

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

La frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch) es una de las especies frutícolas más cultivadas a nivel mundial debido a su alto valor económico, su atractivo comercial y sus propiedades nutricionales. Su fruto destaca por su elevado contenido de antioxidantes, vitamina C, antocianinas, fibra y compuestos bioactivos beneficiosos para la salud humana. Además, posee una gran versatilidad en su consumo tanto fresco como industrializado, lo que impulsa su demanda tanto en mercados locales como internacionales. (Sozzi, 2008).

La variedad San Andreas se posiciona como una de las más destacadas a nivel mundial. Fue desarrollada por la Universidad de California a finales de la década del 2000, a partir de cruces controlados para obtener un cultivar con alta productividad, buena resistencia a enfermedades y excelente calidad de fruto. Esta variedad es de día neutro, lo que significa que no depende del fotoperiodo para florecer, característica que permite múltiples cosechas al año, siendo ideal para regiones con climas templados como Tarija. (Shaw & Larson, 2008).

La variedad Camino Real es ampliamente reconocida por su alta productividad y calidad de fruto. Desarrollada por el programa de mejoramiento genético de la Universidad de California, esta variedad fue lanzada en 2001 como resultado de cruzamientos entre las selecciones Cal 89.230-7 y Cal 90.253-3. Se caracteriza por ser una planta de día corto, lo que significa que su floración está influenciada por la duración del día, siendo ideal para regiones con estaciones bien definidas, como Tarija. Los frutos de Camino Real son grandes, de color rojo intenso, con excelente sabor y firmeza, lo que los hace adecuados tanto para el mercado fresco como para la industria de procesamiento (Shaw & Larson, 2001).

La producción mundial de frutillas 2023-2025 ha mostrado un crecimiento sostenido, impulsado por la creciente demanda global y la expansión de áreas cultivadas. En 2023, la producción total alcanzó aproximadamente 10.5 millones de toneladas, con China liderando con más de 4.2 millones de toneladas, seguida por

Estados Unidos (1.25 millones), Egipto (731,145), Turquía (676,818) y México (641,552). España, aunque ha experimentado una ligera disminución en su producción, se mantiene como un productor destacado en Europa. Otros países como Rusia, Polonia, Brasil y Corea del Sur también figuran entre los principales productores, con volúmenes que oscilan entre 177,000 y 261,000 toneladas. Este crecimiento refleja no solo la adaptación a nuevas tecnologías agrícolas, sino también la respuesta a las preferencias cambiantes de los consumidores a nivel mundial.

En Bolivia, y en particular en el departamento de Tarija, el cultivo de frutilla ha cobrado importancia dentro del sector agrícola debido a las condiciones climáticas favorables de la región, que varían entre los 16 °C y 28 °C, y a la existencia de zonas agrícolas aptas para su producción. Sin embargo, uno de los principales retos en la producción de frutilla en la región es el acceso limitado a material genético sano, libre de patógenos, lo cual repercute directamente en el rendimiento y la calidad de los cultivos. (Weather Spark, 2024).

Frente a esta situación, el cultivo *in vitro* representa una herramienta biotecnológica eficaz para la propagación de plantas libres de enfermedades, permitiendo la conservación y renovación de germoplasma de manera segura y controlada. En este marco, la renovación del banco de germoplasma de la variedad San Andreas mediante técnicas de cultivo *in vitro* se vuelve una estrategia clave para preservar este material genético de alto valor, así como para garantizar su disponibilidad para futuras investigaciones y programas de mejoramiento vegetal. (Pierik, 1988)

El presente trabajo dirigido se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma "Juan Misael Saracho", en la ciudad de Tarija. La iniciativa busca establecer un banco actualizado, funcional y sostenible, que permita a mediano y largo plazo disponer de material vegetal de calidad, contribuyendo al fortalecimiento del sistema agrícola local y nacional.

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO DIRIGIDO

En el departamento de Tarija, la producción de frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) se ha convertido en una actividad agrícola importante para muchas comunidades rurales debido a su valor comercial y alta demanda en mercados locales y regionales. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta este cultivo es la limitada disponibilidad de material vegetal de calidad, lo cual repercute negativamente en el rendimiento, la sanidad y la vida útil del cultivo.

A esto se suma la ausencia de viveros especializados o programas formales de certificación de plantines de frutilla en la región, lo que genera una oferta informal y no regulada. Como consecuencia, los productores suelen recurrir a material propagado por estolones sin trazabilidad ni control sanitario, lo que incrementa la diseminación de enfermedades y la pérdida de uniformidad genética en los cultivares.

Asimismo, la falta de renovación del material genético conservado en el banco de germoplasma del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* ha puesto en riesgo su viabilidad y representatividad como recurso estratégico para programas de investigación, docencia y producción de plantas sanas. Esta situación compromete la calidad del material disponible y limita su utilidad en procesos de propagación, transferencia tecnológica y formación académica.

La variedad San Andreas, introducida en la región por su alta productividad y adaptabilidad a climas templados, ha mostrado buen comportamiento agronómico. No obstante, su propagación tradicional mediante estolones favorece la acumulación progresiva de enfermedades, especialmente de origen viral, bacteriano y fúngico, comprometiendo la sanidad del cultivo y disminuyendo la longevidad de las plantas.

Además de la variedad San Andreas, el banco de germoplasma también conserva la variedad Camino Real, otro cultivar de alto rendimiento y relevancia comercial. Camino Real es una variedad de día corto, reconocida por su adaptabilidad a diversos sistemas de cultivo y su resistencia a enfermedades como *Phytophthora cactorum* y *Verticillium dahliae*. Sin embargo, al igual que San Andreas, su

propagación convencional presenta limitaciones sanitarias, lo que justifica su inclusión en procesos de renovación mediante cultivo *in vitro*.

Frente a este panorama, se hace imprescindible implementar un proceso de renovación del banco de germoplasma de frutilla, centrado en las variedades San Andreas y Camino Real, utilizando técnicas de cultivo *in vitro* que permitan preservar su potencial genético, asegurar plantas libres de patógenos, y responder a la necesidad de contar con material vegetal certificado y tecnológicamente validado para los sistemas productivos locales.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DIRIGIDO

El departamento de Tarija enfrenta una serie de limitaciones técnicas en la producción de frutilla, entre ellas, la escasez de semilla certificada y material vegetal libre de patógenos. Esta situación ha provocado una creciente dependencia de plantines importados, los cuales elevan los costos de producción y presentan baja adaptación a las condiciones locales, además de riesgos asociados a enfermedades exógenas.

El cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos se presenta como una alternativa biotecnológica eficiente para la producción de plantas madre sanas, genéticamente homogéneas y de alto potencial productivo. Esta técnica permite la multiplicación masiva y el saneamiento del material vegetal, contribuyendo a la generación de semillas locales de calidad.

Actualmente, el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho” cuenta con un banco de germoplasma compuesto por especies agrícolas de relevancia como: papa (*Solanum tuberosum* L.), frutilla (*Fragaria* × *ananassa*), frambuesa (*Rubus idaeus*), duraznero (*Prunus persica* L.), así como ornamentales como rosas (*Rosa spp.*) y lisiantus (*Eustoma grandiflorum*). Sin embargo, dicho banco requiere ser renovado y fortalecido mediante técnicas actualizadas de micropropagación, que aseguren la conservación de los genotipos y la disponibilidad continua de plantas madre libres de enfermedades.

Esta propuesta permitirá no solo atender la demanda local de material vegetal de calidad, sino también fortalecer las capacidades del laboratorio para investigación, docencia y vinculación tecnológica, consolidando a la Universidad como un referente regional en biotecnología vegetal aplicada.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Renovar el banco de germoplasma de frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) mediante técnicas de cultivo *in vitro* en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la FCAyF, con la finalidad de conservar y disponer de material vegetal sano y representativo.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Obtener vitroplantas de frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var San Andreas y Camino Real) mediante cultivo de ápices meristemáticos.
- Multiplicar las vitroplantas obtenidas a través de subcultivos sucesivos en medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento.
- Registrar y organizar las accesiones regeneradas en el banco de germoplasma bajo condiciones controladas, garantizando su trazabilidad y conservación.
- Esbozo de propuesta, Categorización y control de calidad de plantines de Frutilla producidos *in vitro* en Tarija.

ENFOQUE DEL TRABAJO DIRIGIDO

El presente trabajo dirigido está enfocado en la aplicación de biotecnologías vegetales, específicamente el cultivo *in vitro*, para la obtención, multiplicación y conservación de vitroplantas de frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas y Camino Real). Se utilizarán técnicas de cultivo de ápices meristemáticos, con el fin de regenerar plantas libres de patógenos y genéticamente estables.

Este trabajo contribuirá a la renovación del banco de germoplasma del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *In vitro* de la FCAyF, garantizando un

suministro continuo de material vegetal de calidad de las variedades San Andreas y Camino Real. La producción de vitroplantas libres de patógenos permitirá no solo fortalecer las capacidades técnicas del laboratorio, sino también brindar a los productores locales acceso a plantas madre sanas, uniformes y de alto rendimiento.

Asimismo, se elaborará una propuesta técnica que permita categorizar y estandarizar la producción de plantines certificados, brindando una base para futuras acciones de transferencia tecnológica e implementación en viveros especializados.

El trabajo se orienta también a fortalecer las capacidades técnicas y científicas del laboratorio, al permitir la validación de protocolos aplicables en condiciones locales, promoviendo así el desarrollo agrícola sostenible y el acceso a tecnologías limpias y modernas para los productores de frutilla en Tarija.

ALCANCE DEL TRABAJO DIRIGIDO

El presente trabajo será desarrollado en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho”, en la ciudad de Tarija. El proyecto se centrará en las variedades de frutilla San Andreas y Camino Real, reconocidas por su alto valor comercial y su comportamiento favorable en condiciones de valle. Se prevé la obtención de al menos 10 clones por cada variedad, los cuales serán evaluados en cuanto a su tasa de multiplicación, viabilidad y sanidad, con el objetivo de incorporar líneas regeneradas al banco de germoplasma y fortalecer la disponibilidad de material vegetal de calidad para la región.

Las actividades comprenderán la obtención de vitroplantas a partir de ápices meristemáticos, su multiplicación mediante técnicas de micropropagación, la evaluación de parámetros de viabilidad y sanidad, así como la propuesta de un esquema de categorización para la producción de plantines certificados.

Este trabajo no contempla la evaluación en campo de los plantines obtenidos, ni el estudio comparativo con otras variedades. Tampoco se realizarán análisis moleculares, limitándose a métodos *in vitro* convencionales. Sin embargo, se dejará

como base metodológica para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en la producción de frutilla en Tarija y otras regiones del país.

CARACTERÍSTICAS DE LA INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZO EL TRABAJO DIRIGIDO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de “Fitopatología y cultivo *in vitro*” de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho”, ubicado en la ciudad de Tarija provincia cercado.

