

**Establecimiento *in vitro* de fresa
Fragaria × *ananassa* (Duchesne ex
Weston) Duchesne ex Rozier a partir de
meristemos**

Alex Fabricio Jami Loachamin

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Establecimiento *in vitro* de fresa
Fragaria × *ananassa* (Duchesne ex
Weston) Duchesne ex Rozier a partir de
meristemos**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Alex Fabricio Jami Loachamin

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

**Establecimiento *in vitro* de fresa *Fragaria* × *ananassa* (Duchesne ex Weston)
Duchesne ex Rozier a partir de ápices meristemos**

Alex Fabricio Jami Loachamin

Resumen. La etapa de establecimiento en la micro propagación está limitada por la presencia de bacterias y hongos en la planta madre que colonizan el explante y el medio de cultivo, siendo este uno de los problemas más frecuentes. El uso de antibióticos para el control de la contaminación, no es común por su alto costo y toxicidad en los explantes. En este estudio se evaluó el efecto de Kasugamicina (Kasumin[®]) y Azoxistrobina + Gentamicina y Oxitetraciclina (Amistar[®] + Agrygent[®]) en la preparación de ápices caulinares y estolones de fresa, previo a su desinfección y establecimiento *in vitro* de meristemos. Se evaluó la contaminación y fenolización de los explantes. La contaminación en los explantes se empezó a observar al segundo día después de la siembra (DDS) *in vitro*. A los 21 DDS, los tratamientos Kasumin[®] y Amistar[®] + Agrygent[®] no presentaron diferencias significativas en la inmersión de los estolones respectivamente obteniendo un 62 y 67% de cultivos asépticos, y un 58 y 75% en ápices caulinares, pero en los meristemos obtenidos de la inmersión de los estolones se observó fenolización esta no influyó en su regeneración; en cambio en la inmersión de los ápices caulinares los meristemos presentaron fuerte fenolización ocasionando una regeneración lenta. Al tratar estolones y ápices caulinares con Kasumin[®] y Amistar[®] + Agrygent[®] hay diferencia en el porcentaje de cultivos asépticos, pero se presenta una menor fenolización al tratar los estolones con Kasumin[®] 15 mL/L por 30 minutos.

Palabras clave: Ápices caulinares, desinfección, fenolización, frutilla, oxidación.

Abstract. The stage of establishment in the micropropagation is limited by the presence of bacteria and fungi in the mother plant that colonizes the explant and the culture medium, this being one of the most frequent problems. The use of antibiotics to control contamination is not common because of its high cost and toxicity in explants. In this study, the effect of Kasugamicin (Kasumin[®]) and Azoxystrobin + Gentamicin and Oxytetracycline (Amistar[®] + Agrygent[®]) was evaluated in the preparation of cauline apices and strawberry stolons, prior to disinfection and *in vitro* establishment of meristems. The contamination and phenolization of the explants were evaluated. The contamination in the explants began to be observed on the second day after sowing (DDS) *in vitro*. At 21 DDS, the Kasumin[®] and Amistar[®] + Agrygent[®] treatments did not show significant differences in the immersion of the stolons, respectively, obtaining 62 and 67% of aseptic cultures, and 58 and 75% in cauline apices, but in the meristems obtained from the immersion of the stolons, phenolization was observed, this did not influence its regeneration. In the immersion of the cauline apices, the meristems showed strong phenolization causing a slow regeneration. When treating stolons and shoot tips with Kasumin[®] and Amistar[®] + Agrygent[®] there is no a difference in the percentage of aseptic cultures, but there is less phenolization when treating the stolons with Kasumin[®] 15 mL / L for 30 minutes.

Keywords: Cauline apices, disinfection, phenolization, strawberry, oxidation.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4. CONCLUSIÓN	16
5. RECOMENDACIONES	17
6. LITERATURA CITADA	18

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Pagina
1. Medio de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemos de fresa.	6
2. Porcentaje de meristemos asépticos y promedio de porcentaje de fenolización/meristemo como efecto de Kasumin [®] y Amistar [®] + Agrygent [®] en estolones de fresa.	11
3. Porcentaje de meristemos asépticos y promedio de porcentaje de fenolización/meristemo de fresa como efecto de la inmersión de los ápices caulinares en Kasumin [®] y Amistar [®] + Agrygent [®]	12
4. Promedio de porcentaje de fenolización/meristemo y cultivos asépticos de fresa como efecto de Kasumin [®] y Amistar [®] + Agrygent [®] en la inmersión de ápices caulinares y estolones de fresa.	14

