

Establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa* var. Aroma a partir de yemas de corona

In vitro establishment of *Fragaria x ananassa* var. Aroma from crown buds

Javier J. Gonzales-Arteaga¹; Ladislao C. Romero-Rivas¹; Juan Rodríguez-Layza^{1, *};
Adelmo Párraga-Quintanilla¹

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

*Autor correspondiente: jrodriguezla@undac.edu.pe (J. Rodríguez Layza).

ID ORCID de los autores

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

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

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

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

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar un protocolo de desinfección y de establecimiento *in vitro*, de explantes de yemas de corona de fresa *Fragaria x ananassa* Var. Aroma, provenientes de Centro Poblado Menor Mallampampa, Huancabamba y del sector La Florida, distrito de Chontabamba, Oxapampa, Pasco, Perú, mediante un diseño en bloques completos al azar. Se utilizaron tres métodos de desinfección T1 (adaptado de Coba, 2009), T2 (adaptado Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004) y T3 (adaptado Mamani, 2005) y en el establecimiento fueron los tratamientos, t1 (MS+ BAP 0,5 mg l⁻¹ + ANA 0,5 mg l⁻¹), t2 (MS+BAP 0,5 mg l⁻¹ + ANA 0,3 mg l⁻¹ + AG₃ 0,2 mg l⁻¹), t3 (MS+BAP 0,5 mg l⁻¹ + AIA 0,6 mg l⁻¹), t4 (MS+BAP 0,5 mg l⁻¹ + AIA 0,5 mg l⁻¹ + AG₃ 0,3 mg l⁻¹) y t5 (MS sin reguladores). A los 36 días después de la inoculación (ddi), el mejor tratamiento en desinfección fue T3, por presentar menor contaminación por bacterias y menor fenolización y sin diferencias significativas en hongos y sobrevivencia de los explantes. El mejor medio de establecimiento fue t3, por presentar menor grado de fenolización, una mayor sobrevivencia, brotación y número de brotes y hojas.

Palabras clave: establecimiento; desinfección; yemas de corona; *in vitro*; micropropagación.

ABSTRACT

The objective of the research was to determine a protocol for disinfection and *in vitro* establishment of explants from strawberry crown buds *Fragaria x ananassa* Var. Aroma, from the Minor Town Center Mallampampa, Huancabamba and the La Florida sector, Chontabamba district, Oxapampa, Pasco, Peru, through a randomized complete block design. Three disinfection methods were used T1 (adapted from Coba, 2009), T2 (adapted from Sánchez-Cuevas and Salaverría, 2004) and T3 (adapted from Mamani, 2005) and in the establishment were the treatments, t1 (MS+ BAP 0.5 mg l⁻¹ + NAA 0.5 mg l⁻¹), t2 (MS+BAP 0.5 mg l⁻¹ + NAA 0.3 mg l⁻¹ + GA3 0.2 mg l⁻¹), t3 (MS+BAP 0.5 mg l⁻¹ + IAA 0.6 mg l⁻¹), t4 (MS+BAP 0.5 mg l⁻¹ + IAA 0.5 mg l⁻¹ + GA3 0.3 mg l⁻¹) and t5 (MS without regulators). At 36 days after inoculation (dai), the best disinfection treatment was T3, because it presented less contamination by bacteria and less phenolization and without significant differences in fungi and explant survival. The best establishment medium was t3, for present a lower degree of phenolization, greater survival, sprouting and number of shoots and leaves.

Keywords: establishment; disinfection; crown buds; *in vitro*; micropropagation.

Recibido: 23-08-2022.

Aceptado: 06-12-2022.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

La fresa *Fragaria x ananassa* Duch., es un cultivo que se establece a partir de plantines que provienen de yemas de estolones, cuyo rendimiento disminuye con facilidad; una alternativa es el cultivo *in vitro* (Pillco-Tancara & Quezada-Portugal, 2017), es rápida, eficiente y libre de enfermedades (Bonilla et al., 2015); asimismo, *Fragaria x ananassa* Duch. considerada híbrida interespecífica con características entre *F. chiloensis* y *F. virginiana*, con “rizomas muy ramificados y sin estolones o con éstos muy cortos” (Muñoz & Navarro, 1998); sus semillas no son viables; sin embargo, tiene “un sistema de crecimiento y formación de coronas y estolones que permite una propagación vegetativa rápida y segura” (Kessel, 2012); de rizoma cilíndrico muy corto, denominado corona, contiene las yemas, base del crecimiento de la planta (MINAGRI, 2008); se dispone de variedades que se consumen como fruta fresca o procesada, tiene alto contenido de vitamina C que va de 36,42 a 45,87 mg 100 g⁻¹ de fruta en cv. Selva (Mena et al., 2017); y en la variedad Camino Real el contenido de antocianinas es de 5,9 mg l⁻¹ (Cárdenas-Navarro et al., 2019), en Camarosa entre 45,64 a 92,83 y en Osogrande de 30,43 a 48,95 en mg equivalentes de Cianidin-3-glucósido 100 g⁻¹ (Carvajal de Pabón et al., 2012). Para la desinfección de explantes, la combinación de etanol al 70% e hipoclorito de sodio, permite niveles de contaminación inferiores; y al incrementar la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición, el número de explantes contaminados disminuye; pero, incrementa la cantidad de explantes no viables (Bedoya-Perez et al., 2016); que produce grandes pérdidas en el cultivo *in vitro*, hasta un 90% (Aguirre et al., 2016). En la micropropagación, la elección de las plantas madres donadoras de explantes es muy importante, éstas no deben mostrar síntomas de enfermedades y presentar características fenotípicas de las variedades correspondientes (Mamani-Sánchez & Murillo-García, 2020), se recomienda que provengan de un ambiente controlado para disminuir agentes contaminantes en el establecimiento *in vitro*, no obstante también depende del tipo de explante. El establecimiento *in vitro* de fresa cv. Aroma, a partir de brotes apicales con una combinación de 0,25 mg l⁻¹ de bencil aminopurina (BAP) más 0,30 mg l⁻¹ de ácido giberélico (GA) y 0,60 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (IBA) fue posible un 70% de tejido vegetativo con viabilidad, previamente tratada con una solución antioxidante 150 mg l⁻¹ de ácido ascórbico e inmersión en etanol al 70% por 30 segundos y en solución de hipoclorito de sodio comercial y agua destilada (1:6) por 10 minutos (Ruíz et al., 2018). Se ha logrado un buen establecimiento *in vitro* de las variedades de fresa Portola, Albión y Camino Real en el medio Murashige y Skoog (MS) + 0,5 mg l⁻¹ por una rápida brotación y contaminación baja (Félix-Hernández et al., 2017).