ANTECEDENTES

La formación profesional en la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales (FCAyF) de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho” (U.A.J.M.S.) está orientada a la integración de conocimientos teóricos, prácticos y de investigación, especialmente en las áreas de producción vegetal, manejo de recursos naturales, biotecnología y fitomejoramiento. Esta visión integral ha impulsado el fortalecimiento de las capacidades académicas, científicas y tecnológicas a través de la implementación de laboratorios especializados que permiten a los estudiantes y docentes vincularse con la realidad productiva y científica regional.

En ese marco, el Laboratorio de Fitopatología fue creado en junio de 1995 con el objetivo de proporcionar apoyo técnico y académico a las asignaturas relacionadas con sanidad vegetal, diagnóstico de enfermedades y control fitosanitario. Su implementación respondió a la necesidad de generar conocimiento aplicado en la prevención, detección y tratamiento de enfermedades que afectan los principales cultivos agrícolas del departamento de Tarija.

Posteriormente, considerando la creciente demanda de tecnologías de propagación vegetal y conservación de germoplasma, en julio de 1998 se iniciaron las gestiones para ampliar el laboratorio con una sección especializada en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, cuya puesta en funcionamiento se concretó en abril del año 2000. Desde entonces, el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* se ha convertido en una herramienta estratégica para el desarrollo de investigaciones relacionadas con la

micropropagación de especies hortofrutícolas, forestales y ornamentales, la conservación de material vegetal libre de patógenos, y la producción de plantas mejoradas mediante técnicas biotecnológicas.

Desde 1997, esta unidad fue reconocida como parte de la Red Universitaria de Laboratorios de Prestación de Servicios, con el propósito de fortalecer los vínculos entre la universidad y el sector productivo, a través de la oferta de servicios especializados como análisis fitopatológicos, ensayos de sanidad vegetal, producción de vitroplantas, asesoramiento técnico y apoyo a proyectos de tesis de grado.

En los últimos años, el laboratorio ha trabajado con especies de alto valor económico y social para la región, como la uva, el duraznero, el tomate y el orégano. Sin embargo, uno de los retos actuales es la renovación y fortalecimiento del banco de germoplasma de frutilla, una especie ampliamente cultivada en Tarija por su valor comercial, nutricional y demanda creciente. En particular, la variedad San Andreas, introducida por su alto rendimiento y adaptabilidad, requiere de un manejo cuidadoso del material genético para evitar la pérdida de vigor y la transmisión de enfermedades a través de la propagación convencional por estolones.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

Capítulo I: MARCO TEÓRICO

1.1.Origen

La frutilla o fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) tiene un origen relativamente reciente si se compara con otros cultivos agrícolas. Mientras los cereales comenzaron a domesticarse hace más de 10.000 años, las primeras frutillas fueron cultivadas hace unos 2.000 años en jardines de las civilizaciones griegas y romanas. Sin embargo, los registros históricos más claros sobre su cultivo en Europa datan del siglo XIV, cuando el rey Carlos V de Francia ordenó plantar más de 1.000 frutillas en los jardines del Louvre en París. En sus inicios, la especie que se cultivaba era *Fragaria vesca*, también conocida como la frutilla del bosque o fraise des bois, originaria de Europa. Esta variedad era pequeña, de aroma intenso, y se utilizaba tanto para el consumo fresco como para fines medicinales y cosméticos. Posteriormente, se incorporaron otras especies como *Fragaria moschata* (fresa almizclada), valorada por su sabor y aroma, y *Fragaria viridis*, utilizada principalmente como planta ornamental. La verdadera transformación genética de la frutilla ocurrió a partir del contacto entre el Viejo y el Nuevo Mundo. En el siglo XVI, los colonizadores europeos descubrieron en América del Norte la *Fragaria virginiana*, una especie de fruto pequeño, pero más resistente, que fue introducida en Europa a finales de 1500. Aunque su calidad no superaba a la *F. vesca*, su rusticidad la hacía valiosa para los agricultores europeos. (Grupo *Fragaria*, 2021)

El gran cambio se dio en el siglo XVIII con la llegada de *Fragaria chiloensis*, una especie nativa de la costa del Pacífico sudamericano (Chile y zonas de California). Esta frutilla, de frutos más grandes y de excelente sabor, fue llevada a Francia por el ingeniero Amédée-François Frézier en 1714. A partir de cruzamientos espontáneos entre *F. chiloensis* y *F. virginiana* en los jardines franceses, surgió una nueva especie híbrida: la actual *Fragaria x ananassa* Duchesne. (Grupo *Fragaria*, 2021)

Este híbrido combinaba las mejores características de sus progenitores: el gran tamaño de *F. chiloensis* y la rusticidad de *F. virginiana*, estableciendo así la base

genética de todas las frutillas comerciales modernas. El nombre "ananassa" hace referencia al aroma similar al de la piña (ananas) que poseían algunos de los primeros híbridos. El primer científico que documentó y describió este nuevo híbrido fue Antoine Nicolas Duchesne en 1766, quien publicó su obra *Histoire Naturelle des Fraisières*, donde propuso el nombre científico *Fragaria x ananassa* y describió las bases de su herencia genética, convirtiéndose en uno de los precursores de la genética vegetal moderna. (Grupo Fragaria, 2021)

1.2.Características de la frutilla

Fragaria × ananassa, comúnmente llamada frutilla o fresa, es una planta perenne herbácea de bajo crecimiento, estolonífera, perteneciente a la familia Rosaceae. Es un híbrido interespecífico originado del cruce entre *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*, desarrollado inicialmente en Europa en el siglo XVIII. La planta alcanza hasta 30 cm de altura y se extiende lateralmente mediante estolones que emiten raíces en los nudos, formando nuevas plántulas. Presenta hojas compuestas trifoliadas con márgenes aserrados, agrupadas en una roseta basal densa. Las flores, hermafroditas, blancas y pentapétalas, se disponen en inflorescencias tipo corimbo y florecen principalmente en primavera. El fruto es un receptáculo carnoso (falso fruto), cónico, de color rojo brillante al madurar, con aquenios visibles en la superficie. El sistema radicular es fasciculado, superficial, y requiere suelos sueltos y bien drenados. Las frutillas prefieren climas templados, aunque existen variedades adaptadas a zonas cálidas. Su reproducción es principalmente asexual mediante estolones, lo que permite la propagación clonal. Según la variedad, pueden ser plantas de día corto o día neutro, lo cual determina su comportamiento reproductivo. Esta especie es ampliamente cultivada a nivel mundial por su alta demanda en el mercado de frutas frescas, congeladas, mermeladas, repostería y cosmética natural, debido a sus propiedades organolépticas, nutricionales y funcionales. (Missouri Botanical Garden, s.f.)

1.3.Taxonomía de la frutilla

Reino: Vegetal

Phylum: Telemophytae

División: Tracheophytae

Sub división: Anthophyta

Clase: Angiospermae

Sub clase: Dicotyledoneae

Grado Evolutivo: Archichlamydeae

Grupo de Ordenes: Corolinos

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Sub familia: Rosoideae

Nombre científico: *Fragaria × ananassa* Duch

Nombre común: Frutilla

Fuente: (Herbario Universitario T.B., 2026)

1.4.Morfología y anatomía de la frutilla

1.4.1. Sistema Radicular

La frutilla posee un sistema radicular fasciculado, caracterizado por raíces adventicias que emergen desde la corona de la planta. Estas raíces son fibrosas, superficiales y se distribuyen en las capas superiores del suelo, generalmente entre los 15 y 30 cm de profundidad. Esta característica hace que la planta sea sensible a la sequía y requiera un manejo adecuado del riego y del suelo para asegurar un desarrollo óptimo. (Vilca, 2012).

1.4.2. Tallo (Corona)

El tallo de la frutilla, conocido como corona, es un eje corto y engrosado del cual emergen las hojas, raíces y estolones. La corona es una estructura perenne que acumula reservas y es esencial para la regeneración de la planta en ciclos sucesivos. Su crecimiento es influenciado por factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Mc Leod, C., Águila, K., & Cárcamo, J. (2020).

1.4.3. Hojas

Las hojas de la frutilla son trifoliadas, compuestas por tres folíolos dentados con pecíolos largos y pubescentes. Presentan una disposición alterna y emergen en espiral desde la corona. La superficie foliar está cubierta de tricomas que pueden influir en la tolerancia a plagas y enfermedades. Las hojas son fundamentales para la fotosíntesis y el crecimiento de la planta. (Mc Leod, C., Águila, K., & Cárcamo, J. 2020).

1.4.4. Estolones

Los estolones son tallos horizontales que se desarrollan a partir de la corona y se extienden sobre la superficie del suelo. En sus nudos, pueden formar nuevas plantas al enraizar, lo que permite la propagación vegetativa de la frutilla. Este mecanismo es aprovechado en la producción comercial para obtener plantines genéticamente idénticos a la planta madre. (Aunchayna Reilly, R. 2011).

1.4.5. Inflorescencia y Flor

La frutilla presenta inflorescencias tipo corimbo, con flores hermafroditas de simetría radial. Cada flor consta de cinco sépalos, cinco pétalos blancos, numerosos estambres y un receptáculo cónico que se desarrolla en el fruto. La floración es influenciada por el fotoperiodo y la temperatura, clasificándose las variedades en día corto, día largo y día neutro según su respuesta a la duración del día. (Villagrán, V. 2004).

1.4.6. Fruto

El fruto de la frutilla es un eterio, es decir, un fruto agregado que se desarrolla a partir del receptáculo floral engrosado y carnoso. Los verdaderos frutos son los aquenios, comúnmente conocidos como "semillas", que se encuentran en la superficie del receptáculo. El tamaño, forma y color del fruto varían según la variedad y las condiciones de cultivo. (Mieres, M. R.1997).

1.5. Biotecnología

La biotecnología incluye una amplia gama de tecnologías aplicadas a la agricultura, ganadería, silvicultura, pesca y acuicultura, y la agroindustria que se utilizan para diversos fines, como el mejoramiento genético de plantas y animales para aumentar sus rendimientos o eficiencia; caracterización y conservación de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura; diagnóstico de enfermedades de plantas y animales, desarrollo de vacunas o la producción de alimentos fermentados (FAO,2020).

1.6.Germoplasma vegetal y bancos de conservación *In vitro*

El germoplasma vegetal se define como el conjunto de recursos genéticos presentes en las plantas, que incluye tejidos, semillas, plántulas, estolones y otras estructuras reproductivas capaces de regenerar individuos completos. Este material genético puede clasificarse en dos tipos principales: germoplasma sexual, que proviene de semillas, y germoplasma asexual, que se obtiene de partes vegetativas como estolones, meristemos, yemas axilares u hojas. Su uso es esencial en programas de mejoramiento genético, conservación de la biodiversidad, propagación masiva y desarrollo de cultivares resistentes (FAO & Bioversity International, 2014).

1.6.1. Importancia del germoplasma en la conservación y mejoramiento

La conservación del germoplasma es clave para preservar la diversidad genética de las especies cultivadas y silvestres, permitiendo su uso futuro frente a amenazas como enfermedades, plagas o cambio climático. En el ámbito agrícola, constituye la base de los programas de mejoramiento vegetal, ya que posibilita la introducción de

rasgos deseables como resistencia a estrés hídrico, calidad nutricional o adaptación a nuevas condiciones agroecológicas. Además, su conservación es estratégica para garantizar la seguridad alimentaria y la sostenibilidad de los sistemas productivos (Engels & Visser, 2003).