Figuras	Pagina
1. Extracción de meristemos de fresa para establecimiento <i>in vitro</i> . (A) Eliminación de raíces y tallos de estolones, (B) reducción de estolón, (C) ápice caulinar, (D) disección de ápice caulinar, (E) vellosidades del meristemo, (F) meristemo.	5
2. Parámetros a evaluar en el porcentaje de fenolización (oxidación) en los meristemos de fresa; (A) 100%, (B) 75%, (C) 50%, (D) 25%.	7
3. Meristemos de fresa fenolizados, meristemos extraídos de estolones tratados con fungicida y bactericida (A) Kasumin [®] (B) Amistar [®] + Agrygent [®]	9
4. Meristemos de fresa establecidos <i>in vitro</i> , extraídos de estolones sumergidos en Kasumin [®] ; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.	10
5. Meristemos de fresa establecidos <i>in vitro</i> , extraídos de estolones sumergidos en Amistar [®] + Agrygent [®] en la desinfección; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.	10
6. Explante de fresa contaminado, bacteria (A), hongos (B).	11
7. Meristemos de fresa fenolizados extraídos de ápices caulinares sumergidos tratados con (A) Kasumin [®] (B) Amistar [®] + Agrygent [®]	12
8. Meristemos de fresa establecida <i>in vitro</i> , expuestos a Kasumin [®] en la desinfección; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.	13
9. Meristemos de fresa establecidos <i>in vitro</i> , expuestos a Amistar [®] + Agrygent [®] en la desinfección; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.	13

10. Explante de fresa contaminado con bacteria al día 14 de su establecimiento (A) Kasumin [®] , (B) Amistar [®] + Agrygent [®]	13
11. Plántulas de fresa a los 42 días de establecidas <i>in vitro</i> a partir de meristemas extraídos de estolones y ápices caulinares expuestos a bactericida + fungicida (A) Kasumin [®] estolón; (B) Amistar [®] + Agrygent [®] estolón; (C) Kasumin [®] ápice caulinar.	15

1. INTRODUCCIÓN

La fresa comercial (*Fragaria x ananassa* Duch.) es consumida por millones de personas alrededor del mundo, es conocida por su delicado sabor y alto contenido de vitaminas. Es un octoploide híbrido entre *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. (Opazo Castro 2012). La *F. chiloensis* es nativa de la costa oeste del norte y sur de América, mientras que *F. virginiana* es de la costa este de Norteamérica. Estas dos especies fueron llevadas a Europa donde se cruzaron dando lugar a los actuales cultivares comerciales (Darrow 1966).

La producción de fresa en Honduras está concentrada en la zona occidental que corresponde a los departamentos de Ocotepeque, Copan, Lempira y La Esperanza y zona central en los departamentos de Comayagua, La Paz y Francisco Morazán. Estos se caracterizan por ser los más productivos de fresa en el país, con un precio promedio anual a nivel nacional de ventas al por mayor de \$2.57/kg en el 2016, se ha registrado un incremento anual de 5.5%, al pasar la libra de fresas de \$1.87/kg en 2011 a \$2.31/kg en el año 2015 (UPEG 2016).

El cultivar Albión desarrollado por la Universidad de California y lanzado comercialmente en el 2004 se caracteriza por tener excepcional calidad de fruta, un gran tamaño buen sabor, firmeza y un peso promedio de 32 g/fruta (Eurosemillas 2018) con una producción de 1.36 a 1.81 kg por planta en los 18 meses (Carmona 2009). Los frutos acumulan azúcar entre 10 y 14° Brix, con una densidad de plantación 65,000 plantas/ha con un rendimiento de 75 t/ha (LLAUHEN 2014). Es de muy fácil recolección ya que resiste el manejo pos-cosecha, además es resistente a condiciones meteorológicas adversas y enfermedades como *Anthracosis*, *Phytophthora* sp, *Verticillium* sp, *Colletotrichum* sp (Eurosemillas 2018).

La fresa se propaga convencionalmente de forma asexual, por corona y estolones (Altamirano 2004). Para la propagación *in vitro* se pueden usar todos los tejidos de la planta con activa capacidad de proliferación; en el caso de la fresa se prefiere utilizar ápices meristemáticos (Altamirano 2004), provenientes de corona o estolones. La extracción y la desinfección de los explantes a partir de los estolones es más fácil. La alta pubescencia de los tejidos al encontrarse en contacto directo con el suelo induce una alta contaminación de los explantes, especialmente cuando estos son extraídos de plantas provenientes del campo (Sánchez y Salaverría 2004).

