PAZ – BOLIVIA

2005

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE DOS VARIETADES DE FRUTILLA
(*Fragaria ananassa* Duch.) PARA SU MICROPROPAGACIÓN EN
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO**

*Tesis de Grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

BEATRIZ MAMANI SÁNCHEZ

Tutor:

Ing. Rafael Murillo García

Asesores:

Ing. Jorge A. N. Quezada Portugal

Ing. M.Sc. Jorge Pascuali Cabrera

Comité Revisor:

Dra. M.Sc. M. Eugenia Ascarrunz G.

Ing. M.Sc. Celia Fernández Chávez

Ing. Freddy Porco Chiri

APROBADA

Vice-Decano:

Ing. M.Sc. Félix Rojas Ponce

DEDICATORIA

A Dios por guiar mis pasos en todo momento.

*A mis padres Albina y Juan por todo su amor
sacrificio, apoyo incondicional y confianza.*

A mis hermanos por todo el cariño que me dan.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a Dios por haberme regalado la vida y lograr alcanzar mis sueños y conocer el cariño de mi familia.

A mis padres Albina y Juan y a mis hermanos: Roció, José Luis, Jaime, Carola, Henry, Freddy y a mi adorado sobrinito por todo su apoyo incondicional y confianza.

A los docentes de la Facultad de Agronomía por sus enseñanzas durante mis estudios universitarios.

Al Instituto de Biología Molecular y Biotecnología en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal y a los investigadores, por haberme colaborado en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Ing. Jorge Quezada Portugal y Ing. M. Sc. Jorge Pascuali Cabrera y al Ing. Rafael Murillo por transmitirme sus conocimientos, paciencia y tiempo para la culminación del presente trabajo.

A la Dra. M. Sc. M. Eugenia Ascarrunz, Ing. M. Sc. Celia Fernández y al Ing. Freddy Porco por sus sugerencias, dedicación y tiempo para la culminación del presente estudio.

A la Ing. Jeannette Pérez Docente de la Escuela Militar de Ingeniería por haberme colaborado con la enseñanza en cultivo de tejidos vegetales.

Al Ing. Roberto Miranda y al Dr. Vladimir Orsag por toda su colaboración brindada durante la presente investigación.

A la Señora Gabriela Vargas por su amistad y confianza recibida en mi persona.

A mis amigos de la Facultad de Agronomía: Angélica Toledo, Roxana Mamani, Sergio Moreira, Katthy Torrico, Anita Villegas, Virginia Montaña, Kendy Cárdenas, Nelly Calle y demás amigos, por todo su apoyo no solo en esta investigación sino durante toda la carrera.

A mis amigos de la Unidad de Biotecnología Vegetal M. Cristina López, Cecilia Vega, Gabriela Villegas, Ester Conde, Juan Carlos Bermejo M. Cristina Santa Cruz, Paola, Lorena, Alfredo Sánchez y Delmi por compartir agradables momentos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedente.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.2 Objetivo General.....	3
1.3.3 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Hipótesis.....	4
1.4.1 Hipótesis Nula.....	4
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Frutilla.....	5
2.2 Taxonomía de la Frutilla.....	5
2.3 Descripción Botánica de la Frutilla.....	6
2.4 Reproducción en Frutilla.....	7
2.4.1 Reproducción Sexual.....	7
2.4.2 Reproducción Asexual.....	7
2.5 Variedades de Frutilla.....	8
2.5.1 Variedad Oso Grande.....	8
2.5.2 Variedad Sweet Charlie.....	9
2.6 Rendimiento de la Frutilla por Variedades.....	9
2.7 Enfermedades en Frutilla.....	9
2.8 Biotecnología Vegetal.....	10
2.9 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	11
2.10 Métodos de Regeneración.....	11
2.10.1 Embriogénesis Somática.....	11

2.10.2	Organogénesis.....	12
2.10.2.1	Formación de Yemas Adventicias.....	12
2.10.2.2	Formación de Yemas Axilares.....	13
2.11	Cultivo de Yemas (Ápices).....	13
2.12	Micropropagación.....	14
2.13	Ventajas de la Micropropagación.....	14
2.14	Etapas de la Micropropagación.....	15
2.15	Medios de Cultivo.....	15
2.16	Composición del Medio de Cultivo.....	15
2.16.1	Sales Inorgánicas o Minerales.....	16
2.16.2	Compuestos Orgánicos.....	16
2.16.2.1	Fuentes de Carbono.....	16
2.16.2.2	Reguladores de Crecimiento.....	17
2.16.2.3	Vitaminas.....	20
2.16.2.4	Aminoácidos y Amidas.....	20
2.16.3	Complejos Naturales.....	20
2.16.4	Materiales Inertes de Soporte.....	21
2.17	Contaminación en Frutilla.....	21
2.18	Explantes para el Establecimiento <i>in vitro</i> en Frutilla.....	22
2.19	Medios para la Micropropagación en Frutilla.....	22
2.20	Ventajas de la Micropropagación en los Rendimientos de Frutilla.....	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1	Localización.....	25
3.1.1	Ubicación Geográfica.....	25
3.2	Materiales.....	25
3.2.1	Material Vegetal.....	25
3.2.2	Equipos y Materiales de Laboratorio.....	26
3.2.3	Metodología.....	26
3.3.1	Fase 0: Selección de Plantas Donadoras de Frutilla.....	27
3.3.2	Fase 1: Establecimiento de Frutilla.....	28
3.2.3.1	Efecto de la Desinfección en dos tipos de Explantes de Frutilla.....	29
3.2.3.1.1	Diseño Experimental para la Desinfección de Explantes de Frutilla.....	30
3.2.3.1.2	Variables de Respuesta para la Desinfección de Explantes de	

Frutilla.....	31
3.2.3.2 Efecto de los Medios de Cultivo en dos Variedades de Frutilla.....	32
3.2.3.2.1 Diseño Experimental para los Medios de Cultivo en Variedades de Frutilla.....	32
3.2.3.2.2 Variables de Respuesta para el Efecto de los Medios en variedades de Frutilla.....	33
3.3.3 Fase II: Multiplicación de Frutilla.....	35
3.3.3.1 Diseño Experimental Fase II: Multiplicación de Frutilla.....	36
3.3.3.2 Variables de Respuesta para la Fase II: Multiplicación de Frutilla.....	37
3.3.4 Fase III: Enraizamiento de Frutilla.....	38
3.3.4.1 Diseño Experimental para la Fase III: Enraizamiento de Frutilla.....	39
3.3.4.2 Variables de Respuesta Fase III: Enraizamiento de Frutilla.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
4.1 Fase 1: Establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	42
4.1.1 Efecto de la Desinfección sobre dos tipos de Explantes de Frutilla para su Establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	42
4.1.1.1 Porcentaje de explantes no contaminados.....	42
4.1.1.2 Porcentaje de necrosis.....	43
4.1.1.3 Porcentaje de oxidación.....	45
4.1.1.4 Porcentaje de necrosis para yemas de estolones.....	46
4.1.1.5 Tiempo de formación de una hoja <i>in vitro</i> en dos tipos de explantes...	48
4.1.2 Elección del Mejor Explante.....	50
4.1.3 Efecto de los Medios de Cultivo en dos Variedades de Frutilla.....	51
4.1.3.1 Porcentaje de contaminación.....	51
4.1.3.2 Porcentaje de sobrevivencia.....	52
4.1.3.3 Porcentaje de oxidación.....	52
4.1.3.4 Tamaño de los explantes a los 28 días de su establecimiento.....	53
4.1.3.5 Crecimiento relativo del explante.....	57
4.1.3.6 Días a la formación de dos hoja <i>in vitro</i>	58
4.1.4 Análisis del Efecto de los Medios de Cultivo en dos Variedades.....	61
4.2 Fase 2: Multiplicación.....	61
4.2.1 Primer subcultivo.....	61
4.2.1.1 Número de brotes.....	61
4.2.1.2 Longitud de brotes.....	63

4.2.1.3	Número de hojas.....	65
4.2.1.4	Número de raíces por brote.....	67
4.2.2	Segundo subcultivo.....	71
4.2.2.1	Número de brotes.....	71
4.2.2.2	Longitud de Brotes.....	74
4.2.3	Tercer subcultivo.....	75
4.2.3.1	Número de brotes.....	75
4.2.3.2	Longitud de Brotes.....	79
4.2.4	Análisis de la Fase de Multiplicación de dos Variedades por Subcultivos...	80
4.3	Fase 3: Enraizamiento.....	82
4.3.1	Crecimiento relativo de la parte aérea.....	82
4.3.2	Materia seca de la parte aérea.....	83
4.3.3	Número de raíces.....	84
4.3.4	Longitud de raíces.....	87
4.3.5	Materia seca de las raíces.....	90
4.3.6	Porcentaje de explantes que forman raíces.....	91
4.3.7	Análisis de la Fase de Enraizamiento.....	95
5	CONCLUSIONES.....	97
6	RECOMENDACIONES.....	99
7	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	100

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Comparación de rendimientos por variedades de frutilla.....	9
Cuadro 2.	Enfermedades en el cultivo de frutilla.....	10
Cuadro 3.	Formulación de medios para la micropropagación en frutilla.....	23
Cuadro 4.	Comparación de rendimientos en frutilla mediante el método tradicional vs. micropropagación.....	24
Cuadro 5.	Comparación en la producción de estolones por variedades mediante el método tradicional y micropropagación	24
Cuadro 6.	Tratamientos resultantes de las combinaciones de tipo de explantes de frutilla y tiempos de inmersión al desinfectante al 2% de concentración de NaClO.....	29
Cuadro 7.	Tratamientos desinfectantes para yemas provenientes de estolones de frutilla para su introducción a condiciones <i>in vitro</i>	29
Cuadro 8.	Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la fase de establecimiento de frutilla.....	33
Cuadro 9.	Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la fase de multiplicación de frutilla.....	37
Cuadro 10.	Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la fase de enraizamiento de frutilla.....	39
Cuadro 11.	Análisis de varianza para explantes no contaminados.....	42
Cuadro 12.	Análisis de varianza para el porcentaje de necrosis en dos tipos de explantes.....	44
Cuadro 13.	Análisis de varianza para la oxidación en dos tipos de explantes...	45
Cuadro 14.	Análisis de varianza para la variable necrosis en explantes de estolones.....	47
Cuadro 15.	Análisis de varianza para la variable tiempo de formación de una hoja <i>in vitro</i> en dos tipos de explantes (estolones y corona).....	48
Cuadro 16.	Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación.....	51
Cuadro 17.	Análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia.....	52
Cuadro 18.	Análisis de varianza para la oxidación en dos variedades de frutilla.....	52
Cuadro 19.	Análisis de varianza para el tamaño de los explante a los 28 días de su establecimiento.....	54

Cuadro 20.	Análisis de efectos simples para la interacción de las variedades y medios de cultivo para el tamaño de los explantes a los 28 días..	56
Cuadro 21.	Análisis de varianza para el crecimiento relativo.....	57
Cuadro 22.	Análisis de varianza para tiempo que transcurre para formar dos hojas <i>in vitro</i>	58
Cuadro 23.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para el tiempo en que transcurre para formar dos hojas <i>in vitro</i>	60
Cuadro 24.	Análisis de varianza para número de brotes del primer subcultivo.....	61
Cuadro 25.	Análisis de varianza para la longitud de brotes en el primer subcultivo.....	63
Cuadro 26.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para la longitud de brotes en el primer subcultivo.....	64
Cuadro 27.	Análisis de varianza para número de hojas del primer subcultivo.....	66
Cuadro 28.	Análisis de varianza para número de raíces en el primer subcultivo.....	67
Cuadro 29.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de raíces por brote en el primer subcultivo.....	69
Cuadro 30.	Análisis de varianza para número de brotes en el segundo subcultivo.....	71
Cuadro 31.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de brotes para el segundo subcultivo.....	73
Cuadro 32.	Análisis de varianza para la longitud de brotes en el segundo subcultivo.....	74
Cuadro 33.	Análisis de varianza para número de brotes en el tercer subcultivo.....	76
Cuadro 34.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de brotes.....	77
Cuadro 35.	Análisis de varianza para la longitud de brotes en el tercer	

	subcultivo.....	79
Cuadro 36.	Análisis de varianza para el crecimiento relativo de la parte aérea.....	83
Cuadro 37.	Análisis de varianza para materia seca de la parte aérea.....	84
Cuadro 38.	Análisis de varianza para el número de raíces.....	84
Cuadro 39.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de raíces.....	86
Cuadro 40.	Análisis de varianza para la longitud de la raíz.....	87
Cuadro 41.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para la longitud de las raíces.....	88
Cuadro 42.	Análisis de varianza para materia seca de las raíces.....	90
Cuadro 43.	Análisis de varianza para el porcentaje de vitroplantas que forman raíces.....	91
Cuadro 44.	Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para el porcentaje de vitroplantas que forman raíces.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Descripción morfológica de la frutilla: a) hojas trifoliadas, b) corona, c) raíces, d) inflorescencia y flores, e) fruto, f) estolón (Con hijuelos en desarrollo).....	6
Figura 2.	Variedades de frutilla: a) Sweet Charlie b) Oso Grande.....	25
Figura 3.	Colecta de material vegetal para la extracción de explantes de a) Corona b) Estolón.....	27
Figura 4.	Explante proveniente de yema de corona.....	28
Figura 5.	Explante de frutilla a) contaminado con hongos b) necrótico.....	31
Figura 6.	Explantes que presentaron oxidación fenólica: a) Relativamente fuerte, b) Muy fuerte.....	34
Figura 7.	Formación de brotes axilares de frutilla en la cámara de crecimiento.....	35
Figura 8.	Procedimiento de repique de frutilla en la cámara de flujo laminar.....	36
Figura 9.	Formación de raíces y elongación de la parte aérea.....	38
Figura 10.	Vitroplanta de frutilla lista para aclimatar.....	41
Figura 11.	Porcentaje de explantes no contaminados en dos tipos de explantes.....	43
Figura 12.	Efecto de dos tipos de explantes de frutilla y tiempos de inmersión al desinfectante (NaClO al 2%) en el porcentaje de necrosis.....	45
Figura 13.	Efecto de dos tipos de explantes de frutilla y tiempos de inmersión al desinfectante (NaClO al 2%) en el porcentaje de oxidación.....	46
Figura 14.	Efecto de los tratamientos desinfectantes en la necrosis en explantes de frutilla provenientes de estolones.....	47
Figura 15.	Efecto de dos tipos de explantes de frutilla en el tiempo que transcurre para la formación de una hoja <i>in vitro</i>	49
Figura 16.	Formación de una hoja en explantes de estolones a los 13 días de su establecimiento.....	50
Figura 17.	Tamaño de los explantes por variedad a los 28 días.....	54
Figura 18.	Altura alcanzada de los explantes por variedades: a) Sweet Charlie (T2), b) Oso Grande (T1).....	55
Figura 19.	Tamaño de los explantes a los 28 días del establecimiento en	

	función a la concentración de BAP.....	55
Figura 20.	Comportamiento de las variedades según la variación de BAP en el tamaño de los explantes a los 28 días de su establecimiento.	57
Figura 21.	Crecimiento relativo de los explantes según la concentración de BAP.....	58
Figura 22.	Tiempo para formar dos hojas según la variación de BAP.....	59
Figura 23.	Comportamiento de las variedades según la variación de BAP en el tiempo que transcurre para formar dos hojas <i>in vitro</i>	60
Figura 24.	Número de brotes por variedad para el primer subcultivo.....	62
Figura 25.	Formación de brotes en función a la concentración de BAP en el primer subcultivo.....	63
Figura 26.	Longitud de los explantes en función a la concentración de BAP en el primer subcultivo	64
Figura 27.	Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de BAP sobre la longitud del brote en el primer subcultivo.....	65
Figura 28.	Número de hojas por variedades en el primer subcultivo.....	66
Figura 29.	Número de hojas en función a la concentración de BAP.....	67
Figura 30.	Número de raíces por variedad en el primer subcultivo.....	68
Figura 31.	Número de raíces en función a la concentración de BAP.....	68
Figura 32.	Efecto de la interacción de las variedades según la variación de BAP sobre el número de raíces en el primer subcultivo.....	69
Figura 33.	Efecto producido por el tratamiento 4.....	70
Figura 34.	Número de brotes por variedad en el segundo subcultivo.....	72
Figura 35.	Número de brotes según la variación de BAP en el segundo subcultivo	72
Figura 36.	Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de BAP sobre el número de brotes en el segundo subcultivo.....	73
Figura 37.	Brotes procedente de la Variedad. a) Oso Grande (T1) y b) Sweet Charlie (T5) del segundo subcultivo a los 28 días.....	74
Figura 38.	Longitud del brote según la concentración de BAP en el segundo subcultivo.....	75
Figura 39.	Número de brotes por variedades en el tercer subcultivo.....	76
Figura 40.	Número de brotes según la concentración de BAP del tercer	

	subcultivo	77
Figura 41.	Efecto de la interacción de las variedades según la variación de BAP sobre el número de brotes en el tercer subcultivo.....	78
Figura 42.	Brotes axilares de frutilla del tratamiento 1 (Oso Grande* M.S.+ 0.5 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP) en el tercer subcultivo a los 28 días.....	78
Figura 43.	Longitud del brote en el tercer subcultivo según la concentración de BAP.....	80
Figura 44.	Comparación de las variables de respuesta en la variedad Oso Grande por subcultivos (T1).....	80
Figura 45.	Comparación de las variables de respuesta en la variedad Sweet Charlie por subcultivos.	81
Figura 46.	Crecimiento relativo del follaje según la variación de M.S.....	83
Figura 47.	Número de raíces por variedad.....	85
Figura 48.	Número de raíces en función a la concentración del M.S.....	85
Figura 49.	Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de M.S. sobre el número de raíces.....	87
Figura 50.	Longitud de las raíces por variedades.....	88
Figura 51.	Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de M.S. sobre la longitud de las raíces.....	89
Figura 52.	Porcentaje de explantes que forman raíces en dos variedades.....	91
Figura 53.	Porcentaje de explantes que forman raíces según la variación M.S.....	92
Figura 54.	Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de M.S. sobre el porcentaje de explantes que forman raíces.....	93
Figura 55.	a) Explantes correspondiente al tratamiento 4 (Sweet Charlie * 25% M.S.), b) Hoja con síntoma de deficiencia de P y N. c) Hoja procedente del T1 (Oso Grande * 25 % M.S.).....	94

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Que es el ácido elálgico.....	107
Anexo 2. Equipos de la Unidad de Biotecnología Vegetal.....	107
Anexo 3. Materiales de Laboratorio.....	108
Anexo 4. Medio basal Murashige & Skoog (1962).....	109
Anexo 5. Preparación de soluciones stock del medio Murashige & Skoog (1962).....	110
Anexo 6. Preparación de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).....	111
Anexo 7. Micropropagación en Frutilla.....	112
Anexo 8. Prueba de Duncan para la desinfección de explantes de estolones para la variable necrosis.....	113
Anexo 9. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable tamaño de los explantes.....	113
Anexo 10. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable crecimiento relativo	113
Anexo 11. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable tiempo que transcurre en formar dos hojas <i>in vitro</i>	114
Anexo 12. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de brotes del primer subcultivo).....	114
Anexo 13. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable longitud del brote del primer subcultivo.....	114
Anexo 14. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de hojas del primer subcultivo.....	115
Anexo 15. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de raíces del primer subcultivo.....	115
Anexo 16. .Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de brotes del segundo subcultivo	115
Anexo 17. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable longitud de brotes del segundo subcultivo	116
Anexo 18. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de brotes del tercer subcultivo.....	116
Anexo 19. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la	

	variable longitud de brotes del tercer subcultivo	116
Anexo 20.	Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable crecimiento relativo	117
Anexo 21.	Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de raíces.....	117
Anexo 22.	Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable porcentaje de explantes que forman raíces.....	117
Anexo 23.	Promedios en la materia seca del follaje (mg).....	118
Anexo 24.	Promedios en la materia seca de las raíces (mg).....	118

RESUMEN

En Bolivia se tienen zonas aptas para la producción de frutilla, en razón de que este cultivo se ha diversificado en distintas zonas agroecológicas tales como: Valles, Subtrópico y en el Altiplano Central. Los agricultores dedicados a este rubro han visto que los rendimientos son muy bajos en comparación con otros países, esta diferencia se atribuye a que, ellos adquieren plantas sin su respectivo registro sanitario. Otro aspecto importante es que, todas las variedades comerciales de frutilla se propagan por vía asexual, a través de estolones o por división de las coronas; ambas formas de reproducción presentan desventajas como ser: la disminución del rendimiento, pérdida de la calidad del fruto y la degeneración, debida a una infestación acumulada de enfermedades. Una alternativa para satisfacer la demanda de este tipo de material vegetal (libre de enfermedades y en estado juvenil) es a través de la micropropagación. A través del presente trabajo se determinó un protocolo adecuado para la micropropagación de dos variedades de frutilla (Sweet Charlie y Oso Grande) las más utilizadas en el mercado boliviano.

Para la introducción a condiciones *in vitro* se utilizaron dos explantes: coronas y estolones determinándose su desinfección con NaClO al 2% por 25 min. y 0.8% por 13 min. respectivamente; se observó que los explantes de estolones regeneraron en menor tiempo. Para ésta misma fase se utilizaron, tres medios (0.1, 0.5 y 1 mg/L de BAP) en ambas variedades, llegándose a determinar que el medio con 0.1 mg/L de BAP es, adecuado para Oso Grande y 0.5 mg/L de BAP en Sweet Charlie, logrando reducir el tiempo de formación de dos hojas en condiciones *in vitro*. En la fase de multiplicación, en el primer subcultivo las dos variedades llegaron a obtener mayor cantidad de brotes con 0.5 mg/L de BAP en el medio M.S. A partir del segundo y el tercer subcultivo la Sweet Charlie genera mayor cantidad de brotes con 1 mg/L de BAP; en cambio, la variedad Oso Grande con 0.5 mg/L de BAP incrementa su tasa de multiplicación. Para la fase de enraizamiento se determinó que los medios diluidos al 50 y 75% de M.S. con 1 g/L de carbón activado son adecuados para ambas variedades, por el contrario cuando la concentración de M. S. fue de 25% las dos variedades estudiadas presentaron síntomas de deficiencia de fósforo y nitrógeno.

ABSTRACT

In Bolivia there are capable areas for the strawberry production, because there was a diversification in many agroecological areas like: Valleys, Subtropical and the Central Highland. The agricultural workers dedicated to this activity, have seen a very low lower yields in comparison with other countries, this difference is attributed to that, they acquire plants without its respective sanitary registration. Another important aspect is that, all the commercial varieties of strawberry had asexual propagation, by crown division or runners, both reproduction forms present disadvantages like: the decrease of yields, loss of fruit's quality and the degeneration, due to and cumulative infestation of diseases. An alternative to satisfy the demand of this type of vegetable material (free of diseases and younger state) is through the micropropagation. Through the present research it was determined an adequate protocol to the micropropagation of two kinds of strawberry (Sweet Charlie and Oso Grande) the most used in the Bolivian market.

For the introduction to *in vitro* conditions two explants were used: both crown and runner being were disinfected with NaClO to 2% for 25 min. and 0.8% for 13 min. respectively; it was observed that the runner explants regenerated in minor time. For this stage three media were used (0.1, 0.5 and 1 mg/L of BAP) in both varieties, determining that the medium with 0.1 mg/L of BAP is adequate for Oso Grande and 0.5 mg/L of BAP in Sweet Charlie variety, reducing the formation time of two leaves under *in vitro* conditions. In the multiplication stage, in the first subculture, the two varieties obtained more quantity of buds with 0.5 mg/L of BAP in M.S. medium. Then, in the second and third subculture, the Sweet Charlie generates more quantity of buds with 1 mg/L of BAP. On the other hand, the Oso Grande variety with 0.5 mg/L of BAP increased its multiplication rate. For the rooting stage, it was determined that the medium dilute to 50 and 75% of M.S. with 1 g/L activated of activated coal were adequate for both varieties. When the M.S. concentration medium was of 25% both varieties showed phosphorous and nitrogen deficiency symptoms.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La multiplicación vegetativa (por esquejes, división, acodo y distintos tipos de injertos), tradicionalmente ha jugado durante muchos años un importante papel en la agricultura y ha sido ampliamente utilizada en los cultivos de: papa, manzana, bananos, frutilla, pera, bulbos, plantas ornamentales, tuberosas y cultivos leñosos.

Los métodos clásicos de la reproducción vegetativa o bien son insuficientes para las necesidades reales demasiado lentos, difíciles, caros o a veces son completamente inviábiles. En respuesta a ello, se descubrió que las plantas pueden ser clonadas más rápidamente *in vitro* que por métodos tradicionales (Pierik, 1990).

Varios investigadores sugieren que es factible la multiplicación masiva de plantas de frutilla como Lee y Fossard (1977); Hilderbrant (1980); Damiano (1980); Pennell (1980); Cossio y Menin (1982) apreciándose así, diversas modificaciones en la micropropagación de frutilla que van desde el medio de cultivo hasta la fuente del material vegetal (Villegas, 1990).

En Bolivia se han realizado pocos trabajos publicados en micropropagación en frutilla. Sin embargo, se puede afirmar que dentro de estas investigaciones se destacan las tesis de grado de Sivila (1998) y Pereira (1998). En este sentido, Sivila (1998) menciona que el medio Boxus con la adición de 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIB es adecuado para la fase de multiplicación mientras que, para el enraizamiento fue el medio Navatel el que presentó mejores resultados. Por otro lado, Pereira (1998) señala que el medio Murashige y Skoog con 2.5 mg/L de BAP como el adecuado para la multiplicación *in vitro* y para promover el enraizamiento con 2.5 mg/L de AIA es el que presentó mejores resultados.

1.2 Justificación

En el Departamento de La Paz se tienen muchas variedades cultivadas pero dentro de las que presentaron mayores rendimientos con respecto a las demás, son las variedades Oso Grande y Sweet Charlie Ticona (2000) y Poma (2004); al mismo tiempo, los autores mencionan que los frutos de ambas variedades presentan: buena calidad, buen sabor, de consistencia firme, bajo contenido de acidez y son resistentes durante el transporte.

Todas las variedades comerciales de frutilla se propagan en forma asexual, a través de estolones donde cada planta madre genera entre 10 a 12 estolones y cada uno de ellos entre 4 a 6 nuevas plantas; la otra forma de reproducción consiste en el deshijamiento de las plantas madres del mismo cultivar (por división de la corona), aunque esta última no es muy utilizada por los viveristas (Montecinos, 1993). Ambas formas de reproducción presentan desventajas en la disminución del potencial de rendimiento año tras año, de igual manera la pérdida de la calidad del fruto y así como la degeneración del cultivo, debido a una infestación acumulada de enfermedades.

Otro aspecto importante es que el ciclo de vida útil del cultivo de frutilla es corto (dos años); transcurrido este tiempo es necesario realizar cambios en los campos de producción para mantener los niveles de productividad (Holmes *et al.*, 2003). De esta manera estos campos requieren refrescar su material vegetal, utilizando para ello plantas madres provenientes de cultivo *in vitro*.

