

INTRODUCCIÓN

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 (Sozzi, 2008). Además, posee una gran versatilidad en su consumo tanto fresco como industrializado, lo que impulsa su demanda tanto en mercados locales como internacionales.

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 (Shaw & Larson, 2008). 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.

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 (Weather Spark, 2024).

Tal es que en las gestiones 2022 y 2023 se han importado de la Argentina más de 200.000 plantines de frutilla por un valor que supera los 2.000.000 de bolivianos. Actualmente, debido a la caída del valor del dinero boliviano en el ámbito del comercio internacional se dificulta la importación de plantines de frutilla para emplearlos en la producción local de esta apreciada fruta (El País, 2023)

Descripción del problema.

A pesar del potencial agroclimatalógico que tiene el departamento de Tarija para la producción rentable de la frutilla, actualmente afronta una limitación técnica fundamental referida a la falta de productores/proveedores locales de plantines (material genético) de alta calidad y libre de patógenos.

De acuerdo datos del INIAF (2023), a nivel nacional no se reportan productores de material Prebásico de Frutilla (plantines provenientes de cultivo *in vitro*), consecuentemente, es una práctica tradicional la propagación del cultivo a través de estolones obtenidos de parcelas de producción comercial, lo cual acarrea problemas de propagación de plagas y el envejecimiento acumulado de las plantas madre.

Ante esta situación se ha generado una creciente dependencia de plantines importados de Argentina y Chile, lo cual representa, además de la salida de recursos económicos del país, un riesgo para la producción en términos de disponibilidad de plantines en

volúmenes y épocas adecuadas para la plantación en campo, a lo que se suma la posibilidad de introducir plagas cuarentenarias, dada cuenta que muchas veces el material genético se importa vía contrabando.

Actualmente, la importación de plantines de frutilla no es favorable económicamente dada la situación económica del entorno a nuestro país, por tanto, se deben realizar los esfuerzos necesarios para desarrollar un sistema propio de producción de plantines de alta calidad genética y sanitaria.

Planteamiento del problema.

Uno de los factores que contribuye a esta situación es la escasa disponibilidad de técnicas estandarizadas para la producción eficiente de plantines, lo que ocasiona un establecimiento irregular de las plantaciones y una reducción del rendimiento.

La propagación vegetativa de frutilla depende en gran medida del uso adecuado de fitorreguladores, los cuales influyen directamente en la formación de raíces, brotes y la vigorosidad del material propagado. No obstante, no se cuenta con información local que determine las dosis óptimas de reguladores de crecimiento como AIB, ANA y BAP para mejorar la producción de plantines en las condiciones de Tarija.

La falta de un protocolo estandarizado limita la capacidad de los productores y viveristas el acceso a material vegetativo sano, homogéneo y vigoroso, afectando la rentabilidad del cultivo.

Justificación.

La micropropagación ofrece una solución efectiva para producir plantas de frutilla libres de enfermedades y de alta calidad genética. Esta técnica permite la multiplicación rápida y masiva de plantas a partir de explantes pequeños, asegurando uniformidad y sanidad.

Ante esta situación el Laboratorio de Fitopatología y cultivo *in vitro* ha decidido encarar trabajos de investigación dirigidos a brindar una alternativa de solución al problema identificado (falta de material genético de alta calidad genética y sanitaria)

logrando la introducción *in vitro* de la variedad San Andreas a partir de tejido meristemático, así mismo ha logrado establecer un protocolo de multiplicación *in vitro*.

En consecuencia, resta realizar trabajos de investigación referidas a la Fase III del cultivo *in vitro* – Enraizamiento, con el objetivo de lograr vitroplantas con buena calidad de raíces que permitan a futuro realizar ensayos de Aclimatación del material genético obtenido y finalmente obtener plantas madre de frutilla que se ponga a disposición del productor frutillero de Tarija.

Por tanto, se justifica la realización del trabajo propuesto ensayando diferentes concentraciones de fitorreguladores AIB, ANA y BAP, esperando lograr un buen desarrollo de raíces *in vitro*.

Objetivos

Objetivo general

- ❖ Optimización del proceso de enraizamiento *in vitro* de la frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch. Var. San Andreas) mediante la aplicación de diferentes niveles de dos auxinas en el medio de cultivo MS 1962, para establecer un protocolo de producción de vitroplantas enraizadas, como parte de un protocolo de producción de plantas madre en la FCAYF.

Objetivo Específicos.

- ❖ Determinar el efecto de diferentes dosis de AIB, ANA y BAP en el medio de cultivo Murashigue & Skoog (1962) para promover la generación óptima de raíces (número y tamaño) en vitroplantas de Frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch. Var. San Andreas)
- ❖ Identificar la interacción entre los factores AIB × ANA × BAP Murashigue & Skoog (1962) y su influencia en la calidad del material obtenido (vigor de vitroplantas) en condiciones *in vitro*.

Hipótesis.

Ha₁: Al menos una de las combinaciones de dosis de fitorreguladores promoverá un buen desarrollo de raíces adventicias de la Frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch. Var. San Andreas) durante la fase de enraizamiento *in vitro*.

Ho₁: No existe diferencias en el efecto de las diferentes dosis de fitorreguladores en el desarrollo de raíces adventicias de Frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch. Var. San Andreas) durante la fase de enraizamiento *in vitro*.

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* Duch (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.

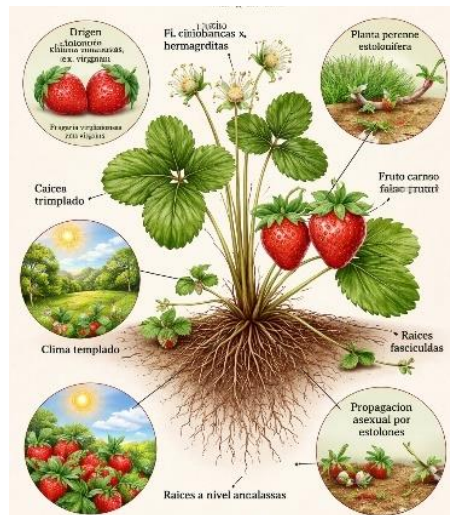
El nombre "ananassa" hace referencia al aroma similar al de la piña (ananas) que poseían algunos de los primeros híbridos. El primer científico que documentó y describió este nuevo híbrido fue Antoine Nicolas Duchesne en 1766, quien publicó su obra *Histoire Naturelle des Fraisiers*, donde propuso el 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.).

Figura 1 :Características de la frutilla



Fuente: (elaboración propia)

1.3.Taxonomía de la frutilla

Reino	Vegetal
Phylum	Magnoliophyta
División	Tracheophyta
Sub división	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub clase	Rosoidae
Grado Evolutivo	Metachlamideae
Grupo de Órdenes	Cáliz dialisépalo
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Nombre científico	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> Duch.
Nombre común	Frutilla

Fuente: (Herbario Universitario, 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, 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, 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. (Reilly, 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)

1.5.1. Cultivos *in vitro* en Bolivia

En Bolivia existe cerca de 18 laboratorios inscritos en REDBIO, aunque el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales no pasa de los 25 años. Su aplicación práctica en el campo agrícola es la conservación de recursos fitogenéticos y la generación de plantas de alta calidad genética y sanitaria, factibles de ser certificadas. Estas técnicas son aplicadas a la conservación de tubérculos, raíces, frutales y últimamente, especies forestales. Los laboratorios bolivianos se aglutinan en torno a la REDBIO Bolivia,

misma que permite formar parte de los 750 laboratorios de biotecnología vegetal registrados en toda Latinoamérica y el Caribe (Ávila e Izquierdo, 2006).

Actualmente, las técnicas de cultivo de tejidos más utilizadas en Bolivia son las siguientes:

- La limpieza viral para la obtención de plantas libres de patógenos.
- La micropropagación a gran escala de plantas, que genera semilla certificada de alta categoría en el caso de papa y de material vegetal con alta calidad genética y fitosanitaria en especies aún no incluidas en el proceso formal de producción certificada.
- La conservación in vitro como componente de la estrategia de conservación de los bancos de germoplasma de especies multiplicadas vegetativamente o de semilla recalcitrante.