1.6.2. Objetivos y funciones de los bancos de germoplasma

Un banco de germoplasma es una instalación diseñada para conservar y mantener material genético vegetal de forma segura y controlada. Sus principales funciones son:

- Preservar la diversidad genética de especies cultivadas y silvestres.
- Facilitar el acceso al material vegetal para programas de investigación y desarrollo.
- Apoyar el mejoramiento genético y la producción de plantas libres de patógenos.
- Garantizar la trazabilidad, sanidad y calidad del material vegetal conservado.

En este sentido, los bancos de germoplasma actúan como reservorios estratégicos para la agricultura del presente y del futuro (FAO & Bioversity International, 2014).

1.7. Manejo y documentación de bancos *in vitro*

a) Registro y codificación de accesiones

Toda accesión incorporada a un banco de germoplasma debe ser registrada con un código único de identificación, el cual debe incluir: especie, variedad, procedencia, número de subcultivo, fecha de ingreso y condiciones de cultivo. Esta información debe documentarse en formato físico y digital, para asegurar la trazabilidad genética y el control sanitario del material vegetal (Engels & Visser, 2003).

b) Condiciones de almacenamiento y monitoreo

El mantenimiento de bancos *in vitro* requiere condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, generalmente en cámaras de crecimiento con temperaturas de

22–25 °C, 50–60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Además, se deben realizar inspecciones periódicas para monitorear la presencia de contaminaciones, el crecimiento de brotes, y la viabilidad del material mediante pruebas de tetrazolio u otras técnicas (Pierik, 1988).

1.8. Biotecnología Vegetal

La biotecnología vegetal es aquella ciencia que se encarga de desarrollar nuevas y diversas variedades de rasgos en los cultivos y en las plantas. Logrando así que se puedan estudiar los diversos genes que conforman a una planta, y las características que les proporcionan. Además, permite que estos rasgos sean transferidos de una planta a otra, logrando una mejora genética. (Centro de Biotecnología Vegetal, 2023)

1.9. Banco de germoplasma

El banco de germoplasma tiene su origen en las investigaciones pioneras del científico ruso Nikolai Vavilov en la década de 1930. Un banco de germoplasma, en este sentido, es una instalación diseñada para conservar material biológico vivo tales como semillas, tejidos vegetales, plántulas o ADN de manera que pueda sobrevivir y mantenerse disponible a largo plazo. La finalidad de estos bancos es evitar la pérdida irreparable de diversidad genética provocada por fenómenos naturales (cambios climáticos, desastres) o actividades humanas (deforestación, urbanización, agricultura intensiva). La conservación de esta riqueza genética, tanto de plantas cultivadas como silvestres, resulta fundamental no solo para el equilibrio ecológico, sino también para garantizar el acceso a recursos clave en futuras estrategias de producción agrícola, mejoramiento de cultivos, y adaptación al cambio ambiental. (CICY, 2026)

1.10. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica Biotecnológica que se refiere al cultivo de organismos vivos en medios estériles, axénicos, de laboratorio, dotándole al material vivo todos sus requerimientos nutricionales. Si bien el cultivo *in vitro* de microorganismos como bacterias y hongos fue desarrollado ya muchos años atrás, alrededor de los años 1950, en Francia, se logra el cultivo de plantas *in vitro*, gracias a

la capacidad de los vegetales de regenerar órganos a partir de una o unas pocas células. El cultivo *in vitro* de explantes vegetales tiene importancia en el dominio de la fitopatología por la producción de plantas libres de patógenos, en la genética para la obtención y la selección de nuevos genotipos de plantas con características sobresalientes, plantas resistentes a enfermedades, la propagación rápida de material vegetal seleccionado, la conservación de genotipos o germoplasmas en condiciones de mínimo espacio y de disponibilidad permanente. Para la obtención de plantas de papa libres de virus se puede recurrir al cultivo de ápices meristemáticos, los cuales *in vitro* son capaces de regenerar una planta completa para luego ser trasplantada al suelo y mantener sus características genéticas idénticas. Los meristemas son tejidos en crecimiento activo, por lo que se considera que las partículas virales todavía no logran alcanzar las células neoformadas además de que este tejido todavía no cuenta con sistemas conductores, logrando de esta manera obtener plantas libres de virus después de su regeneración *in vitro*. Morel y Martin en 1952, fueron los primeros en obtener dalias y patatas libres de virus con la ayuda del cultivo de meristema. (Pierik, 1988)

1.11. Propagación de cultivo *in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería

recién en la década del '50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad. (Castillo, s.f.)

1.11.1. Tipos de Propagacion

Los dos tipos de propagación de plantas:

1.11.1.1. Macropropagación y micropropagación vegetal

La propagación vegetal puede realizarse mediante métodos convencionales o técnicas biotecnológicas. La macropropagación corresponde a métodos tradicionales de multiplicación realizados en vivero o campo, empleando estructuras vegetativas como estolones, rizomas, hijuelos o segmentos de tallo. En el cultivo de frutilla, este tipo de propagación se realiza principalmente mediante estolones, permitiendo la obtención rápida de nuevas plantas; sin embargo, puede favorecer la acumulación y diseminación de patógenos cuando el material madre presenta problemas sanitarios (Njukwe et al., 2007).

La micropropagación consiste en la multiplicación de plantas bajo condiciones asépticas mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales, permitiendo obtener gran cantidad de material vegetal uniforme, con mejor control sanitario y mayor capacidad de multiplicación. Esta técnica constituye una herramienta biotecnológica importante para la obtención de vitroplantas, conservación de germoplasma y producción de material vegetal de alta calidad fisiológica y sanitaria (Castillo, s.f.; Gupta et al., 2020).

En el caso de la frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), la micropropagación mediante cultivo *in vitro* representa una alternativa eficiente frente a la propagación convencional, debido a que permite reducir riesgos de transmisión de enfermedades, mejorar la uniformidad del material vegetal y favorecer la multiplicación controlada de plantas madre seleccionadas.

1.12. Métodos de cultivo de tejidos vegetales

Existen varios métodos para el cultivo de tejidos vegetales. En la organogénesis, el método más común, la formación de órganos puede ocurrir directamente a partir de meristemos o indirectamente a partir de células diferenciadas (callo). Los cultivos resultantes pueden utilizarse para la producción masiva de plantas (micropropagación) o para el desarrollo de órganos específicos. (Espinosa-Leal et al., 2018).

1.12.1. Organogénesis

La organogénesis es la producción de órganos vegetales a partir de un tejido específico para desarrollar plantas completas. Se caracteriza por ser polar, lo que significa que se libera un solo órgano aéreo o raíz y a partir de él se genera una nueva planta completa. Simultáneamente, la organogénesis puede ser directa, en cuyo caso el brote organogénico se produce directamente a partir de los explantes, o indirecta, en cuyo caso el proceso organogénico se produce a partir de callos previamente formados en los explantes originales. (Gupta et al., 2020).

1.12.2. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso de producir embriones a partir de células somáticas vegetales (cualquier célula no sexual) para generar una planta completa. A diferencia de la organogénesis, este es un proceso polar en el que las estructuras aéreas y las raíces de las plantas se desarrollan a partir del embrión somático. Puede ser directa o indirecta, dependiendo de si el proceso comienza con los explantes originales o con callos previamente formados. (Gupta et al., 2020).

1.13. Condiciones generales para el cultivo *in vitro*.

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

- La constitución genética de la planta.
- Nutrientes: Agua, macro y microelementos y azúcares.
- Factores físicos que influyen en el crecimiento: Luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂.
- Sustancias orgánicas: Reguladores del crecimiento, vitaminas, etc. (Pierik.1988).

1.14. Multiplicación *in vitro* de frutilla a partir de Meristemos

La multiplicación *in vitro* mediante ápices meristemáticos es una técnica de propagación clonal altamente eficiente, que permite obtener plantas genéticamente uniformes, libres de virus, bacterias y hongos. Esta técnica es particularmente relevante en el cultivo de frutilla (*Fragaria* × *ananassa*), ya que su forma tradicional de propagación a través de estolones facilita la acumulación de enfermedades, afectando negativamente el rendimiento y la calidad del cultivo (Pierik, 1988).

La regeneración de plantas desde meristemos en condiciones de laboratorio permite el saneamiento del material vegetal, preservando su identidad genética y mejorando su calidad fitosanitaria. La técnica incluye diversas fases, cada una de las cuales requiere condiciones estrictamente controladas para garantizar la eficacia del proceso. (Khan et al. 2012).

Ventajas del uso de ápices meristemáticos en frutilla

- Eliminación de patógenos (virus, bacterias y hongos).
- Producción masiva de plantas genéticamente homogéneas.
- Disminución del tiempo requerido para establecer un cultivo comercial.
- Conservación del germoplasma y mejora del material vegetal

(Swartz et al., 1981; Debnath, 2009).

1.15. Características de la variedad San Andrea

1.15.1. Origen y Tipo de Variedad

La variedad San Andreas es de origen californiano y se clasifica como de día neutro moderado, lo que significa que su floración no depende estrictamente de la duración del día. Esta característica le permite adaptarse a diferentes condiciones climáticas y extender su período de producción. (Undurraga D. 2013).

1.15.2. Morfología de la Planta

La planta de San Andreas presenta un tamaño intermedio con un crecimiento vegetativo inicial rápido. Sus hojas son de color verde oscuro, y los pecíolos son largos y pubescentes. Las inflorescencias son compactas, con flores bisexuales blancas. El sistema radicular es fibroso y bien desarrollado, lo que le confiere una buena capacidad de absorción de nutrientes. (Eurosemillas. 2022).

1.15.3. Características del Fruto

Los frutos de San Andreas son de gran tamaño, con un peso promedio de 30 g y un máximo de 60 g. Presentan un color rojo brillante y uniforme, con pulpa firme y un sabor dulce y aromático. La variedad muestra una excelente vida postcosecha y es resistente a enfermedades como el oídio y la antracnosis. (Undurraga D.b2013).

1.15.4. Rendimiento y Productividad

En estudios realizados en Bolivia, la variedad San Andreas mostró una precocidad destacada, iniciando la producción a los 93 días después de la siembra. El rendimiento alcanzado fue de 88 toneladas por hectárea, con frutos de hasta 30 g y un diámetro promedio de 3.5 cm. (Mollisaca Aruquipa, W. 2016).

1.15.5. Características de la variedad Camino Real

1.15.6. Origen y Tipo de Variedad

La variedad Camino Real fue desarrollada por el programa de mejoramiento genético de la Universidad de California, resultado del cruce entre las selecciones avanzadas Cal 89.230-7 y Cal 90.253-3. Fue seleccionada en 1995 en el Wolfskill

Experimental Orchard y liberada comercialmente en 2001. Se clasifica como una variedad de día corto, iniciando su producción un poco más tarde que 'Camarosa', pero compensando con rendimientos superiores y una menor proporción de frutos de segunda calidad. (Canadian Food Inspection Agency. 2023).