Estos contaminantes pueden ocasionar muerte de los tejidos, competir con ellos o modificar el medio. El uso de antibióticos para el control de la contaminación, que puede ser aplicados a la planta madre, explante o medio de cultivo no es muy común por su toxicidad y por fenolización en los explantes. Para evitar que los explantes sufran oxidación o fenolización se sugiere disminuir la intensidad de la luz y agregar antioxidantes al medio de cultivo (Sánchez y Salaverría 2004).

Una de las etapas de la micro propagación es el establecimiento *in vitro*, que está limitado por la presencia de bacterias y hongos que colonizan el explante y el medio de cultivo, ocasionando muerte. Este constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, tanto al inicio del proceso como durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* y se considera la mayor limitante del desarrollo de un protocolo de micropropagación (Esquivel y Bonilla 2016)

La detección e identificación de hongos fitopatógenos se ha basado tradicionalmente en la observación de los síntomas en campo difícilmente distinguibles a simple vista por la dificultad de identificación ya que muchas plantas están enfermas, pero no presentan síntomas. El aislamiento del agente causal en medio de cultivo a partir de los tejidos afectados, y la caracterización morfológica de las colonias originadas, es un proceso largo y costoso. Los síntomas en campo de plantas de fresa infectadas por *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* son muy similares y consisten en la flacidez y marchitez de la planta, usualmente de las hojas periféricas, la cual puede terminar en muchos casos en muerte; y en manchas, de pardas a oscuras en tejidos de raíz y corona, que acaban frecuentemente en necrosis (Pastrano 2017).

El Kasumin[®] (kasugamicina) es un fungicida y bactericida con amplio rango de acción y sistémico, es absorbida por las hojas y raíces movilizándose en todas las partes de la planta. Su modo de acción es inhibir la incorporación de los aminoácidos en la síntesis de las proteínas de las células en bacterias y hongos (MPPMC 2018).

El azoxistrobina (Amistar[®]) es un fungicida sistémico y de contacto perteneciente al grupo químico de los metoxiacrilatos, con acción preventiva, curativa y antiesporulante. Actúa inhibiendo el proceso respiratorio de los hongos, resultando especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno (SA 2018).

El gentamicina y oxitetraciclina (Agygent[®]) es un bactericida de amplio espectro y sistémico, se mueve en el xilema en forma acropétala para el control preventivo y curativo de una amplia gama de bacterias que infestan los cultivos agrícolas. La gentamicina inhibe la síntesis de proteínas uniéndose irreversiblemente al ribosoma bacteriano, la oxitetraciclina tiene un efecto sinérgico bacteriostático (SAM 2013).

El objetivo de este estudio fue:

- Evaluar el efecto de Kasumin[®] y Amistar[®] + Agygent[®] en la preparación de estolones y ápices caulinares en el establecimiento *in vitro* de meristemos de fresa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se realizó durante los meses de mayo y septiembre del 2018 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Fuente del material vegetal.

Las plantas de fresa se recolectaron en el Municipio Güinope, El Paraíso, Honduras. Estas fueron propagados de manera convencional, por división de corona en los invernaderos de las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, al momento de realizar el estudio este tenía una edad de tres meses.

Mantenimiento del material vegetal en invernadero.

Una vez establecidas las plantas de fresa en maceteros en el invernadero y durante tres meses se realizó riego cada día por una hora con nebulizador durante la mañana, medio día y tarde. Se fertilizó las plantas dos veces con fertilizante de liberación lenta (16-8-12) 3 gr/planta a los días 2 y 28. Se realizaron dos aplicaciones de fungicida Amistar® 0.33 g/L + bactericida Agrygent® 1.5 g/L, con intervalo de un mes. Una vez observados los estolones se procedió a separarlos y continuar con el proceso de extracción de meristemas.

Preparación del material vegetal. Una vez colectados los estolones se lavaron con agua potable y jabón para retirar suelo y luego se eliminó las raíces y tallos.

Experimento 1. Efecto de la inmersión de estolones en fungicida y bactericida previo a la reducción y desinfección.

Inmersión de estolones en fungicida y bactericida.

Los estolones se sumergieron en fungicida y bactericida según los dos tratamientos a evaluar:

- 15 mL/L de Kasumin® + 3 gotas Tween 80/100 mL, por 30 minutos
- Amistar® 0.6 mL/L + Agrygent® 1.5 mL/L + 3 gotas Tween 80/100 mL, por 30 minutos.