Estas técnicas, impulsadas por los centros de investigación y universidades, han beneficiado a empresas, productores, comunidades campesinas y agricultores al poder ofertar materiales de alta calidad sanitaria. Esta aplicación ha fortalecido a entidades vigentes anteriormente como el Programa Nacional de Semillas y el Sistema Nacional para la Conservación de Recursos Genéticos para la Agricultura y la Alimentación (SINARGEAA). La aplicación del cultivo de tejidos en Bolivia (VMARNDF, 1999) inicia en 1986 con la Unidad de Producción de Semilla de Papa (SEPA), que basa su estrategia para la producción de cerca de 3.000 toneladas anuales de semilla de papa, a partir de plántulas libres 7 UMSS - CIUF 1 Red Latinoamericana de Biotecnología. www.redbio.org de enfermedades mediante el cultivo de tejidos in vitro. Los mecanismos de control interno de calidad, entre ellos el test de ELISA para detectar la eventual presencia de virus, están sujetos a un cronograma tanto para las plántulas de laboratorio como de invernadero.

1.5.2. Micropropagación

Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades—La

micropropagación se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por ingeniería genética, mutagénesis o mejora genética. Se utiliza también la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente.

La micropropagación de plantas In Vitro es una técnica que consiste en propagar plantas de forma asexual. Con este método replicamos plantas a partir de un explante, a partir de hojas, tallos, raíces, semillas o cualquier otro órgano, para cultivarlo en un laboratorio.

De esta forma podemos crear un ambiente artificial y controlarlo, por ejemplo, la temperatura, la humedad, nutrientes esenciales, entre otros que nos permiten asegurar un crecimiento exitoso.

El resultado de este proceso son plantas idénticas a la planta madre de la que se tomó el explante. Sus frutos y demás características tendrán el mismo sabor, tamaño, color, resistencia a enfermedades, al medio ambiente, entre otros.

Esta técnica se utiliza para multiplicar plantas mejoradas genéticamente, especímenes únicos que cuentan con características ideales o para acelerar el mejoramiento u obtener abundante material para investigaciones

Etapas de la micropropagación (BIOPLAN IN VITRO. s f, s.f.)

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- FASE 0: Selección y Preparación de la planta madre
- FASE 1: Introducción del material seleccionado in vitro
- FASE 2: Multiplicación de brotes
- FASE 3: Enraizamiento
- FASE 4: Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas in vitro; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir

simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación in vitro.

1.5.2.1.Fase 0: Selección: preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

1.5.2.2.Fase 1: Introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro. (Alicia Castillo, 2004)

1.5.2.3.Fase 2: multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivan la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

1.5.2.4.Fase 3: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Alicia Castillo, 2004)

1.5.2.5.Fase 4: Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. La siguiente lista presenta una comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (in vitro) respecto a una planta en condiciones naturales (in vivo). (Alicia Castillo, 2004)

1.5.3. Fisiología in vitro – in vivo

1.5.3.1. In vitro

- No realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa
- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radicales
- Ausencia de cera en la cutícula (Alicia Castillo, 2004)

1.5.3.2. In vivo

- Realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radicales
- Presencia de cera en la cutícula

Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando. (Alicia Castillo, 2004)

1.5.4. Dos características fundamentales a tener en cuenta en el cultivo in vitro.

a) *La asepsia* (ausencia de gérmenes)

b) *Factores que afectan el crecimiento.*

1.5.4.1. Ambiente químico

- Composición del medio de cultivo
- pH

1.5.4.2. Ambiente físico

- temperatura
- luz y fotoperíodo
- humedad. (Giambiasi, 2007)

a) Ventajas de la técnica de CTV

- Producción de gran número de plantas.
- Obtención de plantas en cualquier época del año
- Almacenamiento de plantas en poco espacio
- Producción de plantas libres de contaminación, enfermedades y plagas
- Herramienta para el fitomejoramiento: plantas mejoradas
- Propagación de especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción
- Clonación de individuos "élite", son desempeño agronómico destacado
- Obtención de plantas libres de virus
- Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma: material de un conjunto de individuos que representa la variabilidad genética de una población vegetal
- Obtención de metabolitos secundarios

- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas
- Germinación de semillas
- Producción de haploides y dobles haploides
- Estudios fisiológicos diversos (Rivas, 2016)

b) Desventajas de la técnica *in vitro*.

- No todas las especies son viables de propagar *in vitro*; algunas son recalcitrantes.
- Cada especie requiere de métodos específicos
- La estandarización de protocolos resulta costosa (Rivas, 2016)

1.5.5. Sustancias de crecimiento. (hormonas)

Las plantas dentro de su desarrollo requieren de reguladores hormonales, capaces de controlar toda la actividad metabólica en función de garantizar la homeostasis intracelular y extracelular. Cada fitohormona de acuerdo con su estructura química realiza diferentes interacciones para poder cumplir con sus funciones. Las principales fitohormonas utilizadas en el crecimiento vegetal son las auxinas, giberelinas, citoquininas, entre otras.

1.5.5.1. Auxinas

Son un tipo de fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (4). Esta suele encontrarse muy bien distribuida en la mayoría de las células y tejidos vegetales, por lo que puede interferir en procesos de diferenciación unicelular, pluricelular o incluso tener acción en los diferentes tejidos vegetales. Dadas las funciones que posee esta hormona es considerada como un tipo de morfógeno capaz

de inducir la diferenciación celular de órganos como raíces, tallos y hojas, y así mismo, dar origen a ellos (5,6). (Cortes1, 2019)

1.5.5.2.Giberelinas

Las giberelinas, también conocidas como ácidos giberélicos, tuvieron su primera aparición en años cercanos a la década de 1930, cuando algunos científicos analizaron por primera vez algunas fitopatologías relacionadas con el arroz. Dentro de esta investigación se pudo observar la asociación de un hongo que anteriormente era conocido como *Gibberella fugikuroi* como agente etiológico de la enfermedad “bakanae” en co (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA). (Cortes1, 2019)

1.5.5.3.Citoquininas

Las citoquininas son un tipo de fitohormonas específicas derivadas de la adenina que tuvieron su primera aparición entre los años de 1940 y 1950, cuando Caplin y Steward, (1948) empezaron a estudiar el efecto que podía tener el extracto de levadura y el jugo de tomate sobre el crecimiento vegetal. Durante este estudio se pudo observar que estas sustancias tenían la capacidad de iniciar y sustentar la proliferación de tejidos madre cuando eran aplicadas sobre organismos vegetales en pequeñas cantidades (15). Con el paso del tiempo fueron estudiándose otros tipos de sustancias que podían tener un efecto similar, encontrando en el agua de coco una de las primeras citoquininas que fue aislada y reconocida por primera vez como la zeatina (proveniente del endospermo inmaduro del maíz) (16,17)

Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogé- 118 NOVA. 2019; 17 (32): 109-129 nico vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal. (Cortes1, 2019)

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización

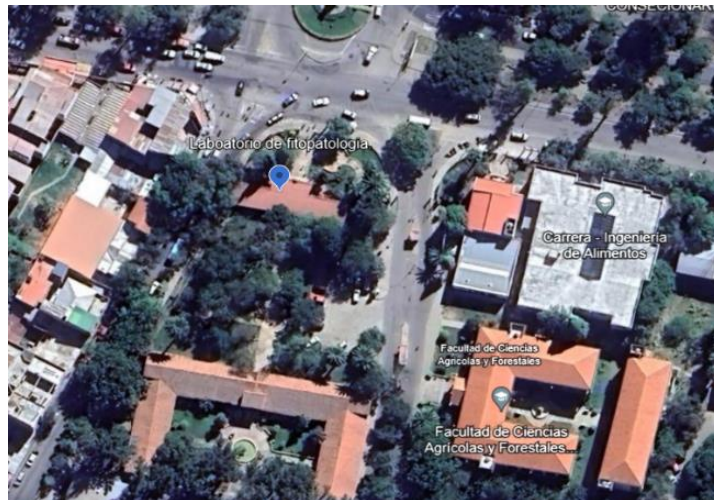
El presente trabajo de investigación se realizará en la zona el tejear municipio de cercado en el departamento de Tarija,

2.1.1. Ubicación

Ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y $15'$ de latitud sur, y los meridianos $64^{\circ}21''$ y $65^{\circ}05'$ de latitud oeste con una altura promedio de 1850 m.s.n.m, 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" (Maldonado, 2018).