Una alternativa para satisfacer la demanda del material vegetal, presenta la Biotecnología Vegetal a través de la Micropropagación, la cual consiste en cultivar un explante con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas, proporcionándole artificialmente condiciones físicas y químicas para su crecimiento y desarrollo. Esta técnica permite obtener plantas rejuvenecidas con el fin de obtener plantas de alta calidad, libres de enfermedades fúngicas y bacterianas; al mismo

tiempo obtener altas tasas de multiplicación en superficies reducidas en un corto tiempo durante cualquier época del año.

Las plantas obtenidas mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales facilita la posibilidad de obtener plantas madres, que es lo que interesa al productor ya que a partir de ellas éste puede obtener la primera generación mediante la producción de estolones, la cual estará destinada a la producción.

De acuerdo a las experiencias mencionadas por Boxus (1984) y FUSAGRI (1984) citado por Sánchez (2004) las vitroplantas de frutilla provenientes de cultivo *in vitro* son más uniformes, presentan un mayor número de estolones, tienen mayor sobrevivencia en campo y el rendimiento de los frutos se incrementa entre 15 a 24% en comparación con las plantas propagadas por el método tradicional.

En este sentido en el presente trabajo de investigación se planteó los siguientes objetivos:

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar el comportamiento *in vitro* de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar el proceso de desinfección en dos tipos de explantes de frutilla para su introducción a condiciones *in vitro*.
- Determinar el mejor explante de frutilla para su introducción a condiciones *in vitro*.
- Determinar el medio de cultivo óptimo para la micropropagación de dos variedades de frutilla.
- Analizar el comportamiento de dos variedades de frutilla en las fases de: establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

1.4 Hipótesis

1.4.1 Hipótesis Nula

- No existen diferencias en los tratamientos desinfectantes en los dos tipos de explantes de frutilla para su introducción a condiciones *in vitro*.
- No hay diferencia en la respuesta de los dos tipos de explantes de frutilla para su introducción a condiciones *in vitro*.
- Los medios de cultivo no presentan diferencias en las tres fases de la micropropagación en dos variedades frutilla.
- Las variedades de frutilla tienen similar comportamiento en las fases de: establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Frutilla

La amplia distribución del cultivo de frutilla por casi todo el mundo se debe al desarrollo de variedades con distinto grado de adaptación ecológica y a los modernos sistemas de manejo de cultivo, lo cual hace posible su producción desde las regiones frías hasta las regiones tropicales y subtropicales (PROEXANT, 2004).

Villagran (1996) citado por Castellón (2000), manifiesta que la frutilla se ha convertido en un producto de gran demanda especialmente en países desarrollados con relación a las demás especies de frutos pequeños con los que se las asocia. Esto se atribuye a sus características organolépticas y sobre todo su alto contenido de vitamina C en comparación con los demás frutos y algunas propiedades anticancerígenas por contener el ácido elágico que actúa como un inhibidor de agentes anticancerígenos (ver Anexo 1).

2.2 Taxonomía de la Frutilla

Folquer (1986) indica que la frutilla pertenece al:

Orden: Rosales.

Familia: Rosaceae.

Sub Familia: Rosoideae.

Género: *Fragaria*.

Especie: *F. ananassa* Duchesne.

Variedades: Oso Grande

Sweet Charlie

2.3 Descripción Botánica de la Frutilla

Folquer (1986) y Montecinos (1993), mencionan que la frutilla es una planta herbácea que crece en forma de roseta posee un sistema radicular fasciculado y adventicio; el tallo esta constituido por un eje corto (1 a 3 cm) de aspecto cónico denominado "corona" la misma esta cubierta por hojas básales superpuestas llamadas estípulas; las hojas son largamente pecioladas su limbo está dividido en tres foliolos con bordes aserrados cubierta con tricomas en el envés de la hoja. También de la corona nacen unas ramificaciones que reciben el nombre de "estolones", éstos son tallos largos y rastreros capaces de emitir nuevas plantas (a través de este sistema se da la multiplicación asexual). Así mismo, de las axilas de las hojas salen las inflorescencias en donde están ubicadas las flores (hermafroditas); el fruto es un aquenio y esta incrustados en un receptáculo succulento, en realidad la parte comestible de la frutilla es el hipanto (receptáculo) el que sólo se desarrolla si los óvulos son fecundados y se lo considera como un falso fruto tal como se aprecia en la Figura 1:

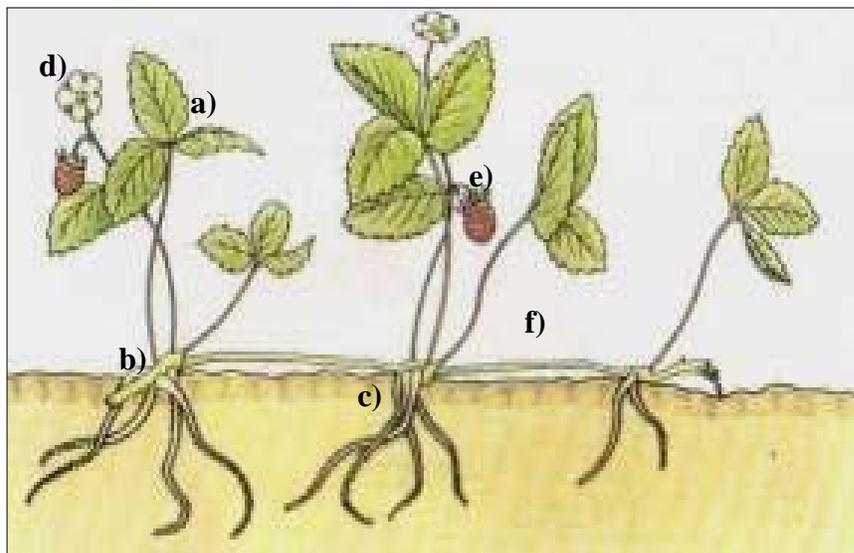


Figura 1. Descripción morfológica de la frutilla: a) hojas trifoliadas, b) corona, c) raíces, d) inflorescencia y flores, e) fruto, f) estolón (Con hijuelos en desarrollo).

Fuente: Infoagro. (2004).

2.4 Reproducción en Frutilla

Folquer (1986), menciona que la frutilla es capaz de reproducirse sexual y asexualmente:

2.4.1 Reproducción Sexual

Así mismo, Folquer (1986) menciona que la reproducción sexual se realiza en especies silvestres de *Fragaria* y en algunas de sus variedades derivadas de líneas puras. Debido a la homocigosis de dichas variedades, las semillas originan plantas que no reproducen con exactitud las características de la planta madre. El origen híbrido de dichas variedades hace que las plantas obtenidas por semilla no reproduzcan las características de los padres, apareciendo una gran diversidad de formas como consecuencia de la segregación de los factores hereditarios lo que es incompatible con la uniformidad de tipo y calidad exigida por la producción comercial.

Por el contrario, las variedades híbridas de fruto grande a las que pertenecen todas las variedades comerciales las semillas se utilizan solo en trabajos de mejoramiento tendientes a la creación de nuevas variedades.

2.4.2 Reproducción Asexual

Villagrán (1996) citado por Castellon (2000) y Montecinos (1993) coinciden en que la frutilla se propaga comercialmente en forma vegetativa a través de estolones.

Bareiro (2004), menciona que esta fase corresponde a la etapa vegetativa de la frutilla se caracteriza por la reducción de la cantidad y el tamaño de las flores con el inicio de la emisión de estolones. De ahí que la producción de frutilla en esta época ya no es de buena calidad los frutos son: pequeños, ácidos y sin aroma. Este comportamiento se desencadena por la interacción de los efectos de la duración del

día (fotoperíodo) y de la temperatura del ambiente. En este sentido, la frutilla emite estolones cuando la duración del día se alarga y la temperatura es alta.

2.5 Variedades de Frutilla

El Boletín Económico (2003) indica que desde un punto de vista agronómico, las variedades de la frutilla se pueden clasificar en tres grupos: reflorecientes o de día largo, no reflorecientes o de día corto y remontantes o de día neutro. La floración en los dos primeros casos se induce por un determinado fotoperíodo, mientras que éste factor no interviene en el tercero. En cualquier caso, no sólo influye el fotoperíodo sino las temperaturas y horas de frío que soporta la planta.

Villagran (1994) mencionado por Ticoná (2000) comenta que entre las variedades de día corto se encuentran: Chandler, Pájaro, Oso Grande, Sweet Charlie, etc.

2.5.1 Variedad Oso Grande

PROEXANT (2004), señala que es una variedad californiana vigorosa con follaje verde oscuro. Su fruto es de color rojo anaranjado, forma de cuña achatada, calibre grueso, de buen sabor, presenta resistencia durante el transporte por lo que es apto para la venta como producto fresco en el mercado. Al respecto, el Grupo Medina (2004) mencionan que la variedad Oso Grande es menos ácida que las variedades Chandler y Camarosa.

Por su parte, Ticoná (2000) indica que la variedad Oso Grande ingresa con una verdadera producción a los dos meses de la siembra; así mismo, afirma que ésta variedad presentó mayores rendimientos, con frutos de buena calidad y de consistencia firme.

2.5.2 Variedad Sweet Charlie

Borque (2003) y el Grupo Medina (2004) coinciden en que la variedad Sweet Charlie fue obtenida por la Universidad de Florida, es una variedad temprana de alta precocidad excelente sabor y su fruto es de color anaranjado.

Chandler *et al.* (2004), señalan que la fruta de Sweet Charlie presentó un peso promedio de 17 g; su fruto es dulce, sabrosa y tiene un bajo contenido de acidez. El color externo de la fruta es anaranjado; en cambio, el interior del fruto es naranja con rayas de color blanco. Así mismo, afirman que los frutos de primera calidad tienen la forma de cuña mientras, que las frutas de segunda calidad tienen la forma cónica acuar. Al igual que Jiménez (2000) concuerda con los anteriores autores en que esta variedad es resistente a la antracosis de fruto y de corona (*Colletotrichum acutatum*) y que no ha presentado ningún problema al moho polvoriento (*Sphaerotheca macularis* f.sp. *fragariae*).

2.6 Rendimiento de la Frutilla por Variedades

Los rendimientos en el cultivo de la frutilla están en función a las variedades tal como afirma Ticona (2000) el mismo que obtuvo, los siguientes resultados:

Cuadro 1. Comparación de rendimientos por variedades de frutilla.

Variedad	Promedio de rendimientos de frutos kg/Ha
Oso Grande	11.764,47
Sweet Charlie	10.039,75
Chandler	9.610,70

Fuente: Ticona (2000)

2.7 Enfermedades en Frutilla

El cultivo de la frutilla es afectado tanto por enfermedades: fúngicas, bacterianas y virales; a continuación en el Cuadro 2 se citan algunas de las enfermedades.

Cuadro 2. Enfermedades en el cultivo de frutilla.

Tipos de enfermedades	Agente causal	Síntomas
Fúngicas	<i>Phytophthora cactorum</i>	Enfermedad muy grave que produce colapsamiento de las hojas jóvenes, apareciendo en el corazón (corona) de la planta una necrosis marrón.
	<i>Vertivillium albo-atrum</i>	Enfermedad muy destructiva; retarda el crecimiento paraliza la producción e influye en la formación de coronas secundarias muy débiles.
	<i>Colletotrichum fragariae</i>	Causa necrosis redondeadas en los folíolos y pecíolos marchitamiento y posteriormente la muerte de las hojas y raíces.
Bacterianas	<i>Xantomonas fragariae</i>	Produce decoloraciones translucidas de aspecto húmedo esta aumenta su tamaño progresivamente en toda la planta hasta producir necrosis total de las hojas y de toda la planta.
Virales	Strawberry Mottle virus 1	Genera manchas cloróticas a veces rodeadas de un limbo rojo o decoloración a lo largo de las nervaduras foliares con folíolos abollonados. Manifestándose por un menor vigor y productividad de las plantas sanas.
	Strawberry yellow edge virus 2	Las hojas presentan pecíolos cortos con bordes de color amarillo y curvados hacia arriba y en el centro, junto a las nervaduras salen manchas amarillas.

Fuente: Folquer (1978), Boxus (1984), Maroto (1995) y Pereira (1998).

2.8 Biotecnología Vegetal

Para Darías (1993), la biotecnología vegetal es el área de la ciencia y la tecnología que utilizan organismos vivos o algunas de sus partes constituyentes para generar organismos modificados o productos derivados con utilidad clínica, alimentaría y/o industrial. Al respecto, Gómez (1999) menciona que la biotecnología vegetal permite el empleo de órganos o tejidos vegetales para la obtención de un producto o nuevos genotipos, que abarca desde la micropropagación hasta el cultivo de células y protoplastos.

2.9 Cultivo de Tejidos Vegetales

Jiménez (1998), menciona que los orígenes del cultivo de tejidos vegetales se remonta a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo de tejidos vegetales puede definirse como un conjunto de técnicas que permite el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales en condiciones controladas.

Al respecto, Hartmann (1994) indica que el cultivo de tejidos vegetales está enfocado especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades y la propagación masiva de algunas especies de interés económico y biológico.

2.10 Métodos de Regeneración

Gómez (1999), menciona que la morfogénesis *in vitro* puede seguir dos vías: embriogénesis somática y organogénesis dependiendo del grado de diferenciación del explante inicial, de sus características genéticas, del manejo del cultivo *in vitro* y además del objetivo del trabajo.

2.10.1 Embriogénesis Somática

Roca y Mroginski (1991) y Gómez (1999), coinciden en que la embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula sin la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical y apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas completas y normales.

2.10.2 Organogénesis

Para Azcón-Bieto y Talon (2000), la totipotencia celular hace posible que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tengan la capacidad para diferenciar meristemos adventicios y regenerar nuevos órganos (organogénesis). Aunque, la organogénesis es el resultado de la interacción entre el material vegetal (explante), el medio de cultivo y las condiciones ambientales.

Según Jiménez (1999), la organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar en otras palabras es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema, con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido materno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos.

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

2.10.2.1 Formación de Yemas Adventicias

Darías (1993), señala que es la formación “de novo” de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de una o un pequeño grupo de células pequeñas. La proliferación de yemas adventicias se logra empleando altas concentraciones de citocinina. Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas en un corto tiempo, pero tiene el inconveniente de que es fuente de variabilidad genética ya que al transformarse una célula o pequeños grupos de células, puede existir el caso de que ocurran mutaciones.

2.10.2.2 Formación de Yemas Axilares

Roca y Mroginski (1991), comentan que en este caso en condiciones *in vitro* se estimulan el desarrollo de las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema esta determinada por el número de yemas axilares preexistente en el inóculo.

Al respecto, Jiménez (1999) indica que éste método a pesar de no ser el más rápido es el más utilizado para la propagación comercial debido a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan menores índices de variación genética.

2.11 Cultivo de Yemas (Ápices)

Según Darías (1993), esta técnica basada en la multiplicación de yemas ha sido utilizada en muchos laboratorios desde hace algunos años. Esto ha propiciado el suministro de vitroplantas las cuales son saludables y libres de enfermedades

Jiménez (1998), menciona que el cultivo aséptico de ápices y meristemas da la formación de una plántula y posteriormente la inducción de brotes axilares. Este procedimiento constituye la base de la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* por vía organogénesis.

Villarroel (1998), indica que el cultivo de yemas es la técnica del cultivo de tejidos vegetales que ha sido más ampliamente usada para dar inicio con el establecimiento de los explantes a condiciones *in vitro*, estas pueden provenir de yemas apicales o laterales (axilares) de la planta donadora; en este caso se prefiere la inoculación de brotes juveniles por presentar una mejor respuesta en condiciones *in vitro* y que además ésta técnica ha sido adaptada a un gran número de especies vegetales.

2.12 Micropropagación

Roca y Mroginski (1991), indican que originalmente la micropropagación se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación de: órganos, tejidos o células vegetales que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío, tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce puede crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que deriva.

Según Darías (1993), la micropropagación es la propagación clonal que ocurre en condiciones asépticas, esta técnica tiene su mayor aplicación en la multiplicación rápida de variedades nuevas o introducidas recientemente y en la reproducción de semilla en especies de reproducción agámica con bajos coeficientes de reproducción.

2.13 Ventajas de la Micropropagación

Jiménez (1998), indica que las principales ventajas de este sistema de propagación se pueden resumir en:

- Altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas, en un corto tiempo.
- Introducción rápida de nuevas variedades o clones.
- Producción independiente de las condiciones ambientales.
- Incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Uniformidad de las plantas producidas.
- Mayor facilidad en la comercialización.

2.14 Etapas de la Micropropagación

Según Darías (1993), la micropropagación consta de cinco fases fundamentales:

- La fase 0. De selección de las plantas donadoras del explante para la propagación.
- La fase I. De establecimiento, se realiza la desinfección de los explantes y la inoculación de los mismos en el medio de cultivo en condiciones *in vitro*.
- La fase II. De multiplicación que es, en la que realmente se realiza la propagación masiva de brotes a partir de los explantes establecidos.
- La fase III. De enraizamiento y crecimiento de los brotes hasta obtener plantas completas.
- La fase IV. De transplante a un sustrato, para su aclimatación *ex vitro*.

2.15 Medios de Cultivo

Según Hurtado y Merino (1997), el éxito que se obtenga en cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio del cultivo adecuado como el empleo de tejidos viables, incubación y la calidad del reactivo. Por su parte, Gómez (1999) indica que el medio de cultivo permite que de forma artificial y bajo condiciones estériles puedan vivir y multiplicarse las células, tejidos u órganos separados del tejido que les dio origen.

2.16 Composición del Medio de Cultivo

Dodds y Roberts (1990), Hurtado y Merino (1997) y Gómez (1999) citado por Aguilar (2003), mencionan que los componentes del medio de cultivo son los siguientes:

- a) Sales inorgánicas o minerales
- b) Compuestos orgánicos
- c) Complejos naturales
- d) Materiales inertes de soporte

2.16.1 Sales Inorgánicas o Minerales

Gómez (1999), comenta que los nutrientes utilizados en cultivo *in vitro* son los mismos requeridos normalmente por las plantas macro y micronutrientes. Por su parte, Mejia (1988) citado por Conde (2002) menciona que las plantas necesitan tomar del medio algunos iones inorgánicos que son indispensables para el crecimiento de las plantas y están constituidos por: nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio, azufre, cloro y sodio.

Ramírez (1989) y López (1990), coinciden en que los micronutrientes intervienen en el crecimiento y desarrollo. Los más esenciales para una adecuada actividad metabólica de las células son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de la clorofila y la formación de cloroplastos.

Según Hurtado y Merino (1997), en la actualidad las sales del medio Murashige y Skoog (1962) se usan con bastante éxito, pues se ha demostrado que es el medio más adecuado para una gran variedad de especies así como para diferentes partes de una planta. Esta formulación contiene grandes cantidades de macronutrientes, también contiene alta concentración de nitrógeno en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 .

2.16.2 Compuestos Orgánicos

Darías (1993), comenta que los compuestos orgánicos se clasifican en tres grupos: carbohidratos (fuentes de carbono), sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados con el empleo de ciertos aminoácidos, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

2.16.2.1 Fuentes de Carbono

Según López (1990), los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar más empleado

universalmente. La concentración a la cual se utiliza es de 20 a 45 g/L. Asimismo, Darías (1993) indica que la sacarosa puede ser sustituida por el azúcar refinada obteniéndose óptimos resultados en cultivo *in vitro*.

2.16.2.2 Reguladores de Crecimiento

Weaver (1976) citado por Quezada (1999), menciona que las sustancias de crecimiento extraídas de los tejidos y las sustancias sintéticas que tienen efectos reguladores no pueden ser llamados hormonas sino más bien reguladores de crecimiento. Estos se definen como compuestos orgánicos producidos por las plantas, siendo suficiente utilizar bajas concentraciones para regular los procesos fisiológicos.

Ramírez (1989) y Hurtado & Merino (1997), coinciden en que los reguladores de crecimiento son un conjunto de sustancias químicas y orgánicas distinto de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

De acuerdo con Hurtado y Merino (1997) actualmente los reguladores de crecimiento están agrupadas y divididas en:

- a) Promotores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas)
- b) Inhibidores de crecimiento (ácido abscísico)
- c) El etileno.

Al respecto, Pierik (1990) indica que en el cultivo *in vitro* de plantas superiores las auxinas y las citocininas juegan un papel importante en la morfogénesis *in vitro*.

- **Auxinas**

Azcón-Bieto y Talon (2000), mencionan que los efectos fisiológicos de las auxinas están implicados en muchos procesos del desarrollo vegetal porque afectan en la:

división, crecimiento y diferenciación de las células. La respuesta a nivel celular inducido por las auxinas son: alargamiento o elongación de las células, la formación de raíces adventicias y presentan dominancia apical.

Al respecto, Gómez (1999) indica que ha demostrado que la acción de las auxinas sobre el alargamiento celular esta basado en una serie de modificaciones que se producen previas a este proceso, tales como:

- Incremento del contenido osmótico de la célula.
- Aumento en la permeabilidad celular al incrementarse la plasticidad de la pared.
- Aumento en la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas específicas, lo cual origina un incremento de la plasticidad y de la extensión celular.

Según Hurtado y Merino (1997), las concentraciones a usar de las auxinas varían de especie a especie, pero generalmente se utilizan de 0.1 a 10 mg/L. De la misma manera, Gómez (1990) indica que el rango más empleado esta comprendido entre 0.25 hasta 3 mg/L. Las auxinas más ampliamente usadas son: AIA (ácido indolacético), ANA (ácido naftalenacético), AIB (ácido indolbutírico), ácido p-clorofenoxiacético (pCPA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

- **Citocininas**

Azcón-Bieto y Talon (2000), indican que las citocininas están implicadas en efectos fisiológicos como: división celular, proliferación de yemas axilares (ruptura de la dominancia apical), neo formación de órganos *in vitro*, entre otros.

Para Gómez (1999), las raíces son las principales zonas de producción de estas fitohormonas y es improbable que los meristemas, los ápices caulinares y los explantes de yemas tengan suficiente citocininas endógenas como para garantizar

su crecimiento y desarrollo. Por esta razón, el 85% de los medios de cultivo empleados al inicio del cultivo *in vitro* son suplementados con una citocinina.

La concentración de citocininas en el medio de cultivo varía desde 0.1-10 mg/L, señalándose como óptima desde 0.2-2 mg/L. Dentro de este grupo se encuentran: la 6 furfuril amino-purina (kinetina), la 6 benzil amino-purina (6 BAP), la 6 dimetil-alil-aminopurina (2ip) y la 6 (4 hidroxil, 3 metil, 2 butenil) adenina (zeatina).

- **Interacción entre Auxinas y Citocininas**

Azcón-Bieto y Talon (2000), mencionan que la diferenciación de yemas vegetativas (caulogénesis) es promovida por un balance auxina/citocinina favorable a las citocininas, mientras que el balance favorable a las auxinas induce la formación de raíces (rizogénesis); es decir, el control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas.

Al respecto, Gómez (1999) señala que las citocininas realizan su efecto incrementando la división celular, dicha acción esta relacionada con la presencia de auxinas. Se ha comprobado que cuando uno de los dos reguladores se aplica al medio de cultivo en una concentración muy elevada el otro regulador se hace limitante al romperse el balance hormonal, lo cual muestra que sus efectos se complementan en el proceso de división celular.

Se atribuye a la auxina un efecto en la duplicación del ADN y en la mitosis (metafase y anafase), y la citocinina el efecto sobre la citocinesis (división del citoplasma para formar dos células hijas), es decir, el equilibrio entre ambos es de gran importancia para que ocurran los distintos procesos morfogénicos. Una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas provoca la formación de brotes o yemas. Cuando la proporción es a favor de las auxinas se produce la diferenciación de las células hacia primordios radicales, lo cual permite controlar la morfogénesis *in vitro*

en gran variedad de tejidos aunque, estos procesos están además influenciados por otros factores.

2.16.2.3 Vitaminas

López (1999), indica que las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas concentraciones. Las vitaminas más empleadas son: tiamina, ácido nicotínico, myo-inositol, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y el tocoferol.

2.16.2.4 Aminoácidos y Amidas

Así mismo, López (1999) menciona que los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos también, pueden actuar como agentes quelantes entre las que se tienen son: la L-glutamina, L-asparagina, L-arginina, L-serina y L-cisteína.

2.16.3 Complejos Naturales

Gómez (1999) y Murillo (2002), coinciden en que en muchas preparaciones de diversos medio de cultivo se han empleado diferentes compuestos a fin de enriquecerlos, entre los cuales podemos citar: el agua de coco, extracto de malta, hidrolizado proteico, jugo de tomate, extracto de levadura, jugo de naranja y pulpa de plátano y banano, etc.

- **Sustancias antioxidantes**

Según Gómez (1999), una de las principales dificultades del cultivo *in vitro* en especies tropicales es la oxidación de fenoles. Estas sustancias si no son controladas pueden en la mayoría de los casos, provocar la muerte del explante. Para esto se han empleado diferentes antioxidantes los cuales en su mayoría no

realizan un control total de la enzima polifenoloxidasa. Una mayor efectividad se puede lograr al adicionar el antioxidante en medio líquido o hacer cortes de los explantes en una solución con estas sustancias: ácido ascórbico, L-cisteína, tiourea, peróxido de hidrógeno, policlar, polivinilpirrolidone. También el carbón activado es otra sustancia que evita la oxidación de los explantes.

2.16.4 Materiales Inertes de Soporte

Según Hurtado y Merino (1997), el agar es el material de soporte más ampliamente usado en cultivo de tejidos vegetales, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte puesto que es fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes al crecimiento. De acuerdo, a Gómez (1999) el agar debe ser añadido en concentraciones de 6 a 9 g/L (medio sólido) y de 2 a 4 g/L (medio semisólido).

2.17 Contaminación en Frutilla

Para Jiménez (1999), la contaminación en cultivo *in vitro* es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micropropagación. Al respecto, Roca y Mroginski (1990) indican que para establecer cultivos asépticos es necesario desinfectar los explantes superficialmente, dicho procedimiento debe permitir eliminar los microorganismos fúngicos y bacterianos exógenos con el menor daño posible a los explantes.

Boxus (1984), explica que las diferencias en el porcentaje de contaminación en frutilla esta directamente relacionado con la variedad y época de colecta del explante. Al respecto, Boxus *et al.* (1977) y Sobczykiewicz (1979) citado por Martinelli (1992) recomiendan colectar los explantes en primavera o verano y no así en otoño o invierno para disminuir la contaminación fúngica y bacteriana en frutilla.

2.18 Explantes para el Establecimiento *in vitro* en Frutilla

Según Villegas (1990), los explantes para el cultivo de tejidos de frutilla pueden provenir de las yemas de corona o de estolones, prefiriéndose estos últimos por su facilidad para la extracción y desinfección. Al respecto, Martinelli (1992) indica que generalmente se usa como explantes las yemas apicales de los estolones para el establecimiento *in vitro* en frutilla.