En estolones de las variedades, San Andrés, Camino Real y Festival, se desinfectó en hipoclorito de sodio comercial (30%), luego en alcohol etílico (30%), ambos durante 5 minutos, donde se presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia en San Andrés y Festival; asimismo, el medio MS con 1,25 mg l⁻¹ de BAP y 1 mg l⁻¹ de ácido indolacético (AIA) permitió mejores resultados en establecimiento de las tres variedades y la mejor respuesta de sobrevivencia fue en la variedad Camino Real en medio MS modificado + 1 mg l⁻¹ de kinetina (Jiménez & Alvarado, 2014).

La contaminación (por hongos y bacterias) y la fenolización, es común en la introducción *in vitro* de muchas especies vegetales; por tanto, es importante evitarlo mediante el tratamiento de los explantes con desinfectantes y antioxidantes, respectivamente, la eficiencia de éstas va a depender de la concentración y tiempo de exposición (Sanchez-Cuevas & Salaverría, 2004); además, el establecimiento *in vitro* puede variar dependiendo del origen del material biológico, estado de desarrollo, edad ontogénica, y tamaño del explante (Mroginski & Roca, 1991).

En la introducción *in vitro* de segmentos foliares de dos grados de maduración diferentes de las variedades de fresa, Oso Grande y Sweet Charlie, en medios de cultivo suplementados con tiazuron y ácido indolbutírico, se determinó en aquellas que procedían de tejido juvenil y en la combinación de 0,002 mg l⁻¹ y 0,2 mg l⁻¹ de tiazuron e IBA, respectivamente (Pillco-Tancara & Quezada-Portugal, 2017). En la inducción de respuestas morfogénicas de *Acourtia cordata* a partir de plántulas germinadas *in vitro*, en MS, sacarosa y agar de 30 y 4 g l⁻¹ + auxinas y citocininas a 5 y 0,5 mg l⁻¹, se detectó 0,2% de contaminación y sin explantes en estado de oxidación (Gómez-Serrano et al., 2010).

Durante la propagación *in vitro*, uno de los problemas a enfrentar es el establecimiento, debido al proceso de oxidación de los explantes, que causa un oscurecimiento del tejido, en especial en las especies leñosas (Azofeifa-Delgado, 2009), que se produce en todos los tejidos frente a un estrés abiótico, como un sistema de defensa del explante (Hernández & González, 2010); otro es, la contaminación por hongos, que depende del tipo de desinfectante que se utilice; así, al utilizar hipoclorito de sodio, éste no controló comparado al bicloruro de mercurio donde su porcentaje fue menor y depende de la concentración y el tiempo de exposición (García et al., 2015), una forma de reducir la contaminación por hongos, es la aplicación de fungicidas a las plantas donadoras (Bogado et al., 2016); asimismo, se tiene que ver la composición del medio, la especie, condiciones ambientales y los reguladores de crecimiento (Twaij et al., 2020).

Uno de los grandes problemas que se enfrenta el cultivo de fresa, es que las plantas obtenidas mediante el sistema convencional son muy

propensas a enfermedades (Dutta & Sen, 2019), de modo que para un alto rendimiento, se requiere contar con semilla que garantice la producción; la que se puede lograr mediante el cultivo in vitro (Mir et al., 2019), que permite tener la variedad o cultivar libre de patógenos en especial virus, al mismo tiempo, una menor aplicación de pesticidas; por el otro lado, obtener individuos con cierta homogeneidad, consecuencia de una propagación asexual. En este contexto, el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional

Daniel Alcides Carrión (Undac), Filial Oxapampa, requiere contar con protocolos desarrollados para cada fase que implica el cultivo in vitro de fresa.