1.15.7. Morfología de la Planta

La planta de Camino Real es compacta, de hábito globoso, con densidad de follaje media y vigor moderado. Las hojas presentan un color verde medio a oscuro, con perfil semi-erecto y blistering interveinal medio. Los pecíolos son densamente pubescentes, y las estípulas muestran una coloración antociánica de media a fuerte. Esta morfología permite mayores densidades de plantación y facilita las labores de manejo y recolección. (Canadian Food Inspection Agency. 2023).

1.15.8. Características del Fruto

Los frutos de Camino Real son grandes, con forma cónica y color rojo oscuro tanto en el exterior como en la pulpa. Presentan una firmeza notable, lo que les confiere una excelente vida poscosecha. El sabor es bueno, con una textura algo gruesa y acidez media. La variedad muestra una baja incidencia de deformaciones, siendo adecuada tanto para el mercado en fresco como para la industria. (Proplantas. s.f.).

1.15.9. Rendimiento y Productividad

En condiciones favorables, Camino Real ha demostrado rendimientos superiores a 67 toneladas por hectárea. Aunque su producción inicia ligeramente más tarde que otras variedades como 'Camarosa', mantiene un tamaño de fruto constante a lo largo de la temporada y presenta una baja proporción de frutos de segunda calidad. (Centro de Validación y Transferencia de Tecnología de Sinaloa, A.C. 2019).

1.15.10. Producción de frutilla en Bolivia y Tarija

El departamento de Tarija se ha consolidado como una de las principales regiones productoras de frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch.) en Bolivia, destacándose particularmente el municipio de Cercado por la implementación de programas de reconversión productiva destinados al fortalecimiento del cultivo. De acuerdo con

información difundida por medios regionales, se establecieron aproximadamente 222 parcelas productivas de la variedad San Andreas, cubriendo una superficie de 19,5 hectáreas y alcanzando una producción estimada de 780 toneladas anuales, representando cerca del 60 % de la producción departamental. Asimismo, como parte de las estrategias de fortalecimiento productivo, se distribuyeron plantas madre y plantines de frutilla destinados a la ampliación de áreas de cultivo y sostenibilidad de la producción local. Entre los años 2022 y 2024, se reportó la entrega de aproximadamente 306.000 plantines, permitiendo la habilitación de 61,2 hectáreas productivas en el municipio de Cercado. (La Voz de Tarija, 2025; El País, 2025).

1.16. Problemática del material vegetal de propagación en frutilla

Uno de los principales problemas en la producción de frutilla es la calidad fitosanitaria del material vegetal utilizado, ya que la propagación mediante plantas infectadas favorece la diseminación de enfermedades y reduce el potencial productivo del cultivo. En este contexto, las virosis constituyen uno de los principales problemas sanitarios debido a que muchos patógenos no pueden eliminarse completamente mediante métodos tradicionales de desinfección. Asimismo, el intercambio e importación de germoplasma vegetal representa un riesgo fitosanitario importante, debido a la posible introducción de patógenos sistémicos que afectan la calidad y sanidad de las plantas madre, limitando el rendimiento y uniformidad del cultivo (EEAOC, s.f.).

1.17. Calidad genética, sanitaria y fisiológica del material vegetal

La calidad genética y sanitaria del material vegetal constituye un factor determinante para el éxito productivo del cultivo de frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), debido a que influye directamente en el vigor, uniformidad, productividad y sanidad del cultivo. En este contexto, la calidad del material de propagación comprende características genéticas, sanitarias y fisiológicas que aseguran el adecuado desarrollo de las plantas (FAO, 2010).

Debido a que la frutilla se propaga principalmente de forma agámica o asexual, existe una mayor susceptibilidad a la acumulación y diseminación de patógenos sistémicos, incluyendo virus, fitoplasmas, bacterias y hongos, los cuales pueden ser transmitidos por diferentes vectores presentes en viveros y plantaciones, afectando negativamente la calidad del material vegetal y el rendimiento productivo. (EEAOC, s.f.).

1.18. Sistema de certificación vegetal en Argentina (INASE)

Argentina posee uno de los sistemas más desarrollados para la certificación de plantines de frutilla en Sudamérica, mediante el Instituto Nacional de Semillas (INASE), institución encargada del control sanitario, identidad varietal y trazabilidad del material vegetal propagado. Este sistema constituye una referencia técnica útil para el planteamiento de estrategias preliminares de categorización y control de calidad del material vegetal producido *in vitro*. (INASE, s.f.).

1.18.1. Normativa en Bolivia (INIAF y SENASAG)

En Bolivia, el control del material vegetal de propagación se encuentra regulado por el Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), entidad responsable del registro, control y certificación de materiales de propagación vegetal, mientras que el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG) participa en el control fitosanitario del material propagativo destinado a la producción agrícola. (INIAF, 2022; Publiagro, 2025).

El Compendio de Normas Nacionales sobre Semillas y Material de Propagación Vegetal (INIAF, 2022) constituye una referencia para la regulación de materiales propagativos en Bolivia. Sin embargo, actualmente no existe una normativa específica orientada a plantines de frutilla producidos mediante cultivo *in vitro*, situación que evidencia la necesidad de plantear lineamientos técnicos preliminares relacionados con la categorización y control de calidad del material vegetal regenerado. (INIAF, 2022).

1.18.2. Referente fitosanitario internacional de propagación vegetal (SAG-Chile)

Chile cuenta con sistemas rigurosos de control fitosanitario del material vegetal propagativo, orientados a garantizar la sanidad y uniformidad del material destinado a producción comercial. La experiencia chilena representa un referente regional en la organización técnica de viveros y material propagativo. (SAG, 2024).

1.18.3. Necesidad de un sistema preliminar de categorización de plantines de frutilla producidos *in vitro* en Tarija

En Bolivia, actualmente no se dispone de lineamientos específicos orientados a la categorización y control de calidad de plantines de frutilla producidos mediante cultivo *in vitro*. Esta situación limita la estandarización del material vegetal propagado y dificulta la diferenciación técnica del material destinado a conservación, multiplicación o producción comercial.

Surge la necesidad de plantear lineamientos técnicos preliminares orientados a la organización, trazabilidad y evaluación del material vegetal regenerado bajo condiciones de laboratorio. La implementación de criterios básicos de categorización podría contribuir al fortalecimiento de futuros sistemas de producción y control de calidad de plantines de frutilla en el departamento de Tarija.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente trabajo dirigido se desarrollará específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo *In vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma "Juan Misael Saracho".

Figura 1

Ubicación del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo In vitro



Fuente:(Google Earth 2025)

3.1.1. Ubicación

Ubicado en el departamento de Tarija, Provincia Cercado, zona el Tejar.

El departamento de Tarija ubicado al sur de Bolivia, limita al norte con el departamento de Chuquisaca, al sur con la República Argentina, al este con la República del Paraguay y al oeste con los departamentos de Chuquisaca y Potosí. Geográficamente se encuentra entre los paralelos 20°50' y 22°50' de latitud sur y los meridianos 62°15' a 65°20' de longitud oeste.

3.2.Características agroecológicas

3.2.1. Temperatura

La temporada templada dura 4,2 meses, del 1 de octubre al 7 de febrero, y la temperatura máxima promedio diaria es más de 24 °C. El mes más cálido del año en Tarija es diciembre, con una temperatura máxima promedio de 24 °C y mínima de 16°C.

La temporada fresca dura 2,5 meses, del 16 de mayo al 31 de julio, y la temperatura máxima promedio diaria es menos de 21 °C. El mes más frío del año en Tarija es julio, con una temperatura mínima promedio de 5 °C y máxima de 20 °C.

3.2.2. Precipitación

La temporada más mojada dura 4,1 meses, de 20 de noviembre a 24 de marzo, con una probabilidad de más del 40 % de que cierto día será un día mojado. El mes con más días mojados en Tarija es enero, con un promedio de 19,1 días con por lo menos 1 milímetro de precipitación.

La temporada más seca dura 7,9 meses, del 24 de marzo al 20 de noviembre. El mes con menos días mojados en Tarija es junio, con un promedio de 5,6 días con por lo menos 1 milímetro de precipitación.

Entre los días mojados, distinguimos entre los que tienen solamente lluvia, solamente nieve o una combinación de las dos. El mes con más días con solo lluvia en Tarija es enero, con un promedio de 19,1 días. En base a esta categorización, el tipo más común de precipitación durante el año es solo lluvia, con una probabilidad máxima del 63 % el 11 de enero.

3.2.3. Lluvia

Para mostrar la variación durante un mes y no solamente los totales mensuales, mostramos la precipitación de lluvia acumulada durante un período de 31 días en una escala móvil centrado alrededor de cada día del año. Tarija tiene una variación extremada de lluvia mensual por estación.

Llueve durante el año en Tarija. El mes con más lluvia en Tarija es enero, con un promedio de 155 milímetros de lluvia. El mes con menos lluvia en Tarija es julio, con un promedio de 39 milímetros de lluvia.

3.2.4. Humedad

El nivel de humedad percibido en Tarija, medido por el porcentaje de tiempo en el cual el nivel de comodidad de humedad es bochornoso, opresivo o insoportable, no varía considerablemente durante el año, y permanece prácticamente constante en 0%.

3.2.5. Viento

La velocidad promedio del viento por hora en Tarija tiene variaciones estacionales leves en el transcurso del año.

La parte más ventosa del año dura 5,5 meses, del 18 de julio al 1 de enero, con velocidades promedio del viento de más de 10,7 kilómetros por hora. El mes más ventoso del año en Tarija es noviembre, con vientos a una velocidad promedio de 11,7 kilómetros por hora.

El tiempo más calmado del año dura 6,5 meses, del 1 de enero al 18 de julio. El mes más calmado del año en Tarija es abril, con vientos a una velocidad promedio de 9,7 kilómetros por hora.

3.2.6. Sector agrícola

Según datos del Panorama Productivo del Departamento de Tarija 2023, la producción agrícola en el departamento experimentó un crecimiento del 4% durante el año 2022 respecto al 2021, sumando 40.222 toneladas adicionales de productos agrícolas. Los principales cultivos reportados fueron caña de azúcar, maíz, papa y uva (MDPyEP, 2023).

3.3.MATERIALES

3.3.1. Material vegetal

- **Variedades**
 - San Andreas
 - Camino Real

Figura 2

Obtención de plantas madre de frutilla Var. San Andrea y Camino Real



(elaboración propia)

3.3.2. Material de laboratorio

Equipos

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| • Autoclave. | • Agitador. |
| • Cámara de flujo laminar. | • Horno de esterilización. |
| • PH-metro. | • Horno microondas. |
| • Balanzas de precisión. | • Refrigerador. |
| • Microscopio. | • Cámara de crecimiento |

3.3.3. Materiales de uso dentro del laboratorio

- Cajas Petri.
- Vasos de vidrio.
- Pipeta.
- Probeta.
- Tubos de ensayo.
- Canastillas.
- Mechero.
- Papel filtro.
- Papel de aluminio.
- Frascos de vidrio.
- Encendedor.
- Marcador.
- Bisturí.