Debido a la estacionalidad del cultivo de frutilla no siempre es factible encontrar estolones su disponibilidad depende de las condiciones ambientales, mientras que las yemas de las coronas se encuentran presentes en cualquier época del año (Sánchez, 2004).

2.19 Medios para la Micropropagación en Frutilla

Sivila (1998), indica que obtuvo buenos resultados en la fase de multiplicación con el medio Boxus (1977) en cuatro variedades de frutilla (Gento, Ostara, Duglas y Pájaro) teniendo un promedio de 15 a 22 brotes en un lapso de cuatro semanas. En la fase de enraizamiento observó los mejores resultados con el medio de Navatel (1983) al cual añadió 500 ppm de carbón activado y las plantas ya estaban listas para aclimatar.

Según Pereyra (1998), estableció que el mejor tratamiento para la formación de brotes en la variedad Fern en la fase de multiplicación es el medio Murashige y Skoog (1962) con la adición de 2.5 mg/L de BAP; en cambio, para la fase de enraizamiento el mejor tratamiento para la formación de raíces es el medio Murashige y Skoog (1962) con la suplementación de 2.5 mg/L de AIA.

Para la micropropagación en frutilla se han realizado distintas formulaciones con lo que respecta al medio basal y los reguladores de crecimiento, tal como se detalla en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Formulación de medios para la micropropagación en frutilla.

Fase	Medio Basal	Reguladores de Crecimiento (mg/L)
Establecimiento	Boxus (1974)	1 AIB + 0,1 BAP + 0,1 AG ₃
	M.S. (1962)	1 BAP + 0,5 AIB
Multiplicación	M.S. (1962)	0,2-1 AIB +1,1 BAP +1 AG ₃ o 0,02-0.2 AIB + 1,1 BAP
	50% M.S.(1962)	1 BAP + 0,5-1AIB
	Boxus(1974)	1 AIB + 1 BAP + 0,1 AG ₃ ,
Enraizamiento	M.S. (1962)	0,4 – 1 AIB.
	Boxus (1974)	1 AIB
	50% M.S. (1962)	0,5 - 1 AIB

Fuente: Puttock y Heather (1987) y Villegas (1990).

Damiano (1978) citado por Boxus (1984), menciona que en la fase de enraizamiento de frutilla la adición de 1 a 2 g/L de carbón activado en el medio de cultivo promueve la elongación de las raíces y del brote; indicando a la vez, que el carbón activado incrementa un 30% en la calidad comercial de las plantas de frutilla en la variedad Rabunda.

2.20 Ventajas de la Micropropagación en los Rendimientos de Frutilla

Aerts (1979) citado por Boxus (1984), menciona que las plantas de frutilla propagadas mediante métodos tradicionales (estolones) causa una disminución de 20 a 80% de la producción de frutos así también, una reducción de un 50% en el número de estolones en la variedad Gorella como consecuencia de la difusión de patógenos cuyo control es casi imposible en condiciones de campo. Por el contrario, Mullin *et al.* (1974) citado por Boxus (1984) en la variedad Fresno obtuvo un incremento en la producción de frutos (15 a 24%) al utilizar plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

En Italia en 1980 Damiano estudio el comportamiento de las variedades Belrubi, Gorella y Pocahontas de plantas obtenidas por la técnica tradicional vs.

micropropagación y obtuvo los siguientes resultados presentados en el Cuadro 4 (Boxus, 1984).

Cuadro 4. Comparación del rendimiento en frutilla mediante el método tradicional vs. micropropagación.

Variedad	Gorella		Belrubi		Pocahontas	
	Peso/planta (g)	Peso promedio de fruta (g)	Peso/planta (g)	Peso promedio de fruta (g)	Peso/planta (g)	Peso promedio de fruta (g)
Tradicional	455.6	13.2	369.3	14.5	496.3	8.0
Micropropagación	548.3	12.7	416.5	16.9	708.4	10.3

Fuente: Damiano (1980) citado por Boxus (1984)

Así mismo, Damiano (1980) citado por Boxus (1984) contabilizó el número de estolones comerciales por variedades y observó que el número de estolones fue incrementándose de las plantas que provenían de cultivo *in vitro* en relación de plantas producidas por el método tradicional (ver Cuadro 5). Además afirma que solo la variedad Aliso recibió riego.

Cuadro 5. Comparación en la producción de estolones por variedades mediante el método tradicional y micropropagación.

Variedad	Gorella	Belrubi	Aliso
Origen de las plantas	Número de estolones/planta madre	Número de estolones/planta madre	Número de estolones/planta madre
Tradicional	39.3	10.8	89.5
Micropropagación	62.0	26.2	146.3

Fuente: Damiano (1980) citado por Boxus (1984)

Al respecto, Schawarz *et al.* (1981) citado por Boxus (1984) observó un similar efecto en el incremento del número de estolones; así mismo, afirma que esta respuesta se debe al estado juvenil de las plantas procedentes de la técnica de micropropagación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

3.1.1 Ubicación Geográfica

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología Vegetal, perteneciente al Instituto de Biología Molecular y Biotecnología dependiente de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales de la Universidad Mayor de San Andrés, situada en el Campus Universitario de Cota Cota en la ciudad de La Paz, Bolivia.

Geográficamente ubicada a una altitud aproximada de 3500 - 3600 m.s.n.m., 16° 32' 00" - 16° 33' 00" de latitud Sur y 68° 00' 00" - 68° 40' 30" de longitud Oeste (Zevallos, 2000 citado por Vega, 2002).

3.2 Materiales

3.2.1 Material Vegetal

Se utilizaron dos variedades de frutilla: Sweet Charlie y Oso Grande, como se observa en la Figura 2:



a)



b)

Figura 2. Variedades de frutilla: a) Sweet Charlie b) Oso Grande.

La variedad Sweet Charlie se obtuvo de carpa solar de la Empresa Agrícola “Cabaña La Esperanza” en la zona Tacachira ubicada en el municipio de Laja. Mientras la variedad Oso Grande se consiguió de la carpa solar ubicada en el “Campus Universitario de la Facultad de Agronomía” en la zona de Cota Cota.

3.3.5 Equipos y Materiales de Laboratorio

Los equipos y materiales utilizados en la presente investigación se encuentran detallados en los Anexos 2 y 3.

3.3 Metodología

El trabajo estuvo dividido de la siguiente manera, fase O: Selección de plantas donadoras, fase I: de establecimiento de yemas, fase II: de multiplicación y la fase III que correspondió al enraizamiento de frutilla.

- **Preparación de Soluciones Stock y Medio de Cultivo**

El medio basal que se utilizó para las fases de: establecimiento, multiplicación y enraizamiento fue el M.S., formulado por Murashige y Skoog (1962) ver Anexo 4; compuesto por cinco soluciones stock: macronutrientes, micronutrientes, cloruro de calcio, quelatos de hierro y vitaminas-aminoácidos (Anexo 5).

Para la preparación de medios de cultivo para las fases I y II se trabajó con el 100% de la concentración del medio basal M.S. (Anexo 6), añadiendo las variaciones de los reguladores de crecimiento (AIB y BAP) de acuerdo a los tratamientos propuestos.

En cuanto a la fase III, el medio basal se diluyó al 25, 50 y 75% de su concentración normal de las soluciones stock de M.S. suplementado con 1 g/L de carbón activado.

Además, al medio M.S. se añadió 30 g/L de azúcar, 5 g/L de agar este último solo para las fases I y II en cambio para la fase III se suplemento 1.5 g/L de phytigel. El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 .

Seguidamente se procedió a distribuir el medio de cultivo: para la fase I se colocó 5 ml de medio en tubos de ensayo en cambio; en las fases II y III se distribuyó en frascos a 25 y 30 ml respectivamente, posteriormente estos fueron cubiertos con papel aluminio y papel madera amarrándolos con cuerdas para mayor seguridad. Finalmente se realizó la esterilización en autoclave a 120°C y 15 PSI durante 15 minutos. Para después almacenarlos en la cámara de establecimiento y utilizarlo pasado tres días.

3.3.1 Fase O: Selección de las Plantas Donadoras

- **Selección de plantas donadoras**

Se tomó en cuenta que las variedades en estudio no muestren síntomas de enfermedades y que presenten características fenotípicas propias de las mismas.

- **Colecta del material vegetal**



a)



b)

Figura 3. Colecta de material vegetal para la extracción de explantes

a) Corona y b) Estolón.

Se extrajo la planta completa del vivero para obtener yemas provenientes de corona; en cambio, para la adquisición de yemas de estolones se cortaron las guías de aproximadamente 20 a 35 cm (ver Figura 3). Ambos se colocaron inmediatamente en recipientes con agua para evitar su deshidratación.

3.3.2 Fase I: Establecimiento de Frutilla

- **Lavado de las plantas donadoras**

Las plantas y los estolones fueron lavados por separado con una solución jabonosa seguidamente se sometieron a seis enjuagues sucesivos. Al mismo tiempo, se eliminó el follaje y las raíces dejando solamente las coronas como se aprecia en la Figura 4:



Figura 4. Explante proveniente de yema de corona.

Posteriormente se seccionaron las yemas que se encontraban adheridas a la corona así también se cortaron las yemas apicales de los estolones, ambos explantes se colocaron por separado en una solución de ácido cítrico al 0.5%.

Para el establecimiento a condiciones *in vitro* de frutilla en esta fase se realizó dos procesos experimentales. En la primera (para la desinfección) se evaluó el efecto de diferentes tipos de explantes con distintos tratamientos desinfectante. Mientras que para el segundo (establecimiento en condiciones *in vitro*) se evaluó el efecto de los medios de cultivo en dos variedades de frutilla.

3.3.2.1 Efecto de la Desinfección en dos tipos de Explantes de Frutilla

- **Desinfección de los explantes**

Los explantes provenientes de yemas de corona y estolones fueron sumergidos en alcohol al 70% durante 1 minuto, seguidamente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% el mismo que contenía dos gotitas de detergente líquido (Agente tensoactivo) en diferentes tiempos de exposición: 25 y 30 minutos (ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos resultantes de las combinaciones de tipo de explantes de frutilla y tiempos de inmersión al desinfectante al 2% de concentración de NaClO.

Tratamiento	Tipo de explante	Tiempo de exposición (min)
T1	Corona	25
T2	Corona	30
T3	Estolones	25
T4	Estolones	30

Adicionalmente con las yemas de estolones se realizaron 8 tratamientos desinfectantes, como se detallan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos desinfectantes para yemas provenientes de estolones de frutilla para su introducción a condiciones *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min)
A1	1.5	30
A2	1.5	25
A3	1	30
A4	1	25
A5	1	20
A6	1	15
A7	0.8	15
A8	0.8	13

- **Inoculación de los explantes al medio de cultivo**

Seguidamente dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril para después colocar las yemas en ácido cítrico al 1% previamente autoclavado durante 3 minutos posteriormente se realizó la siembra en los tubos de ensayo con medio M.S.+ 0.1 mg/L AIB + 0.5 mg/L BAP. Finalmente fueron cultivadas en la cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad) y 25°C durante 28 días.

3.3.2.1.1 Diseño Experimental para la Desinfección de Explantes de Frutilla

Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente al Azar con arreglo Bifactorial (tipo de explante y tiempo de exposición al desinfectante) con 10 réplicas (Calzada, 1970). El modelo lineal matemático corresponde al siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = Una observación cualquiera
 μ = Media general
 α_i = Efecto del i-ésimo tipo de explante
 β_j = Efecto del j-ésimo tiempo de exposición
 $(\alpha\beta)$ = Interacción entre tipo de explante y tiempo de exposición
 ε_{ijk} = Error experimental

Para los demás tratamientos desinfectantes en yemas de estolones se utilizó para su análisis el Diseño de Bloques al Azar, donde la variable estudiada son los tratamientos de desinfección y el bloque que corresponde a las repeticiones. Se utilizó el siguiente modelo lineal matemático (Calzada, 1970).

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_j + \alpha_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = Una observación cualquiera
 μ = Media general
 β_j = Efecto del j-ésimo tratamiento de desinfección
 α_i = Efecto de la i-ésima repetición (Bloque)
 ε_{ijk} = Error experimental

3.3.2.1.2 Variables de Respuesta para la Desinfección de Explantes de Frutilla

a) Porcentaje explantes no contaminados

Se registró la cantidad de explantes en los que no se presentó agentes contaminantes (bacterias, hongos y levaduras).

b) Porcentaje de necrosis

Se realizó el conteo de explantes muertos ver Figura 5b.



a)



b)

Figura 5. Explante de frutilla a) contaminado b) necrótico.

c) Porcentaje de oxidación

Se cuantificó el número de explantes que presentaban oxidación.

d) Tiempo que transcurre para la formación de una hoja *in vitro*

Número de días que tarda el explante en formar una hoja después de haber sido inoculado a condiciones *in vitro*.

Una vez que se determinó el mejor explante se continuó introduciendo yemas de las variedades: Oso Grande y Sweet Charlie a diferentes medios de cultivo.

3.3.2.2 Efecto de los Medios de Cultivo en dos Variedades de Frutilla

- **Transferencia de yemas a diferentes medios de establecimiento**

Previamente desinfectadas las yemas de los estolones de las variedades: Oso Grande y Sweet Charlie fueron sembradas en tubos de ensayo en los medios de cultivo propuestos (Cuadro 8), seguidamente se sellaron con papel aluminio, plastifilm y fueron rotuladas. Para después colocarlas en gradillas y trasladadas a la sala de crecimiento por 4 semanas, a una temperatura promedio de 25°C, con un fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad) horas y una intensidad lumínica de 1800 lux.

3.3.2.2.1 Diseño Experimental para los Medios de Cultivo en Variedades de Frutilla

Para la evaluación del efecto de los medios de cultivo y la respuesta de dos variedades para su introducción a condiciones *in vitro* se utilizó un Arreglo bifactorial con un Diseño Completamente al Azar con 10 repeticiones (Calzada, 1970).

➤ **Factores de Estudio**

Factor A: Concentraciones de BAP (mg/L)

A1 = M.S. + 0.1 BAP (Boxus, 1977)

A2 = M.S. + 0.5 BAP

A3 = M.S. + 1.0 BAP (Villegas, 1990)

Factor B: Variedades de Frutilla

V 1 = Oso Grande

V 2 = Sweet Charlie

Cuadro 8. Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la fase de establecimiento de frutilla.

Tratamiento	Medio de cultivo	Variedades
T1	MS + 0.1mg/L AIB + 0.1mg/L BAP	Oso Grande
T2	MS + 0.1mg/L AIB + 0.5mg/L BAP	Oso Grande
T3	MS + 0.1mg/L AIB + 1mg/L BAP	Oso Grande
T4	MS + 0.1mg/L AIB + 0.1mg/L BAP	Sweet Charlie
T5	MS + 0.1mg/L AIB + 0.5mg/L BAP	Sweet Charlie
T6	MS + 0.1mg/L AIB + 1mg/L BAP	Sweet Charlie

De acuerdo al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

- Donde:
- Y_{ijk} = Una observación cualquiera
 - μ = Media general
 - α_i = Efecto de la i -ésima concentración de BAP
 - β_j = Efecto de la j -ésima variedad de frutilla
 - $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre la concentración de BAP y la variedad
 - ε_{ijk} = Error experimental

3.3.2.2.2 Variables de Respuesta para el Efecto de los Medios en Variedades de Frutilla

a) Porcentaje de contaminación

Se registró la cantidad de explantes contaminados por hongos o bacterias las mismas que fueron eliminadas posteriormente.

b) Porcentaje de sobrevivencia

Se contabilizó la cantidad de explantes que se adaptaron a condiciones *in vitro* a los 28 días del establecimiento, ver Figura 6a.

c) Porcentaje de oxidación

Debido a que todos los explantes provenientes de estolones presentaron oxidación fenólica en esta variable se tomó en cuenta para su evaluación, aquellos explantes que presentaron una oxidación relativamente leve y otra muy fuerte. Cuya característica en la primera es que los explantes que se oxidaron no afecto posteriormente en su regeneración (ver Figura 6a) en cambio, en el segundo caso los explantes que se oxidaron causo su muerte (ver Figura 6b).



a)



b)

Figura 6. Explantes que presentaron oxidación fenólica:

a) Relativamente fuerte, b) Muy fuerte.

d) Altura inicial y final del explante

Se midió la altura de los explantes en mm a los 7 días de la transferencia al medio de cultivo y finalmente a los 28 días.

e) Crecimiento Relativo (C.R.) del explante

Debido a que la altura final del explante, es directamente proporcional al tamaño inicial de las yemas, se analizó principalmente el crecimiento relativo. Mediante el cual se puede evaluar el número de veces que el explante ha duplicado su tamaño inicial, este parámetro se obtuvo a partir de la siguiente formula, mencionado por Quezada (1999).

$$\text{Crecimiento Relativo (C.R.)} = ((\text{tamaño final} - \text{tamaño inicial})/\text{tamaño inicial})$$

f) Días a la formación de dos hojas *in vitro*

Se registró los días que transcurren en que cada explante llegó a formar dos hojas en condiciones *in vitro*.

3.3.3 Fase II: Multiplicación de Frutilla

Para el desarrollo de esta fase se utilizó explantes provenientes de la fase anterior los que presentaron buen estado de desarrollo y libres de contaminación.

- **Transferencia de los brotes**

En la cámara de flujo laminar los explantes (dos variedades) se transfirieron al azar a los diferentes medios de multiplicación (Cuadro 9). Siendo posteriormente transferidos a la sala de crecimiento (ver Figura 7) por un lapso de 28 días, con una temperatura media de 24°C, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y con una intensidad lumínica de 1800 lux.



Figura 7. Formación de brotes axilares de frutilla en la cámara de crecimiento.

Para la fase multiplicación se continuó con el repique como se aprecia en la Figura 8 por dos subcultivos más. De la siguiente manera: los brotes obtenidos del primer subcultivo fueron transferidos al azar a los nuevos medios de

multiplicación propuestos (ver Cuadro 9), así sucesivamente hasta el tercer subcultivo.

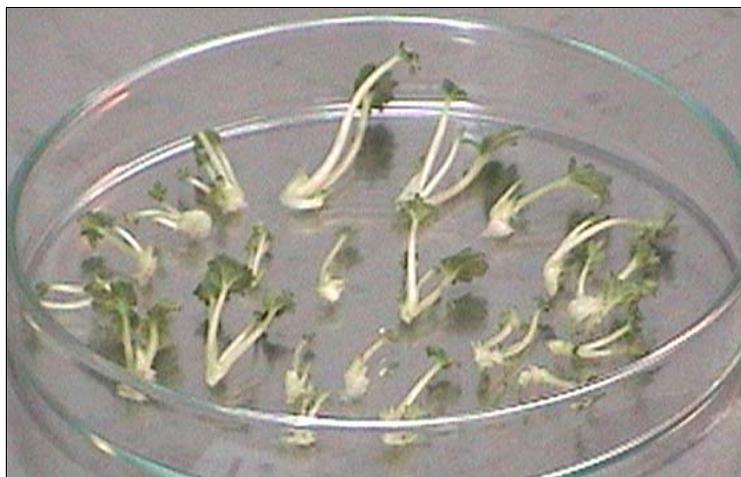


Figura 8. Procedimiento de repique de frutilla en la cámara de flujo laminar.

3.3.3.1 Diseño Experimental Fase II: Multiplicación de Frutilla

Para la evaluación de la etapa de multiplicación de brotes axilares de frutilla se utilizó un Diseño Experimental Completamente al Azar con arreglo bifactorial, con igual número de repeticiones (Calzada, 1970). En este caso, los factores fueron la concentración de BAP en tres niveles y las dos variedades de frutilla.

➤ Factores de Estudio

Factor A: Concentraciones de BAP (mg/L)

A1 = M.S. + 0.5 BAP (Navatel, 1989 citado por Martinelli, 1992)

A2 = M.S. + 1.0 BAP (Villegas, 1990 y Boxus, 1977)

A3 = M.S. + 1.5 BAP

Factor B: Variedades de Frutilla

V 1 = Oso Grande

V 2 = Sweet Charlie

Cuadro 9. Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la fase de multiplicación de frutilla.

Tratamiento	Medio de cultivo	Variedades
T1	MS + 0.5mg/L AIB + 0.5mg/L BAP	Oso Grande
T2	MS + 0.5mg/L AIB + 1mg/ L BAP	Oso Grande
T3	MS + 0.5mg/L AIB + 1.5mg/L BAP	Oso Grande
T4	MS + 0.5mg/L AIB + 0.5mg/L BAP	Sweet Charlie
T5	MS + 0.5mg/L AIB + 1mg/L BAP	Sweet Charlie
T6	MS + 0.5mg/L AIB + 1.5mg/L BAP	Sweet Charlie

Utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

- Donde:
- Y_{ijk} = Una observación cualquiera
 - μ = Media general
 - α_i = Efecto de la i-ésima concentración de BAP
 - β_j = Efecto de la j-ésima variedad de frutilla
 - $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre la concentración de BAP y la variedad
 - ε_{ijk} = Error experimental

3.3.3.2 Variables de Respuesta para la Fase II: Multiplicación de Frutilla

a) Número de brotes

Se contabilizó a los 28 días de la siembra la cantidad de brotes que llegaron a formar los explantes.

b) Tamaño del brote

Se realizó la medición de la longitud del brote a los 28 días de su transferencia del medio de cultivo en mm.

c) Número de hojas

Se contabilizó aquellas hojas bien estructuradas es decir, las que presentaban buen desarrollo.

d) Número de raíces

Se registró el número de raíces por explante sembrado que llegaron a formarse durante esta fase por brote subcultivado.

3.3.4 Fase III: Enraizamiento de Frutilla

- **Transferencia de los brotes**

De la fase anterior, se seleccionó los brotes que presentaron mejor desarrollo y fueron transferidas a los diferentes medios de enraizamiento (ver Cuadro 10) dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente los frascos fueron transferidos a la sala de crecimiento durante 42 días a una temperatura promedio de 24°C, con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad, bajo una intensidad lumínica de 2000 lux.



Figura 9. Formación de raíces y elongación de la parte aérea.

3.3.4.1 Diseño Experimental para la Fase III: Enraizamiento de Frutilla

Para la evaluación de la etapa de enraizamiento se utilizó un Diseño Experimental Completamente al Azar con arreglo bifactorial, con 15 repeticiones por tratamiento (Calzada, 1970). En esta etapa los factores de variación fueron la concentración del medio basal M.S. y las dos variedades de frutilla.

➤ Factores de Estudio

Factor A: Concentraciones de M.S. (Murashige y Skoog, 1962)

A1 = 25% M.S.

A2 = 50% M.S. (Villegas, 1990 y Scherwinski *et al.*, 2004)

A3 = 75% M.S. (Scherwinski *et al.*, 2004)

Factor B: Variedades de Frutilla

V 1 = Oso Grande

V 2 = Sweet Charlie

Cuadro 10. Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la fase de enraizamiento de frutilla.

Tratamiento	Medio de cultivo	Variedades
T1	25% M.S.	Oso Grande
T2	50% M.S.	Oso Grande
T3	75% M.S.	Oso Grande
T4	25% M.S.	Sweet Charlie
T5	50% M.S.	Sweet Charlie
T6	75% M.S.	Sweet Charlie

Utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = Observación cualquiera
 μ = Media general
 α_i = Efecto de la i-ésima concentración de M.S.
 β_j = Efecto de la j-ésima variedad
 $(\alpha\beta)_{jk}$ = Interacción entre la concentración de M.S. y la variedad
 ε_{ijk} = Error experimental

3.3.4.2 Variables de Respuesta para la Fase III: Enraizamiento de Frutilla

a) Altura inicial y final de la vitroplanta (parte aérea)

Se midió la longitud inicial a los 7 días y a los 42 días (mm) después de la transferencia de los explantes a los medios de cultivo.

b) Crecimiento Relativo (C.R.) del explante

Esta variable se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Crecimiento Relativo (C.R.)} = ((\text{tamaño final} - \text{tamaño inicial})/\text{tamaño inicial})$$

c) Número de raíces

Se contabilizó el número de raíces que llegó a formar cada vitroplanta al cabo de 42 días, ver Figura 10.

d) Longitud de raíces

Se realizó la medición de la longitud de las raíces después de 6 semanas en mm (ver Figura 10).



Figura 10. Vitroplanta de frutilla lista para aclimatar.

e) Materia seca de la parte aérea y de las raíces

Para ello, previamente se construyó sobres de papel madera de 12*7 cm, los cuales fueron etiquetados y pesados antes y después de colocar la muestra fresca en su interior. Los sobres con la muestra se llevaron a la mufla, donde estuvieron a 105°C durante 24 horas siguiendo la metodología de Forage Anaysis Procedures (1993) mencionado por Aguilar (2003). Finalmente por diferencia se obtuvo el peso seco de la muestra.

f) Porcentaje de explantes que forman raíces

Se contabilizó aquellos explantes que llegaron a formar por lo menos una raíz.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Fase I: Establecimiento a condiciones *in vitro*

4.1.1 Efecto de la Desinfección sobre dos tipos de Explantes de Frutilla para su Establecimiento a condiciones *in vitro*

Antes de realizar los respectivos análisis de varianza se tuvo que efectuar una transformación de datos utilizando para ello la formula $\sqrt{x+1}$ en las variables: porcentaje explantes no contaminados y necrosis con esto se demostró que no existe anormalidad en la distribución de errores, excepto para las demás variables en las que no se necesitó hacer dicha transformación.

4.1.1.1 Porcentaje de explantes no contaminados

El análisis de varianza del Cuadro 11 para los explantes no contaminados muestra diferencias estadísticas entre explantes, asimismo, se puede observar que no existen diferencias significativas entre el tiempo de exposición al desinfectante y la interacción entre los factores.

Cuadro 11. Análisis de varianza para explantes no contaminados.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Tipo de explante (A)	1	0.0672	0.0672	4.50	0.04 *
Tiempo de exposición al desinfectante (B)	1	0.0000	0.0000	0.00	1.00 ns
Interacción (A*B)	1	0.0000	0.0000	0.00	1.00 ns
Error	36	0.5379	0.0149		
Total	39				

* = Significativo ns = no significativo

C. V. = 8.92%

Como resultado de la introducción de dos tipos de explantes de frutilla a condiciones *in vitro* la Figura 11 muestra, que cuando se utilizó yemas provenientes de estolones el 100% de los explantes no presentaron contaminación en ambos tiempos de inmersión al desinfectante (NaClO al 2%),

los mismos mostraron ser efectivos en la eliminación de los microorganismos externos presentes en la superficie del explante. Mientras, que en las yemas de corona se logró obtener 80% de explantes no contaminados. La diferencia de los resultados se asume al hecho de que las yemas de corona se encuentran en contacto directo con el suelo, la misma que favorece que el tejido este más expuesto a agentes contaminantes dificultando de esta manera la total eliminación de los microorganismos por el desinfectante. Al respecto, Villalobos y Pérez (1979) citado por Sánchez (2004) mencionan que la alta pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo inducen una alta contaminación de los explantes de frutilla, especialmente cuando estos son extraídos de plantas provenientes de campo.