Coordenadas: $21^{\circ}32'31''\text{S}$ $64^{\circ}43'19''\text{W}$

Figura 2: *Ubicación del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo in vitro.*



Fuente: (Earth google, 2024)

2.2. Materiales

Se utilizarán diferentes materiales para la elaboración de esta investigación.

2.2.1. Material vegetal

Se utilizará vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas) que actualmente están en proceso de multiplicación, las cuales fueron obtenidas por cultivo de meristemos en el Laboratorio de Fitopatología y cultivo *in vitro*.

Figura 3: Vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)



2.2.2. Equipos, reactivos e instrumental de laboratorio

Material escritorio

- Cuaderno
- Lápiz
- Borrador
- Computadora
- Impresora

Productos químicos

- Componentes del medio Murashige & Skoog 1962
- AIB Acido Indolbutirico
- ANA Ácido Naftalenacético
- BAP Bencilaminopurine
- Agar.
- Alcohol.
- Agua destilada

Equipo de laboratorio

- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- pH metro.
- Balanzas de precisión.
- Agitador.
- Horno de esterilización.
- Refrigerador.
- Temporizador.

Materiales

- Vasos de vidrio.
- Pipeta.
- Probeta.
- Mechero.
- Tubos Fisher.
- Bisturí.
- Pinzas.
- Encendedor

2.3. Metodología.**2.3.1. Diseño Experimental**

Se aplicó un diseño experimental trifactorial (3x2x2) con 12 tratamientos y 5 repeticiones haciendo un total de 60 unidades experimentales distribuidas completamente al azar. Y de acuerdo a los resultados se realizarán pruebas comparativas de medias Tuckey (0,5).

2.3.1.1. Variables de estudio.

Los factores de estudio fueron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento añadidos al medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) para promover el desarrollo balanceado de vitroplantas (buenas raíces y plantas vigorosas para una óptima aclimatación), dicho reguladores se dosificaron en los siguientes niveles:

- Factor A (AIB): 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L
- Factor B (ANA): 0.1 mg/L, 0.2 mg/L
- Factor C (BAP): 0.5 mg/L, 1.0 mg/L

Tabla 1: *Distribución de tratamientos en unidades experimentales y repeticiones*

AIB	ANA	BAP	Trats.	R1	R2	R3	R4	R5
0.0	0,1	0,5	T1					
		1.0	T2					
	0,2	0,5	T3					
		1.0	T4					
0,5	0,1	0,5	T5					
		1.0	T6					
	0,2	0,5	T7					
		1.0	T8					
1.0	0,1	0,5	T9					
		1.0	T10					
	0,2	0,5	T11					
		1.0	T12					

Cada unidad experimental consistió en un tubo Fisher de vidrio con 10 ml de medio de cultivo, con un explante de frutilla.

Las condiciones de cultivo en sala de crecimiento fueron: Temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo (800Lux) 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

2.3.1.2. Variables de respuesta

Se espera que las combinaciones de concentraciones de AIB, ANA y BAP influyeran de manera significativa la formación de raíces y el vigor de las vitroplantas de frutilla. Se anticipa que las combinaciones más altas de estas auxinas favorezcan tanto el número de raíces como el tamaño y la calidad del vigor de las plantas.

a) Crecimiento de raíces

Luego de un periodo de crecimiento de 60 días se realizó una medición del tamaño de raíces para lo cual se utilizará una regla graduada.

Los datos de crecimiento de las raíces se recopilarán en función de la longitud medida, esto permitirá determinar si las diferencias observadas en el crecimiento de raíces entre los tratamientos son estadísticamente significativas.

b) Número de raíces

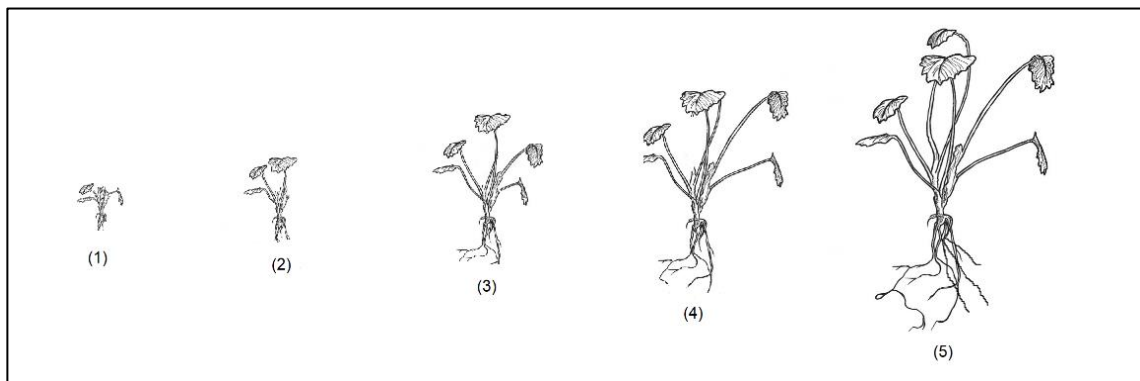
Se evaluará visualmente cada plántula, donde se contará y registrará de manera exhaustiva el número de raíces de cada vitroplanta individualmente.

c) Vigor de las vitroplantas.

Para la estimación del vigor se utilizará una escala comparativa de desarrollo de vitroplantas.

Cada unidad experimental recibirá una puntuación basada en su apariencia general y desarrollo. Estos datos serán analizados y permitirán identificar qué combinaciones de fitorreguladores favorecen el mejor desarrollo de las vitroplantas.

Figura 4: *Plantilla para la evaluación del vigor de vitroplantas de Frutilla (Fragaria × ananassa Duch. Var. San Andreas)*



Fuente: Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* (2025)

Descripción de Plantilla:

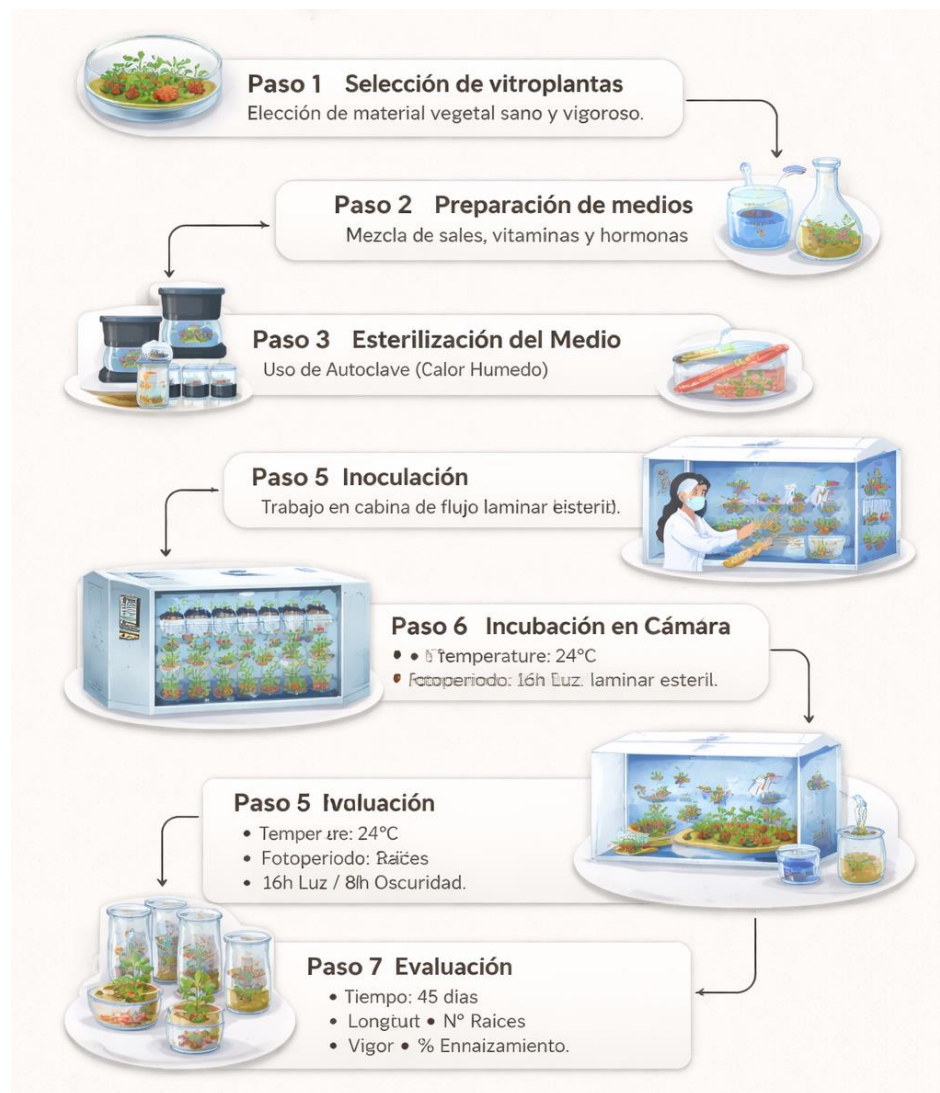
- Excelente (5): ≥ 4 raíces largas, buen porte de hojas turgentes, vitroplanta vigorosa
- Bueno (4): 3–4 raíces moderadas, crecimiento uniforme buen vigor.