Desinfección de estolones. Al terminar el tratamiento en fungicida y bactericida los estolones se sumergieron en alcohol al 70% por 10 segundos y luego en una solución de cloro comercial (NaOCL 4.72% i.a) al 15% $\frac{v}{v}$ más 3 gotas/100 mL de Tween 80 (agente mojante), por 20 minutos. Por último, se trasladaron a la cámara de flujo laminar donde se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Extracción y desinfección de ápices caulinares. Se realizó la reducción de los estolones hasta dejar expuesto el ápice caulinar (Figura 1). El ápice caulinar se sumergió en alcohol al 70% por 10 segundos, después en una solución de cloro comercial al 20% v/v (NaOCL 4.72% i.a) + 3 gotas/100 mL de Tween 80 por 20 minutos y luego en una solución 15% (NaOCL 4.72% i.a) + 3 gotas/100 mL de Tween 80, por 30 minutos.

Experimento 2. Efecto de la inmersión de ápices caulinares en fungicida y bactericida previo a la reducción y desinfección.

Desinfección de estolones. Los estolones una vez lavados con agua y jabón y eliminados raíces y tallos se sumergieron en alcohol al 70% por 10 segundos, después en una solución de cloro comercial (NaOCL 4.72% i.a) al 15% v/v más 3 gotas/100 mL de Tween 80, por 20 minutos, se trasladaron a la cámara de flujo laminar donde se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Extracción de ápice caulinar y segunda desinfección. Posterior a la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar se realizó la reducción de los estolones hasta dejar expuesto el ápice caulinar que mide aproximadamente 7 mm. El ápice se sumergió en alcohol al 70% por 10 segundos.

Inmersión de ápices caulinares en fungicida y bactericida. Los ápices caulinares se sumergieron en fungicida y bactericida según los dos tratamientos a evaluar:

1. 15 mL/L de Kasumin[®] + 3 gotas Tween 80/100 mL, por 30 minutos
2. Amistar[®] 0.6 mL/L + Agrygent[®] 1.5 mL/L + 3 gotas Tween 80/100 mL, por 30 minutos.

Tercera desinfección. Los ápices caulinares se sumergieron en alcohol al 70% por 10 segundos luego en cloro comercial al 15% (NaOCL 4.72% i.a) más 3 gotas/100 mL de Tween 80, por un minuto.

Extracción de meristemos y establecimiento *in vitro*.

Después de los tratamientos de desinfección e inmersión en fungicidas y bactericidas, dentro de la cámara de flujo laminar y con la ayuda de un estereoscopio se realizó la extracción de los meristemos en una placa Petri estéril. Al obtener los meristemos se sumergieron en antioxidante estéril (ácido ascórbico 100 mg/L + ácido cítrico 150 mg/L) (Sanchez y Salaverria 2004). Los meristemos obtenidos se colocaron en los tubos de ensayo con medio de cultivo estéril. La Figura 1 muestra las actividades que se deben realizar para la extracción de los meristemos.