El objetivo de la presente investigación fue determinar un protocolo de desinfección y establecimiento in vitro de yemas de corona de fresa *Fragaria x ananassa* Var. Aroma, procedentes del Centro Poblado Menor (CPM) Mallampampa, distrito de Huancabamba y del sector la Florida, Chontabamba, provincia de Oxapampa, región Pasco, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, filial Oxapampa, Carretera Central s/n, km 3.5, Barrio Miraflores, distrito y provincia de Oxapampa, región Pasco, Perú.

El material para establecer el método de desinfección fueron yemas extraídas de las coronas de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch. Var. Aroma) de un cultivo de 4 meses de edad, procedentes del CPM Mallampampa, distrito de Huancabamba, provincia de Oxapampa, región Pasco. UTM 10.517245 LS y 75.447462 LO a una altitud de 2014 msnm, (GPS Garmin Monterra) las cuales fueron trasladadas debidamente codificadas, a las instalaciones de la Undac, filial Oxapampa, donde se retiró el sustrato y se introdujeron en una bolsa de polipropileno y llevadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal. En el laboratorio, las plantas fueron lavadas con agua corriente de caño, a fin de retirar los restos de sustrato, defoliadas y lavado de coronas, Anexo, Figuras 1, 2 y 3; luego, las coronas fueron colocadas en un vaso de precipitado de 1000 ml para ser lavadas nuevamente en agua corriente. La desinfección se realizó utilizando tres métodos: T1, adaptado de Coba 2009 (Coba, 2009); T2, adaptado de Sánchez-Cuevas & Salaverría, 2004 (Sánchez-Cuevas & Salaverría, 2004); T3, adaptado de Mamani, 2005 (Mamani-Sánchez, 2005), Tabla 1, luego las yemas de corona fueron sembradas en 10 ml de medio de cultivo sólido MS (de sales y vitaminas), con 0,5 mg l⁻¹ de BAP + 0,5 mg l⁻¹ de

ANA + 30 g l⁻¹ de sucrosa y 9 g l⁻¹ de agar, y el pH ajustado a 5,6; esterilizado en autoclave a 121 °C y 0,1 MPa durante 20 minutos.

El material biológico para el establecimiento in vitro, fueron yemas de corona de fresa *Fragaria ananassa* Duch. Var. Aroma, extraídas de plantas de 7 meses de edad, del sector La Florida, distrito de Chontabamba, provincia de Oxapampa, región Pasco y trasladadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal, donde se retiró los residuos de sustrato mediante lavado con agua corriente de caño, posteriormente fueron defoliadas y colocadas en un vaso de precipitados de 1000 ml para un segundo lavado, posteriormente fueron desinfectadas con el mejor método establecido, T3 (Tabla 1); seguido, con la ayuda de un estereoscopio ACCU-SCOPE, pinzas y hojas de bisturí N° 11, se extrajeron las yemas de corona y se sembraron en cinco medios (tratamientos): t1 (MS + BAP, 0,5 mg l⁻¹ + ANA, 0,5 mg l⁻¹), t2 (MS + BAP, 0,5 mg l⁻¹ + ANA, 0,3 mg l⁻¹ + AG₃, 0,2 mg l⁻¹), t3 (MS + BAP, 0,5 mg l⁻¹ + AIA, 0,6 mg l⁻¹), t4 (MS + BAP, 0,5 mg l⁻¹ + AIA, 0,5 mg l⁻¹ + AG₃, 0,3 mg l⁻¹) y t5 (MS sin reguladores) en 10 ml de cada uno. A todos los medios se agregaron 30 g l⁻¹ de sucrosa, 9 g l⁻¹ de agar, el pH se ajustó a 5,6 y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 0,1 MPa por 20 min. Después de la siembra de las yemas de corona en los medios de cultivo respectivo en la etapa de desinfección como de establecimiento fueron incubadas a 20 °C, 77,98 μmol m⁻² s⁻² de luminosidad, 60% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz.

Tabla 1

Tratamientos en el proceso de desinfección de yemas de corona de fresa

Proceso	T1 (adaptado de Coba, 2009)	T2 (adaptado de Sánchez-Cuevas & Salaverría, 2004)	T3 (adaptado de Mamani, 2005)
Lavado	Tres veces con 4 g l ⁻¹ de detergente en agitación por 6 minutos	Tres veces con jabón líquido antibacterial 15 ml l ⁻¹ durante 5 minutos	Una vez con jabón líquido antibacterial 15 ml l ⁻¹ , durante 5 minutos
Enjuague	Una vez en agua destilada en agitación	---	Seis veces en agua destilada en agitación
Inmersión	En etanol 70% por 1 minuto, en cámara de flujo laminar	En etanol 70% por 10 segundos, en cámara de flujo laminar	En etanol 70% por 1 minuto, en cámara de flujo laminar
Inmersión	En hipoclorito de sodio al 0,93% más 5 gotas de Tween 20, por 20 minutos	En hipoclorito de sodio al 0,93% más 1 gota de Tween 20 /100 ml, por 20 minutos	En hipoclorito de sodio al 2,00% más 20 gotas l ⁻¹ de Tween 20, por 25 minutos
Lavado con agua estéril en 300 mg l ⁻¹ de ácido ascórbico y 100 mg l ⁻¹ ácido cítrico	En la cámara de flujo laminar, 3 enjuagues, 10 minutos	En la cámara de flujo laminar, 3 enjuagues, 10 minutos	En la cámara de flujo laminar, 3 enjuagues, 10 minutos

Para la desinfección y establecimiento, se utilizó el DBCA, (Steel & Torrie, 1985), 3 métodos de desinfección (tratamientos), y 4 repeticiones; mientras que, en el establecimiento in vitro, los tratamientos fueron 5 medios de cultivo y 3 repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida de 5 yemas de corona, una en cada frasco de 20 ml, con 10 ml de medio.