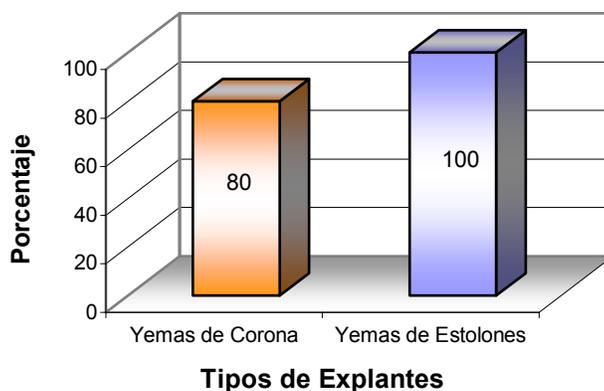


Figura 11. Porcentaje de explantes no contaminados en dos tipos de explantes.

4.1.1.2 Porcentaje de necrosis

En el análisis de varianza (Cuadro 12) se observa la presencia de diferencias altamente significativas entre los explantes para la variable necrosis o muerte del explante y no muestra diferencias significativas entre el tiempo de desinfección y la interacción entre los factores.

Cuadro 12. Análisis de varianza para la necrosis en dos tipos de explantes.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Tipo de explante (A)	1	0.508	0.605	32.400	0.000 **
Tiempo de exposición al desinfectante (B)	1	0.067	0.067	3.600	0.065 ns
Interacción (A*B)	1	0.067	0.067	3.600	0.065 ns
Error	36	0.672	0.019		
Total	39	1.412			

C. V. = 10.62%

Mediante la Figura 12, se evidencia que en yemas de corona se obtuvo 20 y 60% de necrosis cuando estas fueron sometidas durante 25 y 30 minutos respectivamente al desinfectante (NaClO al 2%), en cambio en las yemas de estolones se obtuvo 100% de necrosis para los mismos tiempos de inmersión. Posiblemente este resultado estuvo influenciado por el tamaño y el estado fisiológico de los explantes. Las yemas de estolones tenían un menor tamaño (5 a 7 mm) y presentaban tejidos herbáceos lo que le da la característica de ser más sensible a la desinfección en este sentido hubo una elevada mortalidad; mientras que las yemas provenientes de corona eran de mayor tamaño (10 a 12 mm) y procedentes de tejidos algo lignificados razón por lo que estaban más protegidas impidiendo así que el desinfectante ingrese en forma directa hacia los tejidos meristemáticos, evitando de esta manera su daño.

Al respecto, Villalobos y García (1982) citado por Jiménez (1999) indican que el tamaño del explante es un factor que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración mientras con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación pero más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas. Por su parte, Gómez (1999) menciona que la concentración y el tiempo de exposición necesaria para una desinfección adecuada, varían considerablemente en función al tipo de explante utilizado y su posterior regeneración.

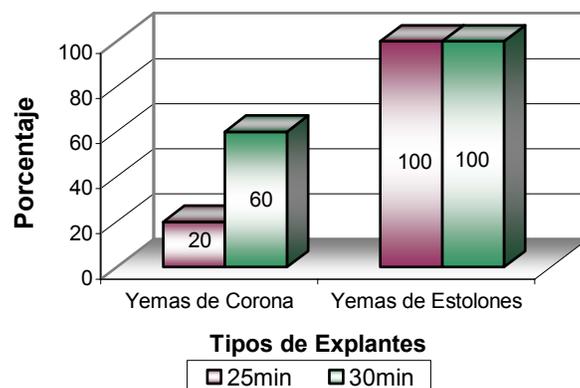


Figura 12. Efecto de dos tipos de explantes de frutilla y tiempos de inmersión al desinfectante (NaClO al 2%) en el porcentaje de necrosis.

4.1.1.3 Porcentaje de oxidación

El análisis de fuentes de variación (ver Cuadro 13) indica que existen diferencias significativas entre el factor tipo de explante y no muestra diferencias significativas entre el factor tiempo de exposición al desinfectante, ni la interacción entre los factores.

Cuadro 13. Análisis de varianza para la oxidación en dos tipos de explantes.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Tipo de explante (A)	1	9.025	9.025	361.00	0.000 **
Tiempo de exposición al desinfectante (B)	1	0.025	0.025	1.00	0.324 ns
Interacción (A*B)	1	0.025	0.025	1.00	0.324 ns
Error	36	0.900	0.025		
Total	39	9.975			

C. V. = 30%

Mediante la Figura 13 se evidencia que el mayor porcentaje de oxidación se presentó en explantes de estolones en un 100% para ambos tiempos de inmersión al desinfectante a diferencia de lo no ocurrido con las yemas de corona. Esto podría deberse a que si bien ambos explantes fueron sumergidos en ácido cítrico al 1% (antioxidante) durante 3 minutos previo a la inoculación al medio de

cultivo este hecho solo favoreció a los explantes de corona. Siendo esta práctica utilizada para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica de los explantes (Jiménez, 1999). Aunque los explantes de corona presentaron una oxidación relativamente muy baja la misma en el transcurso del tiempo se difundió en el medio de cultivo. Debido a que el NaClO además de ser un desinfectante también es un agente oxidante Roca y Mroginski (1990); es probable que la alta concentración NaClO y las características del explante, el enjuague de los estolones no haya sido suficiente para eliminar los restos de hipoclorito.

Así mismo, se puede señalar que durante la escisión de los explantes ocurren daños celulares, en respuesta a ello se activan el metabolismo de fenoles, la cual se manifiesta con el empardecimiento del medio de cultivo, que se inicia en la zona cercana al explante y puede extenderse por todo el medio, como consecuencia del proceso de oxidación (Quezada, 2005).

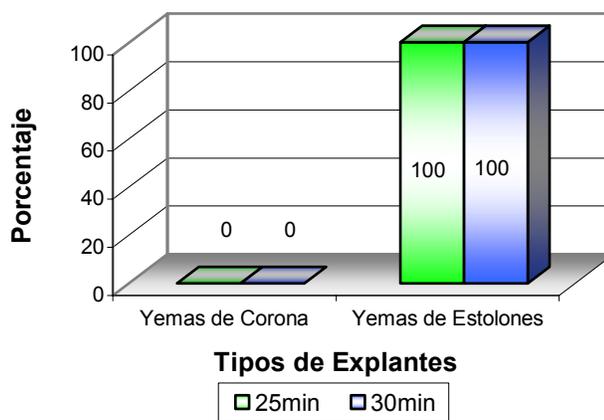


Figura 13. Efecto de dos tipos de explantes de frutilla y tiempos de inmersión al desinfectante (NaClO al 2%) en el porcentaje de oxidación.

4.1.1.4 Porcentaje de necrosis para yemas de estolones

Como no se logró establecer los explantes de estolones con la concentración del hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% y tiempos de inmersión al desinfectante anteriormente estudiado, se probaron tratamientos de desinfección solo para este

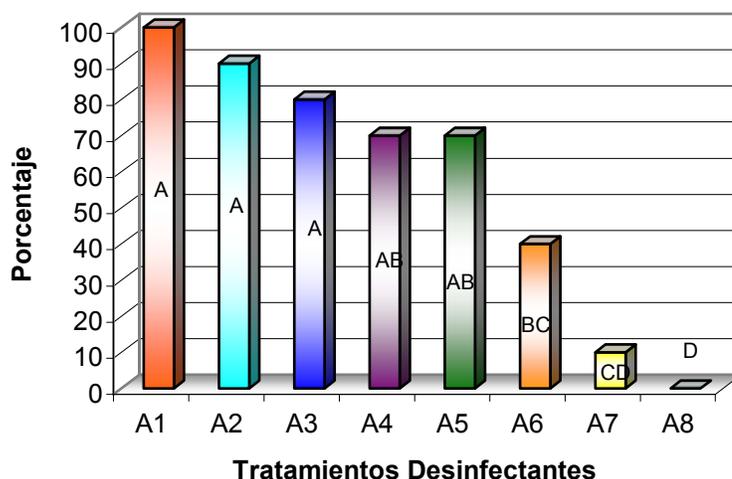
tipo de explantes descritos en el Cuadro 7.

Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable necrosis en explantes de estolones.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Bloques	9	0.177	0.020	0.821	
Sistema de desinfección	7	1.605	0.229	9.603	0.000**
Error	63	1.504	0.024		
Total	79	3.286			

C. V. = 12.51%

El análisis de varianza (Cuadro 14) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la variable necrosis.



Letras iguales no son estadísticamente diferentes

Figura 14. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de estolones en el porcentaje de necrosis.

El análisis de Duncan al 0.05 (ver Anexo 8) revela, que el mejor tratamiento desinfectante para yemas de estolones en la variable necrosis es A8 (0.8% NaClO durante 13 minutos), presentando 0% de necrosis cuando la concentración del hipoclorito de sodio y tiempo de exposición es menor. También se observó que los tratamientos no adecuados para este fin son: A1 (1.5% NaClO * 30

minutos), A2 (1.5% NaClO * 25 minutos) y A3 (1% NaClO * 30 minutos) causando 100, 90 y 80% de necrosis respectivamente (ver Figura 14). Los resultados concuerda con Sánchez (2004), quien menciona que concentraciones altas o períodos de inmersión más prolongados causan necrosis en los explantes de frutilla, dicho autor obtuvo bajos porcentajes de necrosis utilizando 20% de blanqueador comercial (1.05% NaClO) durante 20 minutos de inmersión.

En este tipo de explantes se presentó oxidación fenólica en baja proporción en comparación a los primeros tratamientos desinfectantes. También se podría señalar que a medida que la concentración del NaClO y tiempo de inmersión disminuía durante la desinfección la oxidación fue reduciéndose gradualmente.

4.1.1.5 Tiempo de formación de una hoja *in vitro* en dos tipos de explantes de frutilla

Para comparar el mejor tratamiento para la variable tiempo que transcurre a la formación de una hoja en condiciones *in vitro* en dos tipos de explantes se seleccionó de cada sistema de desinfección el mejor tratamiento.

Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable tiempo de formación de una hoja *in vitro* en dos tipos de explantes (estolones y corona).

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Bloques	9	104.450	11.606	0.985	
Tipo de explante	1	1232.450	1232.450	1045926	0.000**
Error	9	106.050	11.783		
Total	19	1442950			

C. V. = 16.70%

Los resultados presentados en el análisis de varianza (Cuadro 15) muestran diferencias altamente significativas entre explantes. En la Figura 15 se observa que el mejor tratamiento corresponde a los explantes que provienen de estolones con un promedio de aproximadamente 13 días en que llegaron en formar una hoja (ver Figura 16).

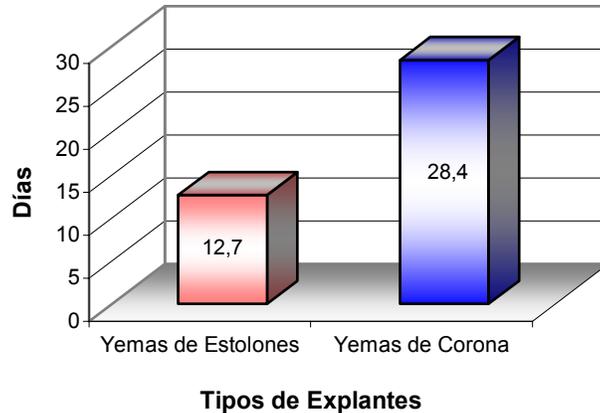


Figura 15. Efecto de dos tipos de explantes de frutilla en el tiempo que transcurre para la formación de una hoja *in vitro*.

Esta diferencia de resultados entre explantes para la variable tiempo que transcurre en formar una hoja se atribuye al estado fisiológico del explante; en razón de que las yemas de estolones se encuentran en estado de crecimiento activo, es decir, que en condiciones naturales (*ex vitro*) este material vegetal se encuentra en proceso de multiplicación vegetativa y así mismo éstos explantes están constituidos por tejidos herbáceos, característica que favorece en una mejor respuesta *in vitro*; en cambio, los tejidos de las yemas de corona son algo más lignificados y su proceso de multiplicación es más lenta. Al respecto, Jiménez (1999) indica que los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas en crecimiento activo tienen un mejor desarrollo que aquellos de plantas adultas o yemas en reposo. Al mismo tiempo afirma que a medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar mejor será la respuesta *in vitro*. Por otro lado, el resultado concuerda con Pierik (1990) quien indica que los explantes en estado vegetativo regeneran con mayor facilidad en condiciones *in vitro*, en comparación a aquellos que provienen de plantas en estado de reposo.

Así mismo, se puede señalar que en ambos explantes no se llegó a observar vitrificación durante esta fase.



Figura 16. Formación de una hoja en explantes de estolones a los 13 días de su establecimiento.

4.1.2 Elección del Mejor tipo de Explante

De acuerdo al experimento realizado se podría señalar que el mejor explante en el cultivo de frutilla para iniciar con el establecimiento a condiciones *in vitro* sería la yema de estolón debido a las siguientes características encontradas: a) Mayor porcentaje de sobrevivencia, b) Bajo porcentaje de contaminación y c) Facilidad en la manipulación durante la desinfección en comparación con las de corona.

Esto concuerda con Villegas (1990) quien indica que los explantes de frutilla pueden provenir de la corona o de los estolones, pero es más fácil la extracción y desinfección de los explantes de los estolones. Por su parte, Roca y Mroginski (1990) mencionan que es fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que de materiales adultos.

Otro aspecto importante es que, en condiciones *in vitro* las yemas provenientes de estolones tienen la capacidad de formar una hoja en un lapso corto de 13 días en cambio, los explantes de corona tardaron 29 días, es decir, 16 días más que los estolones.

4.1.3 Efecto de los Medios de Cultivo en dos Variedades de Frutilla

Antes de realizar los respectivos análisis de varianza se tuvo que efectuar una transformación de datos utilizando para ello \sqrt{x} en las variables: porcentaje de contaminación, porcentaje de sobrevivencia y altura de los explantes; en cambio para la variable oxidación se utilizó para su respectiva transformación la fórmula $\sqrt{x+1}$, excepto para la variable crecimiento relativo en la que se realizó la transformación de datos utilizando para ello **(log (logx + 10))** con esto se demostró que no existe anomalía en la distribución de errores.

4.1.3.1 Porcentaje de contaminación

Cuadro 16. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0114	0.0114	2.00	0.163 ns
Medio (B)	2	0.0057	0.0028	0.50	0.609 ns
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0057	0.0028	0.50	0.609 ns
Error	54	0.3088	0.0057		
Total					

C. V. = 7.45%

De acuerdo con el análisis de varianza del Cuadro 16, se evidencia que no existen diferencias significativas entre variedades, medios de cultivo y la interacción por tanto los factores de estudio no afectaron en forma directa a la contaminación. Al mismo tiempo, se podría indicar que la desinfección de los explantes fue adecuada en ambas variedades, reduciendo la contaminación al 0% en Oso Grande y 3.33% en Sweet Charlie. El método de desinfección utilizado fue más efectivo que el propuesto por Hoyos y Vicaria (1989) citado por Pereira (1998) quienes lograron reducir la contaminación al 50% en el mismo tipo de explantes. En la variedad Fresno Sánchez (2004) logró controlar la alta contaminación de hongos y bacterias de los explantes en un 10% cuando estos fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.05% durante 20 minutos.

4.1.3.2 Porcentaje de sobrevivencia

Cuadro 17. Análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0257	0.0257	1.00	0.321 ns
Medio (B)	2	0.1086	0.0543	2.11	0.131 ns
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0171	0.0085	0.33	0.718 ns
Error	54	1.3897	0.0257		
Total					

C. V. = 11.98%

El análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 17) indica que no existen diferencias significativas como efecto de la variedad y el medio de cultivo, así como en la interacción de ambos factores. En este sentido, el 85% de los explantes se desarrollaron favorablemente en condiciones *in vitro*; los resultados concuerdan con el trabajo realizado por Pereira (1998) quien logró establecer explantes de frutilla de la variedad Fern en un promedio de 80% en el medio Murashige y Skoog.

4.1.3.3 Porcentaje de oxidación

Cuadro 18. Análisis de varianza para la oxidación en dos variedades de frutilla.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0457	0.0457	1.71	0.19 ns
Medio (B)	2	0.1201	0.0600	2.25	0.11 ns
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0400	0.0200	0.75	0.47 ns
Error	54	1.4412	0.0266		
Total	59	1.6470			

C. V. = 15.08%

El análisis de fuentes de variación, indica que no existen diferencias estadísticas entre las variedades Oso Grande y Sweet Charlie y los medios de cultivo, así como en su interacción. Estos resultados sugieren, que la oxidación de los explantes ocurre independientemente de la variedad y del medio de cultivo empleado, ya que este tipo de explantes generalmente presentan cierto grado de oxidación. Al respecto, Hoyos y Vicaria (1989) citado por Pereira (1998) indican

que uno de los mayores obstáculos en el cultivo de tejidos en frutilla, es el alto porcentaje de contaminación y la oxidación de tejidos, dichos autores lograron controlar un 35% de la oxidación fenólica. En el presente trabajo se observó que si bien todos los explantes se oxidaron en el 85% de los casos, la oxidación fue relativamente leve y no ocasiono su muerte posterior; en cambio las yemas que presentaron una fuerte oxidación murieron obteniéndose un 15% de pérdida de los explantes por este efecto. Según Jiménez (1999) la oxidación es un fenómeno que puede provocar la muerte del explante, a su vez pueden incrementar los procesos de oxidación debido a que después de oxidados se convierten en fuertes agentes oxidantes, siendo que los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad.

La respuesta favorable de la sobrevivencia de los explantes en el presente estudio pudo estar influenciado por el uso de 100 mg/L de ácido cítrico (Antioxidante) en el agua de enjuague y además previo a la inoculación de los explantes éstos fueron sumergidos en una solución de ácido cítrico al 1% (Autoclavado) durante 3 minutos, con lo que se logró controlar la oxidación en un 85%. Esta afirmación, concuerda con lo propuesto por Sánchez (2004) quien logró controlar la oxidación de explantes de frutilla al sumergirlas en una solución con 4 g/L de cisteína (Antioxidante) previo a la siembra en el medio de cultivo. Al igual que en la variedad Fern Pereira (1998) logró controlar la oxidación de los explantes cuando éstos fueron sumergidos en una solución con 100 mg/L de ácido ascórbico (Antioxidante) durante 5 minutos.

4.1.3.4 Tamaño de los explantes a los 28 días de su establecimiento

Los resultados presentados en el análisis de varianza (Cuadro 19) para el tamaño de los explantes muestran diferencias altamente significativas entre los factores de estudio así como en la interacción de los mismos

Cuadro 19. Análisis de varianza para el tamaño de los explante a los 28 días de su establecimiento.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	4.369	4.369	12.53	0.0008 **
Medio de Cultivo (B)	2	3.704	1.852	5.310	0.0078 **
Variedad* Medio (A*B)	2	2.395	1.197	3.430	0.0395 *
Error	54	18.30	0.348		
Total	59	29.30			

C. V = 18.23%

Para el factor (A) que corresponde a las variedades se realizó el análisis de medias. La Figura 17 permite diferenciar que la variedad Sweet Charlie obtuvo un mayor tamaño (12.87 mm) en comparación con la variedad Oso Grande (9.08 mm); los resultados obtenidos posiblemente se debe a las características genóticas de cada variedad (ver Figura 18). Al respecto, García y Noa (1998) mencionan que existe una influencia marcada del genotipo en el éxito del cultivo de meristemos y ápices donde los porcentajes de establecimiento varían entre especies, variedades y clones.

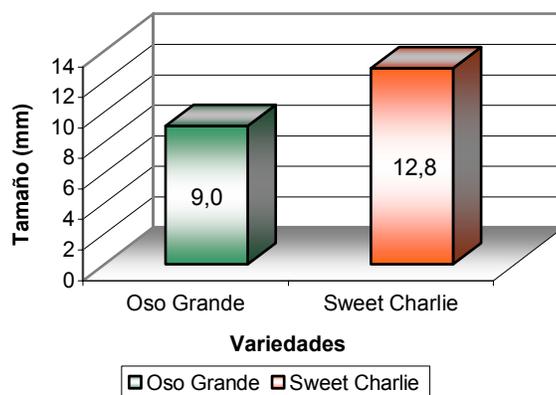


Figura 17. Tamaño de los explantes por variedades (establecimiento).



a) b)

Figura 18. Altura alcanzada de los explantes por variedades: a) Sweet Charlie (T2), b) Oso Grande (T1).

Los resultados presentados en la Figura 19 mediante la prueba de Duncan con un nivel de 0.05 (Anexo 9) muestran que los medios con las variaciones de 0.1 y 0.5 mg/L de BAP tuvieron efectos estadísticamente diferentes, en cambio el medio con 1 mg/L de BAP es intermedio entre los medios con 0.1 y 0.5 mg/L de BAP. Así mismo, la Figura indica que el medio que contenía 0.5 mg/L de BAP fue en el que los explantes lograron mayor tamaño teniendo un valor de 13.0 mm.

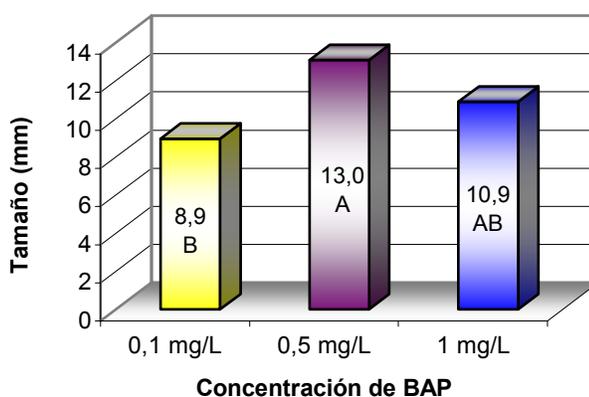


Figura 19. Tamaño de los explantes a los 28 días de su establecimiento en función a la concentración de BAP.

Al existir diferencias significativas en la interacción en esta variable se realizó el análisis de efectos simples. Al respecto, Calzada (1970) señala que si en un

experimento resulta significativa la interacción entre A y B las conclusiones que pueden deducirse de los efectos principales, pierden su interés, adquiriendo por el contrario su importancia las conclusiones que se deduzcan de la significación de los efectos simples.

Cuadro 20. Análisis de efectos simples para la interacción de las variedades y medios de cultivo para el tamaño de los explantes a los 28 días.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (0.1 mg/L BAP)	1	0.400	0.400	1.176	4.02	7.12	n.s.
Entre V y MC2 (0.5 mg/L BAP)	1	6.050	6.050	17.385	4.02	7.12	**
Entre V y MC3 (1 mg/L BAP)	1	0.260	0.260	0.747	4.02	7.12	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.617	0.310	0.890	3.17	5.01	n.s.
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	5.490	2.740	7.870	3.17	5.01	**
Error	54	18.830	0.348				

** = Altamente significativo n.s. = no significativo

En el Cuadro 21, se observa que existen diferencias altamente significativas en respuesta de las dos variedades como efecto de la variación del medio de cultivo con 0.5 mg/L de BAP. En cambio no existen diferencias significativas en respuesta de las dos variedades con las variaciones de 0.1 y 1 mg/L de BAP en el medio de cultivo. Asimismo, muestra diferencias altamente significativas en la respuesta de los medios de cultivo con la variedad Sweet Charlie y no así para la Oso Grande.

En la Figura 20 se evidencia que la variedad Sweet Charlie obtuvo brotes más vigorosos en casi todos los medios, pero la mejor respuesta se observó en el medio que contenía 0.5 mg/L de BAP; presentando un tamaño promedio de 17 mm (ver Figura 18a). En cambio la variedad Oso Grande logró un mayor tamaño (9.9 mm) en el medio que contenía 1 mg/L de BAP con respecto a los otros medios aunque, este no presento diferencias estadísticas.

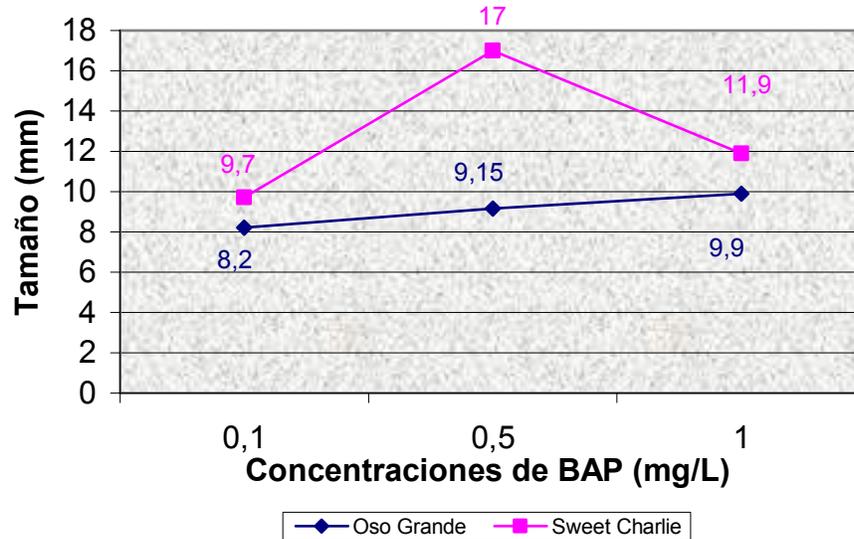


Figura 20. Comportamiento de las variedades según la variación de la BAP en el tamaño de los explantes a los 28 días de su establecimiento.

4.1.3.5 Crecimiento relativo del explante

El análisis de varianza señala que no existe diferencias significativas entre las variedades y la interacción, pero si muestra diferencias significativas entre los medios de cultivo para la variable crecimiento relativo de los explantes.

Cuadro 22. Análisis de varianza para el crecimiento relativo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0008	0.0008	1.63	0.207 ns
Medio (B)	2	0.0034	0.0017	3.41	0.040 *
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0017	0.0008	1.68	0.195 ns
Error	54	0.0275	0.0005		
Total	59	0.0336			

C. V. = 2.60%

Según la prueba de Duncan al 0.05 (ver anexo 10) se puede observar en la Figura 21, que el mejor tratamiento correspondió al medio con 0.5 mg/L de BAP donde presentó un aumento en tamaño de 1.03, seguido del medio con 1 mg/L de BAP (0.90). Por el contrario, el medio que contenía 0.1 mg/L de BAP resulto ser el menos adecuado para promover el aumento en tamaño. Al parecer el medio con

0.5 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de AIB existió un equilibrio de los reguladores de crecimiento para promover el crecimiento de los explantes de frutilla durante esta fase.