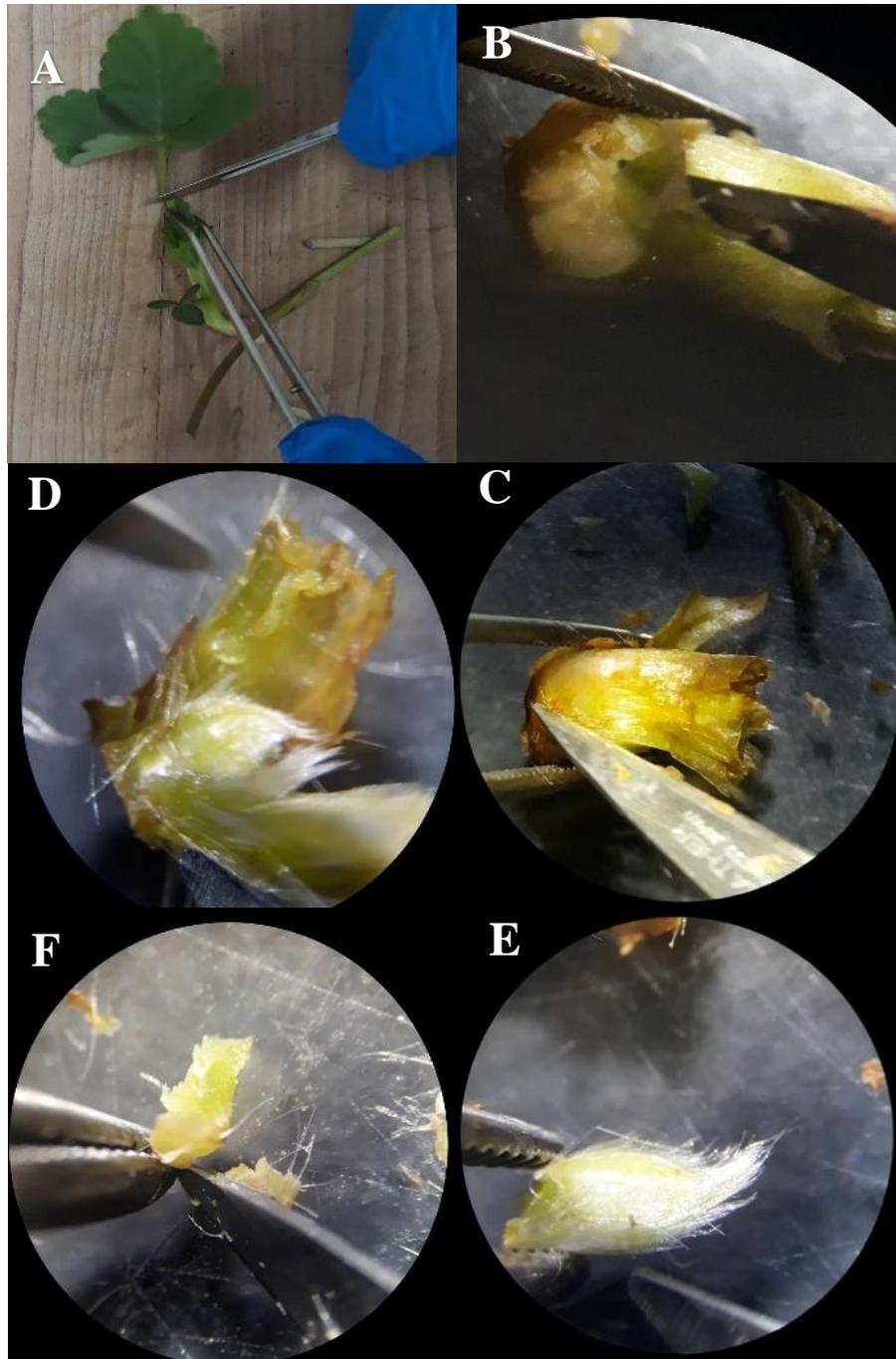


Figura 1. Extracción de meristemas de fresa para establecimiento *in vitro*. (A) Eliminación de raíces y tallos de estolones, (B) reducción de estolón, (C) ápice caulinar, (D) disección de ápice caulinar, (E) vellosidades del meristemo, (F) meristemo.

Medio de cultivo. Se usó el medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de fresa (Cuadro 1). El pH del medio fue de 5.8, luego el medio fue solidificado con Phytigel (1.8 g/L) y se esterilizó a 121 °C, 103.42 Kpa por 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de fresa.

Componentes	Nombre común	Fórmula	mg/L
Macronutrientes	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650.000
	Nitrato de potasio	KNO ₃	1900.000
	Cloruro de calcio bihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	440.000
	Fosfato monobásico de potasio	KH ₂ PO ₄	170.000
	Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	370.000
Micronutrientes	Yoduro de potasio	KI	0.830
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.200
	Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
	Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .4HO	8.600
	Molibdato de sodio bihidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
	Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	FeNaEDTA	50.000
Vitaminas y aminoácidos	Tiamina-HCl		0.100
	Piridoxina-HCl		0.500
	Ácido nicotínico		0.500
	Inositol		100.000
	Glicina		2.000
Fitohormonas	Ácido indole-3-butírico		1.000
	6-Bencilaminopurina		3.000
Antioxidante	Polivinilpirrolidona		100.000
Carbohidrato	Sacarosa		30000.000

Fuente: Ñahuinlla 2018

Incubación. Los explantes se incubaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 °C y 70% de humedad relativa. Todos los explantes fueron incubados los primeros siete días en completa oscuridad a partir del día ocho se incubaron con luz fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad.

Variabes a medir. Las variables evaluadas fueron: 1. Porcentaje de contaminación, determinado de manera visual observando presencia de micelio (hongos) o exudados de apariencia lechosa (bacteria); 2. Oxidación según los parámetros descritos en la Figura 2; 3. Muerte de los explantes. Estos parámetros fueron observados cada siete días por cuatro semanas.



Figura 2. Parámetros a evaluar en el porcentaje de fenolización (oxidación) en los meristemos de fresa; (A) 100%, (B) 75%, (C) 50%, (D) 25%.

Diseño experimental.

Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en los dos experimentos teniendo dos tratamientos en cada uno con tres repeticiones por tratamiento con siete unidades observacionales.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba de normalidad con el test de Shapiro-Wilks modificado, la prueba de homogeneidad usada fue la prueba t. Luego se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey, así como una prueba de correlación. Se utilizó el software estadístico InfoStat®.