Las lecturas de las variables en el proceso de desinfección fueron realizadas a los 6, 11, 14, 27 y 36 días después de la inoculación (ddi), se consideró el número de explantes con presencia de micelios de hongos y colonias de bacterias; la fenolización, fue número de explantes con más del 50% de tejido que

cambió de verde a marrón oscuro y la sobrevivencia, los que mantuvieron el tejido de color verde natural; mientras que, en la fase de establecimiento, además de las mencionadas fueron brotación, número de brotes y número de hojas por microplanta. Las lecturas fueron realizadas a los 11, 17, 24 y 32 ddi.

Los datos fueron procesados con el software estadístico R v4.0.4, mediante el análisis de variancia (Anova) para encontrar significancia entre los tratamientos y prueba de comparación múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) que sirvió para determinar el mejor método de desinfección, y el mejor medio para el establecimiento de yemas de corona. Los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada de $X+1$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección

El Anova, muestra diferencias significativas para tratamientos (métodos de desinfección) en yemas de corona a los 14 y 36 ddi y altamente significativas a los 27 ddi para bacterias; mientras que, en las variables hongos, fenolización y sobrevivencia no hubo diferencias significativas, Tabla 2. La prueba de comparación múltiple de Duncan, $\alpha = 0,05$, Tabla 3, muestra que, la sobrevivencia a los 14 ddi, T1 fue estadísticamente superior e igual a T3, y en fenolización T2 fue superior e igual a T3; mientras que, en contaminación con bacterias T2 y T3 fueron superiores a T1, sin diferencias entre éstos, y en hongos no se presentó diferencias. A los 27 ddi en bacterias T3 fue superior a T1 y T2; sin embargo, en hongos, fenolización y sobrevivencia no se encontró diferencias significativas; por otro lado, a los 36 ddi, T3 fue superior a T1 e igual a T2 en bacterias y fenolización, y no hubo diferencia en hongos y sobrevivencia. Al respecto se reporta que, en estolones de fresa de cv. Chandler, el uso de $HgCl_2$ a 0,1%, por dos minutos se obtuvo una supervivencia de

70,78% con una contaminación del 35,41%, previamente sumergido en etanol al 70% por dos minutos (Kumar et al., 2020); esto demostraría que la contaminación y la supervivencia de los explantes está en función del tipo, tiempo de exposición y la concentración de los desinfectantes utilizados, considerando que se utilizó yemas de corona de fresa var. Aroma.

En cuanto a la sobrevivencia de los explantes a los 14 ddi, donde T1 fue superior a T2 e igual a T3; pero en el resto de las evaluaciones no hubo diferencias entre estos tratamientos, esto se debería que hubo explantes que se recuperaron de la fenolización. Referente a esto, la esterilización de explantes de fresa, "Osogrande" y "Toro", con NaClO 0,5% por 15 minutos, se obtuvo una supervivencia de 75%, similar a cv Chandler en NaClO al 1% por 10 minutos y en "Islamabad" al 2,5% NaClO por 5 minutos con una fenolización del 75% de los meristemos a esta última concentración y disminuyó cuando se bajó la concentración a 0,5% en "Osogrande", "Toro" y "Chandler", por 10 minutos (Munir et al., 2015).

Tabla 2

Cuadrados medios, coeficiente de variación (CV) y valores descriptivos de tres métodos de desinfección

ddi	Fuente de variación	gl	Hongos	Bacterias	Fenolización	Sobrevivencia
6	Bloques	3	0,0100ns	0,0148ns	0,0198ns	0,0105ns
	Tratamientos	2	0,0011ns	0,0196ns	0,0216ns	0,0173ns
	CV%		9,955	11,375	9,912	9,548
	Promedio		0,794	1,093	0,985	1,071
	Mínimo		0,707	0,866	0,816	0,949
	Máximo		0,913	1,225	1,225	1,225
11	Bloques	3	0,0159ns	0,0159ns	0,0097ns	0,0008ns
	Tratamientos	2	0,0089ns	0,0089ns	0,0037ns	0,0057ns
	CV%		10,435	10,435	8,253	11,898
	Promedio		0,808	1,077	1,057	1,030
	Mínimo		0,707	0,866	0,913	0,837
	Máximo		1,000	1,225	1,225	1,140
14	Bloques	3	0,0202ns	0,0022ns	0,0049ns	0,0049ns
	Tratamientos	2	0,0052ns	0,0571*	0,0219ns	0,0219ns
	CV%		12,484	8,649	7,263	7,263
	Promedio		0,815	1,087	1,074	1,008
	Mínimo		0,707	0,866	0,949	0,837
	Máximo		1,000	1,225	1,225	1,225
27	Bloques	3	0,0202ns	0,0029ns	0,0183*	0,0043ns
	Tratamientos	2	0,0052ns	0,0568**	0,0096ns	0,0260ns
	CV%		12,484	6,341	5,230	13,563
	Promedio		0,815	1,090	1,060	0,980
	Mínimo		0,707	0,866	0,866	0,816
	Máximo		1,000	1,225	1,225	1,140
36	Bloques	3	0,0202ns	0,0004ns	0,0206ns	0,0016ns
	Tratamientos	2	0,0052ns	0,0408*	0,0246ns	0,0113ns
	CV%		12,484	8,043	7,718	12,615
	Promedio		0,815	1,070	1,064	0,982
	Mínimo		0,707	0,866	0,866	0,837
	Máximo		1,000	1,225	1,225	1,140