- Medio (3): 2–3 raíces cortas, vigor limitado.
- Regular (2): 1–2 raíces débiles, vitroplanta pequeña, vigor pobre.
- Malo (1): sin raíces/explante sin desarrollo.

2.3.2. Procedimiento experimental.

A continuación, se muestra un esquema del procedimiento a seguir en el desarrollo del trabajo de investigación:

Figura 5: *Flujo de proceso (elaboración propia)*



Fuente: Elaboración propia.

2.3.2.1. Selección de vitroplantas.

La selección de vitroplantas es una etapa crítica de la micropropagación, ya que ello garantiza que las unidades experimentales sean homogéneas, en consecuencia, se emplearán vitroplantas con características morfológicas uniformes.

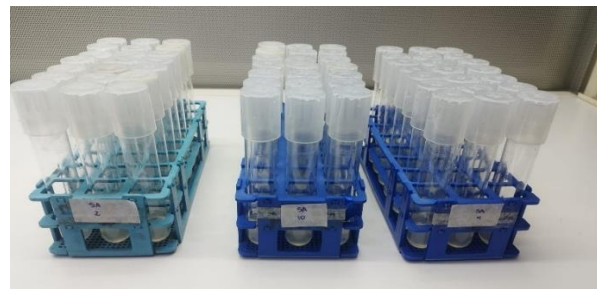
2.3.2.2. Preparación de medio de cultivo de enraizamiento.

Los medios de cultivo serán preparados de acuerdo a los tratamientos planteados en el diseño experimental, donde se empleará como medio base el Murashige y Skoog (sales inorgánicas y compuestos orgánicos) al cual se modificará los tratamientos ya descritos, para lo cual se dosificará los fitorreguladores a partir de soluciones Stock de concentraciones conocidas.

El pH de los medios se ajustará a 5.8 previo a la esterilización y como gelificante se utilizará agar, a razón de 7gr/L.

Luego de preparados los 12 medios de cultivo, serán dispensados en las unidades experimentales (tubos Fisher con 10 ml de medio) e identificados convenientemente.

Figura 6: *Preparación de medio de cultivo de enraizamiento.*



2.3.2.3.Esterilización del medio.

Los frascos se someterán a un proceso de esterilización por autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1. 5 atmosferas de presión.

Tras completar la esterilización, se enfriarán los frascos gradualmente a temperatura ambiente y se almacenarán en un lugar fresco y oscuro para mantener la calidad del medio de cultivo.

2.3.2.4.Esterilización de Material

Los materiales a utilizarse en el procedimiento, incluyendo pinzas, caja Petri, tubos de ensayo, bisturí, vasos de precipitados, serán esterilizados mediante calor seco. Para ello, se envolverán en doble papel y se someterán a una temperatura constante de 150°C en un horno durante un periodo de una hora y media. Este proceso garantiza la eliminación de cualquier contaminante microbiano presente en los materiales, asegurando así emplear materiales estériles.

Las superficies de trabajo se desinfectaron con alcohol al 96% antes de cada jornada de trabajo.

2.3.2.5.Inoculación/siembra de vitroplantas.

Las inoculaciones se realizarán dentro de una cabina de flujo laminar, empleando guantes y material previamente esterilizado.

Con pinzas y bisturíes estériles, los explante se colocarán con el cuello de la vitroplanta inmersa debajo la superficie del medio de cultivo.

Finalmente, los tubos serán cerrados con sus respectivas tapas y sellados con cinta plastifilm para evitar el ingreso de contaminantes saprofíticos.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

3.1.1. Número de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)

En la tabla siguiente se muestra los datos registrados del número de raíces de vitroplantas de los 12 tratamientos y 60 unidades experimentales.

Figura 7: Desarrollo de raíces de frutilla en 5 tubos de ensayo - Tratamientos 1 al 12



T1

T2

T3

T4

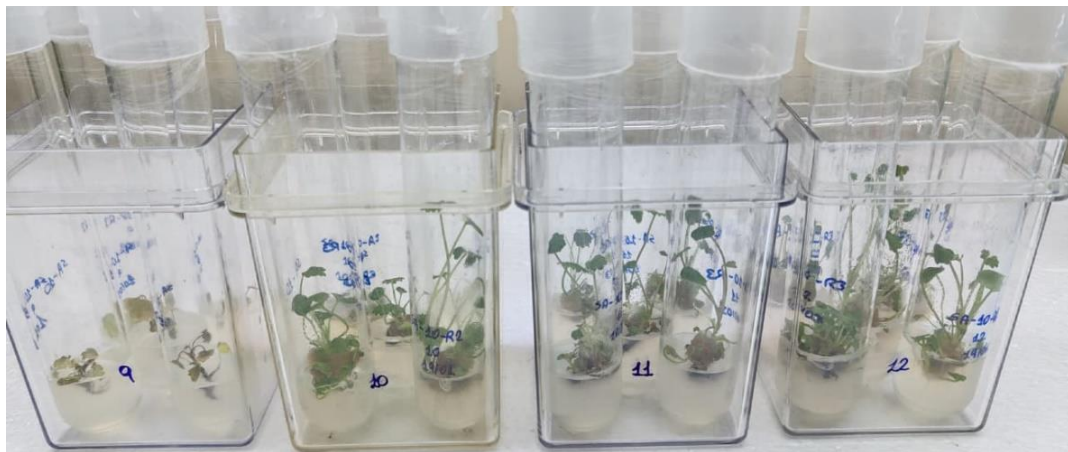


T5

T6

T7

T8



T9

T10

T11

T12

Figura 8: Desarrollo de raíces de frutilla en tubos de ensayo- Tratamientos 1 al 12

T1-SA-10

T2-SA-10

T3-SA-10

T4-SA-10



T5-SA-10



T6-SA-10



T7-SA-10



T8-SA-10



T9-SA-10



T10-SA-10



T11-SA-10



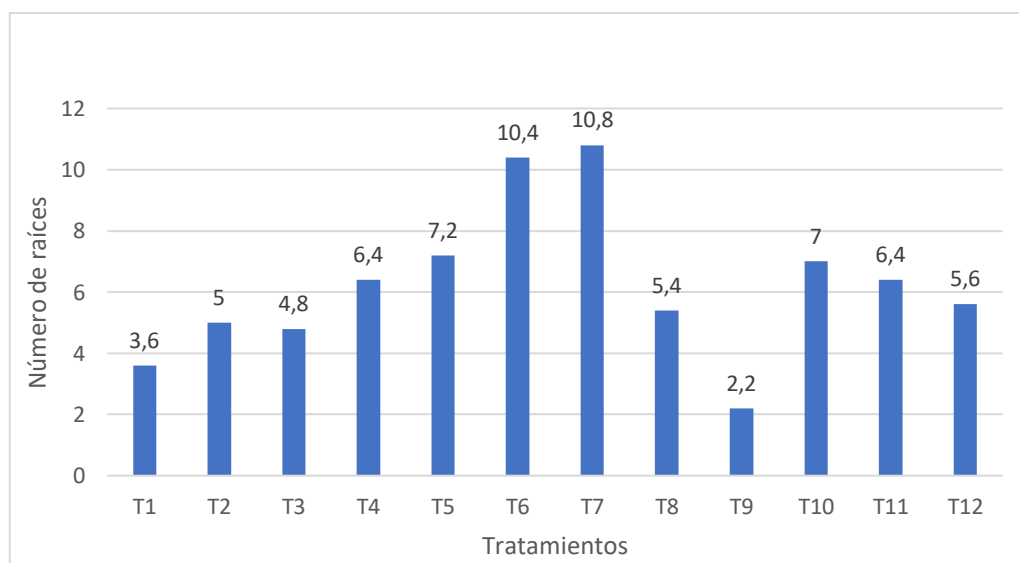
T12-SA-10



Tabla 2: Número de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)