Se realizó un análisis de varianza y separación de medias con la prueba Tukey con una probabilidad de 0.05. Los datos que no cumplieron una distribución normal se le aplicó una transformación de datos de raíz cuadrada del valor más uno, $(\sqrt{x + 1})$ donde x es igual a los datos observados de porcentaje de oxidación, porcentaje de contaminación, porcentaje de sobrevivencia de explantes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Efecto de la inmersión de estolones en fungicida y bactericida previo a la reducción de la desinfección.

Los cambios observados en el color de los meristemos se presentaron al segundo día del establecimiento además de presentar todos fenolización (Figura 3). Sánchez (2005) observó también fenolización en todos los explantes provenientes de estolones, la oxidación fenólica leve no afecta la regeneración, pero la fuerte causa su muerte.

Los cambios en la forma del explante fueron notables hasta el día 14 donde se observó el aumento en el tamaño y el desarrollo de hojas, a los 21 días las hojas se desarrollaron por completo adquiriendo la tonalidad verde oscuro en comparación con el día 14 donde las hojas tenían una tonalidad verde claro (Figuras 4 y 5).

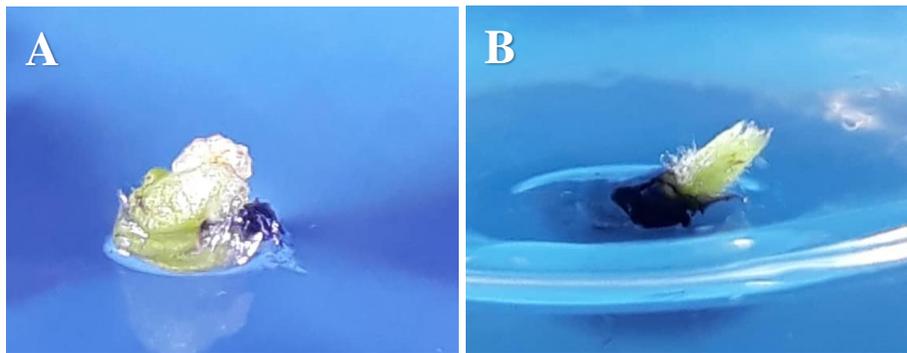


Figura 3. Meristemos de fresa fenolizados, meristemos extraídos de estolones tratados con fungicida y bactericida (A) Kasumin® (B) Amistar® + Agrygent®.



Figura 4. Meristemos de fresa establecidos *in vitro*, extraídos de estolones sumergidos en Kasumin®; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.



Figura 5. Meristemos de fresa establecidos *in vitro*, extraídos de estolones sumergidos en Amistar® + Agrygent® en la desinfección; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.

Se observó diferencia significativa entre los tratamientos. En los meristemos extraídos de estolones tratados en Kasumin® con 35% de fenolización en comparación con el tratamiento Amistar® + Agrygent® obteniendo un 61% de fenolización. No se observaron diferencias significativas con respecto a porcentaje de cultivos asépticos (Cuadro 2). La contaminación en los explantes se empezó a observar al segundo día después de la siembra *in vitro*. Se identificó micelios sobre el meristemo y bacterias sobre y en los alrededores del explante en contacto con el medio de cultivo (Figura 6). Se observó además desarrollo significativo independiente de los tratamientos, los meristemos asépticos no presentaron ningún tipo de contaminación después del día siete, el 100% de los explantes sobrevivientes formaron hojas.

Cuadro 2. Porcentaje de meristemas asépticos y promedio de porcentaje de fenolización/meristemo como efecto de Kasumin® y Amistar® + Agrygent® en estolones de fresa.

Tratamiento	Cultivos Asépticos	Fenolización / meristemo
		%
Kasumin®	62 ns	35 a [¥]
Amistar® + Agrygent®	67	61 b
CV	23.77	29.87
R ²	0.84	0.84

¥=Valores con letra diferente difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$).
ns=no hay diferencia significativa ($P > 0.05$).

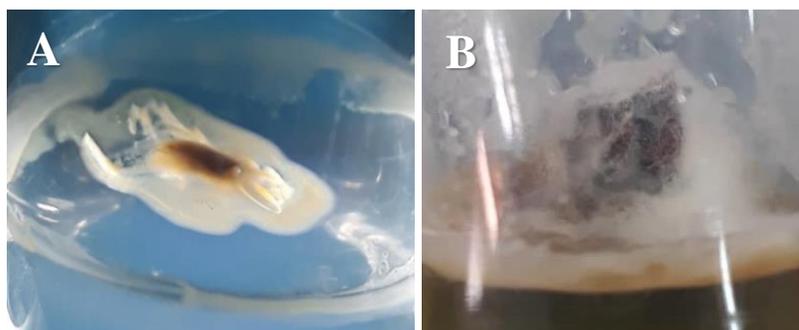


Figura 6. Explante de fresa contaminado, bacteria (A), hongos (B).