3.3.4. Productos químicos

- Murashige & Skoog
- BAB- Bencil Amino Purina
- Kinetina
- Agar
- Sacarosa
- Mió inositol
- Vitaminas
- Alcohol
- Hipoclorito de sodio
- Agua destilada

3.4.METODOLOGÍA

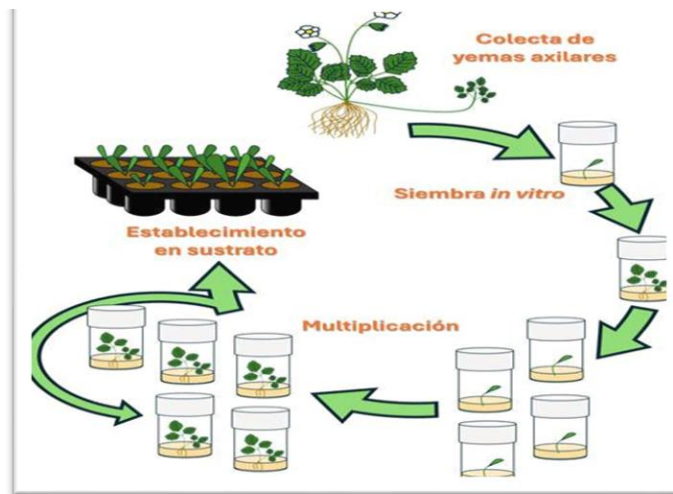
El presente trabajo dirigido se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, con el objetivo de contribuir a la renovación del banco de germoplasma de frutilla. El trabajo se realizó con las variedades San Andreas y Camino Real, considerando material vegetal previamente manejado en condiciones controladas. Se emplearon técnicas básicas de cultivo *in vitro* orientadas al aislamiento, establecimiento y multiplicación de material vegetal. Se tuvo un enfoque práctico y descriptivo, basado en observaciones directas y registros de laboratorio.

Para la ejecución del proceso se utilizaron equipos como autoclave, campana de flujo laminar, balanza analítica, pH-metro y material de vidrio estéril.

Asimismo, se emplearon medios de cultivo basados en sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento (BAP, AIB, GA3) y agentes gelificantes como agar.

Figura 3

Procedimiento para la obtención de un material vegetal



Elaboración propia, adaptado de Portal Frutícola (2025).

3.4.1. Fase 0. Selección de plantas madre

Para el inicio del trabajo se realizó la selección de plantas madre de frutilla de las variedades San Andreas y Camino Real, las cuales se encontraban previamente aclimatadas bajo condiciones controladas en el vivero del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales.

La selección se efectuó considerando plantas libres de síntomas visibles de enfermedades, con buen vigor vegetativo y con características morfológicas de cada variedad. En la variedad San Andreas se seleccionaron los clones 2, 10 y 14 mientras que para Camino Real se seleccionaron los clones 1, 10 y 13. Para cada clon se eligieron 2 plantas madre, haciendo un total de 6 clones y 12 plantas madre en total. La cantidad de plantas madre fue definida considerando la disponibilidad de material vegetal, representatividad clonal de ambas variedades y la capacidad operativa del laboratorio

para el manejo, seguimiento y conservación del material durante las diferentes fases del proceso *in vitro*.

Figura 4

Recolección de estolones de plantas madre



(elaboración propia)

Nota: Los estolones recolectados constituyeron el material vegetal de partida para el posterior aislamiento de meristemos apicales.

3.4.1.1. Obtención de explantes (meristemos apicales)

A partir de las plantas madre previamente seleccionadas, se recolectaron estolones jóvenes, sanos y fisiológicamente activos de aproximadamente 5-8 cm de longitud, los cuales fueron utilizados como material vegetal inicial.

Posteriormente, el material fue trasladado al laboratorio bajo condiciones de humedad controlada para evitar su deshidratación. Bajo condiciones asépticas y

utilizando instrumental estéril, se procedió al aislamiento de meristemas apicales a partir de los ápices presentes en los estolones.

El aislamiento fue realizado con apoyo de una lupa estereoscópica, permitiendo la extracción precisa del domo meristemático, obteniéndose explantes de aproximadamente 0,2-0,5 mm para su establecimiento *in vitro*.

Figura 5

Obtención de estolones de plantas madre



(elaboración propia)

3.4.1.2.Fase 0. Desinfección del material vegetal

El material vegetal recolectado fue sometido a un proceso de desinfección superficial previo al aislamiento de meristemas apicales:

- Lavado inicial: los estolones se lavaron con agua corriente y jabón neutro para eliminar partículas superficiales.
- Alcohol: se sumergieron en el alcohol etílico al 70% durante 1 minuto.

- Hipoclorito de sodio: bajo cámara de flujo laminar, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% (dilución 1:3 de hipoclorito comercial al 5% en agua destilada estéril) durante 15 minutos.
- Enjuagues: se realizaron cuatro enjuagues consecutivos con agua destilada estéril, cada uno de 5 minutos, para eliminar residuos del desinfectante.

Todo el instrumental (bisturí, pinzas, vasos) fue esterilizado previamente en la estufa de esterilización (170°C por 1 hora).

Figura 6

Cámara de flujo laminar, desinfección de material vegetal



(elaboración propia)

3.4.1.3.Preparación de medio de cultivo introducción

La tabla correspondiente al medio de introducción describe la composición utilizada para la fase inicial del cultivo *in vitro*, cuyo objetivo fue favorecer el establecimiento y adaptación de los explantes en condiciones controladas.

Este medio estuvo basado en sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento, proporcionando los nutrientes esenciales para el desarrollo del tejido vegetal. La incorporación de ácido ascórbico permitió reducir la oxidación de los

explantes, mientras que la adición de BAP (6-bencilaminopurina) favoreció la inducción de brotes y el establecimiento inicial de meristemos apicales bajo condiciones controladas. Asimismo, el uso de PPM contribuyó al control de contaminantes durante la fase inicial del cultivo.

El medio fue suplementado con azúcar como fuente de energía y solidificado con agar. Finalmente, se ajustó a un pH de 5,7, generando condiciones adecuadas para el establecimiento y desarrollo inicial del material vegetal. El medio fue preparado bajo condiciones de esterilidad y posteriormente esterilizado en autoclave antes de su utilización.

Figura 7

Preparativo de medio de introducción



(elaboración propia)

Tabla 1*Medio de Introducción*

Componente	Concentración/Stock	Cantidad (ml o g) para 100ml
Macros (M1)	X10	10,00 ml
Micros (M2)	X100	1,00ml
Micros (M3)	X100	1,00ml
Vitaminas (M4)	X100	1,00ml
Tiamina (10mg/100ml)	-	0,30ml
Mio-inositol (1000mg/100ml)	-	1,00ml
Acido ascórbico (1000mg/100ml)	-	1,00ml
BAP (10mg/100ml)	-	0,80ml
PPM(2ml/L)	-	0,20ml
Azúcar	-	3,30g
Agua destilada	-	100ml
pH	-	5,7
Agar(8,5g/L)	-	0,85 g

3.4.2. Fase 1. Establecimiento *in vitro*

Bajo la cámara de flujo laminar, los meristemas apicales previamente aislados fueron colocados sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente, cada meristemo apical fue inoculado individualmente en tubos de ensayo conteniendo medio de introducción. Los tubos fueron sellados con cinta Parafilm y mantenidos bajo condiciones controladas de incubación para favorecer el establecimiento y desarrollo inicial del tejido vegetal.

Condiciones de incubación:

- Temperatura: $22 \pm 2^\circ\text{C}$
- Primero 2 días: oscuridad total (para reducir estrés fisiológico).
- Posteriormente: fotoperiodo de 16 horas luz (2000-3000 lux) y 8 horas oscuridad.
- Duración de la fase 30 días

Durante este periodo se realizó un monitoreo visual periódico (cada 3 días) para registrar: presencia de contaminación (hongos/bacterias), oxidación fenólica (pardeamiento), emisión de brotes y vigor aparente. Solo los explantes que mostraron brotes verdes y ausencia de contaminación fueron seleccionados para la siguiente fase.

Figura 8

Establecimiento in vitro de meristemos apicales de frutilla



(elaboración propia)

3.4.2.1. Medio de cultivo para la fase de multiplicación

La tabla correspondiente al medio de cultivo para la fase de multiplicación describe la formulación utilizada durante los subcultivos sucesivos, cuyo objetivo fue promover la proliferación de brotes y el incremento del material vegetal en condiciones *in vitro*. Se emplearon medios basados en sales minerales tipo KNOP y MS, complementados con vitaminas y reguladores de crecimiento como BAP (bencilaminopurina), AIB (ácidoindolbutírico) y GA₃ (ácido giberélico), los cuales favorecieron la división celular, elongación y desarrollo de brotes. El uso de mio-inositol y azúcar, contribuyó al crecimiento y desarrollo del tejido vegetal, actuando como fuente de energía, mientras que el agar permitió la solidificación del medio, proporcionando soporte físico a los explantes. El pH fue ajustado a 5.8 generando condiciones óptimas para la multiplicación. Finalmente, el medio fue preparado bajo condiciones de esterilidad y esterilizado en autoclave antes de su utilización, garantizando un ambiente adecuado para el desarrollo del cultivo.

Figura 9

Preparación de medio de cultivo para la fase de multiplicación



(elaboración propia)

Tabla 2*Medio de Multiplicación*

Fase 2		Multiplicación
		Medio
Componente/Stock	Conc. /Stock	Cantidad (2.4L)
Macros (KNOP M1)	X10	240ml
Micros MS(M2)	X100	24ml
Micros MS(M3)	X100	24ml
Vitaminas MS(M4)	X100	24ml
Mio-inositol	-	24ml
AIB (10mg/100ml)	-	24ml
BAP(10mg/100ml)	-	36ml
GA3(50mg/100ml)	-	0.96ml
Azúcar	-	84g
Agar	-	16.4g
Agua destilada	-	2.4L
pH	-	5.8

Nota: El mismo medio de cultivo fue utilizado en los diferentes subcultivos sucesivos de multiplicación, manteniendo la misma composición nutricional y hormonal durante el proceso.

3.4.3. Fase 2. Multiplicación de Brotes

Los brotes regenerados a partir del establecimiento de meristemos apicales fueron sometidos a subcultivos sucesivos con la finalidad de incrementar el material vegetal obtenido *in vitro*.

La multiplicación se realizó aproximadamente cada 28-30 días, bajo condiciones asépticas empleando la técnica de segmentación de brotes desarrollados. Bajo cámara de flujo laminar y utilizando instrumental estéril, los brotes vigorosos fueron seccionados transversalmente, obteniendo segmentos de aproximadamente 0,5-1 cm de longitud, conteniendo al menos una yema viable para favorecer la regeneración y proliferación del material vegetal. Cada segmento se transfirió individualmente a un

frasco con medio de multiplicación fresco, colocando 6 explantes por frasco (densidad estándar). Los frascos se incubaron bajo las mismas condiciones ambientales (22°C, fotoperiodo 16/8 h, 2000-3000 lux).