AIB mg/L	ANA mg/L	BAP mg/L	Trats.	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{X}$
0,0	0,1	0,5	T1	4,0	3,0	4,0	3,0	4,0	18	3,6
0,0	0,1	1,0	T2	6,0	6,0	5,0	5,0	3,0	25	5,0
0,0	0,2	0,5	T3	5,0	6,0	5,0	4,0	4,0	24	4,8
0,0	0,2	1,0	T4	6,0	7,0	6,0	7,0	6,0	32	6,4
0,5	0,1	0,5	T5	7,0	8,0	8,0	7,0	6,0	36	7,2
0,5	0,1	1,0	T6	10,0	9,0	11,0	10,0	12,0	52	10,4
0,5	0,2	0,5	T7	11,0	10,0	12,0	9,0	12,0	54	10,8
0,5	0,2	1,0	T8	5,0	6,0	6,0	5,0	5,0	27	5,4
1,0	0,1	0,5	T9	4,0	4,0	0,0	0,0	3,0	11	2,2
1,0	0,1	1,0	T10	6,0	7,0	7,0	8,0	7,0	35	7,0
1,0	0,2	0,5	T11	7,0	6,0	6,0	7,0	6,0	32	6,4
1,0	0,2	1,0	T12	5,0	6,0	6,0	5,0	6,0	28	5,6

Figura 9: Promedio de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)



Con los datos de la Tabla N se realizó el análisis de varianza para el número de raíces.

Tabla 3: ANOVA del promedio de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)

F. de V.	GL	SC	CM	Valor F	Ft 5%	Ft 1%
Tratam.	11	338.3333333	30.7575758	30.50	1.99	2.64
AIB	2	148.6333333	74.3166667	73.70	3.19	5.08
ANA	1	6.6666667	6.6666667	6.61	4.04	7.19
BAP	1	9.6000000	9.6000000	9.52	4.04	7.19
AIB*ANA	2	14.0333333	7.0166667	6.96	3.19	5.08
AIB*BAP	2	27.7000000	13.8500000	13.74	3.19	5.08
ANA*BAP	1	81.6666667	81.6666667	80.99	4.04	7.19
AIB*ANA*BAP	2	50.0333333	25.0166667	24.81	3.19	5.08
Error	48	48.4000000	1.0083333			
Total	59	386.7333333				
CV		16.10949				

De acuerdo a la tabla de ANOVA, se observa que existe una interacción entre AIB*ANA*BAP que muestra diferencias altamente significativas para el número promedio de raíces de vitroplantas, por tal razón, se procede a realizar la prueba de comparación de medias.

Tabla 4: Comparación de medias DMS para número de raíces

AIB	ANA	BAP	Trat	$\bar{X}$	
AIB 0.5mg/L	ANA 0,2mg/L	BAP 0.5mg/L	7	10,8	A
AIB 0.5mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 1.0mg/L	6	10,4	A
AIB 0.5mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 0.5mg/L	5	7,2	B
AIB 1.0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 1.0mg/L	10	7,0	B
AIB 0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 1.0mg/L	4	6,4	B
AIB 1.0mg/L	ANA 0,2mg/L	BAP 0.5mg/L	11	6,4	B
AIB 1.0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 1.0mg/L	12	5,6	C
AIB 0.5mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 1.0mg/L	8	5,4	C
AIB 0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 1.0mg/L	2	5,0	C
AIB 0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 0.5mg/L	3	4,8	C
AIB 0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 0.5mg/L	1	3,6	D
AIB 1mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 0.5mg/L	9	2,2	E

De la tabla N4 se puede indicar que los tratamientos T7 y T6 con un promedio de raíces de 10,8 y 10,4 respectivamente lograron ser los mejores promotores de formación de raíces, seguidos de los tratamientos del grupo B que generaron un promedio de entre 7,2 y 6,4 raíces por vitroplanta, en tanto que los tratamientos del grupo C promovieron un promedio de 5,6 y 4,8 raíces por vitroplanta, Finalmente, con los tratamientos 1 y 9 apenas se lograron un promedio de 3,6 y 2,2 raíces por vitroplanta.

Soto (2004) obtuvo los mejores resultados de enraizamiento empleando AIB 1,0mg/L. con las variedades Camarosa, Aroma y Sweet Charlie.

Así mismo, Romero-Rivas, et al. (2023) con la variedad Aroma, empleando el medio Murashige & Skoog suplementado separadamente con MS+AIB (1,0mg/L) y MS+ANA(0,5mg/L) encontraron un número promedio de raíces por vitroplanta de 1.63

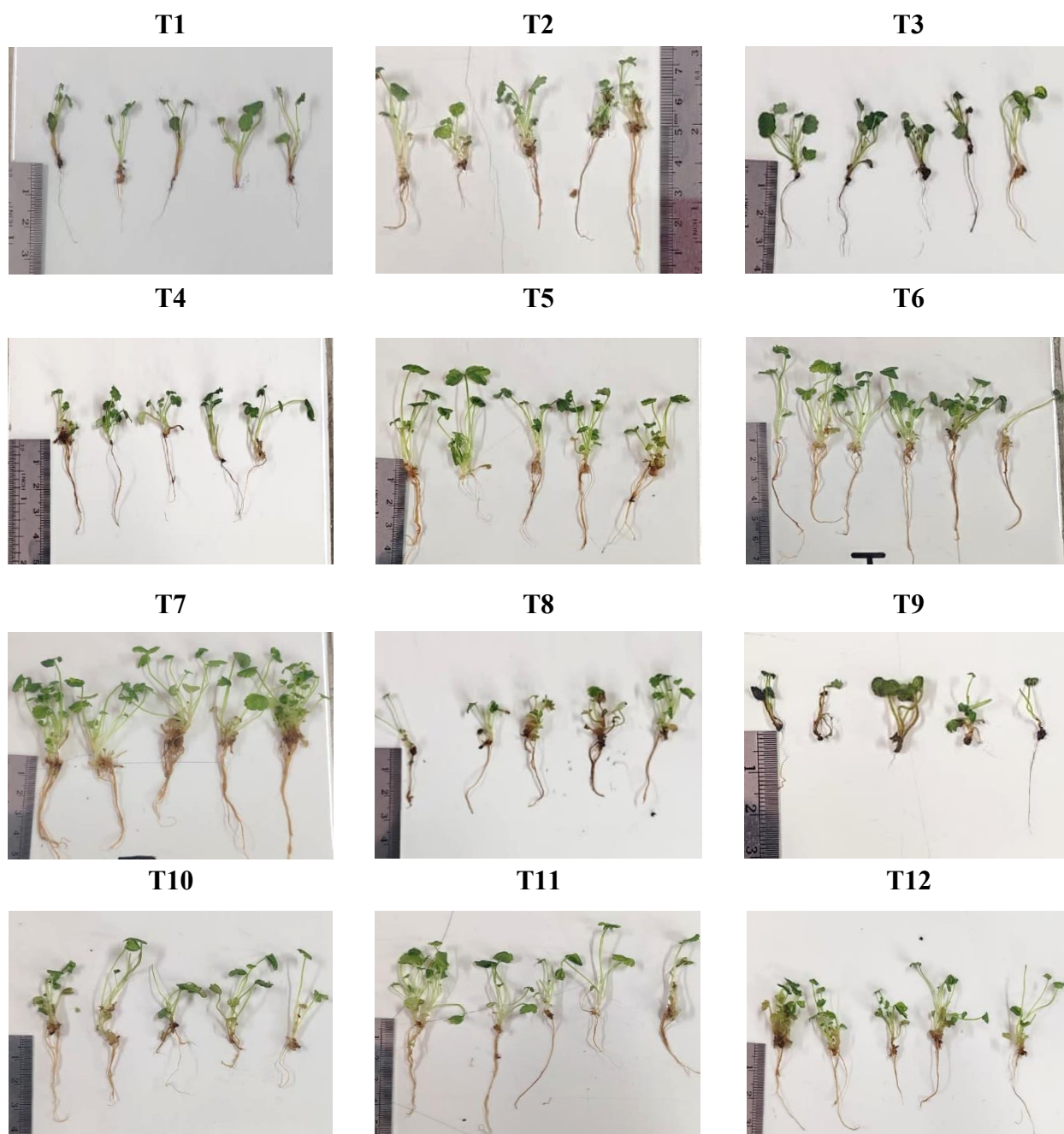
y 1.06 a los 32 días después de la inoculación, siendo nuestros resultados superiores, pero habiéndose evaluado a los 60 días de desarrollo.