Experimento 2. Efecto de la inmersión de ápices caulinares en fungicida y bactericida previo a la reducción de la desinfección.

Los cambios en los explantes iniciaron al día cuatro del establecimiento donde se observó fenolización lo que causó su lenta regeneración y en otros casos su mortalidad (Figura 7). Al respecto Sánchez (2005) indica que la fenolización de los explantes de fresa ocurre independientemente de la variedad y del medio de cultivo empleado, ya que este tipo de explantes generalmente presentan cierto grado de fenolización. Sanchez y Salaverria (2004), recomiendan tener cuidado con la dosis del desinfectante y el tiempo de inmersión seleccionados, pues todos los desinfectantes son tóxicos para el tejido.

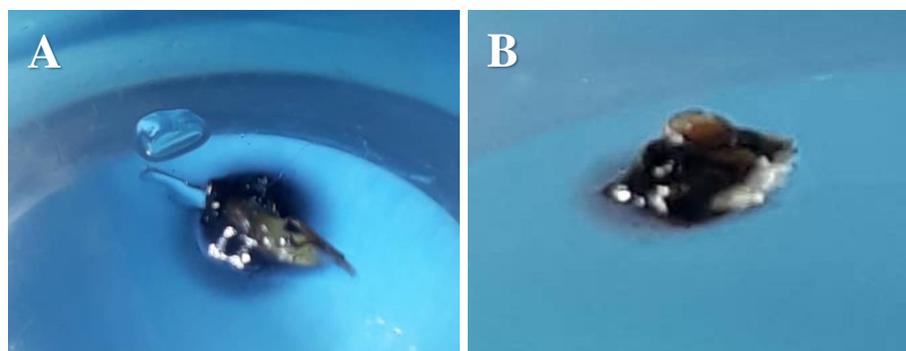


Figura 7. Meristemos de fresa fenolizados extraídos de ápices caulinares sumergidos tratados con (A) Kasumin® (B) Amistar® + Agrygent®.

Con base en los resultados obtenidos, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a la fenolización y al porcentaje de cultivos asépticos (Cuadro 3) La presencia de contaminantes fúngicos y bacterianos en este experimento se observó a los 4 y 14 días después de su establecimiento. Los meristemos de fresa presentan vellosidades las cuales pueden influir en la desinfección. Por su parte Ñahuinlla (2018) expone que la presencia de vellosidades no permite que los productos de desinfección lleguen a descontaminar los tejidos a profundidad.

Cuadro 3. Porcentaje de meristemos asépticos y promedio de porcentaje de fenolización/meristemo de fresa como efecto de la inmersión de los apices caulinares en Kasumin® y Amistar® + Agrygent®.

Tratamiento	Cultivos Asépticos	Fenolización / meristemo
		%
Kasumin®	58 ns	60 ns
Amistar® + Agrygent®	75	73
CV	34.99	34.14
R ²	0.66	0.49

ns=no hay diferencia significativa (P>0.05).

En los dos tratamientos al día 21 se observó cambios notables en el tamaño y forma del explante (Figura 8 y 9), en comparación con el Experimento 1 los cambios se dieron al día 14 esto se debe a la presencia de oxidación fuerte que afectó su regeneración.



Figura 8. Meristemos de fresa establecida *in vitro*, expuestos a Kasumin[®] en la desinfección; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.



Figura 9. Meristemos de fresa establecidos *in vitro*, expuestos a Amistar[®] + Agrygent[®] en la desinfección; (A) Al día 7 del establecido; (B) Día 14; (C) Día 21.

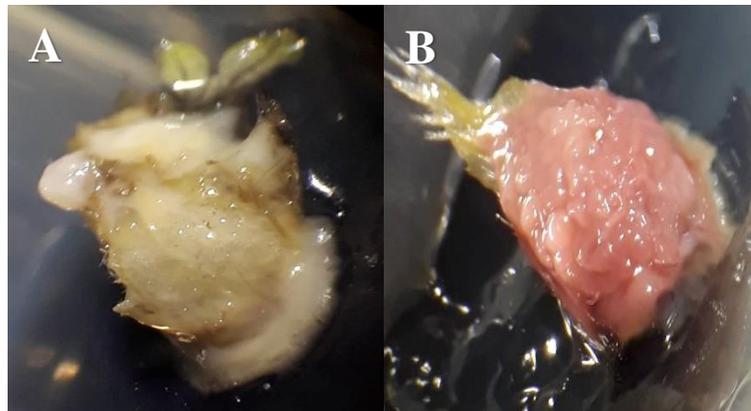


Figura 10. Explante de fresa contaminado con bacteria al día 14 de su establecimiento (A) Kasumin[®], (B) Amistar[®] + Agrygent[®].