Procedimiento por cada subcultivo:

1. Evaluación visual del material vegetal: se descartaron explantes con contaminación, oxidación, bajo desarrollo o crecimiento irregular.
2. Segmentación nodal de los brotes sanos y vigorosos.
3. Transferencia de los segmentos a frascos con medio fresco.
4. Incubación de 28-30 días.

Se realizaron tres subcultivos sucesivos (denominados primera, segunda y tercera multiplicación). Durante la tercera multiplicación, los frascos se organizaron por variedad (San Andreas y Camino Real) para evaluar su comportamiento de forma independiente.

Figura 10

Fase de multiplicación y descartar brotes



(elaboración propia)

3.4.4. Registro y conservación en el banco de germoplasma sistema de codificación y trazabilidad

Se diseñó un código único para cada frasco con el siguiente formato:

Código= [Variedad] – [Clon] – [Subcultivo] – [N° correlativo]

- Variedad: SA (San Andreas), CR (Camino Real).
- Clon: C2, C10, C14 (San Andreas); C1, C10, C13 (Camino Real).
- Subcultivo: M1 (primera multiplicación), M2, M3.
- N° correlativo: número secuencial del frasco dentro del subcultivo.

Cada frasco fue etiquetado con su código con un marcador. Se llevó un registro físico (bitácora), con los siguientes campos: código, variedad, fecha de subcultivo, número de frascos y tubos.

Condiciones de conservación:

Las accesiones regeneradas se conservaron en el banco de germoplasma bajo las siguientes condiciones estandarizadas:

Tabla 3

Condiciones de conservación

Parámetro	Condición
Temperatura	22± 2°C
Fotoperiodo	16 horas luz/8 horas oscuridad
Intensidad lumínica	2000-3000 lux
Medio de conservación	MS con 1/3 de sacarosa (11g/L, sin reguladores de crecimiento).
Recipiente	Frascos de vidrio de 250 ml sellados con tapa roscas y cinta Parafilm.
Frecuencia de monitoreo	Cada 15 días (revisiones de contaminación, deshidratación, viabilidad).

3.4.5. Análisis de Datos

Para evaluar la eficiencia del proceso de micropropagación, se realizaron cálculos de distribución de explantes por clon y por variedad, como comparaciones entre variedades.

- Para la determinación del porcentaje de explantes por Clon se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ de explantes por clon} = \left(\frac{\text{Numero de explantes por clon}}{\text{Total de explantes de la variedad}} \right) * 100$$

- Para la comparación entre variedades se aplicó:

$$\% \text{ por variedad} = \left(\frac{\text{Total de explantes por variedad}}{\text{Total general de explantes}} \right) * 100$$

- También, se evaluó la perdida de material vegetal mediante el cálculo del porcentaje de frascos contaminados:

$$\% \text{ de perdida} = \left(\frac{\text{Numero de frascos perdidos}}{\text{Numero total de frascos establecidos}} \right) * 100$$

Estos cálculos permitieron analizar la eficiencia de multiplicación y comparar el comportamiento de los clones y variedades bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Tabla 4*Descripción de Trabajo realizado*

Mes	Actividad principal
Marzo	Introducción
	- Inicio de trabajo dirigido -Selección de plantas madre de frutilla -Preparación de medios de cultivo y acondicionamiento de laboratorio -Capacitación del manejo de la cámara de flujo laminar y técnicas básicas de asepsia
Abril	Reintroducción
	-Preparación de nuevo medios de cultivo -Cambio de botellines a tubos de ensayo -Restablecimiento de explantes con bajo desarrollo -Se realizo nuevamente procesos de desinfección y manipulación en cámara de flujo laminar, mejorando la respuesta del material <i>in vitro</i>.
Mayo	
	-Mantenimiento de condiciones asépticas y ajuste de protocolos -Preparación de material (pinzas, bisturí, tubos, vasos y platos), etc. -Colaboración de replicación de papa en Desiré
Junio	
	-Preparación de material vegetal y evaluación inicial -Se colaboro con replications de ajo -Se colaboro también en campo Centro Experimental de Chocloca con el mantenimiento de las frutillas con una limpieza de malezas y aporcado.
Julio	Establecimiento
	-Introducción de explantes en medio de cultivo

-Nuevamente de colaboro con las frutillas en campo, ya que estas fueron provenientes del laboratorio, las primeras que se obtuvo, se llegaron a observar que ya estaban teniendo frutos.

Agosto Establecimiento y brotación

-Desarrollo inicial y formación de brotes
 -Se colaboro de nuevo con la papa Desiré (replicar).
 -Preparativos de medios y acondicionamiento en el laboratorio.

Septiembre

-Selección de explantes con mejor vigor
 -Relección de material vegetal

Octubre Multiplicación #1

-Primera multiplicación

Noviembre Multiplicación #2

-Segunda multiplicación

Diciembre Multiplicación #3

-Tercera multiplicación realizando 84 frascos por variedad para una obtención de 168 frascos.

CAPITULO III

RESULTADOS

Capítulo III: RESULTADOS

3.1. Obtención de vitroplantas de frutilla mediante cultivo de ápices meristemáticos

Para dar cumplimiento al primer objetivo, se realizó el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos obtenidos a partir de estolones provenientes de plantas madre seleccionadas de las variedades San Andreas y Camino Real. El proceso permitió evaluar la respuesta inicial del material vegetal bajo condiciones asépticas, considerando la desinfección, establecimiento, brotación inicial y vigor de los explantes.

3.1.1. Obtención y desinfección del material vegetal

Se trabajo con un total de 60 explantes iniciales, distribuidos en seis clones: tres correspondientes a la variedad San Andreas y tres a Camino Real. Cada clon apporto 10 explantes, permitiendo una distribución equilibrada del material vegetal inicial.

Tabla 5

Obtención de explantes por variedad y clon

Variedad	Clon	Nº explantes obtenidos	Tipo de explante	Estado tras desinfección
San Andreas	2	10	Estolones	Apto
San Andreas	10	10	Estolones	Apto
San Andreas	14	10	Estolones	Apto
Camino Real	1	10	Estolones	Apto
Camino Real	10	10	Estolones	Apto
Camino Real	13	10	Estolones	Apto
Total		60		

El protocolo de desinfección permitió obtener material vegetal apto para el establecimiento *in vitro*, sin evidenciar contaminación visible en la etapa inicial. Este resultado indica que la combinación de lavado, alcohol al 70%, hipoclorito de sodio al 2% y enjuagues con agua destilada estéril fue adecuada para reducir la carga microbiana del material vegetal.

3.1.2. Eficiencia de establecimiento *in vitro*

Se trabajo con un total de 60 explantes iniciales (30 por variedad). Tras el proceso de desinfección y la incubación en medio de introducción, se seleccionaron 42 explantes con mejores características, lo que presenta una eficiencia de 70%.

Formula:

$$\% \text{ de establecimiento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de explantes establecidos}}{\text{N}^\circ \text{ total de explantes iniciales}} \times 100$$

$$\% \text{ de establecimiento} = \frac{42}{60} \times 100 = 70\%$$

Tabla 6

Registro de establecimiento in vitro

Variedad	Clon	Nº de tubos	Nº explantes obtenidos	% de establecimiento
San Andreas	2	10	7	70%
San Andreas	10	10	7	70%
San Andreas	14	10	7	70%
Camino Real	1	10	7	70%
Camino Real	10	10	7	70%
Camino Real	13	10	7	70%
Total	-	60	42	70%

La eficiencia obtenida demuestra una respuesta favorable de los ápices meristemáticos durante la fase de establecimiento. La reducción de los 60 a 42 explantes no se consideró como pérdida por contaminación, sino como una selección técnica del material con mejor vigor, coloración verde, ausencia de oxidación severa y capacidad de brotación.

3.1.3. Comparación de establecimiento entre variedades

Para comparar la respuesta entre variedades se calculó el porcentaje de establecimiento por variedad.

Formula:

$$\% \text{ por variedad} = \frac{\text{Explantes establecidos por variedad}}{\text{Explantes iniciales de la variedad}} \times 100$$

San Andreas

$$\frac{21}{30} \times 100 = 70\%$$

Camino Real

$$\frac{21}{30} \times 100 = 70\%$$

Tabla 7

Eficiencia de establecimiento por variedad

Variedad	Explantes iniciales	Explantes establecidos	% de establecimiento
San Andreas	30	21	70%
Camino Real	30	21	70%
Total	60	42	70%

Ambas variedades presentaron el mismo porcentaje de establecimiento, lo que evidencia que el protocolo utilizado respondió de manera uniforme para San Andreas y Camino Real. Este resultado es importante porque demuestra que el procedimiento puede aplicarse a ambas variedades sin una diferencia marcada en la fase inicial.

Durante las primeras dos semanas posteriores al establecimiento se observó emisión de brotes verdes y vigorosos en la mayoría de los explantes establecidos, evidenciando una respuesta favorable de los ápices meristemáticos bajo las condiciones de incubación utilizadas.

Asimismo, no se registró contaminación fúngica ni bacteriana en los 42 cultivos seleccionados, indicando que el protocolo de desinfección empleado fue eficiente para reducir la carga microbiana del material.

3.2. Multiplicación De Vitroplantas Mediante Subcultivos Sucesivos

Para cumplir el segundo objetivo, los brotes regenerados a partir de los ápices meristemáticos establecidos fueron multiplicados mediante subcultivos sucesivos. El proceso permitió incrementar el número de explantes y evaluar el comportamiento de los clones y variedades durante la fase de multiplicación *in vitro*.

3.2.1. Progresión de la multiplicación *in vitro*

A partir de los 42 explantes establecidos en tubos de ensayo, se realizó una selección fisiológica del material vegetal, priorizando explantes con mejor vigor, coloración verde, brotación activa y ausencia de oxidación severa. Debido a que el material vegetal correspondía a seis clones, se seleccionaron seis explantes por clon, obteniéndose un total de 36 explantes distribuidos en seis frascos, con una densidad de seis explantes por frasco para el inicio de la fase de multiplicación.

Durante los subcultivos sucesivos, el material vegetal presentó brotación múltiple, permitiendo una multiplicación práctica aproximada de tres unidades de cultivo por frasco inicial, dependiendo del vigor y desarrollo fisiológico observado.

En la primera multiplicación, los seis frascos iniciales permitieron obtener 18 frascos efectivos, equivalentes a 108 explantes. Para esta etapa se prepararon 20 frascos

con medio de cultivo, de los cuales dos quedaron como reserva técnica ante posibles pérdidas por deterioro físico del medio o descarte del material vegetal.

la segunda multiplicación, los 18 frascos efectivos generaron un potencial de 54 frascos; sin embargo, debido a la disponibilidad de medio preparado y a la selección de brotes con mejor desarrollo fisiológico, se establecieron 56 frascos efectivos, equivalentes a 336 explantes.

Finalmente, durante la tercera multiplicación se trabajó con 56 frascos efectivos, alcanzando un total de 168 frascos, distribuidos equitativamente entre las variedades San Andreas y Camino Real (84 frascos por variedad), obteniéndose un potencial de 1008 explantes regenerados.