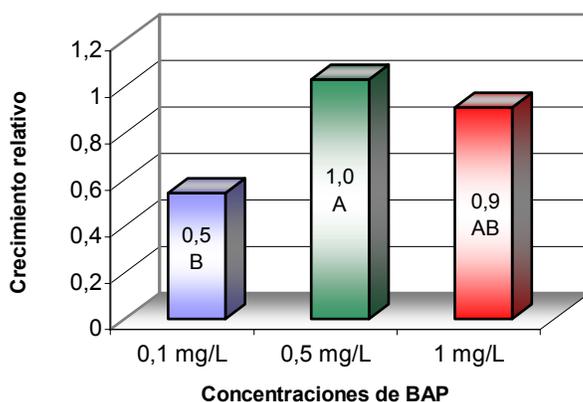


Figura 21. Crecimiento relativo de los explantes según la concentración de BAP.

4.1.3.6 Días a la formación de dos hojas *in vitro*

Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 22) indican que no existen diferencias significativas entre variedades, pero si muestran diferencias altamente significativas entre medios de cultivo y la interacción de los factores.

Cuadro 22. Análisis de varianza para tiempo que transcurre para formar dos hojas *in vitro*.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	104.01	104.016	2.59	0.113 ns
Medio (B)	2	442.43	211.216	5.51	0.006 **
Variedad* Medio (A*B)	2	742.43	371.210	9.25	0.000 **
Error	54	2167.30	40.135		
Total	59	3456.18			

C. V. = 25.22%

A través de la prueba de Duncan al 0.05 (ver anexo 11) la Figura 22 se puede observar que los medios con las variaciones de 0.5 y 1 mg/L de BAP son estadísticamente iguales y al mismo tiempo son los mejores medios de cultivo

para promover una rápida formación de dos nuevas hojas *in vitro*. Sin embargo, el medio que contenía 0.1 mg/L de BAP es estadísticamente diferente a los anteriores y asimismo es el menos adecuado para este fin. Las diferencias encontradas entre los medios de cultivo para la formación de dos hojas *in vitro* se deben fundamentalmente a las concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados. En el presente estudio cuando se utilizó la relación de auxina AIB y citocinina BAP (ver Cuadro 8) de 0.1:0.5 y 0.1:1 en el medio de cultivo ambas mostraron una respuesta favorable en la reducción del tiempo para la formación de dos hojas de 24 y 23 días respectivamente. Al respecto, Darías (1993) citado por Camargo (2000) menciona que la relación auxina y citocinina determina el tipo y la intensidad de la morfogénesis en cultivo de tejidos vegetales, dependiendo de otros factores tales como: las especies y variedades con las que se trabaje.

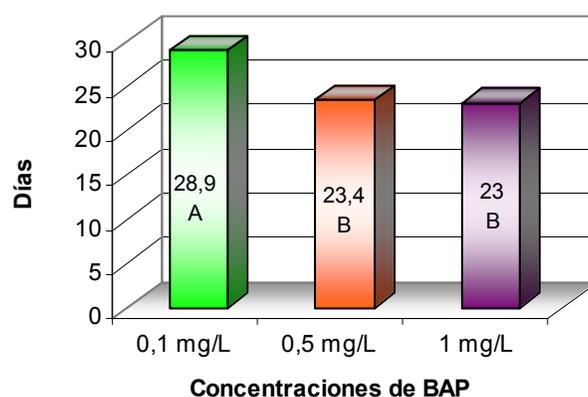


Figura 22. Tiempo para formar dos hojas según la variación de BAP.

En el análisis de efectos simples (Cuadro 23) se observa la presencia de diferencias altamente significativas en respuesta de las variedades Oso Grande y Sweet Charlie con el medio que contenía 0.5 mg/L de BAP. Por otro lado, el análisis estadístico no muestra diferencias significativas en respuesta de las dos variedades como efecto de los medios de cultivo con 0.1 y 1 mg/L de BAP. Así mismo, el Cuadro 24 enseña que la variedad Sweet Charlie presentó diferencias altamente significativas en respuesta de los medios de cultivo y no muestran diferencias significativas con respecto a la variedad Oso Grande.

Cuadro 23. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para el tiempo en que transcurre en formar dos hojas *in vitro*.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (0.1 mg/L BAP)	1	140.45	140.45	3.50	4.02	7.12.	ns
Entre V y MC2 (0.5 mg/L BAP)	1	696.20	646.20	16.10	4.02	7.12	**
Entre V y MC3 (1 mg/L BAP)	1	9.80	9.80	0.24	4.02	7.12	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	115.47	57.73	1.44	3.17	5.01	n.s.
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	1069.40	534.70	13.32	3.17	5.01	**
Error	54	2167.00	40.135				

En la Figura 23 se aprecia que en el medio con 0.5 mg/L de BAP la variedad Sweet Charlie logró reducir el tiempo de formación de dos hojas a 17 días, así también, se observa que los medios no adecuados para esta variedad son los que contenían 0.1 y 1 mg/L de BAP. En cuanto, a la variedad Oso Grande se evidencia que en los tres medios de cultivo esta logró formar dos hojas pero, en un mayor tiempo en relación con la variedad Sweet Charlie.

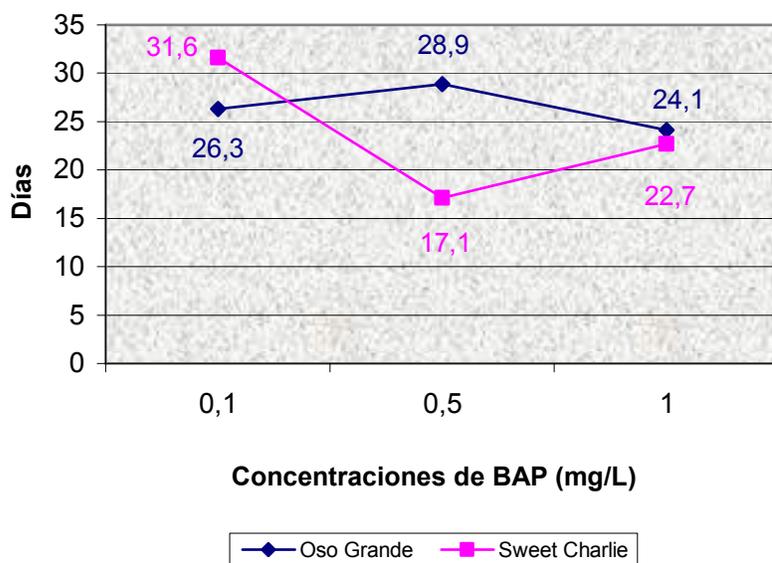


Figura 23. Comportamiento de las variedades según la variación de BAP en el tiempo que transcurre para formar dos hojas *in vitro*.

4.1.4 Análisis del efecto de los medios de cultivo en dos variedades.

En este experimento se podría indicar, que las dos variedades presentaron una respuesta diferente en cuanto a los medios de cultivo, ya que Sweet Charlie fue más exigente en su requerimiento de BAP (0.5 mg/L) para promover un mayor tamaño del explante y reducir el tiempo para la formación de dos hojas; en cambio, la Oso Grande tuvo un comportamiento indiferente en los medios de cultivo. En este sentido, para esta variedad se recomienda el medio que contiene baja concentración de BAP (0.1 mg/L) para reducir costos.

4.2 Fase II: Multiplicación

Previamente al análisis de varianza se realizó una transformación de datos utilizando para ello \sqrt{x} , en las variables: número de brotes, longitud de los brotes y número de hojas, con excepción de la variable número de raíces en la que se ejecutó la transformación de datos con la fórmula **(log (logx + 10))**. Con lo cual se demostró que no existe anomalía en la distribución de errores.

En esta fase se realizó tres subcultivos por lo tanto el estadístico se hizo para cada subcultivo.

4.2.1 Primer subcultivo

4.2.1.1 Número de brotes

Cuadro 24. Análisis de varianza para número de brotes del primer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	1.4334	1.4334	4.46	0.03 *
Medio (B)	2	2.3944	1.1972	3.73	0.02 *
Variedad* Medio (A*B)	2	0.7093	0.3546	1.10	0.33 ns
Error	84	26.982	0.3212		
Total	89	31.519			

C.V. = 24.84%

El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre las variedades (A) y medios de cultivo (B) pero, no muestra diferencias significativas entre la interacción (A*B) para la variable número de brotes. Para el factor A se realizó una comparación de medias, mediante la Figura 24 se evidencia que la variedad Oso Grande presentó mayor cantidad de brotes en relación a la variedad Sweet Charlie. La diferencia de resultados entre las dos variedades esta relacionada con la capacidad de regeneración de brotes, que viene determinado por el genotipo y el estado de desarrollo de la planta tal como afirma Pierik (1990).

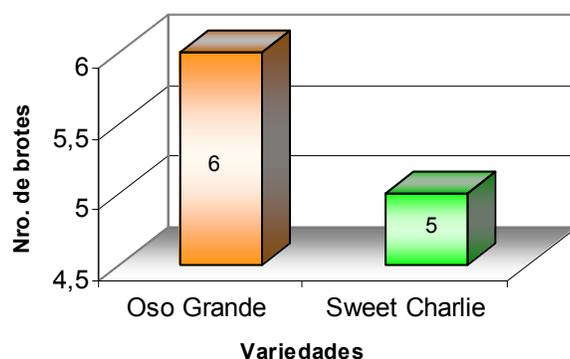


Figura 24. Número de brotes por variedad para el primer subcultivo.

La prueba de Duncan al 0.05 (Anexo 12) muestra que no existen diferencias estadísticas entre los medios que contenían 0.5 y 1 mg/L de BAP respectivamente, resultando a la vez los mejores respecto al medio con 1.5 mg/L de BAP. Dados los resultados es evidente que una alta concentración de BAP en el medio para frutilla induce una menor formación de brotes. Esta afirmación, concuerda con Pereira (1998) quien señala que a medida que se incrementa la concentración de citocinina (BAP) en el medio de cultivo existe una disminución en el número de brotes en la variedad Fern; al colocar 3.75 mg/L de BAP obtuvo 1.93 brotes/explante.

En el presente estudio se evidenció que cuando la relación de auxina y citocinina fue de 0.5:0.5 y 0.5:1 promovió mayor número de brotes en cambio, cuando la combinación fue de 0.5:1.5 (auxina y citocinina) se reduce el número de brotes. Si

bien las citocininas promueven la división celular; también las auxinas ejercen una cierta actividad sobre la división y diferenciación celular (Hurtado y Merino, 1997). Así mismo, los autores señalan que para lograr el control de la forma, tamaño y apariencia del tejido u órgano este control esta regido en gran proporción por los gradientes de reguladores de crecimiento.

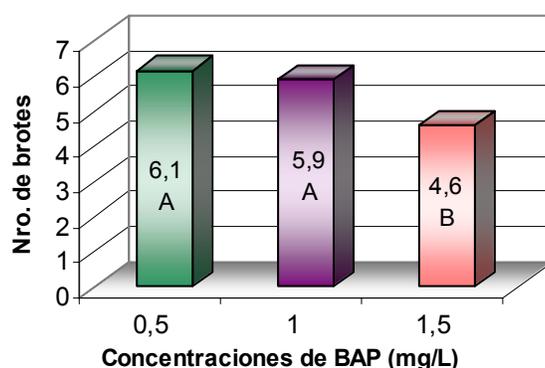


Figura 25. Formación de brotes en función a la concentración de BAP en el primer subcultivo.

4.2.1.2 Longitud de brotes

Cuadro 25. Análisis de varianza para la longitud de brotes en el primer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.6418	0.6418	1.62	0.206 ns
Medio (B)	2	4.2558	2.1279	5.38	0.006 *
Variedad* Medio (A*B)	2	3.1982	1.5991	4.04	0.021 *
Error	84	33.2096	0.398		
Total	89	41.3055			

C. V.= 15.85%

El Cuadro 25 muestra los resultados del análisis de varianza, el mismo que indica diferencias significativas entre los medios de cultivo (B) y la interacción de los factores (A*B); mientras, que para las variedades (A) con relación a la longitud de los brotes no se observa diferencias estadísticas.

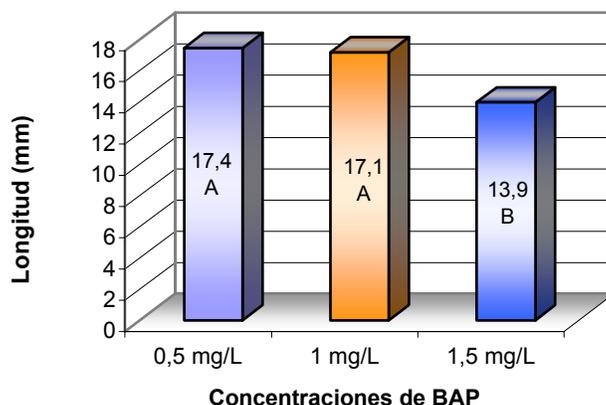


Figura 26. Longitud de los explantes en función a la concentración de BAP en el primer subcultivo

A través de la prueba de Duncan con un nivel de 0.05 (Figura 26) se identificó que no existen diferencias estadísticas en los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP. Asimismo, en éstos medios se obtuvieron los promedios más altos con relación a la longitud de los brotes de 17.4 y 17.1 mm respectivamente. En cambio, el medio que contenía 1.5 mg/L de BAP promovió una menor elongación del brote (13.9 mm), es decir, que a medida que aumenta la concentración de BAP la longitud del brote decrece. Esta respuesta era esperada, como indica Darías (1990) citado por Aguilar (2003) al afirmar que a mayor concentración de citocininas se esperaría obtener un reducido tamaño del brote, por reducir su crecimiento.

Cuadro 26. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para la longitud de brotes en el primer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (0.5 mg/L BAP)	1	1.269	1.269	3.188	3.96	6.96	n.s.
Entre V y MC2 (1 mg/L BAP)	1	1.590	1.590	3.994	3.96	6.96	*
Entre V y MC3 (1.5 mg/L BAP)	1	0.977	0.977	2.454	3.96	6.96	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.055	0.027	0.069	3.11	9.88	n.s.
Entre MC y V 2 (Sweet. Charlie)	2	7.491	3.745	9.410	3.11	9.88	*
Error	84	33.460	0.398				

El Cuadro 26 indica que existen diferencias significativas en respuesta de las variedades (Oso Grande y Sweet Charlie) con el medio con 0.5 mg/L de BAP a la vez, muestra diferencias significativas en respuesta a los medios de cultivo con la variedad Sweet Charlie y no así para la variedad Oso Grande.

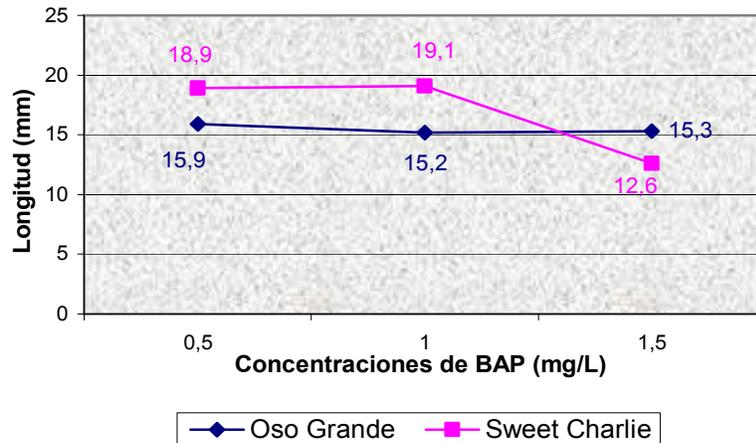


Figura 27. Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de BAP sobre la longitud del brote en el primer subcultivo.

Como se observa en la Figura 27 la variedad Sweet Charlie obtuvo brotes de mayor longitud en los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP (19.9 y 19.1 mm), al mismo tiempo se evidencia que para una concentración de 1.5 mg/L de BAP solo llegó a alcanzar 15.3 mm. Con respecto, a la variedad Oso Grande logró una mayor longitud del brote en el medio con 0.5 mg/L de BAP, aunque no presentó diferencias significativas.

4.2.1.3 Número de hojas

El análisis de varianza para el número de hojas muestra diferencias significativas entre las variedades, diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo y no muestra diferencias estadísticas en la interacción de ambos factores.

Cuadro 27. Análisis de varianza para número de hojas del primer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	6.2756	6.2456	5.26	0.024 *
Medio (B)	2	24.365	12.182	10.22	0.000 **
Variedad* Medio (A*B)	2	4.368	2.1843	1.83	0.166 ns
Error	84	100.137	1.1921		
Total	89	135.145			

C.V. = 26.67 %

Para esta variable se realizó la comparación de medias entre variedades en la Figura 28 se evidencia que la Oso Grande presentó mayor número de hojas (19.8) en relación a Sweet Charlie la misma que llegó a formar 16.7 hojas/brote.

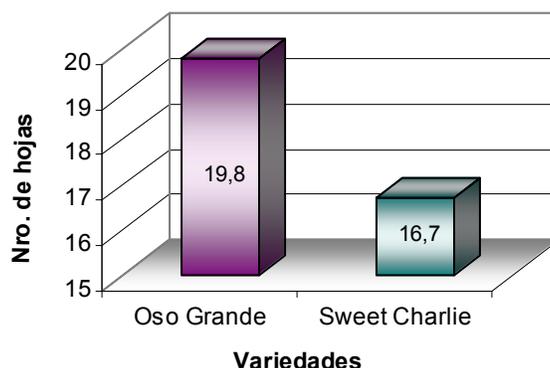


Figura 28. Número de hojas por variedades en el primer subcultivo.

Mediante la prueba de Duncan al 0.05 (ver Anexo 14) se evidencia, que los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP son estadísticamente similares promoviendo 19.2 y 23.3 hojas por brote subcultivado, siendo a la vez estadísticamente diferente con el medio que contenía 1.5 mg/L de BAP que resulto ser el menos favorecido (Figura 29). Al parecer cuando la combinación de los reguladores de crecimiento fue de 0.5 mg/L de AIB + 1.5 mg/L de BAP no resulto ser beneficiosa en esta variable, por lo que ambas variedades presentaron hojas muy pequeñas y mal estructuradas. Según Hurtado y Merino (1997) las citocininas promueven la división celular para que ocurra dicho proceso depende una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis), en los cuales la presencia de las

citocininas es necesaria para la mitosis. Al mismo tiempo, afirman que si la citocinina esta presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante por lo menos en uno de los tres pasos necesarios para la división.

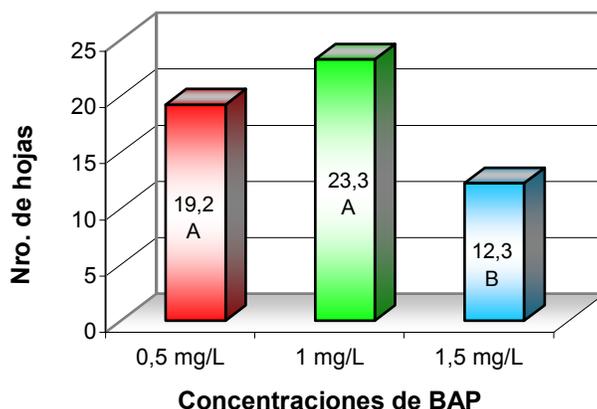


Figura 29. Número de hojas en función a la concentración de BAP.

Los resultados obtenidos para esta variable están directamente relacionados con el número de brotes; en razón de que solo en los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP se logró formar mayor número de brotes (ver Figura 25), lo que hace suponer que en este primer subcultivo existe una interacción entre auxina y citocininas equilibrada para un buen desarrollo del brote. Al respecto, Hurtado y Merino (1997) señalan que las citocininas combinadas con las auxinas estimulan la división celular en las plantas interactuando en la determinación de la ruta que seguirá la diferenciación celular.

4.2.1.4 Número de raíces por brote

Cuadro 28. Análisis de varianza para número de raíces en el primer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0578	0.0578	24.15	0.000 **
Medio (B)	2	0.0350	0.0175	7.33	0.001 **
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0317	0.0158	6.64	0.002 **
Error	84	0.2011	0.0023		
Total	89	0.3258			

C. V. = 5.68 %

El análisis de varianza presenta diferencias altamente significativas entre variedades (A), medios de cultivo (B) y la interacción de los factores (A*B). En la Figura 30 se evidencia que la variedad Sweet Charlie es la que obtuvo un mayor número de raíces (1.6/explante) en relación con la variedad Oso Grande.

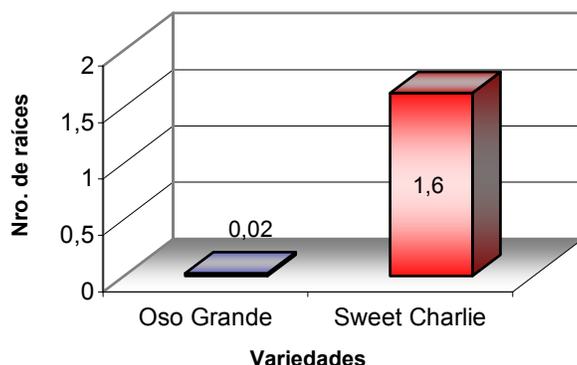


Figura 30. Número de raíces por variedad en el primer subcultivo.

A través de la prueba de Duncan (Anexo 15) para el número de raíces se evidencia que los medios con 1 y 1.5 mg/L de BAP son estadísticamente similares así mismo, se observa diferencias significativas de los anteriores medios con el medio que contenía 0.5 mg/L de BAP como se aprecia en la Figura 31:

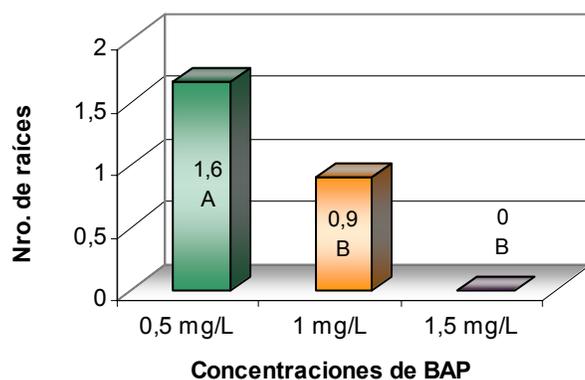


Figura 31. Número de raíces en función a la concentración de BAP.

Cuadro 29. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de raíces por brote en el primer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (0.5 mg/L BAP)	1	0.069	0.069	30.00	3.96	6.96	**
Entre V y MC2 (1 mg/L BAP)	1	0.035	0.035	15.21	3.96	6.96	**
Entre V y MC3 (1.5 mg/L BAP)	1	0.000	0.000	0.000	3.96	6.96	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.000	0.000	0.000	3.11	9.88	n.s.
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	0.017	0.008	3.478	3.11	9.88	*
Error	84	0.201	0.002				

Como se observa en el Cuadro 29 de efectos simples de la interacción se puede afirmar, la existencia de diferencias altamente significativas en respuesta de las dos variedades a la acción de la variación de BAP (0.5 y 1 de mg/L) en el medio. Así también muestra diferencias significativas en el efecto simple entre los medios de cultivo con la variedad Sweet Charlie, lo cual no fue observado en la Oso Grande.

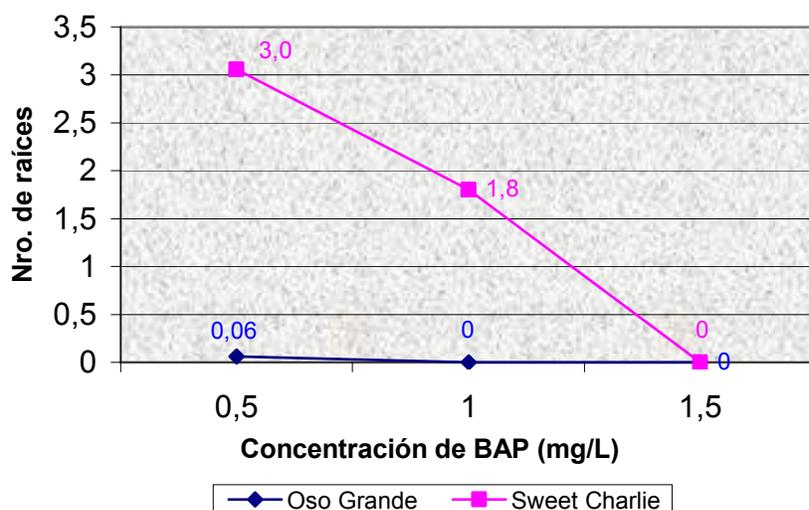


Figura 32. Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de BAP sobre el número de raíces en el primer subcultivo.

En la Figura 32 se evidencia que la variedad Sweet Charlie logró formar mayor número de raíces en los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP y no así en el medio que contenía 1.5 mg/L de BAP; pero en el medio con 0.5 mg/L de BAP logró obtener mayor número raíces. En cambio la variedad Oso Grande solo llegó a formar raíces en el medio con 0.5 mg/L de BAP pero en menor proporción que la variedad Sweet Charlie.

Por lo expuesto anteriormente el tratamiento 4 que correspondía a la combinación (Sweet Charlie * M.S. + 0.5 mg/L AIB + 0.5 mg/L BAP) es el que llegó a formar mayor número de raíces con respecto a los demás tratamientos en esta fase como se aprecia en la Figura 33. Los resultados obtenidos en ésta variedad pueden atribuirse a la combinación de los reguladores de crecimiento, en ambos casos tanto la auxina y citocinina se encontraban en concentraciones similares, por lo que la primera promueve la elongación del brote y la segunda promueve la formación de brotes. Por otro lado, es probable que la citocinina (BAP) no esta totalmente en equilibrio con la auxina (AIB) en este sentido llega un momento en que la auxina presentó dominancia apical, por lo que promovió la expansión del brote y posteriormente la formación de raíces. Al respecto, Darías (1990) indica que el tipo de morfogénesis que ocurra en cultivo de tejidos vegetales depende en gran medida de la relación de las concentraciones de auxinas y citocininas presentes en el medio.

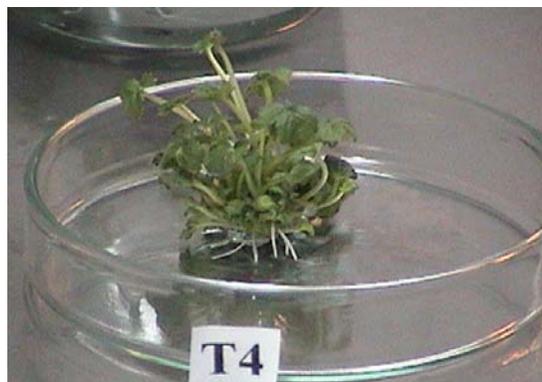


Figura 33. Efecto producido por el tratamiento 4.

Por otro lado se podría señalar que la variedad Sweet Charlie contenía auxinas endógenas las cuales le permitió tener una mayor longitud y posteriormente promover la formación de raíces en comparación con la Oso Grande; siendo que en la fase anterior Sweet Charlie presentó una mayor longitud del explante (ver Figura 17).

4.2.2 Segundo subcultivo

4.2.2.1 Número de brotes

El análisis de varianza efectuado para esta variable indica diferencias altamente significativas entre variedades, medios de cultivo y la interacción de los factores.