Debemos mencionar que no logramos encontrar estudios que haya empleado simultáneamente 2 tipos de auxinas para el enraizamiento *in vitro* de la frutilla Var. San Andreas, y de manera experimental en este ensayo la interacción mostrada por los tratamientos T7 sugieren que los efectos de los reguladores de crecimiento (2 auxinas AIB 0,5mg/L y ANA0,2mg/L y la citoquinina BAP 0,5mg/L) podrían promover, de manera sinérgica, un buen desarrollo de raíces adventicias así como un desarrollo balanceado con la parte aérea de las vitroplantas aun empleando concentraciones menores de la auxina empleada para el enraizamiento *in vitro* de frutilla por Soto (2004) y Romero-Rivas, et al. (2023), con los resultados ya mencionados en el párrafo anterior.

Sin embargo, el resultado del segundo mejor tratamiento, T6 (AIB 0.5mg/L, ANA 0.1mg/L y BAP 1.0mg/L), y las diferentes combinaciones de fitoreguladores del resto de tratamientos muestran que los efectos de las dosis aplicadas no son aditivos, es decir, a mayor concentración de fitoreguladores mayor número de raíces o viceversa.

3.1.2. Longitud de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch. Var. San Andreas)

Figura 10: Longitud de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch. Var. San Andreas) en los 12 tratamientos y 60 unidades experimentales.

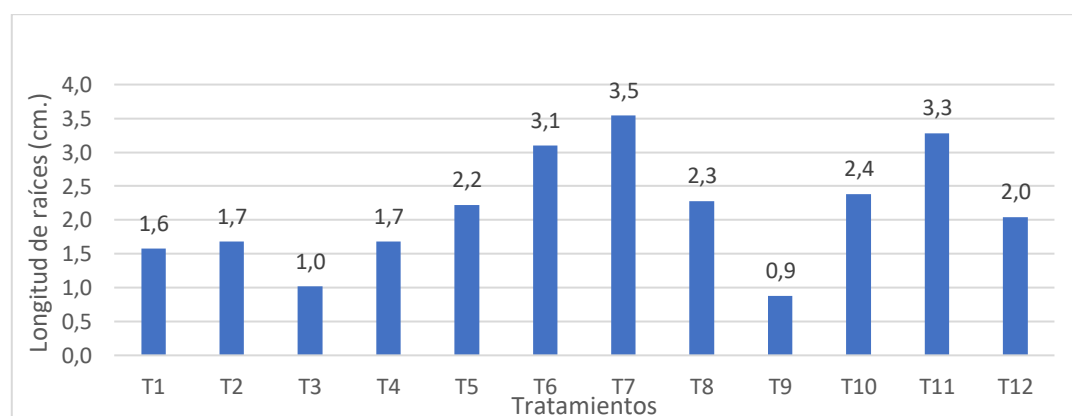


En la tabla 5 se muestra los datos registrados de la longitud de raíces de vitroplantas de frutilla en los 12 tratamientos y 60 unidades experimentales.

Tabla 5: Longitud de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch. Var. San Andreas)

AIB mg/L	ANA mg/L	BAP mg/L	Trats.	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{X}$
0,0	0,1	0,5	T1	1,5	1,3	1,0	1,2	2,9	7,9	1,6
0,0	0,1	1,0	T2	1,9	1,8	1,6	1,5	1,6	8,4	1,7
0,0	0,2	0,5	T3	1,3	1,0	0,9	0,9	1,0	5,1	1,0
0,0	0,2	1,0	T4	1,9	1,4	2,0	1,8	1,3	8,4	1,7
0,5	0,1	0,5	T5	2,4	2,3	2,2	2,0	2,2	11,1	2,2
0,5	0,1	1,0	T6	3,6	3,6	2,9	2,8	2,6	15,5	3,1
0,5	0,2	0,5	T7	3,5	4,5	3,8	2,9	3,0	17,7	3,5
0,5	0,2	1,0	T8	2,4	2,0	2,5	2,5	2,0	11,4	2,3
1,0	0,1	0,5	T9	1,5	1,4	0,0	0,0	1,5	4,4	0,9
1,0	0,1	1,0	T10	2,5	2,0	2,4	2,6	2,4	11,9	2,4
1,0	0,2	0,5	T11	3,2	3,2	3,3	3,2	3,5	16,4	3,3
1,0	0,2	1,0	T12	2,3	2,2	2,0	1,9	1,8	10,2	2,0

Figura 11: Longitud de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch. Var. San Andreas)



Con los datos de la Tabla N se realizó el análisis de varianza para la longitud de raíces.

Tabla 6: ANOVA de longitud de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. *San Andreas*)

F. de V.	GL	SC	CM	Valor F	Ft 5%	Ft 1%
Tratam.	11	39.26800000	3.56981818	19.31	1.99	2.64
AIB	2	16.77100000	8.38550000	45.35	3.19	5.08
ANA	1	1.66666667	1.66666667	9.01	4.04	7.19
BAP	1	0.17066667	0.17066667	0.92	4.04	7.19
AIB*ANA	2	4.34233333	2.17116667	11.74	3.19	5.08
AIB*BAP	2	0.81633333	0.40816667	2.21	3.19	5.08
ANA*BAP	1	7.77600000	7.77600000	42.05	4.04	7.19
AIB*ANA*BAP	2	7.72500000	3.86250000	20.89	3.19	5.08
Error	48	8.87600000	0.18491667			
Total	59	48.14400000				
CV	20.09436					

De acuerdo a la tabla de ANOVA, se observa que para la variable respuesta longitud promedio de raíces de vitroplantas existe una interacción entre AIB*ANA*BAP cuya F_{cal} es mayor que $F_{tab}(0.01)$ indicando la existencia de diferencias altamente significativas, por tal razón, se procede a realizar la prueba de comparación de medias.

Tabla 7: Comparación de medias DMS para longitud de raíces

AIB	ANA	BAP	Trat	$\bar{X}$	
AIB 0.5mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 0.5mg/L	7	3,54	A
AIB 1.0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 0.5mg/L	11	3,28	A
AIB 0.5mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 1.0mg/L	6	3,1	A
AIB 1.0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 1.0mg/L	10	2,38	B
AIB 0.5mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 1.0mg/L	8	2,28	B
AIB 0.5mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 0.5mg/L	5	2,22	B
AIB 1.0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 1,0mg/L	12	2,04	B
AIB 0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 1.0mg/L	2	1,68	C
AIB 0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 1.0mg/L	4	1,68	C
AIB 0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 0.5mg/L	1	1,58	C
AIB 0mg/L	ANA 0.2mg/L	BAP 0.5mg/L	3	1,02	D
AIB 1.0mg/L	ANA 0.1mg/L	BAP 0,5mg/L	9	0,88	D

De la tabla N7 se puede indicar que los tratamientos T7, T11 y T6 con promedios de longitud de raíces de vitroplantas de 3.54cm, 3.28cm y 3.1cm respectivamente, lograron obtener los mejores resultados para la variable longitud de raíces, seguidos de los tratamientos del grupo B que generaron un promedio de longitud de raíces de entre 2.38cm, 2.28cm, 2.22cm y 2.04cm respectivamente, en tanto que los tratamientos del grupo C promovieron un promedio de 1.68cm y 1.58cm de longitud de raíces por vitroplanta, Finalmente, con los tratamientos T3 y T9 apenas se lograron un promedio de 1.02cm y 0.88cm de longitud de raíces por vitroplanta.