Tabla 8*Progresión de la multiplicación in vitro de frutilla*

Etapas	Frascos preparados	Frascos efectivos	Factor practico de multiplicación	Explantos por frasco	Total de explantos
Selección para multiplicación (septiembre)	6	6	-	6	36
Multiplicación 1 (octubre)	20	18	x3	6	108
Multiplicación 2 (noviembre)	60	56	x3	6	336
Multiplicación 3 (diciembre)	84x84	168	-	6	1008
Resultado final efectivo	-	166	-	6	996

Nota: El valor teórico de la segunda multiplicación correspondía a 54 frascos; sin embargo, se establecieron 56 frascos efectivos considerando disponibilidad de medio preparado y selección de material vegetal con mejor vigor fisiológico.

El incremento progresivo del material vegetal durante los subcultivos evidenció una adecuada respuesta regenerativa de los explantes bajo las condiciones de cultivo empleadas. La aplicación de un factor práctico de multiplicación de tres permitió

incrementar progresivamente el número de frascos y explantes regenerados, manteniendo una densidad de seis explantes por frasco durante todo el proceso.

La preparación anticipada de frascos con medio de cultivo permitió disponer de material de reserva ante posibles pérdidas relacionadas con deterioro físico del medio, problemas de gelificación o descarte de explantes con bajo vigor fisiológico. Este manejo técnico facilitó la continuidad de la multiplicación.

Sin embargo, durante la tercera multiplicación se registró la pérdida de dos frascos correspondientes a la variedad Camino Real, atribuida a procesos de oxidación fenólica y retraso en el subcultivo, observándose oscurecimiento del tejido vegetal y disminución progresiva del vigor del material. Como consecuencia, el número final efectivo fue de 166 frascos equivalentes a 996 vitroplantas regeneradas, manteniéndose un nivel bajo de pérdida respecto al total proyectado.

A pesar de estas pérdidas, el comportamiento general del material vegetal fue favorable, permitiendo obtener una cantidad de vitroplantas cercana a la meta propuesta inicialmente y evidenciando la capacidad regenerativa del material bajo condiciones controladas de cultivo *in vitro*.

3.2.2. Comportamiento de multiplicación por clon

Al finalizar la fase de multiplicación, se evaluó la distribución de explantes por clon dentro de cada variedad.

Formula:

$$\% \text{ por clon} = \frac{\text{Explantes del clon}}{\text{Total de explantes de la variedad}} \times 100$$

Tabla 9*Distribución de explantes por clon*

Variedad	Clon	N° frascos	Explantes totales	% de la variedad
San Andreas	2	22	132	26%
San Andreas	10	26	156	31%
San Andreas	14	36	216	43%
Camino Real	1	19	114	23%
Camino Real	10	25	150	30%
Camino Real	13	38	228	46%

En San Andreas, el clon 14 presento el mayor porcentaje de multiplicación, con 216 explantes, equivalente al 43% de la variedad. En Camino Real, el clon 13 alcanzo el mayor valor, con 228 explantes, equivalente al 46%. Estos resultados permiten identificar que no todos los clones respondieron de la misma manera durante la multiplicación, destacándose los clones 14 de San Andreas y 13 de Camino Real por su mayor capacidad de regeneración.

3.2.3. Pérdida de material vegetal por oxidación fenólica

Durante la multiplicación, se registró la pérdida de 2 frascos correspondientes a la variedad Camino Real (clones 1 y 10) debido a oxidación fenólica asociada a un retraso en el subcultivo. Esta pérdida fue cuantificada para determinar un efecto sobre la producción final.

Formula:

$$\% \text{ de pérdida} = \frac{\text{N° de frascos perdidos}}{\text{N° total de frascos esperados}} \times 100$$

$$\frac{2}{168} \times 100 = 1,19\%$$

Tabla 10*Perdida de frascos durante la multiplicación*

Variedad	Frascos esperados	Perdidas	Frascos efectivos	Explantos efectivos
San Andreas	84	0	84	504
Camino Real	84	2	82	492
Total	168	2	166	996

La pérdida total fue baja, representando solo el 1,19% del total esperado. Este valor no comprometió al proceso general, ya que se obtuvo un total de 996 explantes efectivos. Además, la pérdida registrada permitió identificar la importancia del subcultivo oportuno para evitar oxidación fenólica en materiales sensibles.

3.2.4. Comparación final entre variedades

Para comparar la producción final entre San Andreas y Camino Real se calculó el porcentaje de participación de cada variedad sobre el total de explantes efectivos.

Formula:

$$\% \text{ por variedad} = \frac{\text{Explantos efectivos por variedad}}{\text{Total general de explantes efectivos}} \times 100$$

San Andreas

$$\frac{504}{996} \times 100 = 50,6\%$$

Camino Real

$$\frac{492}{996} \times 100 = 49,4\%$$

Tabla 11*Comparación general de la producción entre variedades*

Variedad	Nº frascos efectivos	Total, explantes	Porcentaje del total
San Andreas	84	504	50,6%
Camino Real	82	492	49,4%
Total	166	996	100%

Aunque ambas variedades presentaron una respuesta favorable durante el proceso de multiplicación, San Andreas mostró ligeramente mayor estabilidad fisiológica, debido a la ausencia de pérdidas por oxidación fenólica. En contraste, Camino Real presentó una ligera disminución en la producción final asociada a la pérdida de dos frascos durante la fase final de multiplicación.

3.3. Registro, organización y trazabilidad de las accesiones regeneradas

Para dar cumplimiento al tercer objetivo específico, se organizó el material vegetal regenerado durante la fase de multiplicación, estableciendo un sistema de registro que permitió identificar la variedad, clon, etapa de subcultivo, número de frascos y estado sanitario del material conservado. Este proceso permitió mantener la trazabilidad de las vitroplantas obtenidas y facilitar su posterior conservación dentro del banco de germoplasma.

3.3.1. Sistema de codificación y registro de accesiones regeneradas

Para el seguimiento del material vegetal regenerado se empleó un registro físico de laboratorio, considerando los principales datos de cada accesión, tales como variedad, clon, fecha de subcultivo, número de frascos, estado sanitario y observaciones morfológicas del material vegetal.

La identificación del material regenerado se realizó mediante un sistema de codificación estructurado bajo el siguiente formato:

[Variedad] – [Clon] – [Multiplicación] – [Número correlativo]

Donde:

- SA= San Andreas
- CR=Camino Real
- C= Clon
- M1, M2, M3= Primera, segunda y tercera multiplicación
- Numero correlativo= Identificación secuencial del material registrado

Este sistema permitió diferenciar el material vegetal según variedad, clon y fase de multiplicación, facilitando la organización y seguimiento del material conservado dentro del banco de germoplasma.

3.3.2. Acciones conservadas en el banco de germoplasma

Al finalizar la fase de multiplicación, se registraron 166 frascos efectivos, equivalentes a 996 vitroplantas regeneradas. Cada frasco fue considerado como una unidad de conservación *in vitro* dentro del banco de germoplasma.

Tabla 12*Accesiones conservadas por variedad*

Variedad	Frascos conservados	Explantes por frasco	Vitroplantas conservadas	Porcentaje
San Andreas	84	6	504	50,6%
Camino Real	82	6	492	49,4%
Total	166	6	996	100%

Los resultados muestran una distribución equilibrada del material conservado entre ambas variedades. San Andreas representó el 50,6% del total de vitroplantas conservadas, mientras que Camino Real alcanzó el 49,4%. Esta ligera diferencia se relacionó con la pérdida de dos frascos de Camino Real durante la fase final de multiplicación, debido a oxidación fenólica.

La conservación de 996 vitroplantas permitió renovar el banco de germoplasma con material vegetal viable, organizado y trazable, constituyendo una base importante para futuras etapas de multiplicación, enraizamiento, aclimatación y producción de plantines.

3.3.3. Estado sanitario y conservación del material vegetal

Durante la organización del material regenerado, los frascos efectivos fueron evaluados visualmente para determinar su aptitud de conservación. Se considera como material sano aquellos frascos que no presentaron contaminación visible, oxidación severa, deshidratación o necrosis.

Tabla 13*Criterios de evaluación visual del material conservado*

Criterio evaluado	Condición esperada	Interpretación
Coloración	Verde normal	Material viable
Contaminación visible	Ausente	Material apto para conservación
Oxidación severa	Ausente – Bajo	Material fisiológicamente estable
Brotación	Presente	Capacidad de regeneración
Vigor	Medio – Alto	Apto para mantenimiento

La permanencia de frascos sanos y vigorosos permitió considerar que el material regenerado se mantuvo en condiciones adecuadas para su conservación temporal dentro del banco de germoplasma. Este resultado es importante porque no solo se obtuvo material vegetal, sino que se logró organizarlo como recurso biotecnológico con potencial de uso futuro.

3.3.4. Registro de trazabilidad del material regenerado

El sistema de registro implementado permitió identificar el material regenerado mediante variedad, clon, fase de multiplicación y número correlativo, facilitando el seguimiento del material vegetal conservado dentro del banco de germoplasma.

La trazabilidad del material permitió diferenciar las variedades San Andreas y Camino Real, así como reconocer el comportamiento de los clones durante las fases de multiplicación, manteniendo un control básico del estado sanitario y número de frascos conservados.

3.4. Esbozo de propuesta de categorización y control de calidad de plantines de frutilla producidos *in vitro* en Tarija

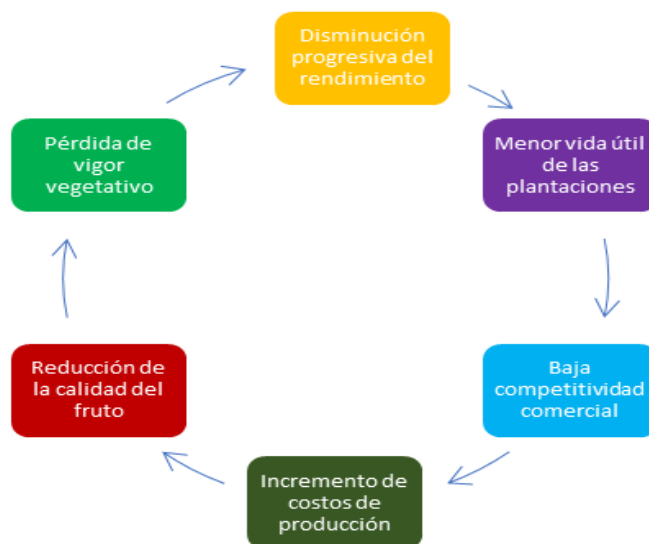
3.4.1. Fundamentación técnica de la propuesta

La producción de frutilla en Tarija depende en gran medida del uso de material propagativo proveniente de campo, situación que puede favorecer la acumulación de enfermedades, pérdida progresiva del vigor fisiológico y menor uniformidad varietal. Frente a esta problemática, el cultivo *in vitro* representa una alternativa biotecnológica con potencial para producir material vegetal bajo condiciones controladas, favoreciendo la multiplicación rápida y el mejoramiento sanitario del material propagativo.