Cuadro 30. Análisis de varianza para número de brotes en el segundo subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	9.6879	9.6879	23.08	0.0001 **
Medio (B)	2	5.2839	2.6419	6.29	0.0028 **
Variedad* Medio (A*B)	2	7.5386	3.7693	8.98	0.0003 **
Error	84	35.2599	0.4197		
Total	89	54.7704			

C.V.= 22.41%

La Figura 34 indica que la variedad Oso Grande fue la que obtuvo mayor número de brotes (10.6) por el contrario, la variedad Sweet Charlie llegó a formar 7.4 brotes por explante. La diferencia de resultados obtenidos entre las dos variedades posiblemente se deba al efecto del genotipo. Los resultados son respaldados por Villegas (1990) quien indica que no todas las variedades de frutilla responden de forma similar durante la multiplicación *in vitro*, por lo que el número de brotes es variable.

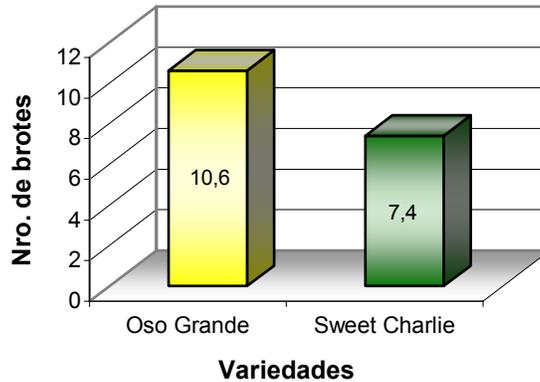


Figura 34. Número de brotes por variedad en el segundo subcultivo.

Los resultados expuestos en la Figura 35 señalan que los medios de cultivo con 0.5 y 1 mg/L de BAP fueron estadísticamente similares (ver Anexo 16). Así mismo, fueron en los que se promovieron mayor número de brotes (10.4 y 9.3); en cambio el medio que contenía 1.5 mg/L de BAP fue estadísticamente diferente a los anteriores medios y por lo tanto es el menos favorable para la formación de brotes axilares en frutilla.

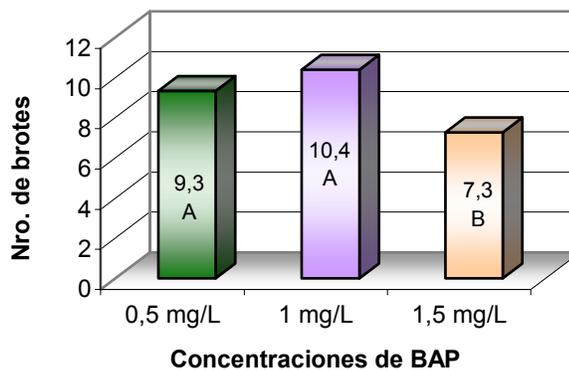


Figura 35. Número de brotes según la variación de BAP en el segundo subcultivo.

El Cuadro 31 señala que existen diferencias altamente significativas de las dos variedades en respuesta a los medios con 0.5 y 1.5 mg/L de BAP, pero no muestra diferencias estadísticas con el medio que contenía 1 mg/L de BAP. Así mismo el análisis de efectos simples muestra diferencias altamente significativas

en respuesta de los medios de cultivo con la Sweet Charlie y no así con la Oso Grande.

Cuadro 31. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de brotes para el segundo subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (0.5 mg/L BAP)	1	4.568	4.568	10.90	3.96	6.96	**
Entre V y MC2 (1 mg/L BAP)	1	0.091	0.091	0.21	3.96	6.96	n.s.
Entre V y MC3 (1.5 mg/L BAP)	1	12.683	12.68	30.26	3.96	6.96	**
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.477	0.238	0.56	3.11	9.88	n.s.
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	12.285	6.242	14.89	3.11	9.88	**
Error	84	0.419					

En la Figura 36 se observa que la variedad Oso Grande logró formar mayor cantidad de brotes axilares en el medio con 0.5 de mg/L BAP (ver Figura 37a) aunque, en el análisis de efectos simples no muestran diferencias estadísticas. En cambio, la variedad Sweet Charlie en el medio con 1 mg/L de BAP llegó a formar mayor cantidad de brotes (ver Figura 37b) ésta variedad tiende a disminuir el número de brotes cuando la concentración de BAP fue menor o mayor.

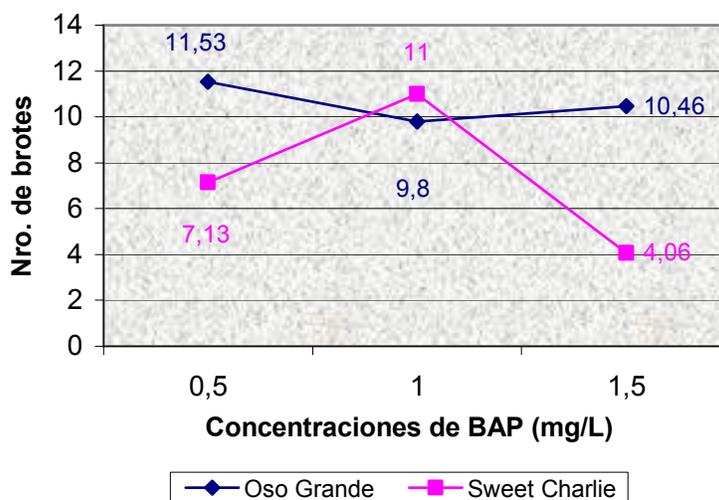


Figura 36. Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de BAP en el número de brotes en el segundo subcultivo.

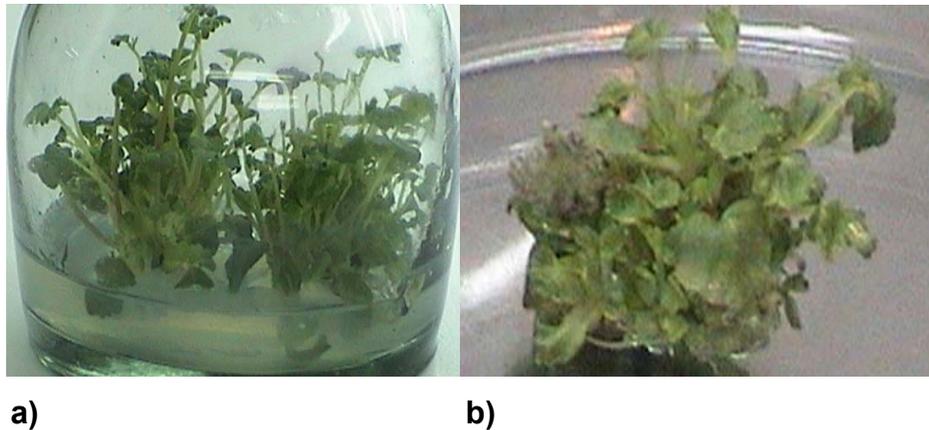


Figura 37. Brotes procedente de las variedades: a) Oso Grande (T1) y b) Sweet Charlie (T5), del segundo subcultivo a los 28 días.

4.2.2.2 Longitud de brotes

El análisis de varianza muestra diferencias altamente significativas entre los medios (B) al mismo tiempo, señala que no existe diferencias significativas entre las variedades (A) y la interacción (A*B).

Cuadro 32. Análisis de varianza para la longitud de brotes en el segundo subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	11.37	11.377	0.71	0.402 ns
Medio (B)	2	237.22	163.611	10.20	0.000 **
Variedad* Medio (A*B)	2	42.15	21.077	1.31	0.274 ns
Error	84	1347.86	76.151	4.75	
Total	89	1728.62			

C. V. = 26.08%

Mediante la prueba de Duncan al 0.05 (ver Anexo 17) en la Figura 38 se observa diferencias estadísticas entre los medios de cultivo y al mismo tiempo se identificó que los brotes alcanzaron una mayor longitud en el medio con 0.5 mg/L de BAP en comparación con los otros medios empleados. El resultado obtenido se asume a que en este caso, la presencia de auxina (0.5 mg/L de AIB) permitió una mayor elongación del brote, por haber establecido una relación de 1:1 de los reguladores

de crecimiento. Al respecto, Azcón-Bieto y Talon (1993) comentan que existe una interdependencia entre las citocininas y las auxinas en el control del desarrollo de las plantas. El mecanismo de acción de las auxinas es modificar la plasticidad de la pared celular permitiendo su extensión; el aumento en la plasticidad permite la expansión celular que en consecuencia produce el crecimiento del brote.

En cambio en los medios con 1 y 1.5 mg/L de BAP el tamaño los brotes fue reduciéndose, esta respuesta se atribuye a que estos medios tuvieron en mayor proporción de citocininas (BAP) con relación a las auxinas (AIB). Según Gómez (1999) una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas inhiben recíprocamente el desarrollo de los brotes, debido a que se anula la dominancia apical.

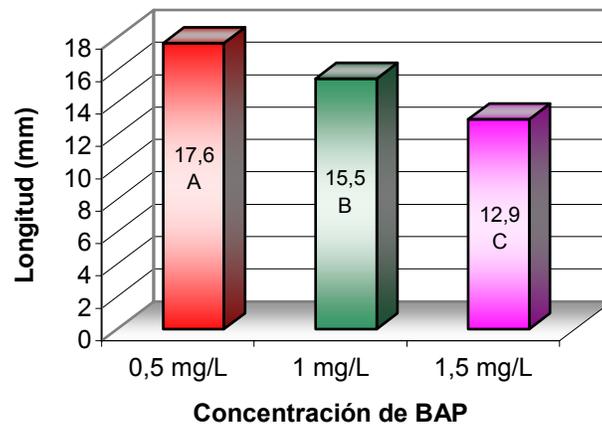


Figura 38. Longitud del brote según la concentración de BAP en el segundo subcultivo.

4.2.3 Tercer subcultivo

4.2.3.1 Número de brotes

El estadístico del Cuadro 33 muestra diferencias altamente significativas entre las variedades (A), medios de cultivo (B) y la interacción (A*B).

Cuadro 33. Análisis de varianza para número de brotes en el tercer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	14.4493	14.4493	42.62	0.0001 **
Medio (B)	2	27.4324	13.716	40.46	0.0001 **
Variedad*Medio (A*B)	2	8.1896	4.0942	12.06	0.0001 **
Error	84	28.4759	0.3390		
Total	89	78.5484			

C. V. = 20.94%

En la Figura 39 se observa que la variedad Oso Grande obtuvo mayor número de brotes con respecto a la variedad Sweet Charlie, el cual aparentemente está relacionado al genotipo correspondiente de cada variedad. Al respecto, Vuysteke y De Lanhege (1985) citado por Murillo (2002) mencionan que se debe tomar en cuenta el genotipo que se va a propagar, ya que el índice de propagación es diferente para cada una de las especies y para las distintas variedades o clones dentro de la especie.

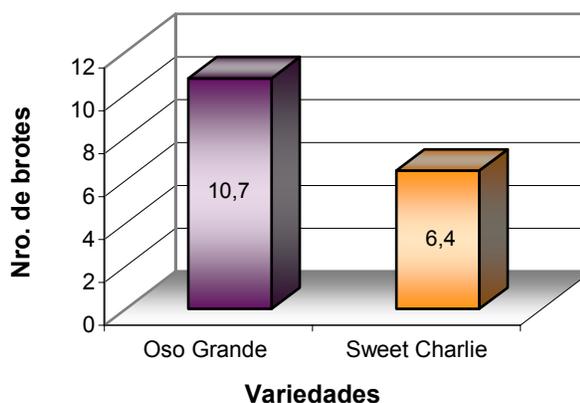


Figura 39. Número de brotes por variedades en el tercer subcultivo.

La prueba de Duncan al 0.05 (ver Anexo 18) indica, que no existen diferencias estadísticas en los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP al mismo tiempo, estos medios estimulan mayor número de brotes en comparación con el medio con 1.5 mg/L de BAP, el mismo que no muestra diferencias significativas con respecto a los medios anteriores (ver Figura 40).

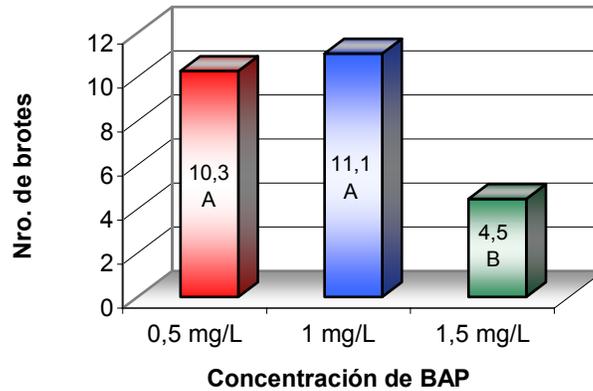


Figura 40. Número de brotes según la concentración de BAP en el tercer subcultivo.

A partir del análisis de efectos simples (Cuadro 35) se puede afirmar la existencia de diferencias altamente significativas en respuesta entre las variedades Oso Grande y Sweet Charlie en la formación de brotes axilares a la acción de la variación de los medios de cultivo con 0.5 y 1.5 mg/L de BAP. En cambio, no existen diferencias significativas en respuesta de las dos variedades con el medio que contenía 1 mg/L de BAP. También, en el Cuadro 35 se puede deducir que existen diferencias altamente significativas en respuesta de los medios de cultivo con las dos variedades con las que se trabajó.

Cuadro 35. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo en el número de brotes para el tercer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (0.5 mg/L BAP)	1	15.99	15.99	47.17	3.96	6.96	**
Entre V y MC2 (1 mg/L BAP)	1	0.000	0.000	0.00	3.96	6.96	n.s.
Entre V y MC3 (1.5 mg/L BAP)	1	6.487	6.487	19.13	3.96	6.96	**
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	13.080	6.54	19.29	3.11	9.88	**
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	22.52	11.26	33.21	3.11	9.88	**
Error	84	28.47	0.339				

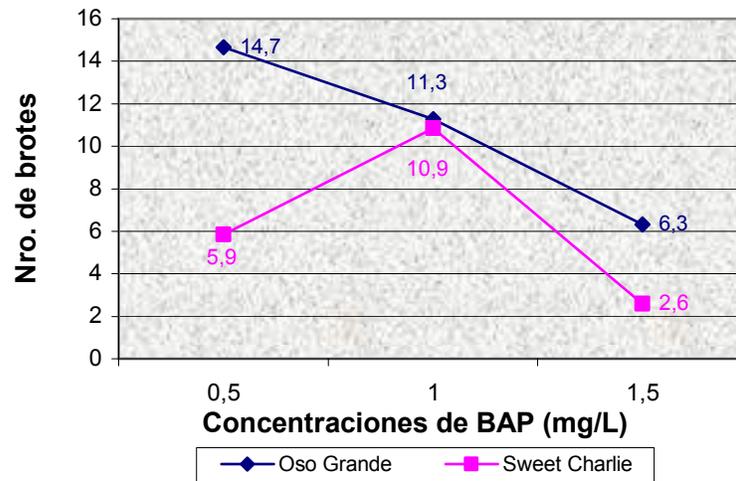


Figura 41. Efecto de la interacción de las variedades según la variación de BAP sobre el número de brotes en el tercer subcultivo.

En la Figura 41 se observa que la variedad Oso Grande a medida que la concentración de BAP aumenta esta variedad reduce el número de brotes, pero en los medios con 0.5 y 1 mg/L de BAP promovió mayor número de brotes (ver Figura 42). En cambio la variedad Sweet Charlie mostró una mejor respuesta en el medio que contenía 1 mg/L de BAP logrando formar 10.9 brotes/explante pero, lo contrario sucedió cuando la concentración de BAP aumenta o disminuye.



Figura 42: Brotes axilares de frutilla del tratamiento 1 (Oso Grande* M.S.+ 0.5 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de AIB) en el tercer subcultivo a los 28 días.

Los resultados obtenidos concuerdan con Ramírez y Barrera (1992) quienes, trabajaron con las variedades Brighton, Douglas, Fern, Solana, Pájaro y Tioga; las mismas que fueron sometidos a medios con distintas concentraciones de BAP de 0.3, 1 y 5 mg/L respectivamente y todos los medios estaban suplementados con 1 mg/L de AIB; donde observaron que a medida que se va aumentando la concentración de BAP en el medio se induce a una mejor respuesta en el número de brotes en las cuatro primeras variedades, en cambio en las variedades Pájaro y Tioga disminuyó la cantidad de brotes. Al parecer el número de brotes que se forman esta en función directa de la variedad y del medio de cultivo utilizado.

4.2.3.2 Longitud de brotes

El análisis de varianza (Cuadro 35) muestra diferencias estadísticas entre los medios de cultivo (B) y no muestra diferencias significativas entre las variedades (A) y la interacción (A*B).

Cuadro 35. Análisis de varianza para la longitud de brotes en el tercer subcultivo.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	24.544	24.54	2.52	0.115 ns
Medio (B)	2	742.155	371.07	38.17	0.000 **
Variedad* Medio (A*B)	2	58.955	29.47	3.03	0.053 ns
Error	84	816.666	9.72		
Total	89	1642.322			

C.V. = 22.83%

Al existir diferencias entre los medios de cultivo, se realizó la prueba de Duncan al 0.05 (Anexo 19) donde, se evidencia que no existen diferencias estadísticas entre los medios que contenían 1 y 1.5 mg/L de BAP, así mismo, se observó que el medio con 0.5 mg/L de BAP es estadísticamente diferente a los anteriores. En este sentido, se puede afirmar que el medio con baja concentración (0.5 mg/L) BAP fue en el que se obtuvo mayor longitud del brote (17.7 mm), tal como se aprecia en la Figura 43:

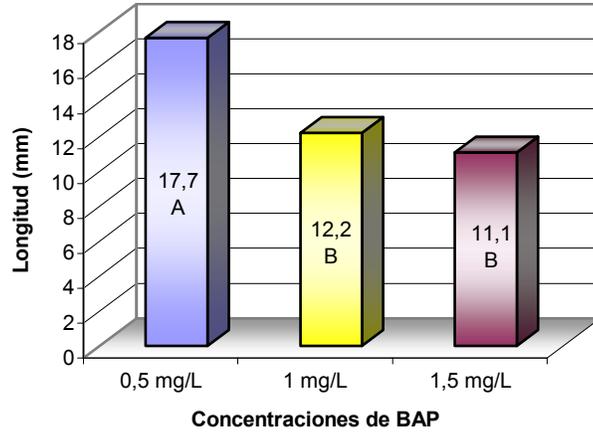


Figura 43. Longitud del brote según la concentración de BAP en el tercer subcultivo.

4.2.4 Análisis de la fase de multiplicación en dos variedades por subcultivos

Durante los tres subcultivo se identificó que el M.S.+ 0.5 mg/L de BAP fue el mejor para promover la formación de brotes en la variedad Oso Grande. En este mismo medio de cultivo Navatel (1989) citado por Martinelli (1992) obtuvo resultados favorables en esta fase.

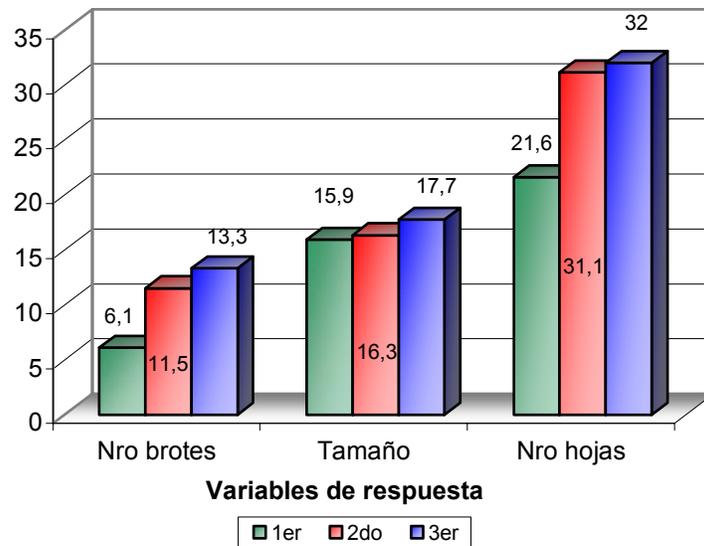


Figura 44. Comparación de las variables de respuesta en la variedad Oso Grande por subcultivos (T1).

Mediante la Figura 44 se evidencia que la variedad Oso Grande va aumentando progresivamente el número de brotes y número de hojas en los tres subcultivos. Este efecto posiblemente se deba a que los explantes van acumulando citocininas en sus tejidos como resultado de ello van aumentando el número de brotes en cada subcultivo. Este resultado era de esperarse como afirma Orellana (1998) quien indica que a medida que aumenta el número de subcultivos hay una tendencia al incremento del número de brotes por explante. Al respecto, Jiménez (1995) citado por Orellana (1998) menciona que en los primeros subcultivos el coeficiente de multiplicación en caña de azúcar es bajo pero a partir del tercer y cuarto subcultivo recién comienza el incremento de brotes.

Así mismo, la Figura 44 muestra que en la variable tamaño de los brotes este tiende a aumentar este hecho se asume a que el medio de cultivo contenía en proporciones similares auxina y citocinina (0.5 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP). Al tener este balance de reguladores de crecimiento favoreció en una mayor elongación del brote.

En cambio, en la variedad Sweet Charlie el medio en que logró mayor número de brotes fue en el M.S. suplementado con 1 mg/L de BAP.

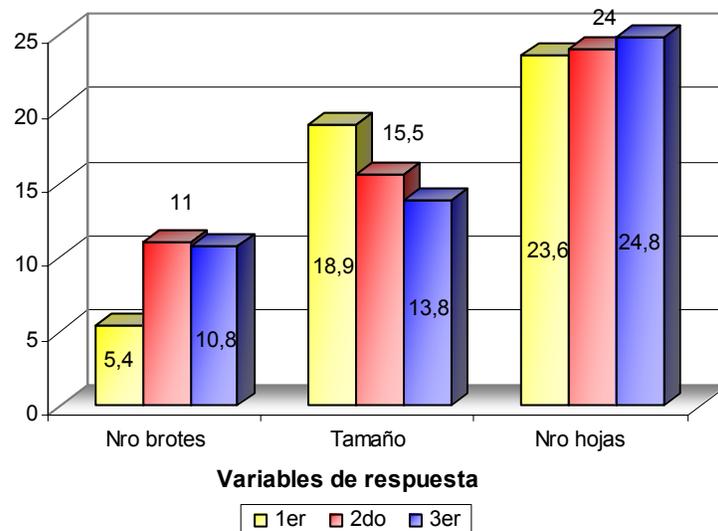


Figura 45. Comparación de las variables de respuesta en la variedad Sweet Charlie por subcultivos.

La Figura 45, revela que la variedad Sweet Charlie presentó un aumento en el número de brotes y número de hojas entre el primer y segundo subcultivo pero a partir del tercer subcultivo tiende a estandarizarse. Al respecto, Pereira (1998) indica que en la variedad Fern a partir del segundo subcultivo existe una tendencia de estandarización en el potencial de multiplicación en cada ciclo de subcultivo en frutilla.

Así mismo, se observa (Figura 45) que el tamaño de los brotes va reduciéndose este resultado se asume al hecho de que el medio tenía menor cantidad de auxinas en relación a las citocininas (0.5 mg/L de AIB + 1 mg/L de BAP) lo que permitió que se de una reducción en el tamaño de los brotes en el transcurso de los subcultivos.

En ambas variedades estudiadas se evidencia que existe un mayor aumento del número de brotes a partir del segundo subcultivo. Esta respuesta era de esperarse puesto que la mayor proliferación de brotes axilares recién se logra observar a partir del segundo subcultivo (Pérez, 2004).

4.3 Fase III: Enraizamiento

Los análisis de varianza que se mostrarán a continuación en los siguientes cuadros, previamente se realizó una transformación de datos utilizando para ello (**log (logx + 10)**) en las variables de respuesta, con esto se demostró que no existe anormalidad en la distribución de errores. Excepto en la variable porcentaje de explantes que forman raíces la cual no se necesitó hacer dicha transformación.

4.3.1 Crecimiento relativo de la parte aérea

El análisis de varianza (Cuadro 36) revela diferencia altamente significativa entre los medios de cultivo y no muestra diferencias significativas entre las variedades y la interacción.

Cuadro 36. Análisis de varianza para el crecimiento relativo de la parte aérea.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0029	0.0029	1.38	0.243 ns
Medio (B)	2	0.0352	0.0179	8.26	0.000 **
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0084	0.0042	1.98	0.144 ns
Error	84	0.1789	0.0021		
Total	89	0.2255			

C.V. = 5.07%

Los resultados que muestra la Figura 46 indica que existió un incremento en el crecimiento de los explantes en el medio diluido al 75% de M.S., no ocurrió lo mismo cuando los medios fueron diluidos al 25 y 50% de M.S. (Anexo 20). Los resultados concuerdan con Camargo (2000) quien trabajo con clavel al reducir la concentración de M.S. al 50% induce un menor crecimiento de la parte aérea de la planta, comparando con el medio al 100% de su concentración.

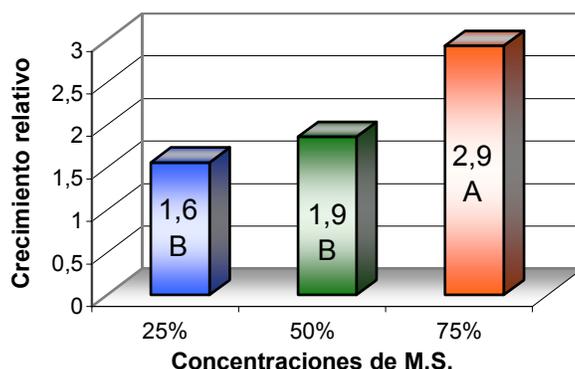


Figura 46. Crecimiento relativo del follaje según la variación de M.S.

4.3.2 Materia seca de la parte aérea

El análisis de varianza del Cuadro 37 señala que no existen diferencias significativas para el efecto de las variedades, medios de cultivo y la interacción entre factores en esta variable.

Cuadro 37. Análisis de varianza para materia seca de la parte aérea.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0000	0.0000	0.01	0.974 ns
Medio (B)	2	0.0105	0.0052	0.58	0.562 ns
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0231	0.0115	1.27	0.285 ns
Error	84	0.7637	0.0090		
Total	89	0.7975			

C. V. = 7.46%

Por lo que se podría señalar que ni la variedad y el medio de cultivo empleado afectaron en forma directa en el contenido de materia seca en el follaje de la vitroplanta. Los resultados obtenidos en esta variable posiblemente se deba a que al tener todos los medios de cultivo sacarosa (30 g/L) favoreció en la acumulación de materia seca, siendo que los carbohidratos son uno de los principales componentes de la materia seca; de manera que los explantes adquirieron del medio de cultivo su fuente de energía (azúcar) y posteriormente lo almacenaron en sus tejidos como carbohidratos por lo que no se presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos estudiados. Al respecto, Salisbury y Ross (1994) señalan que unos de los principales componentes de la materia seca son polisacáridos de la pared celular y lignina además de componentes del protoplasma, incluyendo proteínas, lípidos y aminoácidos ácidos orgánicos. Por su parte, George (1992) citado por Calvete *et al.* (2002) menciona que la sacarosa es una fuente de carbón exógeno que influye en la diferenciación, crecimiento de los tejidos e inducción de órganos.