gl. grados de libertad; **, Significativo al 1%; *, Significativo al 5%; ns. No significativo.

Tabla 3
Comparación múltiple de Duncan, $\alpha = 0,05$, de tres métodos de desinfección

ddi	Tratamiento	Hongos	Bacterias	Fenolización	Sobrevivencia
6	t1	0,79a	1,17a	0,90a	1,08a
	t2	0,81a	1,04a	1,00a	1,00a
	t3	0,80a	1,07a	1,05a	1,13a
11	t1	0,76a	0,76a	1,09a	0,99a
	t2	0,81a	0,81a	1,03a	1,05a
	t3	0,85a	0,85a	1,05a	1,05a
14	t1	0,78a	1,22a	1,15a	1,15a
	t2	0,81a	1,02 b	1,00 b	1,00 b
	t3	0,85a	1,01 b	1,08ab	1,08ab
27	t1	0,78a	1,20a	1,11a	0,89a
	t2	0,81a	1,10a	1,05a	1,00a
	t3	0,85a	0,96 b	1,01a	1,05a
36	t1	0,78a	1,17a	1,15a	0,92a
	t2	0,81a	1,08ab	1,05ab	0,99a
	t3	0,85a	0,96 b	0,99 b	1,03a

Los promedios en columna, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Se debe tener en cuenta que, al aumentar la concentración de cloro y el tiempo de exposición el proceso de supervivencia se afecta de manera significativa (Sanchez-Cuevas & Salaverría, 2004), en estudios de interacción se obtuvo que la asepsia es máxima (78,33%) cuando las yemas apicales se tratan con NaClO al 1,5% más etanol a 70% por medio minuto (Jan et al., 2013) y en "Islamabad" al 2,5% NaClO por 5 minutos con una fenolización del 20% de los meristemas a esta concentración y resultó similar cuando se bajó la concentración a 0,5% en "Osogrande" y "Chandler", por 10 minutos (Munir et al., 2015). Por otro lado, cuando las yemas apicales se tratan con NaClO al 1,5% por 20 minutos, más etanol a 70% por medio minuto, pero se presentó mayor necrosis (58,32%) (Jan et al., 2013). Por ello, los resultados de fenolización a los 14 ddi, t2 fue superior a t1 e igual a t3, esto se debería a la interacción entre el menor tiempo de exposición al etanol al 70% y la concentración de NaClO; pero, a los 36 ddi, la mejor respuesta de t3 a la fenolización, indicaría que la combinación de sustancias durante la desinfección puede provocar menor fenolización; debido a una mejor eficiencia de la enzima superóxido dismutasa para convertir el O_2^- a peróxido de hidrógeno que es el sustrato de la catalasa y tener como producto final agua (Thanh-Tam et al., 2020).

Establecimiento

El Anova (Tabla 4) muestra diferencias significativas para tratamientos (medios de cultivo in vitro) de yemas de corona de fresa var. Aroma en la variable brotación y altamente significativas en fenolización a los 11 ddi; sin embargo, a los 17 ddi fue altamente significativa en número de hojas y no significativa para el resto de variables; a los 24 ddi hubo diferencias significativas en número de brotes y hojas; pero, altamente significativa a los 32 ddi para estas mismas variables. La prueba de comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, Tabla 5, muestra que a los 11 ddi, el t3 fue el menos contaminado por bacterias, y en fenolización el t2 fue superior comparado al resto de tratamientos;