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo dirigido evidenciaron la viabilidad técnica de la propagación *in vitro* mediante meristemos apicales, permitiendo plantear un esbozo preliminar de categorización y control de calidad de plantines de frutilla producidos *in vitro* en Tarija.

3.4.2. Justificación del sistema de categorización propuesto

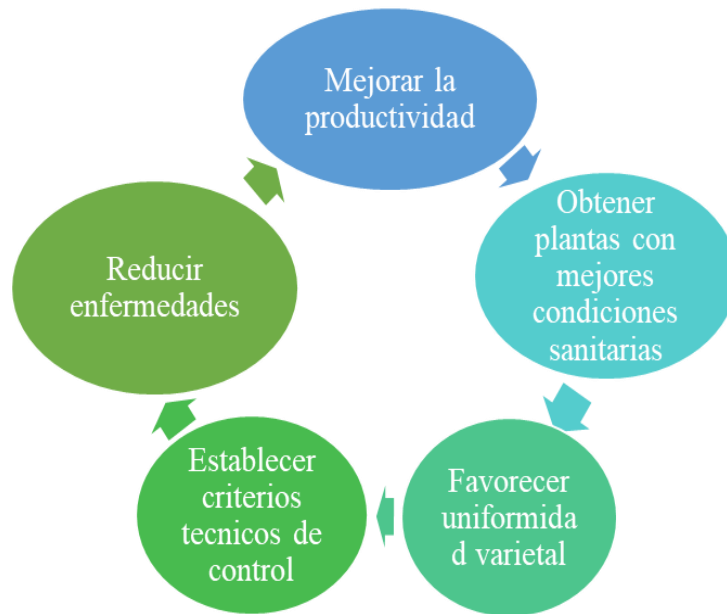
Problemas identificados



(elaboración propia)

La implementación de un sistema preliminar de categorización de plantines de frutilla producidos *in vitro* surge como una alternativa orientada a disminuir problemáticas asociadas al uso continuo de material vegetal sin control sanitario y fisiológico. La categorización permitiría establecer criterios básicos de seguimiento del material vegetal, favoreciendo la producción de plantas con mayor uniformidad, mejor comportamiento fisiológico y menor riesgo fitosanitario.

Beneficios potenciales del sistema propuesto



(elaboración propia)

3.4.3. Objetivo general y específicos del sistema propuesta

Objetivo general

Proponer un sistema preliminar de categorización y control de calidad para plantines de frutilla obtenidos mediante cultivo *in vitro* en Tarija, orientado a fortalecer la producción de material vegetal con mejores condiciones sanitarias, fisiológicas y varietales.

Objetivos específicos

- Definir categorías del material vegetal propagado *in vitro*.
- Establecer criterios mínimos de calidad sanitaria y fisiológica.
- Favorecer procesos básicos de trazabilidad del material vegetal.
- Contribuir a la uniformidad del material propagado.
- Fortalecer la competitividad del sector frutillero.

3.4.4. Base técnica del sistema propuesto

La propuesta se sustenta en el cultivo *in vitro* de frutilla, utilizando principalmente meristemos apicales, yemas axilares y estolones jóvenes, debido a su capacidad regenerativa y potencial para producir material vegetal con mejores condiciones sanitarias y fisiológicas.

Estas estructuras vegetativas presentan elevada capacidad regenerativa y permiten la obtención de brotes bajo condiciones controladas, favoreciendo procesos de multiplicación rápida y organización del material vegetal propagado.

3.4.5. Etapas preliminares del proceso de propagación



(elaboración propia)

Nota: El presente trabajo dirigido fue desarrollado hasta la fase de multiplicación, considerándose las etapas posteriores como parte de una estructura preliminar del sistema propuesto.

3.4.6. Propuesta preliminar de categorización del material vegetal de frutilla producido *in vitro*

Como parte del presente esbozo técnico, se plantea una estructura preliminar de categorización del material vegetal de frutilla producido *in vitro*, orientada a organizar secuencialmente el origen, calidad y destino del material vegetal propagado bajo condiciones de laboratorio.

Tabla 14

Estructura preliminar de categorización

Categoría	Denominación	Descripción técnica	Uso propuesto
I	Planta Madre Elite (PME)	Material inicial sano, vigoroso y trazable	Conservación y multiplicación inicial
II	Material Prebásico (MPB)	Vitroplantas producidas bajo condiciones controladas	Multiplicación <i>in vitro</i>
III	Material Básico (MB)	Material vegetal adaptado fisiológicamente	Aclimatación y vivero
IV	Plantín Certificado de Producción (PCP)	Material uniforme y potencialmente apto para producción	Productores

La propuesta planteada busca establecer una secuencia lógica de organización del material vegetal producido *in vitro*, considerando el origen del material, el proceso de multiplicación y el destino potencial del plantín. Asimismo, permite diferenciar etapas del material propagado, facilitando procesos de seguimiento y trazabilidad dentro del laboratorio.

3.4.7. Criterios mínimos de control de calidad del material vegetal

Considerando las características observadas durante el proceso de multiplicación y conservación del material regenerado, se propusieron criterios

mínimos de evaluación orientados al control básico de calidad del material vegetal producido *in vitro*.

Tabla 15

Criterio de control de calidad

Criterio evaluado	Indicador propuesto	Interpretación
Sanitario	Ausencia de contaminación visible	Material apto para conservación y multiplicación
Fisiológico	Vigor medio a alto	Adecuado crecimiento vegetativo
Morfológico	Uniformidad de hojas y brotes	Uniformidad preliminar del material vegetal
Trazabilidad	Registro de variedad, clon y subcultivo	Seguimiento del material

Los criterios anteriormente propuestos fueron establecidos tomando como referencia el comportamiento observado del material vegetal regenerado durante las fases de multiplicación y conservación. Durante el presente trabajo se observó que el material vegetal con mejores características fisiológicas presentó brotes vigorosos, adecuada coloración y ausencia de oxidación severa, permitiendo su conservación y continuidad en los procesos de multiplicación.

3.4.8. Potencial de implementación del sistema preliminar de categorización en Tarija

El planteamiento de un sistema preliminar de categorización y control de calidad de plantines de frutilla producidos *in vitro* representa una alternativa técnica con potencial de implementación en el contexto productivo del departamento de Tarija, especialmente frente a la necesidad de disponer de material vegetal con mejores condiciones sanitarias, fisiológicas y varietales.

Actualmente, gran parte del material propagativo utilizado en viveros y sistemas de producción de frutilla proviene de plantas cuya condición sanitaria y

fisiológica no siempre puede verificarse técnicamente, situación que puede favorecer la diseminación de enfermedades, pérdida de vigor y disminución de la uniformidad del cultivo.

Bajo una estructura preliminar de categorización podría contribuir a mejorar la organización, trazabilidad y seguimiento del material vegetal producido, favoreciendo procesos de multiplicación más controlados y la disponibilidad de plantines con mejores estándares de calidad.

Asimismo, esta propuesta podría constituir una base inicial para futuras estrategias institucionales relacionadas con producción local de plantines, fortalecimiento de viveros especializados y posibles sistemas de control sanitario del material vegetal propagativo en Tarija.

3.4.9. Consideración técnica final del esbozo

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo dirigido permitieron evidenciar la viabilidad técnica del proceso de propagación *in vitro* de frutilla, permitió establecer bases técnicas preliminares para el planteamiento de un sistema de categorización adaptado a las condiciones locales.

En este sentido, el presente esbozo constituye una propuesta inicial susceptible de fortalecimiento mediante futuras investigaciones, validaciones fitosanitarias y procesos de ajuste técnico, orientados a consolidar estrategias de producción y control de calidad de plantines de frutilla producidos *in vitro* en el departamento de Tarija.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Capítulo IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se logró la obtención y establecimiento de vitroplantas de frutilla de las variedades San Andreas y Camino Real mediante cultivo de ápices meristemáticos, permitiendo regenerar material vegetal viable bajo condiciones controladas de laboratorio y dando cumplimiento al objetivo de obtención de vitroplantas.
- La multiplicación mediante subcultivos sucesivos permitió incrementar progresivamente el material vegetal regenerado, alcanzándose un total de 996 vitroplantas, distribuidas en 504 vitroplantas de la variedad San Andreas y 492 de Camino Real, resultados próximos a la meta planteada de aproximadamente 500 plantas por variedad, evidenciando una adecuada respuesta regenerativa bajo condiciones *in vitro*.
- El comportamiento de los clones evaluados permitió evidenciar diferencias en la capacidad de multiplicación *in vitro*, observándose mayor vigor y capacidad regenerativa en los clones 14 de San Andreas y 13 de Camino Real, los cuales presentaron mejor desarrollo vegetativo y mayor producción de brotes durante los subcultivos.
- El registro, organización y codificación del material vegetal regenerado permitió fortalecer la trazabilidad del germoplasma conservado, facilitando el seguimiento por variedad, clon y etapa de multiplicación, contribuyendo a la renovación y organización del banco de germoplasma de frutilla del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la FCAyF.
- Durante el proceso de multiplicación se registró la pérdida de dos frascos de la variedad Camino Real por oxidación fenólica, sin afectar significativamente la producción final del material vegetal, permitiendo mantener la viabilidad técnica del proceso de propagación *in vitro*.

- Finalmente, se elaboró un esbozo preliminar de propuesta de categorización y control de calidad de plantines de frutilla producidos *in vitro* en Tarija, sustentado en criterios sanitarios, fisiológicos y de trazabilidad observados durante el presente trabajo dirigido, constituyéndose en una base técnica inicial orientada al fortalecimiento de futuros sistemas de producción y control del material vegetal propagativo.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda continuar con procesos periódicos de renovación del banco de germoplasma de frutilla mediante técnicas de cultivo *in vitro*, con el fin de conservar material vegetal fisiológicamente vigoroso y reducir riesgos asociados al envejecimiento del material propagativo.
- Se recomienda optimizar el control de oxidación fenólica durante las fases de establecimiento y multiplicación mediante ajustes en la manipulación del material vegetal y el empleo de antioxidantes, con el propósito de minimizar pérdidas durante el proceso de micropropagación.
- Se sugiere ampliar futuras investigaciones hacia las fases de enraizamiento, aclimatación y evaluación en vivero, permitiendo validar el comportamiento fisiológico y productivo del material vegetal regenerado bajo condiciones *ex vitro*.
- Se recomienda incorporar progresivamente herramientas complementarias de diagnóstico fitosanitario, como técnicas moleculares (PCR) o pruebas serológicas, orientadas a fortalecer el control sanitario del material vegetal propagado *in vitro*.
- Se recomienda fortalecer los sistemas de registro y trazabilidad del banco de germoplasma mediante formatos digitales complementarios, facilitando el seguimiento técnico del material vegetal conservado por variedad, clon y etapa de multiplicación.

- Se sugiere considerar el presente esbozo de propuesta como una base técnica preliminar para futuras estrategias de categorización y control de calidad de plantines de frutilla producidos *in vitro* en Tarija, promoviendo procesos más organizados de producción vegetal y fortalecimiento de viveros especializados.