4.3.3 Número de raíces

Cuadro 38. Análisis de varianza para el número de raíces.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0179	0.0179	5.37	0.023 *
Medio (B)	2	0.0567	0.0283	8.45	0.000 **
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0558	0.0279	8.31	0.000 **
Error	84	0.2822	0.0033		
Total	89	0.4127			

C. V. = 5.77%

El análisis de varianza efectuado para esta variable muestra diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo y la interacción, al mismo tiempo muestra diferencias significativas entre las variedades.

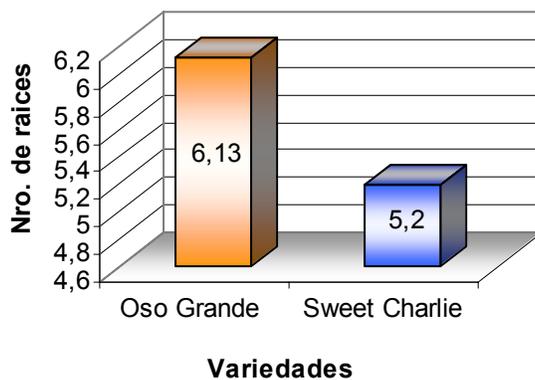


Figura 47. Número de raíces por variedad.

Mediante la Figura 47 se evidencia que la variedad Oso Grande fue la que generó mayor cantidad de raíces en relación a la variedad Sweet Charlie, este efecto posiblemente se deba a las características genóticas de las variedades en estudio. Este resultado presenta similitud con Sivila (1998), quien afirma que al trabajar con las variedades Gento, Ostara, Douglas y Pájaro obtuvo diferentes promedios en cuanto al número de raíces por explante, variando de 6.5, 9.3, 6,9 y 5,4 respectivamente.

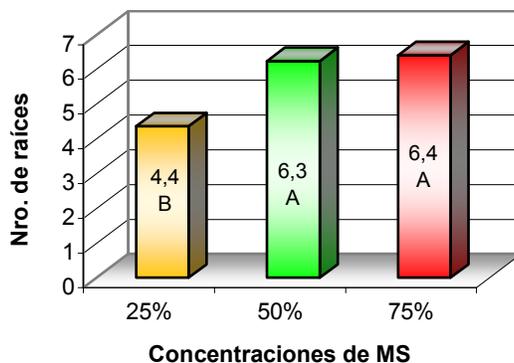


Figura 48. Número de raíces en función a la concentración del M.S.

Mediante la Figura 48 se evidencia que los medios diluidos al 50 y 75% de las

sales del M.S. generaron mayor cantidad de raíces con valores de 6.3 y 6.4 respectivamente; en cambio, el medio con 25% de M.S. fue el menos favorecido para esta variable (ver Anexo 21). El resultado obtenido podría deberse a que en esta dilución la cantidad de nutrientes disponibles es menor, por lo que los explantes inoculados en este medio forman menor cantidad de raíces.

El análisis de efectos simples (Cuadro 39) muestra diferencias altamente significativas en respuesta de las variedades con el medio diluido al 25% de M.S. y no muestra diferencias significativas con el resto de los medios de cultivo. Por otro lado, también muestra diferencias significativas en respuesta de los medios de cultivo en las variedades Oso Grande y Sweet Charlie.

Cuadro 39. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para número de raíces.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (25% M.S.)	1	0.195	0.195	65.00	3.96	6.96	**
Entre V y MC2 (50% M.S.)	1	0.001	0.001	0.33	3.96	6.96	n.s.
Entre V y MC3 (75% M.S.)	1	0.004	0.004	1.33	3.96	6.96	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.031	0.015	5.00	3.11	9.88	*
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	0.139	0.069	23.00	3.11	9.88	**
Error	84	0.282	0.003				

La Figura 49 revela, que la variedad Oso Grande presentó similar comportamiento en los tres medios de cultivo (25, 50 y 75%) en la variable número de raíces; por el contrario la variedad Sweet Charlie logró un mayor número de raíces en los medios diluidos al 50 y 75% de M.S. que en el medio con 25% de M.S. en la que generó menor número de raíces. Esta afirmación concuerda con Scherwinski *et al.* (2004) quienes señalan que la reducción de las sales de M.S al 50 y 75% incrementa el número de raíces en la variedad Tangi.

Por otro lado, la diferencia entre variedades (Oso Grande y Sweet Charlie) con el

medio que fue diluido al 25% de M.S. en la respuesta morfogénica *in vitro* viene determinada por el genotipo como afirman Grattapaglia y Machado (1990) citado por Calvete *et al.* (2002).

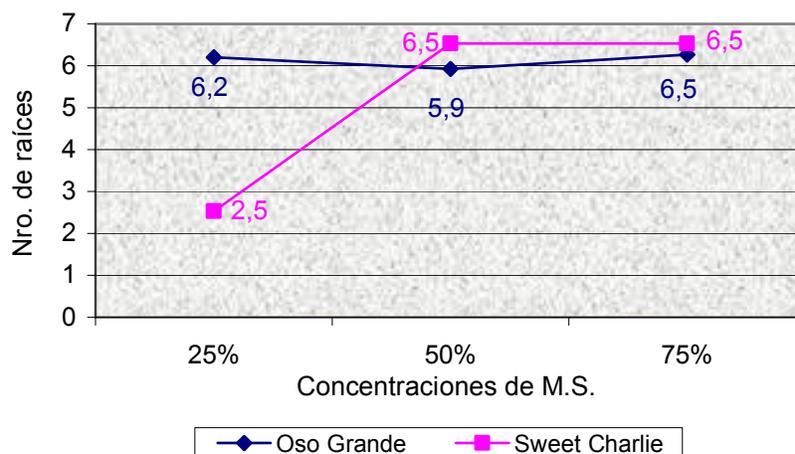


Figura 49. Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de M.S. sobre el número de raíces.

4.3.4 Longitud de raíces

El análisis de varianza muestra diferencias altamente significativas entre las variedades y la interacción de A*B y no muestra diferencias estadísticas entre los medios de cultivo (ver Cuadro 40).

Cuadro 40. Análisis de varianza para la longitud de la raíz.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.1211	0.1211	7.39	0.0080 **
Medio (B)	2	0.0506	0.0253	1.54	0.2196 ns
Variedad* Medio (A*B)	2	0.4767	0.2383	14.59	0.0001 **
Error	84	1.3768	0.0163		
Total	89	2.0253			

C. V. = 9.30%

Mediante la Figura 50 se observa que la variedad Oso Grande generó mayor

longitud de raíces en comparación con la variedad Sweet Charlie. Los resultados son similares a los obtenidos por Sivila (1998) quien determinó que las variedades (Gento, Ostara, Douglas y Pájaro) presentaron una diferente respuesta en cuanto a la longitud de las raíces variando de 65, 102, 84 y 84 mm respectivamente.

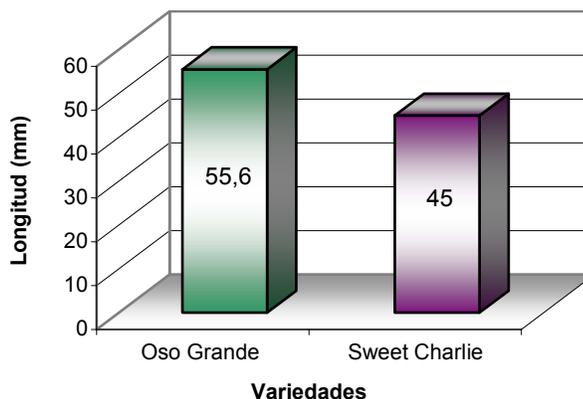


Figura 50. Longitud de las raíces por variedades.

El análisis de efectos simples del Cuadro 41 indica la existencia de diferencias altamente significativas en respuesta de las variedades con el medio M.S. diluido al 25% de su concentración así también, no muestra diferencias significativas para los otros medios en estudio. Al mismo tiempo, se observan diferencias significativas en respuesta de los medios de cultivo en las dos variedades.

Cuadro 41. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para la longitud de las raíces.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (25% M.S.)	1	0.596	0.596	36.56	3.96	6.96	**
Entre V y MC2 (50% M.S.)	1	0.013	0.013	0.828	3.96	6.96	n.s.
Entre V y MC3 (75% M.S.)	1	0.013	0.013	0.828	3.96	6.96	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.123	0.061	3.74	3.11	9.88	*
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	0.400	0.200	12.26	3.11	9.88	**
Error	84	1.376	0.016				

En la Figura 51 se observa que la variedad Oso Grande en concentraciones bien

diluidas, es decir, al 25% de M.S. generó mayor longitud de las raíces, en comparación con 50 y 75% de M.S. Este resultado obtenido posiblemente se deba a que la vitroplanta al tener baja disponibilidad de los elementos nutritivos en el medio, las raíces tienden a explorar con la finalidad de absorber sales que requiere la vitroplanta, en consecuencia de ello aumentan de tamaño.

Así mismo, en la Figura 51 se observa que la variedad Sweet Charlie generó menor tamaño de las raíces en el medio con 25% de M.S. (31.3 mm) en cambio cuando la concentración de las sales de M.S. fue de 50 y 75% logró una mayor longitud de la raíz con valores de 48.8 y 43.3 mm respectivamente. Esta afirmación concuerda con Scherwinski *et al.* (2004) quienes estudiaron el comportamiento de dos variedades de frutilla y determinaron que la variedad Hofla presentó mayor longitud de raíz que la variedad Tangi en los medios diluidos al 50 y 75% de M.S.

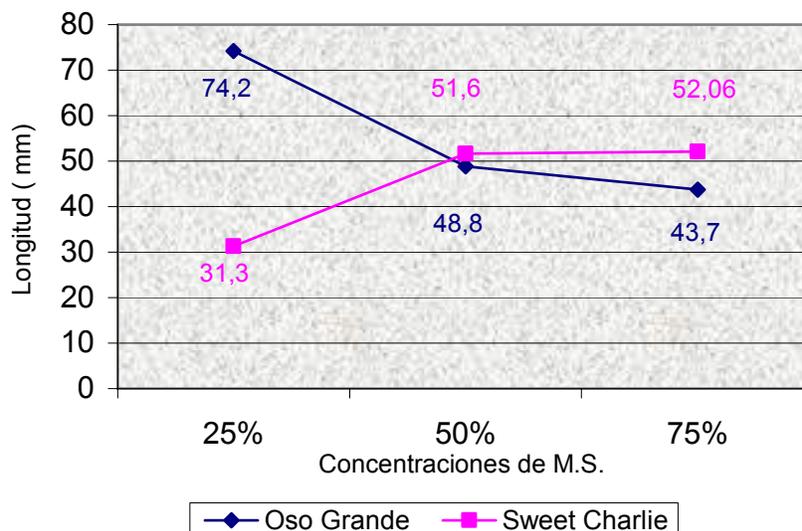


Figura 51. Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de M.S. sobre la longitud de las raíces.

La diferencia encontrada entre las dos variedades con respecto al medio diluido al 25% de M.S., se atribuye a las características genotípicas de cada variedad, lo que hace suponer que la variedad Oso Grande fácilmente llegó a habituar en este

medio por lo que generó mayor longitud de la raíz, lo que no ocurrió con la variedad Sweet Charlie. Al respecto, Salisbury y Ross (1994) relatan que la morfología radicular es controlada por mecanismos genéticos. Así mismo, se observó que la variedad Oso Grande en esta concentración (25% M.S.) formó raíces secundaria y terciarias lo que no sucedió lo mismo con Sweet Charlie.

4.3.5 Materia seca de las raíces

El análisis de varianza (ver Cuadro 42) efectuado para esta variable indica que no existen diferencias significativas entre las variedades (Oso Grande y Sweet Charlie), medios de cultivo ni la interacción de los factores.

Cuadro 42. Análisis de varianza para materia seca de las raíces.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.0005	0.0005	0.05	0.820 ns
Medio (B)	2	0.0333	0.0166	1.46	0.238 ns
Variedad* Medio (A*B)	2	0.0113	0.0056	0.49	0.611 ns
Error	84	0.9604	0.0114		
Total	89	1.0056			

C.V. = 10.36%

La similitud de los valores estadísticos en esta variable es probable que la presencia de azúcar (30 g/L) en los medios favoreció en la formación de biomasa radicular, ya que varios autores sugieren que la adición de 20 a 30 g/L de sacarosa influye en la formación de raíces George (1992) citado por Calvete *et al.* (2002). En este sentido, la sacarosa para los explantes fue su fuente de energía, la misma que permitió mantener su actividad metabólica y consecuentemente la acumulación de carbohidratos (materia seca) en sus tejidos. Al respecto, Calvete *et al.* (2002) menciona que los medios de cultivo con sacarosa favorece que los explantes de frutilla acumulen mayor biomasa que en ausencia de ella.

4.3.6 Porcentaje de explantes que forman raíces

El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre variedades y diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo y la interacción de los factores para el porcentaje de explantes que forman raíces. La información que nos da el Cuadro 43, estaría revelando que la acción de los factores de estudio tuvo un efecto sobre la formación de raíces en los explantes inoculados.

Cuadro 43. Análisis de varianza para el porcentaje explantes que forman raíces.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Prob.
Variedad (A)	1	0.1777	0.1777	5.09	0.026 *
Medio (B)	2	0.3555	0.1777	5.09	0.008 **
Variedad* Medio (A*B)	2	0.3555	0.1777	5.09	0.008 **
Error	84	2.9333	0.0349		
Total	89	3.8222			

C. V. = 19.55%

De los resultados de la comparación de medias entre las dos variedades se evidencia que la variedad Oso Grande el 100% de los explantes inoculados llegó a formar raíces, lo que no sucedió en la variedad Sweet Charlie que solo el 91% de los explantes llegaron a formar raíces ver Figura 52.

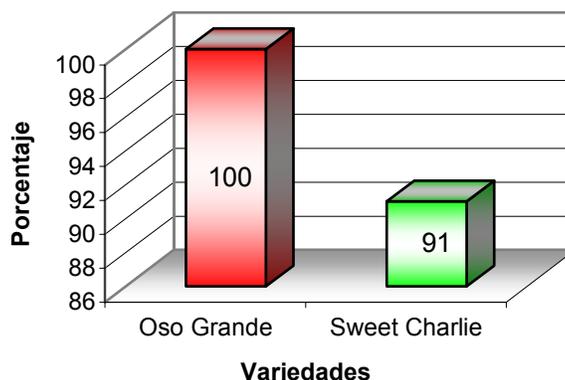


Figura 52. Porcentaje de explantes que forman raíces por variedades.

Según la prueba de Duncan (Anexo 22) señala que los medios diluidos 50 y 75% de M.S. son estadísticamente similares; asimismo, en estos medios todos los explantes llegaron a formar raíces (100%). Por otro lado, el medio que fue diluido al 25% de las sales del M.S., resulto el menos adecuado ya que en este medio

solo el 86% de los explantes llegaron a formar raíces.

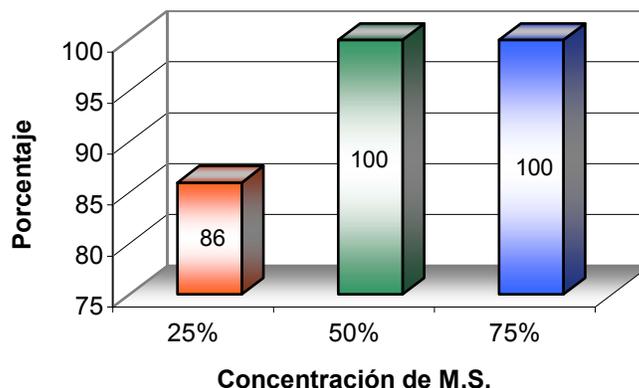


Figura 53. Porcentaje de explantes que forman raíces según la variación M.S.

En el análisis de efectos simples (Cuadro 44) muestra diferencias altamente significativas en respuesta de las variedades Oso Grande y Sweet Charlie en el medio diluido al 25% de M.S. Al mismo tiempo, no muestra diferencias estadísticas entre los medios diluidos 50 y 75% de M.S. Por otro lado, se evidencia que existen diferencias altamente significativas en respuesta de los medios de cultivo en la variedad Sweet Charlie y no muestran diferencias significativas en la variedad Oso Grande.

Cuadro 44. Análisis de efectos simples de la interacción de variedades y medios de cultivo para el porcentaje de explantes que forman raíces.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F cal.	Ft. 0.05	Ft. 0.01	Sig.
Efecto de las variedades (V)							
Entre V y MC1 (25% M.S.)	1	0.553	0.553	16.27	3.96	6.96	**
Entre V y MC2 (50% M.S.)	1	0.000	0.000	0.00	3.96	6.96	n.s.
Entre V y MC3 (75% M.S.)	1	0.000	0.000	0.00	3.96	6.96	n.s.
Efecto de los medios (MC)							
Entre MC y V 1 (Oso Grande)	2	0.000	0.000	0.00	3.11	9.88	n.s.
Entre MC y V 2 (Sweet Charlie)	2	0.725	0.362	10.66	3.11	9.88	**
Error	84	2.930	0.034				

En la Figura 54 se observa que los explantes de la variedad Oso Grande en los

tres medios de estudio (25, 50 y 75% de M. S.) llegaron a formar raíces; en cambio, los explantes de la variedad Sweet Charlie cuando el medio estuvo diluido al 25% de M.S. no todos llegaron a formar raíces, pero formaron en su totalidad en los medios diluidos al 50 y 75% de las sales del M.S. Similares resultados fueron observados por Scherwinski *et al.* (2004) quienes determinaron que las variedades Tangi y Hofla presentaron una favorable respuesta en cuanto al porcentaje de explantes enraizados en los medios diluidos al 50 y 75% de M.S.

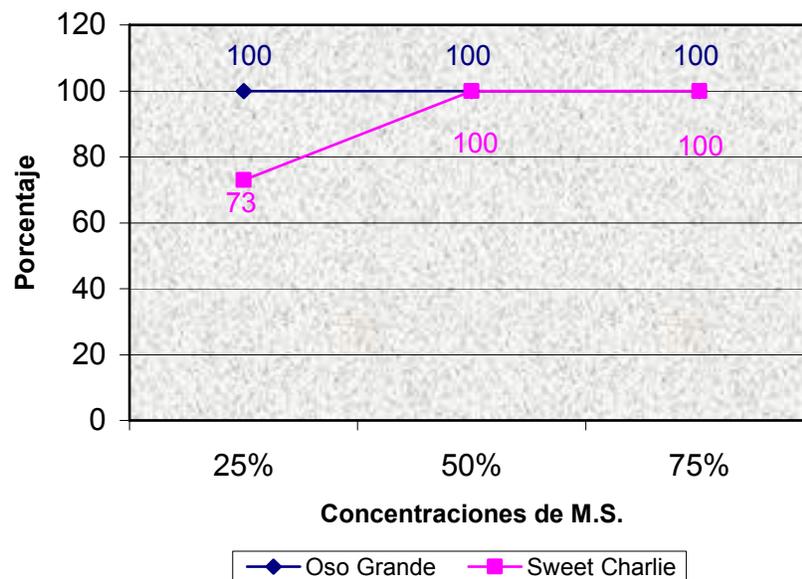


Figura 54. Efecto de la interacción de las variedades según la concentración de M.S. sobre el porcentaje de explantes que forman raíces.

Al mismo tiempo, se observó que los explantes que no regeneraron raíces en su totalidad (T4), presentaron una coloración rojiza en los márgenes de los folíolos (ver Figura 55a y b), este hecho posiblemente se deba a la escasa disponibilidad de los elementos nutritivos, en razón de que en esta dilución la concentración de las sales es menor por lo que la vitroplanta muestra esta sintomatología. El resultado concuerda con Ramírez (1989) quien señala que la sintomatología que provoca la deficiencia de fósforo es que una planta de color verde oscuro en las hojas con frecuencia aparecen coloraciones rojas o púrpuras.



a)

b)

c)

Figura 55. a) Explantes correspondiente al tratamiento 4 (Sweet Charlie * 25% M.S.) b) Hoja con síntoma de deficiencia de P y N. c) Hoja procedente del T1 (Oso Grande * 25 % M.S.).

Así mismo, en los explantes de la variedad Oso Grande se observó que las hojas externas poco a poco se fueron secando hasta morir, pero las hojas nuevas presentan una coloración verde claro, esta respuesta de las hojas podría deberse a la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo; ya que en los borde de los folíolos también presentaban una coloración rojiza pero esta con menor intensidad que la variedad Sweet Charlie, como se aprecia en la Figura 55c.

Al respecto, INTA (2004) mencionan que la respuesta de la planta de frutilla a la carencia de nitrógeno es la reducción en la tasa de crecimiento, las hojas jóvenes son de color verde pálido mientras y las hojas completamente desarrolladas presentan una coloración rojiza a partir de los márgenes internos de los folíolos. Por otro lado, la sintomatología que muestra la baja concentración de fósforo es la presencia de nervaduras más chicas, las mismas que toman color verde azulado y a medida que avanza la deficiencia, esta coloración cubre los folíolos. Las hojas viejas son rojizas y luego púrpura y los pecíolos son rojos.

Por su parte, Orellana (1998) menciona que el manejo de la concentración de sales es recomendado ampliamente para estimular el enraizamiento, lográndose la formación abundante de raíces al disminuir las sales a la mitad, un tercio o un

cuarto de la concentración de los medios; sin embargo el procedimiento más empleado es la reducción de las sales a la mitad ya que una disminución mayor pudiera afectar el desarrollo general de la vitroplanta.

4.3.7 Análisis de la Fase de Enraizamiento

Por lo expuesto anteriormente se podría mencionar que en las variables: crecimiento relativo del follaje, longitud y número de raíces y porcentaje de explantes que forman raíces, se observó que la variedad Oso Grande presentó una respuesta favorable que la variedad Sweet Charlie. En cambio, al analizar los medios de cultivo definitivamente el medio M.S. diluido al 25% de sales no favorece en una respuesta positiva en los explantes inoculados, en razón de que en esta concentración ya se empiezan a notar síntomas de deficiencias de los elementos nutritivos en las vitroplantas. Al respecto, Mejía (1988) citado por Conde (2002) menciona que las plantas necesitan tomar del medio cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos que son los macronutrientes, estos son indispensables para el crecimiento de la planta. Por su parte, López (1990) menciona que para una adecuada actividad metabólica las células requieren de micronutrientes.

En esta fase, para las variables materia seca del follaje y de las raíces no existen diferencias significativas entre los factores de estudio y la interacción, pero vale la pena recalcar que este parámetro es sin ninguna duda una variable que permite, seleccionar el medio adecuado para el enraizamiento y la elongación de los explantes. En razón de que si los explantes presentan mayor contenido de materia seca, entonces será mayor el contenido de carbohidratos presentes en la vitroplanta, lo que favorece a que esta tenga mayor adaptabilidad durante la aclimatación.

Al analizar las medias de los tratamientos tanto para la materia seca del follaje y de las raíces (ver Anexo 23 y 24) en la variedad Oso Grande en los medios

diluidos al 50 y 75% de M.S. fueron en los que presentaron mayor cantidad de materia seca tanto del follaje y de las raíces; aunque el medio con 25% de M.S. presentó resultados relativamente favorables en esta variable este hecho posiblemente se deba a que los explantes en este medio llegaron a formar raíces secundarias y terciarias las mismas que de alguna manera favorecieron en el aumento de peso, pero no se recomienda el uso de este medio ya que estas raíces son más delicadas las mismas que podrían morir durante el transplante al suelo. Al respecto, Montecinos (1993) señala que las raíces secundarias se dañan fácilmente si se produce un estrés por ser más delgadas y tienen una vida corta.

En la variedad Sweet Charlie, también presentó resultados favorables el medio M.S. diluido al 50 y 75%, en la materia seca del follaje y la raíz. Similares resultados se obtuvieron en cuanto a la materia seca en frutilla en el trabajo realizado por Calvete *et al.* (2002), en la variedad Campinas quienes obtuvieron 37.08 y 8.7 mg de materia seca del follaje y de la raíz respectivamente. Al respecto, Salisbury y Ross (1994) citado por Calvete *et al.* (2002) señalan que un mayor contenido de materia seca de las plantas *in vivo* significa mayor acumulación de compuestos fotosintéticos y por ende mayor absorción de minerales. Por otro lado, el contenido de materia seca obtenido en las dos variedades es adecuado para la aclimatación tal como menciona Calvete *et al.* (2002) el aumento en biomasa foliar y radicular en frutilla, sugiere menor acumulación de agua entre los tejidos.

A pesar de que no hay diferencias en la materia seca se puede afirmar que ambas variedades pueden ser inoculadas al medio M.S. diluido al 50 o al 75%, pero para reducir costos del medio de cultivo, los explantes pueden ser inoculados en el medio M.S. al 50% de su concentración.

5. CONCLUSIONES

Después de discutir los resultados obtenidos y de acuerdo a los objetivos propuestos se llegó a las siguientes conclusiones:

5.1 Fase I: Establecimiento

- Una óptima desinfección de yemas provenientes de corona se logró cuando los explantes fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% durante 25 minutos.
- Una desinfección efectiva de yemas de estolones se logró cuando los explantes fueron desinfectadas con NaClO al 0.8% durante 13 minutos.
- El explante que respondió mejor a su establecimiento *in vitro* fue la yema de estolón.
- Se logró controlar la oxidación de los explantes (corona y estolón) con la inmersión en una solución con 1 g/L de ácido cítrico previo a la inoculación.
- Se determinó que los explantes de la variedad Sweet Charlie presentaron mayores longitudes (17 mm), en el medio M.S.+ 0.1 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP, en cambio la Oso Grande en los tres medios en estudio obtuvo un tamaño casi similar de 8.15, 9.18 y 9.9 mm.
- La variedad Sweet Charlie formó dos hojas en 17 días en el medio M.S.+ 0.1 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP. Sin embargo, la Oso Grande no mostró una selectividad del medio de cultivo, esta última llegó a formar dos hojas en los tres medios, pero en un lapso mayor de 26 días.

5.2 Fase II: Multiplicación

- Para el primer subcultivo en el medio M.S. suplementado con 0.5 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP ambas variedades (Oso Grande y Sweet Charlie)

desarrollaron mayor número de brotes.

- En el segundo y tercer subcultivo la variedad Oso Grande logró formar mayor número de brotes en el medio con 0.5 mg/L de BAP; Sin embargo la variedad Sweet Charlie en el medio con 1 mg/L de BAP.
- La variedad Oso Grande fue la que desarrolló mayor cantidad de brotes en relación a la variedad Sweet Charlie en los tres subcultivos.
- En los tres subcultivos realizados se determinó que el número de brotes producidos esta directamente relacionado con el número de hojas.
- Las dos variedades en el medio M.S.+ 0.5 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP llegaron a formar raíces durante esta fase, pero la variedad Sweet Charlie fue la que se generó mayor cantidad de raíces.