Para la misma variable de respuesta, longitud de raíces, Romero-Rivas, *et al.* (2023) con la variedad Aroma, empleando el medio MS suplementado separadamente con AIB (1,0mg/L) y ANA(0,5mg/L) obtuvo una longitud promedio de raíces de 2,09 y 1,17 cm, respectivamente y a los 32 días después de la inoculación. Sin embargo, nuestros resultados son superiores siendo evaluados a los 60 días después de la inoculación.

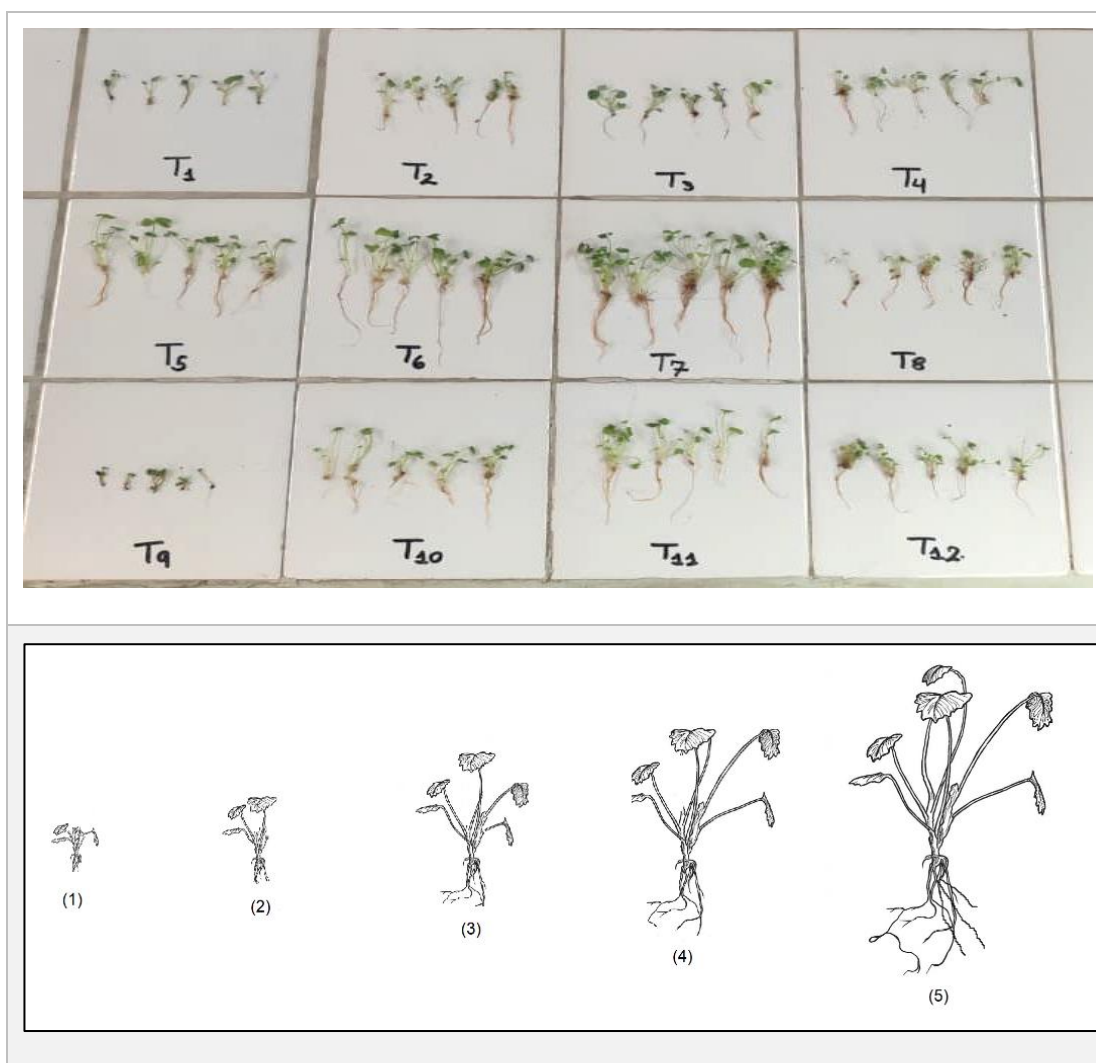
De manera similar que con la anterior variable respuesta no logramos encontrar estudios que empleasen simultáneamente 2 tipos de auxinas para el enraizamiento *in vitro* de la frutilla Var. San Andreas, y de manera experimental en nuestro ensayo la interacción mostrada por los tratamientos T7, T11 y T6 sugieren que los efectos de los reguladores de crecimiento podrían promover un buen desarrollo de raíces adventicias de manera sinérgica aun empleando concentraciones menores de la auxina empleada para el enraizamiento *in vitro* de frutilla por Soto (2004) quien tuvo los mejores resultados de enraizamiento empleando AIB 1,0mg/L.

Sin embargo, los resultados con las dosis del segundo y tercer mejor tratamiento, T11 y T6 y las diferentes combinaciones de fitorreguladores del resto de tratamientos muestran que los efectos de las dosis aplicadas no son aditivos, es decir, a mayor concentración de fitorreguladores mayor número de raíces o viceversa.

3.1.3. Vigor de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)

En la tabla siguiente se muestra los datos registrados de la longitud de raíces de vitroplantas de frutilla en los 12 tratamientos y 60 unidades experimentales.

Figura 12: Vigor de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)

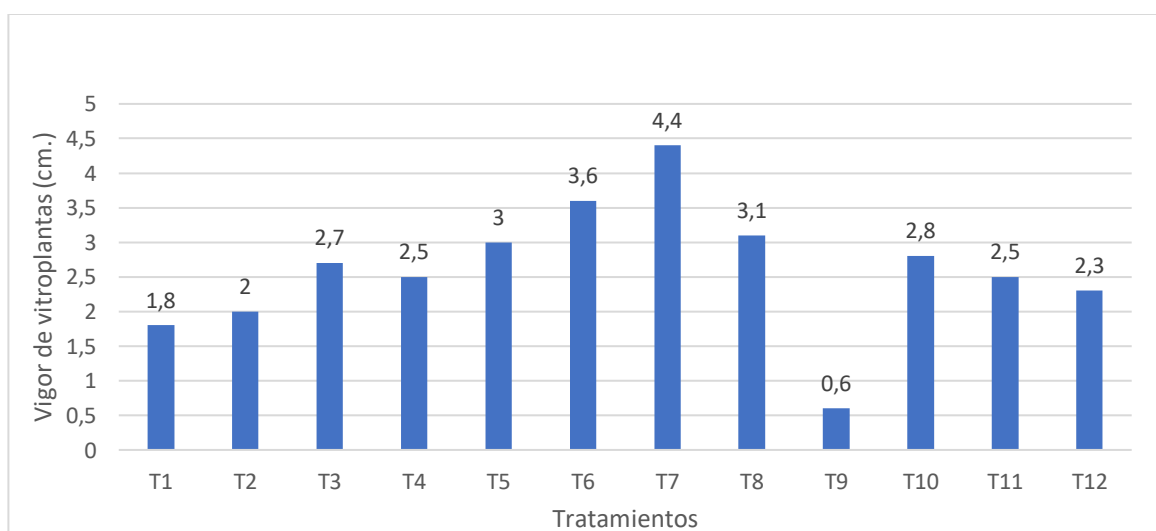


Vigor de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas) en los 12 tratamientos y 60 unidades experimentales.