sin embargo, en brotación los mejores tratamientos fueron t2 y t3 frente a los demás. A los 17 ddi, los mejores medios de cultivo en fenolización fueron t2, t3 y t5, y en las variables brotación y número de hojas fue t3, comparado al resto de tratamientos; mientras que, a los 24 ddi, t3 fue superior al resto de tratamientos en las variables evaluadas, excepto en contaminación por hongos y bacterias que no mostraron diferencias entre los tratamientos; sin embargo, a los 32 ddi, t3 tuvo igual comportamiento que a los 24 ddi, excepto en supervivencia que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Estos resultados de las combinaciones de los reguladores de crecimiento en el establecimiento in vitro de yemas de corona de fresa Var. Aroma en que destacó el tratamiento t3, concuerda con un trabajo realizado donde se probaron diferentes combinaciones de BAP, ANA y AG_3 y resultó la mejor combinación de BAP, 0,2 mg l⁻¹ + ANA, 0,2 mg l⁻¹ + 1 mg l⁻¹ de sulfato de adenina (Jhajhra et al., 2018), esto confirma la sinergia entre citoquinina y auxina, con la diferencia en la auxina que se ha utilizado AIA en vez de ANA y una mayor concentración de BAP; asimismo, en el establecimiento in vitro de los cultivares "Dulce Charly" y "Amanecer de Invierno" con el medio MS + BAP 5 mg l⁻¹ + kinetina 0,1 mg l⁻¹ + 0,7 g l⁻¹ ácido ascórbico + 10 mg l⁻¹ sulfato de adenina, azúcar de mesa al 4%, se logró un número de brotes de 4 a 5 por explante en el tiempo de un mes (Dhukate et al., 2021); esto indica que establecer un medio de cultivo in vitro para fresa, Var. Aroma, es hacer variar los reguladores y las concentraciones de éstos, en tal punto que se mantenga un equilibrio que favorezca el establecimiento del explante, considerada como la fase crítica en el cultivo de tejidos.

En cuanto a la fenolización, resultó ser mejor el t3 e igual a t2, t4 y t5. Esto evidenciaría que esta variable es sensible a la concentración de sales del MS y las combinaciones de los reguladores de crecimiento.

Tabla 4Cuadrados medios, coeficiente de variación (CV) y valores descriptivos de cinco medios de cultivo en establecimiento de microesquejes de *Fragaria x ananassa* Var. Aroma

ddi	Fuente de variación	gl	Hongos	Bacterias	Fenolización	Sobrevivencia	Brotación	Nº brotes	Nº hojas
11	Bloques	2	0,0008ns	0,0429*	0,0030ns	0,0092ns	0,0123ns	0,0194ns	0,0000ns
	Tratamientos	4	0,0086ns	0,0135ns	0,0117**	0,0009ns	0,0177*	0,0220ns	0,0037ns
	CV%		8,162	5,822	4,093	5,562	5,461	7,858	4,706
	Promedio		1,038	1,213	1,255	1,365	1,228	1,266	1,024
	Mínimo		1,000	1,000	1,118	1,225	1,118	1,118	1,000
	Máximo		1,225	1,414	1,414	1,414	1,414	1,500	1,118
17	Bloques	2	0,0008ns	0,0185ns	0,0047ns	0,0123ns	0,0044ns	0,0164ns	0,0009ns
	Tratamientos	4	0,0086ns	0,0108ns	0,0129ns	0,0079ns	0,0144ns	0,0389ns	0,0443**
	CV%		8,162	7,707	4,973	5,001	6,512	9,791	6,983
	Promedio		1,038	1,261	1,256	1,289	1,235	1,302	1,104
	Mínimo		1,000	1,118	1,118	1,118	1,118	1,118	1,000
	Máximo		1,225	1,414	1,414	1,414	1,414	1,658	1,323
24	Bloques	2	0,0008ns	0,0256ns	0,044ns	0,0174*	0,0173ns	0,0116ns	0,0147ns
	Tratamientos	4	0,0086ns	0,0051ns	0,0122ns	0,0068ns	0,0147ns	0,0373*	0,0354*
	CV%		8,162	11,114	6,744	4,722	6,316	7,115	7,792
	Promedio		1,038	1,255	1,241	1,282	1,207	1,252	1,141
	Mínimo		1,000	1,118	1,000	1,118	1,118	1,118	1,000
	Máximo		1,225	1,414	1,414	1,414	1,414	1,500	1,414
32	Bloques	2	0,0008ns	0,0116ns	0,0151ns	0,0131ns	0,0442*	0,0036ns	0,0228ns
	Tratamientos	4	0,0086ns	0,0041ns	0,0220ns	0,0080ns	0,0163ns	0,2839**	0,3389**
	CV%		8,162	8,637	6,508	6,171	6,214	12,597	7,143
	Promedio		1,038	1,260	1,240	1,208	1,227	1,451	1,336
	Mínimo		1,000	1,118	1,000	1,118	1,000	1,000	1,000
	Máximo		1,225	1,414	1,414	1,323	1,414	2,062	2,000

gl. grados de libertad; **. Significativo al 1%; *. Significativo al 5%; ns. No significativo.

Al respecto, en cv Chandler, para controlar la exudación fenólica se utilizó 300 g l⁻¹ de ácido cítrico, donde disminuyó a cero, pero no favoreció la supervivencia de los explantes y por ende la proliferación de brotes; pero, la proliferación de brotes fue favorecida, cuando el medio MS fue

suplementado con 200 a 300 g l⁻¹ de carbón activado (Mir et al., 2019); sin embargo, en el presente trabajo se utilizó 300 mg l⁻¹ de Ácido Ascórbico y 100 mg l⁻¹ Ácido Cítrico, por un tiempo de inmersión de 10 minutos, en el proceso de la desinfección.