5.3 Fase III: Enraizamiento

- Se determinó para el enraizamiento en las dos variedades los medios diluidos al 50 y 75% de M.S. promueven un buen crecimiento y desarrollo tanto de las raíces y del follaje.
- Con 25% de la concentración de las sales del medio M.S. los explantes de ambas variedades presentaron sintomatología de deficiencia de los elementos nutritivos (nitrógeno y fósforo).
- De acuerdo a la respuesta obtenida en las variables tamaño y número de raíces, crecimiento relativo del follaje y porcentaje de explantes que llegan a formar raíces se puede afirmar que los medios diluidos al 50 y 75% de M.S. mostraron ser los más adecuados durante esta fase.

6. RECOMENDACIONES

- Para dar inicio al establecimiento *in vitro* en frutilla es recomendable el uso como material inicial las yemas provenientes de estolones.
- Para la fase de establecimiento se recomienda utilizar el medio M.S. + 0.1 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP en la variedad Sweet Charlie pero para la Oso Grande se recomienda una disminución del BAP a 0.1 mg/L.
- En la fase de multiplicación para el primer subcultivo se recomienda el uso del medio M.S. + 0.5 mg/L de AIB + 0.5 mg/L de BAP en las dos variedades, pero a partir del segundo subcultivo utilizar preferentemente el medio M.S. + 0.5 mg/L de AIB + 1 mg/L de BAP para la variedad Sweet Charlie.
- En la fase de enraizamiento se aconseja colocar los explantes en el medio diluido al 50% de las sales del M.S., suplementado con 1 g/L de carbón activado en ambas variedades.
- Se recomienda el aumento del tiempo de repique de los explantes de frutilla para promover mayor cantidad de brotes.
- Realizar trabajos de aclimatación de las vitroplantas de frutilla procedentes del mejor tratamiento de la fase de enraizamiento.
- Estudios del efecto en los rendimientos (*ex vitro*) de plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Aguilar, M. 2003. Germinación *in vitro* de Totora *Schoenoplectus californicus* spp. e Inducción con BAP y ANA, como base para su Micropropagación. Tesis de Lic. en Biología, U.M.S.A. La Paz, Bolivia. 100 p.

Azcón-Bieto y Talon. 1993. Fisiología Bioquímica Vegetal. Ed. rev. Madrid, España. Impreso en Edigrafos. s.e. 581p.

_____ 2001. Fundamentos de la Fisiología Vegetal. Ed rev. Barcelona, España. Editorial Universitat de Barcelona. 522 p.

Bareiro, T.; Infante, L.; Schmidt, F.y Vita, J. 2004. Suplemento: Momento Oportuno para instalar Huertos. (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado 3 nov. 2003. Disponible en: <http://www.lni.unipi.it/stevia/Suplemento/PAG41004.HTM>

Boletín Económico. 2003. Dirección General de Desarrollo Económico Municipal Irapuato, Gto. México. (en línea). México. Consultado el 10 jul. 2004. Disponible en: <http://www.irapuato.gob.mx/boletines/Informe%20Febrero%202003.pdf>

Borque, V. 2003. Agricultura: Cultivo de Frutillas en la provincia de Tucumán Dirección de la Agricultura. (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado el 10 jul. 2003. Disponible en: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0-0/index/agricultura/text.htm>

Boxus, P. 1984. Handrook of Plant Cell Culture: Strawberry. Ed rev. New York, USA. Editorial Library of Congress Cataloging. v. 3, pp. 453-483.

Calvete, O.; Norman, A y Suzin, S. 2002. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro (en línea) Horticultura Brasileira. v 20, tomo

2. Brasil. Consultado el 15 de oct. 2004. Disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-5362002000400028&lng=en&nrm=iso

Calzada, B. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. Lima, Perú. Ed. Jurídica. 640 p.

Camargo, R. 2000. Determinación del protocolo en clavel. Tesis de Lic. en Ing. Agr., E.M.I. La Paz, Bolivia. pp. 64-66.

Castellón, Y. 2000. Efecto de la Fertilización Orgánica con nutrigrow con Concentraciones diferentes en Cultivo Hidropónico en Frutilla (*Fragaria virginiana*) en condiciones Controladas. Tesis de Lic. en Ing. Agr., U.M.S.A. La Paz, Bolivia. pp. 20-21.

Conde, E. 2002. Determinación de una Técnica alternativa para la Multiplicación *in vitro* de *Citrus Reshni* Hort. ex. Tanaka. Tesis de Lic. en Biología, U.M.S.A. La Paz, Bolivia. 71 p.

Chandler, K.; Albregts, E.; Howard, C. y Brecht, J. 2004. Strawberry Variedad Sweet Charlie. (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado el 15 de nov. 2004. Disponible en:
http://www.inta.gov.ar/famailla/frutilla/info/material_vegetal.htm

Darías, R. 1993. Recopilación de Temas sobre Técnicas de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Oruro, Bolivia U.T.O. y Universidad Cienfuegos de Matanzas. Cuba. s.e. p. 169.

Folquer, F. 1986. La frutilla o fresa. Ed rev. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio del Sur S.A. pp. 62-122.

García, L. y Noa, J. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: Obtención de plantas libres de patógenos. (Pérez, J.) Ed. rev. Santa Clara, Cuba. s.e. pp. 135-49.

Gómez, R. 1999. Aplicaciones de la Biotecnología en la Mejora Genética de Plantas y la Producción de semillas. Modulo 1: Cultivo *in vitro*. Ed. rev. Santa Clara, Cuba. s.e. pp. 32-47.

Grupo Medina 2004. Variedades de Frutilla. (en línea). Consultado el 21 de nov. 2004. disponible en: <http://www.medinagroup.net/agromedina/mpvfresas.html>

Hartmann, H. 1994. Propagación de plantas principios y prácticas. Tercera Edición. México, D.F. Editorial Continental p. 662.

Holmes, T.; Infante, L.; Schmidt, F. y Vita, J. 2003. Fresa. (en línea). Consultado el 20 dic. 2003. Disponible en: <http://www.geocities.com/Athes/Sparta/4704/contacto.htm>

Hurtado, D. y Merino, M. 1997. Cultivo de Tejidos Vegetales: Primera edición. México, D.F. Editorial Trillas. 225 p.

Infoagro. 2004. El cultivo del fresón o fresa. (en línea). Consultado el 23 de abr. 2004. Disponible en: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/fresas.htm#3.6.Exigencias%20agroclimáticas.

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agrícola). 1999. Síntomas de Deficiencia en el cultivo de Frutilla del Interdepartment Horticultural Image Collection. Department of Horticulture, Cornell University. (en línea). Consultado el 20 de dic. 2003. San Pedro, Argentina. Disponible en: www.hort.cornell.edu

Jiménez, E. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Pérez, J.). Ed. rev. Santa Clara, Cuba. s.e. pp 13-24.

_____ 1999. Aplicaciones de la Biotecnología en la Mejora Genética de Plantas y en la Producción de semillas. Modulo 4: Propagación Masiva de plantas *in vitro*. Ed. rev. Santa Clara, Cuba. s.e. pp. 1-46.

Jiménez, G. 2002. Variedades de frutilla: Sweet Charlie. (en línea). Consultado el 18 en. 2003. Disponible en: <http://www.lagranja.com.uy/horticultura/aportes>

López, P. 1990. Medios de Cultivo: Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Estudio de la F.A.O. (Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (Rosell y Villalobos). Roma, Italia. pp. 15-16.

Maroto, J. 1992 Horticultura Herbácea especial. Fresas y Fresones. 4 ed. España. Ediciones Mundi-Prensa. pp. 505-530.

Martinelli, A. 1992. Biotechnology in Agricultura and Forestry; Micropropagation of Strawberry. Ed. rev. Roma. Italia. v, 18 pp. 354-370.

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

Murillo, R. 2002. Curso de Biotecnología Vegetal: Micropropagación *in vitro*. Ed. rev. IBTEN (Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear). La Paz, Bolivia. s.e. pp. 1-12.

Ochoa, N. 1990. Establecimiento de Cultivos *in vitro*: Fundamento teórico-práctico del cultivo de Tejidos Vegetales. Estudio de la F.A.O. (Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (Rosell y Villalobos). Roma, Italia. 25 p.

Orellana, P. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología; Contaminación Microbiana en el Cultivo *in vitro* de Plantas. (Pérez, J.). Impreso en Cuba. s.e. pp. 151-178.

Pérez, J. 2004. Biotecnología Vegetal. (entrevista). Docente de la Carrera de Agronomía de la Escuela Militar de Ingeniería E.M.I. La Paz, Bolivia.

Pereira, R. 1998. Determinación del Protocolo Adecuado para la Micropropagación en Fresa (*Fragaria* sp.). Tesis de Lic. en Ing. Agr., U.T.O. Oruro, Bolivia 100 p.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. rev. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 327 p.

Poma, E. 2004. Productor de frutilla de la carpa solar Cabaña la Esperanza. (entrevista). La Paz, Bolivia.

PPOEXANT (Promoción de Exportaciones Agrícolas no tradicionales). 2004. Cultivo de la Fresa o Frutilla (en línea). Consultado el 10 de jul. 2003. Disponible en: http://www.proexant.org.ec/Manual_Frutilla_2.html

Puttock, B. y Heather, G. 1987. Formulation and uses; Plant culture. Ed. rev. Englant. s.e. v.1 pp. 82 y 306.

Quezada, J. 1999. Evaluación del Potencial de dos Ecotipos de Ajo (*Allium sativum* L.) en el Proceso de Microbulbificación *in vitro*. Tesis Lic. en Ing. Agro., E.M.I. La Paz, Bolivia. 112 p.

_____ 2005. Biotecnología Vegetal (entrevista). Responsable de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología. Carrera de Biología, U.M.S.A. La Paz, Bolivia.

Ramírez, N. 1989. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. rev. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. pp. 31-39

Ramírez, R. y Barrera, J. 1998. Inducción *in vitro* de brotes axilares de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) con distintos reguladores de crecimiento. v. 2, tomo 1, (en línea). Guanajuato, México. Consultado el 14 oct. 2004 disponible en: <http://www.usidc13.ugto.mx./dirinv/acta/publicaciones/v82nacta82.htm>.

Roca, W. y Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura CIAT. s.e. Colombia
970 p.

Salisbury, F. y Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Ed. rev. México Editorial Iberoamericana. pp. 127-157.

Scherwinski, J.; Pereira, V.; Ferreira L, y Luces G. 2004. *In vitro* strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) rooting in different MS medium concentrations (Correo electrónico).

Sivila, C. 1998. Micropropagación *in vitro* de cuatro cultivares de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) y su comportamiento en invernadero. Tesis Lic. en Biología. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. 102 p.

Sánchez, C. 2004. Control de la Oxidación y la Contaminación en el Cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). (en línea). República, Dominicana. Consultado el 10 de jul. 2004. Disponible en:

http://www.redbio.org/rdominicana/redbio2004rd/Memoria_REDBIO_2004/Talleres-PDF/t18-PDF/t18-03.pdf

Ticona V. 2000. Comportamiento de tres variedades de Frutilla (*Fragaria* sp) en Diferentes Métodos de Cobertura Aplicados al Suelo Bajo Carpa Solar. Tesis Lic. en Ing. Agr., U.M.S.A. La Paz. Bolivia. pp. 12-13.

Vega, k. 2002. Introducción y Micropropagación *in vitro* de cuatro Especies de Keñua (*Polylepis* sp) del departamento de La Paz. Tesis de Lic. en Ing. Agr., LOYOLA. La Paz, Bolivia 45 p.

Villaroel, J. 1998. Curso: Micropropagación en Cultivos de Importancia Agronómica, Modulo: 1 Tarija., Bolivia. pp. 30 y 64.

Villegas, A. 1990. Micropropagación de fresa: Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Estudio de la F.A.O. (Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (Rosell y Villalobos). Roma, Italia pp.184-193.

Williner, M.; Pirovani, M. y Güemes, D. 2003. La frutilla mucho más que una fruta de estación. (en línea). Santa Fe, Argentina. Consultado el 12 jul. 2004.
Disponible en: <http://www.elcronistaregional.com/art/20030921/20-1532-0.html>

Anexo 1. Que es el ácido elálgico

El ácido elálgico es el principal compuesto fenólico en frutillas, y al igual que otros compuestos de esa familia se caracteriza por sus propiedades antioxidantes y posibles efectos anticarcinogénicos y antimutagénicos. El ácido elálgico es un fitoquímico, como se denomina a los compuestos biológicamente activos de origen vegetal que aportan un beneficio fisiológico adicional, más allá de los nutricionales básicos conocidos.

En un estudio realizado por la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por Williner *et al* (2003), demostraron mediante un análisis que las frutillas contienen, en algunos casos, 7 y hasta 8 veces más ácido elálgico que otras frutas, por lo que son ideales para sumar a la dieta diaria. Mientras que la banana, la pina, la ciruela, la mandarina, la manzana verde y la pera contienen ácido elálgico en menores proporciones, el kiwi, la manzana roja y las naranjas no mostraron cantidades detectables de este fitoquímico. No obstante, hay variaciones en el contenido de ácido elálgico, es mayor en las frutillas inmaduras (0% de su superficie color rojo), menor en las intermedias (50% color rojo) y mucho menor aún en las maduras (100% color rojo).

Anexo 2. Equipos de la Unidad de Biotecnología Vegetal

Cámara de flujo laminar
Autoclave
Refrigerador
Destilador de agua
pHmetro
Agitado eléctrico con pastilla magnética
Balanza analítica
Temporizador
Luxómetro
Termómetro de máxima y mínima
Microondas
Micropipeta de 10 a 100 y 100 a 1000 µl
Mecheros Bunsen
Mufla

Anexo 3. Materiales de Laboratorio

Vidrio	Vasos de precipitados (600,1000 y 2000 ml)
--------	--

	<p>Matraces erlenmeyer (250, 500 y 1000 ml) Pipetas graduadas (1, 2, 5 y 10 ml) Probetas graduadas (100, 500 y 1000 ml) Frascos ámbar para soluciones stock (320, 100 y 200 ml) Cajas petri Frascos de mayonesa (300 y 500 ml) tubos de ensayo Frascos de cultivo</p>
Químico	<p>Medio Basal Murashige y Skoog (1962) Bencilaminopurina (BAP) Ácido indolbutírico (AIB) Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N Ácido clorhídrico (HCl) 0.1N Carbón activado Ácido cítrico Azúcar Agar y phytigel</p>
Metálico	<p>Espátulas Pinzas bayoneta y pinzas de. 6” Mangos de bisturíes nro. 3 y 4 Hojas de bisturíes nro. 10, 11, 20 y 22 Tijeras</p>
Implementos de Laboratorio	<p>Papel aluminio Papel madera Maskin Magentas Plastifilm y parafilm Gradillas Picetas Propipeta Algodón Atomizador Cronometro</p>
Desinfección	<p>Alcohol (70 y 96%) Hipoclorito de sodio (NaClO) Jabón antifúngico Detergente líquido</p>

Anexo 4. Medio basal Murashige & Skoog (1962).

Reactivos	Formula	Concentración (mg)
SOLUCION A: MACRONUTRIENTES		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	16500
Nitrato de potasio	KNO_3	19000
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	1700
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3700
SOLUCION B: MICRONUTRIENTES		
Yoduro de potasio	KI	8.3
Acido bórico	H_3BO_3	62
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	86
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
Cloruro de cobaltoso hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25
SOLUCIÓN C: CLORURO DE CALCIO		
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4400
SOLUCION D: QUELATOS DE HIERRO		
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278
Etilen diamin tetraacetato	Na_2EDTA	373
SOLUCION E: VITAMINAS Y AMINOÁCIDOS		
Tiamina HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$	1
Piridoxina HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	5
Ácido nicotínico o niacina	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$	5
Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	1000
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	20

**Anexo 5. Preparación de soluciones stock del medio Murashige & Skoog
(1962)**

Previamente, se deberá de autoclavar el agua destilada y los frascos de color ámbar a utilizar. Para la preparación de las soluciones stock del medio basal Murashige y Skoog (1962), a una concentración de 100x se debe seguir los siguientes pasos:

1. Se deberá de pesar cada uno de los componentes, de la solución a preparar del medio Murashige y Skoog, 1962 (ver anexo 1).
2. En un matras erlenmeyer (100 ml de capacidad), verter 70 ml de agua destilada estéril, añadir uno por uno los reactivos pesados esperando que se diluya completamente el anterior, en el agitador magnético con su respectiva pastilla, antes de añadir el siguiente reactivo (observando siempre que la solución se encuentre transparente).
3. Tanto para la solución B (Micronutrientes) y E (Vitaminas y Aminoácidos) existen reactivos con muy poco peso, por lo que es necesario preparar otras soluciones concentradas, como es el caso de sulfato de cobre, glicina y otros. Para añadir estos reactivos al preparar la solución stock se debe sacar alícuotas de la solución concentrada que se esta preparando, por ejemplo: En el caso del sulfato de cobre, se tiene una solución concentrada de 5mg/5ml, para preparar la solución B, se debe añadir 0.25mg de este reactivo, siendo muy difícil de pesar. Por lo tanto se extrae 0.25 ml (250µl) de la solución concentrada de sulfato de cobre, que equivale a 0.25 mg de sulfato de cobre y se adiciona a la solución stock que se esta preparando.
4. Una vez terminado de añadir todos los reactivos para una solución se deberá de aforar en una probeta a 100 ml.
5. Para después verter la solución en frasco de color ámbar (estéril), y finalmente etiquetarlo de la siguiente manera:
 - Medio de cultivo (MS o Murashige & Skoog, 1962)
 - Solución stock que corresponde (Micronutrientes)
 - Concentración (100x (10000 ml MS---100ml stock))
 - Fecha de preparación (26 marzo, 2004)

Anexo 6. Preparación de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)

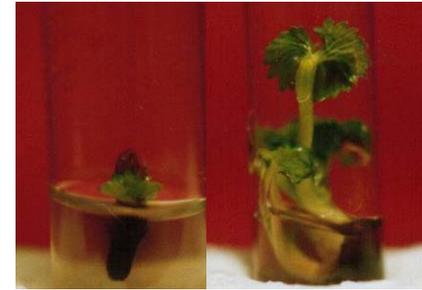
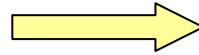
El medio de cultivo formulado por Murashige y Skoog, esta compuesto por cinco soluciones, las mismas presentan una concentración de 100x. Por ejemplo para preparar 1000 ml de medio de cultivo se procederá de la siguiente manera:

1. En un vaso de precipitados de agregar 850 ml de agua destilada.
2. Al mismo agregar 10 ml de cada solución A, B, C, D y E, obteniendo en total 900 ml. En caso de que el medio contenga reguladores de crecimiento se deberá añadir en este paso.
3. Agregar a la misma solución 30 g azúcar, de tal forma que se tiene el 90% del volumen requerido del medio de cultivo, con ayuda de una pastilla magnética y un agitador, mezclar la solución, hasta que la misma se encuentre transparente.
4. Aforar el volumen en este caso a 1000 ml en una probeta y Medir el pH de la solución el cual estará previamente calibrado, ajustándolo a 5.7 con ayuda de NaOH 0.1N o HCl 0.1N.
5. Agregar 5 g de agar taparlo el vaso de precipitados con papel para evitar que se evapore el medio y seguidamente calentarlo el medio ya sea en un microondas o calentador hasta que el agar este completamente diluido y la solución se encuentre transparente.
6. Servir el medio en frascos (25ml) o tubos de ensayo (5ml) y sellarlos con papel de aluminio con papel madera y amarrar con un cordel para asegurar. En el caso de utilizar frascos con tapa no cerrar herméticamente sino más bien que se encuentren un poco sueltas.
7. Autoclavar por 15 minutos a una presión de 15 PSI a una temperatura de 121°.

Anexo 7. Micropropagación en Frutilla



Selección de plantas donadoras



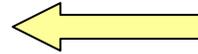
Fase de Establecimiento



Fase de Multiplicación



Fase de Enraizamiento



FASE DE ESTABLECIMIENTO

Anexo 8. Prueba de Duncan (0.05) para la desinfección de explantes de estolones en la variable necrosis.

Tratamientos	Promedio	Duncan *
A1	100	A
A2	90	A
A3	80	A
A4	70	AB
A5	70	AB
A6	40	BC
A7	10	CD
A8	0	D

*= letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 9. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable tamaño de los explantes.

Medios de Cultivo	Promedio Original (mm)	Promedio (mm) Transformado \sqrt{x}	Duncan *
M.S. + 0.1 AIB + 0.1 mg/L BAP	13.07	3.57	A
M.S. + 0.1 AIB + 0.5 mg/L BAP	10.9	3.25	AB
M.S. + 0.1 AIB + 1mg/L BAP	8.95	2.92	B

*= letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 10. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable crecimiento relativo

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio Transformado $\log(\log x + 10)$	Duncan *
M.S.+ 0.1 AIB + 0.1 mg/L BAP	1.03	0.87	A
M.S.+ 0.1 AIB + 0.5 mg/L BAP	0.91	0.87	AB
M.S.+ 0.1 AIB + 1 mg/L BAP	0.54	0.85	B

*= letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 11. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable tiempo que transcurre en formar dos hojas *in vitro*.

Medios de Cultivo	Promedio (días)	Duncan *
M.S. + 0.1 mg/L AIB 0.1 mg/L BAP	28.95	A
M.S. + 0.1 mg/L AIB + 0.5 mg/L BAP	23.40	B
M.S. + 0.1 mg/L AIB + 1mg/L BAP	23.00	B

* = letras iguales no son estadísticamente diferentes

FASE DE MULTIPLICACIÓN

Anexo 12. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de brotes del primer subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio $\sqrt{x+1}$	Duncan *
M.S.+ 0.5 AB + 0.5 mg/L BAP	6.16	2.43	A
M.S.+ 0.5 AIB + 1 mg/L BAP	5.90	2.35	A
M.S.+ 0.5 AIB +1.5 mg/L BAP	4.60	2.02	B

* = letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 13. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable longitud del brote del primer subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio Original (mm)	Promedio (mm) $\sqrt{x+1}$	Duncan *
M.S.+ 0.1 AIB + 0.5 mg/L BAP	17.43	4.13	A
M.S.+ 0.1 AIB + 1 mg/L BAP	17.16	4.11	A
M.S.+ 0.1 AIB + 1.5 mg/L BAP	13.96	3.65	B

* = letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 14. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de hojas del primer subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio $\sqrt{x+1}$	Duncan *
M.S.+ 0.1 AIB + 1 mg/L BAP	23.26	4.62	A
M.S.+ 0.1 AIB + 0.5 mg/L BAP	19.23	4.26	A
M.S.+ 0.1 AIB + 1.5 mg/L BAP	12.26	3.38	B

* = letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 15. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de raíces del primer subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio $\sqrt{x+1}$	Duncan *
M.S.+ 0.1 AIB + 0.5 mg/L BAP	1.56	0.88	A
M.S.+ 0.1 AIB + 1 mg/L BAP	0.90	0.86	A
M.S.+ 0.1 AIB + 1.5 mg/L BAP	0.00	0.83	B

* = letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 16. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de brotes del segundo subcultivo

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio $\sqrt{x+1}$	Duncan *
M.S.+ 0.5 AIB + 1 mg/L BAP	10.4	3.14	A
M.S.+ 0.5 AIB + 0.5 mg/L BAP	9.33	3.09	A
M.S.+ 0.5 AIB + 1.5 mg/L BAP	7.26	3.21	B

* = letras iguales no son estadísticamente diferentes

Anexo 17. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable longitud de brotes del segundo subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio (mm)	Duncan *
M.S.+ 0.5 AIB + 0.5 mg/L BAP	17.63	A
M.S.+ 0.5 AIB + 1 mg/L BAP	15.46	B
M.S.+ 0.5 AIB + 1.5 mg/L BAP	12.96	C

** = letras iguales no son estadísticamente diferentes*

Anexo 18. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de brotes del tercer subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio	Promedio $\sqrt{x+1}$	Duncan *
M.S.+ 0.5 AIB + 1 mg/L BAP	11.06	3.27	A
M.S.+ 0.5 AIB + 0.5 mg/L BAP	10.26	3.05	A
M.S.+ 0.5 AIB + 1.5 mg/L BAP	4.46	2.00	B

** = letras iguales no son estadísticamente diferentes*

Anexo 19. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable longitud de brotes del tercer subcultivo.

Medios de Cultivo	Promedio (mm)	Duncan *
M.S.+ 0.5 AIB + 0.5 mg/L BAP	17.66	A
M.S.+ 0.5 AIB + 1 mg/L BAP	12.20	B
M.S.+ 0.5 AIB + 1.5 mg/LBAP	11.10	B

** = letras iguales no son estadísticamente diferentes*

FASE DE ENRAIZAMIENTO

Anexo 20. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable crecimiento relativo.

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio transformado Log(logx +10)	Duncan *
75% M.S.	2.97	0.93	A
50% M.S.	1.86	0.89	B
25% M.S.	1.56	0.89	B

** = letras iguales no son estadísticamente diferentes*

Anexo 21. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable número de raíces.

Medios de Cultivo	Promedio original	Promedio transformado Log(logx +10)	Duncan *
75% M.S.	6.40	1.02	A
50% M.S.	6.23	1.01	A
25% M.S.	4.36	0.96	B

** = letras iguales no son estadísticamente diferentes*

Anexo 22. Prueba de Duncan (0.05%) para el factor medios de cultivo en la variable porcentaje de explantes que forman raíces.

Medios de Cultivo	Promedio (%)	Duncan *
75% M.S.	100	A
50% M.S.	100	A
25% M.S.	86	B

** = letras iguales no son estadísticamente diferentes*

Anexo 23. Promedios en la materia seca del follaje (mg).

Variedades	Oso Grande	28,69
	Sweet Charlie	27,92
Medios de cultivo	25% M.S.	27,36
	50% M.S.	28,37
	75% M.S.	29,20
T1	Oso Grande*25% M.S.	26,38
T2	Oso Grande*50% M.S.	26,62
T3	Oso Grande*75% M.S.	30,78
T4	Sweet Charlie*25% M.S.	25,96
T5	Sweet Charlie*50% M.S.	28,34
T6	Sweet Charlie*75% M.S.	31,77

Anexo 24. Promedios en la materia seca de las raíces (mg).

Variedades	Oso Grande	7,80
	Sweet Charlie	7,73
Medios de cultivo	25% M.S.	6,84
	50% M.S.	7,95
	75% M.S.	8,63
T1	Oso Grande*25% M.S.	6,06
T2	Oso Grande*50% M.S.	8,58
T3	Oso Grande*75% M.S.	8,98
T4	Sweet Charlie*25% M.S.	6,20
T5	Sweet Charlie*50% M.S.	7,62
T6	Sweet Charlie*75% M.S.	8,67