Tabla 8: *Vigor de vitroplantas de Frutilla (Fragaria × ananassa Duch. Var. San Andreas)*

AIB mg/L	ANA mg/L	BAP mg/L	Trats.	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{X}$
0,0	0,1	0,5	T1	2,0	2,5	1,5	1,5	1,5	9	1,8
0,0	0,1	1,0	T2	1,5	2,0	2,0	2,5	2,0	10	2,0
0,0	0,2	0,5	T3	2,5	3,0	3,0	3,0	2,0	13,5	2,7
0,0	0,2	1,0	T4	3,0	2,0	2,5	2,5	2,5	12,5	2,5
0,5	0,1	0,5	T5	3,0	3,0	3,0	2,5	3,5	15	3,0
0,5	0,1	1,0	T6	4,0	3,0	4,0	4,0	3,0	18	3,6
0,5	0,2	0,5	T7	4,0	4,0	5,0	4,0	5,0	22	4,4
0,5	0,2	1,0	T8	3,0	3,0	3,0	3,5	3,0	15,5	3,1
1,0	0,1	0,5	T9	1,0	1,0	0,0	0,0	1,0	3	0,6
1,0	0,1	1,0	T10	2,5	3,0	3,0	2,5	3,0	14	2,8
1,0	0,2	0,5	T11	2,0	3,0	2,0	3,0	2,5	12,5	2,5
1,0	0,2	1,0	T12	2,5	2,5	2,0	2,0	2,5	11,5	2,3

Figura 13: *Vigor de vitroplantas de Frutilla (Fragaria × ananassa Duch. Var. San Andreas)*



Con los datos de la Tabla N 8 se realizó el análisis de varianza para la longitud de raíces.

Tabla 9: ANOVA de vigor de raíces de vitroplantas de Frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch. Var. San Andreas)

F. de V.	GL	SC	CM	Valor F	Ft 5%	Ft 1%
Tratam.	11	49.04583333	4.45871212	25.18	1.99	2.64
AIB	2	25.60833333	12.80416667	72.31	3.19	5.08
ANA	1	5.70416667	5.70416667	32.21	4.04	7.19
BAP	1	0.70416667	0.70416667	3.98	4.04	7.19
AIB*ANA	2	0.20833333	0.10416667	0.59	3.19	5.08
AIB*BAP	2	4.90833333	2.45416667	13.86	3.19	5.08
ANA*BAP	1	9.20416667	9.20416667	42.05	4.04	7.19
AIB*ANA*BAP	2	2.70833333	1.35416667	7.65	3.19	5.08
Error	48	8.50000000	0.17708333			
Total	59	57.54583333				
CV	16.13339					

De acuerdo a la tabla de ANOVA, se observa que existe una interacción entre AIB*ANA*BAP que muestran diferencias altamente significativas para el vigor promedio de raíces de vitroplantas, por tal razón, se procede a realizar la prueba de comparación de medias.

Tabla 10: Comparación de medias DMS para vigor de vitroplantas

AIB	ANA	BAP	Trat	$\bar{X}$	
AIB 0.5 mg/L	ANA 0.2 mg/L	BAP 0.5 mg/L	7	4,40	A
AIB 0.5 mg/L	ANA 0.1 mg/L	BAP 1.0 mg/L	6	3,60	B
AIB 0.5 mg/L	ANA 0.2 mg/L	BAP 1.0 mg/L	8	3,10	B
AIB 0.5 mg/L	ANA 0.1 mg/L	BAP 0.5 mg/L	5	3,00	C
AIB 1.0 mg/L	ANA 0.1 mg/L	BAP 1.0 mg/L	10	2,80	C
AIB 0 mg/L	ANA 0.2 mg/L	BAP 0.5 mg/L	3	2,70	C
AIB 0 mg/L	ANA 0.2 mg/L	BAP 1.0 mg/L	4	2,50	C
AIB 1.0 mg/L	ANA 0.2 mg/L	BAP 0.5 mg/L	11	2,50	C
AIB 1.0 mg/L	ANA 0.2 mg/L	BAP 1.0 mg/L	12	2,30	D
AIB 0 mg/L	ANA 0.1 mg/L	BAP 1.0 mg/L	2	2,00	D
AB 0 mg/L	ANA 0.1 mg/L	BAP 0.5 mg/L	1	1,80	D
AIB 1.0 mg/L	ANA 0.1 mg/L	BAP 0.5 mg/L	9	0,60	E

De la tabla N10 se puede indicar que con respecto al vigor de vitroplantas el tratamiento T7 con un promedio de 4.4 es el mejor respecto de los 11 tratamientos restantes, seguido por el tratamiento T6 con un promedio de vigor de 3.6.

Para la variable vigor de vitroplantas no encontramos un estudio referido a evaluar el desarrollo balanceado de vitroplantas (parte radicular y parte aérea), todos los estudios están dirigidos a evaluar componentes de las raíces (número y tamaño de raíces) o componentes de la parte aérea (número y tamaño de hojas).

Debemos mencionar que el paso siguiente a la fase de enraizamiento de vitroplantas de frutilla y de cualquier otra especie micropropagada es la Aclimatación (Fase IV), por lo tanto, consideramos importante evaluar de manera integral el desarrollo tanto de raíces como de la parte aérea de las vitroplantas buscando lograr las mejores condiciones para la obtención de plantas aclimatadas provenientes del cultivo *in vitro*.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Capítulo IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Del análisis de resultados del trabajo de investigación podemos desprender las siguientes conclusiones.

- En frutilla, la bibliografía reporta al Ácido Indol Butírico (IAB) como la principal auxina empleada para la fase de enraizamiento *in vitro* de la Frutilla, sin embargo, se demostró que es posible emplear el Ácido Naftalen Acético (ANA) en combinación con AIB para estimular la formación de raíces adventicias, dentro de una posible sinergia entre ambos tipos de auxinas.
- Para la variable Numero de raíces el mejor tratamiento es el T7 con un promedio de raíces de 10,8, seguido del T6 con un promedio de 10,4 y el menor promedio de raíces se obtuvo con el medio T9 con un promedio de 2,2 raíces por vitroplanta,
- Para la variable longitud de raíces los mejores tratamientos son el T7 con un promedio de longitud de raíces de 3,54cm, seguido del T11 con un promedio de 3,28cm y el T6 con un promedio de 3,1cm respectivamente. Los tratamientos con el menor promedio de longitud de raíces son el T3 con un promedio de 1,02 cm y el T9 con un promedio de 0,88cm de longitud de raíces por vitroplanta.
- Para la variable vigor de vitroplanta el mejor tratamiento es el T7 con un promedio de 4,4, seguido del T6 con un promedio de 3,6 de vigor, y el tratamiento con el menor promedio de vigor es el T9 con un promedio de 0,60.
- Se identificó que la interacción entre los factores $AIB \times ANA \times BAP$ influye de manera directa en la calidad del material vegetal obtenido, expresada a través del vigor de las vitroplantas. Los resultados demostraron que el vigor no depende de la concentración individual de cada regulador, sino del equilibrio entre ellos, siendo el tratamiento 7 el que presentó el mayor valor de vigor. Por el contrario, combinaciones con desbalance en las concentraciones, ya sea por

exceso o deficiencia, como en los tratamientos con altas dosis simultáneas o ausencia de AIB, generaron una disminución en la calidad del material vegetal. Esto confirma que la interacción trifactorial es determinante para obtener vitroplantas con características óptimas.

En este estudio se demuestra que el éxito del enraizamiento no depende del incremento de los reguladores de crecimiento (no es directamente proporcional), sino de la interacción equilibrada entre diferentes reguladores (en este caso AIB, ANA y BAP) donde pequeñas variaciones en su concentración pueden generar respuestas significativamente diferentes en el desarrollo de las vitroplantas.

4.2.Recomendaciones

Se recomienda implementar en la fase de enraizamiento la combinación de fitorreguladores del tratamiento T7(AIB 0,5 mg/L,+ANA 0,2 mg/L+BAP 0,5 mg/L) debido a que presentó los mejores resultados en número de raíces, longitud y vigor, constituyéndose en una alternativa eficiente para la producción de vitroplantas de frutilla enraizadas.

Considerando el tradicional mayor costo del AIB, se recomienda realizar ensayos que utilicen concentraciones intermedias de este regulador, complementadas con ANA, AIA, BAP, etc. ya que podrían permitir obtener resultados comparables o mejores a aquellos alcanzados con concentraciones de AIB (≥ 1 mg/L), pero con un menor uso de este insumo.

Se sugiere continuar con investigaciones orientadas a la optimización del uso de reguladores de crecimiento, evaluando distintos fitohormonas o combinaciones alternativas que permitan mantener o mejorar los resultados obtenidos, reduciendo así los costos de producción en sistemas de cultivo *in vitro*.

Para fortalecer la aplicabilidad del estudio, se sugiere evaluar el comportamiento de las vitroplantas en condiciones de aclimatación *ex vitro*, con el fin de validar la estabilidad del sistema radicular y el vigor de las plantas en condiciones más cercanas a la producción real.