Tabla 5Comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, de cinco medios de cultivo en establecimiento in vitro

ddi	Tratamiento	hongos	bacterias	fenolización	sobrevivencia	brotación	Nº de brotes	Nº de hojas
11	t1	1,11a	1,29a	1,32a	1,35a	1,15 b	1,25a	1,04a
	t2	1,00a	1,19ab	1,15 c	1,38a	1,32a	1,35a	1,00a
	t3	1,00a	1,11 b	1,19 bc	1,38a	1,29a	1,35a	1,08a
	t4	1,00a	1,22ab	1,35a	1,35a	1,15 b	1,15a	1,00a
	t5	1,07a	1,25ab	1,26ab	1,35a	1,22ab	1,22a	1,00a
17	t1	1,11a	1,29a	1,35a	1,29a	1,15 b	1,22a	1,15ab
	t2	1,00a	1,28a	1,22 b	1,26a	1,29ab	1,38a	1,00 b
	t3	1,00a	1,15a	1,19 b	1,35a	1,32a	1,46a	1,29a
	t4	1,00a	1,29a	1,29ab	1,32a	1,19ab	1,22a	1,00 b
	t5	1,07a	1,28a	1,22 b	1,22a	1,22ab	1,22a	1,08 b
24	t1	1,11a	1,29a	1,32a	1,29ab	1,12 b	1,15 b	1,15ab
	t2	1,00a	1,25a	1,22ab	1,26ab	1,26ab	1,32ab	1,04 b
	t3	1,00a	1,19a	1,15 b	1,35a	1,28a	1,41a	1,32a
	t4	1,00a	1,26a	1,26ab	1,29ab	1,15ab	1,15 b	1,08 b
	t5	1,07a	1,28a	1,25ab	1,22 b	1,22ab	1,22 b	1,11 b
32	t1	1,11a	1,29a	1,35a	1,15a	1,12 b	1,24 b	1,11 c
	t2	1,00a	1,28a	1,22ab	1,22a	1,26ab	1,41 b	1,15 c
	t3	1,00a	1,22a	1,11 b	1,29a	1,32a	1,98a	1,91a
	t4	1,00a	1,22a	1,26ab	1,19a	1,22ab	1,41 b	1,35 b
	t5	1,07a	1,28a	1,25ab	1,19a	1,22ab	1,22 b	1,15 c

CONCLUSIONES

De los tres protocolos de desinfección de yemas de corona de fresa, *Fragaria ananassa* var. Aroma, fue el tratamiento T3 (adaptado de Mamani, 2005), que tuvo como procedimiento lavado con solución de jabón líquido antibacterial 15 ml l⁻¹ durante 5 minutos, seguido con agua estéril seis veces e inmersión en etanol al 70% por un minuto e hipoclorito de sodio al 2% más Tween 20 gotas l⁻¹, durante 25 minutos, tres enjuagues con agua estéril y la mezcla de 300 mg l⁻¹ de ácido ascórbico y 100 mg l⁻¹ ácido cítrico por 10 min, en base a una menor contaminación por bacterias, menor fenolización y mayor número de explantes que sobreviven.

La mejor combinación de reguladores de crecimiento en el medio de establecimiento de yemas de corona de fresa Var. Aroma, fue el t3 (MS + BAP, 0,5 mg l⁻¹ + AIA, 0,6 mg l⁻¹), de los cinco medios de cultivo in vitro utilizados, por una menor respuesta de los explantes a la fenolización, mayor grado de sobrevivencia, brotación, número de brotes y hojas por explante. Este medio se requiere ser probado con otras variedades o cultivares de fresa con el fin de estandarizar un establecimiento in vitro de fresa.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Central de Investigación de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, por el financiamiento a través de Canon y Regalías

Mineras y a Marilyn C. Enciso Waller, Mayra Y. Monago Curi y Odalyz L. Zúñiga Salcedo que intervinieron como soporte técnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, G., Pierre, J., & Leigue, L. (2016). *Aplicaciones del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos*.
<https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%20Baudoin%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bedoya-Perez, J. C., Sánchez-Jaramillo, C. Y., Bermudez Gómez, S. M., & Ramirez-Restrepo, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo in vitro de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38-46.
- Bogado, F., Vera, C., Ayala, P., Sansberro, P., & Luna, C. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Revista de Investigaciones de La Facultad de Ciencias Agrarias - UNR*, 27(16), 011-016.
- Bonilla, M. M., Mancipe, C., & Aguirre, A. C. (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67-82.
- Cárdenas-Navarro, R., López-Pérez, L., & Lobit, P. (2019). Efecto de la época de aplicación del N y periodo de cosecha en la producción y calidad de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Agropecuaria*, 10(3), 337-345.
- Carvajal de Pabón, L. M., Yahia, E. H., Cartagena, R., Peláez, C., Gaviria, C. A., & Rojano, B. A. (2012). Capacidad antioxidante de dos variedades de *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne (fresa) sometida a variaciones en la nutrición vegetal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 37-53.
- Coba, M. alexandra. (2009). Rescate de *Fragaria chiloensis* var. Huachi especie de frutilla en peligro de extinción, a través de la técnica de cultivo in vitro utilizando meristemos de hojas [Escuela Politécnica del Ejercito]. In *Ingeniería En Biotecnología*.
- Dhukate, M. R., Kher, M. M., & Vadawale, A. V. (2021). Protocol for micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cv. 'Sweet Charlie' and 'Winter Dawn.' *Environmental and Experimental Biology*, 19(1), 1-6.
- Dutta, C., & Sen, D. (2019). Vitro Propagation in Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *Indian Journal of Hill Farming June, Special*, 77-81.
- Félix-Hernández, R., López-López, Y., & Alvarado-Rodríguez, M. (2017). Micropropagación de tres variedades de *Fragaria x ananassa* ("Portola", "Albió" y "Camino Real"). *Biotecnología y Sustentabilidad*, 2(1), 131-136.
- García, D. L., Mesa, N., & Ocampo, M. L. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84.
- Gómez-Serrano, G., Cristiani-Urbina, E., & Villegas-Garrido, T. L. (2010). Establecimiento de protocolos para la propagación in vitro de plantas de *Acourtia cordata* (Cerv.) Turner (Compositae), colectadas en la sierra de Guadalupe. *Polibotánica*, 30, 89-110.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento In Vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 58-69.
- Jan, A., Bhat, K. M., Bhat, S. J. A., Mir, M. A., Bhat, M. A., Wani, I. A., & Rather, J. A. (2013). Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for in vitro culture. *African Journal of Biotechnology*, 12(39), 5749-5753.
- Jhahra, S., Dashora, L. K., Singh, J., Bhatnagar, P., Kumar, A., & Arya, C. K. (2018). In-vitro Propagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), 3030-3035.
- Jiménez, J. I., & Alvarado, E. (2014). Evaluación de dos medios de cultivo en la micropropagación de fresa (*Fragaria X ananassa* DUCH). *Jóvenes En La Ciencia*, 1(1), 91-97.
- Kessel, A. (2012). Mejora Genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch), a través de metodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 34-41.
- Kumar, M., Rajbhar, Y. P., Kumar, V., Yadav, L., Kumar, J., Singh, B. P., & Yadav, A. (2020). Studies on the effect of different surface sterilization agents under in-vitro culture of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) variety "Chandler." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(6), 1833-1835.
- Mamani-Sánchez, B. (2005). Comportamiento in vitro de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo [Universidad Mayor de San Andrés].
- Mamani-Sánchez, B., & Murillo-García, R. A. (2020). Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69-78.
- Mena, L., Sarmiento, G., & Camargo, P. (2017). Impacto del abonamiento integral en el rendimiento y calidad de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Selva bajo sistema de riego por goteo y cobertura plástica. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 357-366.
- MINAGRI. (2008). Estudio de la fresa en el Perú y el Mundo. In *Dirección General de Información Agraria*. http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/estudio_fresa.pdf
- Mir, H., Rani, R., Ahmad, F., Sah, A. K., Prakash, S., & Kumar, V. (2019). Phenolic Exudation Control and Establishment of In vitro Strawberry (*Fragaria x Ananassa*) cv. Chandler. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 33(3), 1-5.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos

- de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. (p. 22).
- Munir, M., Iqbal, S., Baloch, J. U. D., & Khakwani, A. A. (2015). *In vitro explant sterilization and bud initiation studies of four strawberry cultivars*. 17(3), 192-198.
- Muñoz, F., & Navarro, C. (1998). *Flora ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Tomo VI*. Real Jardín Botánico, CSIC.
- Pillco-Tancara, H. C., & Quezada-Portugal, J. Á. N. (2017). Efecto del tiazuron y ácido indolbutírico en la propagación in vitro de dos variedades de fresa (Oso Grande y Sweet Charlie) a partir de secciones foliares. *J. Selva Andina Res. Soc.*, 8(1), 69-82.
- Ruíz, T., Adriano, J., Carrillo, T., Parra, R. Á., Ojeda, D. L., & Hernández, A. (2018). In vitro establishment of two cultivars released from strawberries: strawberry and raspberry. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(4), 799-812. [09342018000400799&lng=es&nrm=iso&tng=en%0Ahttp://Sanchez-Cuevas, M. C., & Salaverría, J. L. \(2004\). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa \(Fragaria X ananassa Duch.\). *Revista Científica UDO Agrícola*, 4\(1\), 21-26.](http://09342018000400799&lng=es&nrm=iso&tng=en%0Ahttp://Sanchez-Cuevas, M. C., & Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (Fragaria X ananassa Duch.). Revista Científica UDO Agrícola, 4(1), 21-26.)
- Steel, R., & Torrie, J. (1985). *Bioestadística: Principios y Procedimientos (2.a Ed.)*. (Bogotá, Co). Bogota, Colombia: McGraw-Hill.
- Thanh-Tam, H., Hosakatte, M., & So-Young, P. (2020). Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(216), 1-18.
- Twaij, B. M., Jazar, Z. H., & Hasan, M. N. (2020). Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. *International Journal of Plant Biology*, 11(1), 1-14.

Anexo



Figura 1. Lavado de residuos de sustrato en laboratorio de Biotecnología Vegetal



Figura 2. Defoliado de plantas de fresa Var. Aroma



Figura 3. Lavado de las coronas en agua de caño