Cabe recalcar que los dos experimentos se sometieron a siete días de oscuridad absoluta porque el material es susceptible a la fenolización, por este motivo los explantes presentaron cambios en su coloración debido a la ausencia de luz. Sanchez y Salaverria (2004), expone que la oxidación de fenoles se incrementa con la luz por lo es importante mantener explantes durante unos días en oscuridad.

En comparación entre los experimentos se observó la fenolización en diferentes escalas. En el Experimento 1 la fenolización es entre el 25 al 50%, la regeneración es rápida, a los 14 días de su establecimiento se observó cambios en tamaño, forma y en la conformación completa de hojas. Mientras que el Experimento 2 la fenolización fue del 75% al 100%, la regeneración es lenta por lo que se observó los cambios del explante a los 21 días de su establecimiento.

Los resultados obtenidos con los productos químicos con el tratamiento Kasumin[®] en el experimento 1 se obtuvo una fenolización del 35% con una sobrevivencia del 62% en comparación con el Experimento 2 con una fenolización del 60% y una sobrevivencia del 58% del total de explante en comparación con Amistar[®] + Agrygent[®] con un 61% y 73% de fenolización y una sobrevivencia de 67 y 75%, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio de porcentaje de fenolización/meristemo y cultivos asépticos de fresa como efecto de Kasumin[®] y Amistar[®] + Agrygent[®] en la inmersión de ápices caulinares y estolones de fresa.

Parte de la planta	Tratamiento	Cultivos asépticos (%)	Fenolización /meristemo (%)
Estolón	Kasumin [®]	62 ns	35 a [¥]
Ápice caulinar	Kasumin [®]	58	60 b
Estolón	Amistar [®] + Agrygent [®]	67	61 b
Ápice caulinar	Amistar [®] + Agrygent [®]	75	73 c

¥=Valores con letra diferente difieren estadísticamente entre sí (P<0.05).

ns=no hay diferencia significativa (P>0.05).

Villalobos y García (1982) indican que el tamaño del explante es un factor que influye en la desinfección, a medida disminuye el tamaño del explante se reduce el riesgo de contaminación; sin embargo, la regeneración es lenta. Con el aumento del tamaño del explante se incrementa el riesgo de contaminación, pero el crecimiento y la regeneración de planta es más rápido.

La procedencia del material vegetal es fundamental para su propagación *in vitro* por la alta susceptibilidad a la presencia de contaminantes. Según Sánchez y Salaverría (2004) la alta pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo inducen una alta contaminación cuando estos son extraídos de plantas provenientes de campo. Sanchez (2005) muestra que cuando se utilizó yemas provenientes de estolones el 100% de los explantes no presentaron contaminación. Cabe recalcar que Sanchez (2005), el material vegetal procedía de estructuras protegidas donde los controles de los contaminantes son más específicos.

Al día 28 se refrescó el medio de cultivo de los meristemos establecidos, al día 42 se observó el desarrollo completo de las plántulas con los tratamientos en Kasumin y Amistar[®] +

Agrygent® en estolones al tener una fenolización leve entre un 35% a un 50% no afectó a su desarrollo en comparación con el tratamiento en kasumin® sumergido en ápices caulinares no completó el desarrollo del explante esto se debe a la presencia de fenolización alta de un 75% que afectó a su desarrollo además de presentar vellosidad el explante que afecto su descontaminación y su fenolización (Figura 11). Nahuinlla (2018) observó el 81% de sobrevivencia esto se debe a la presencia de vellosidad en los explantes, ya que los productos y agentes de desinfección no llegan a descontaminar los tejidos profundidad. Además, estableció un control con fúngicos y bactericidas en invernadero durante cinco semanas previo al ingreso a laboratorio.



Figura 11. Plántulas de fresa a los 42 días de establecidas *in vitro* a partir de meristemas extraídos de estolones y ápices caulinares expuestos a bactericida + fungicida (A) Kasumin® estolón; (B) Amistar® + Agrygent® estolón; (C) Kasumin® ápice caular.

4. CONCLUSIÓN

- Al tratar estolones y ápices caulinares con kasumin[®] (kasugamicina) y Amistar[®] (Azoxistrobina) + Agrygent[®] (Gentamicina + Oxitetraciclina) no hay diferencia en el porcentaje de cultivos escépticos, pero se presenta una menor fenolización al tratar los estolones con Kasumin[®] 15 mL/L por 30 minutos.

5. RECOMENDACIONES

- Tratar a las plantas procedentes del campo con fungicidas y bactericidas previo al ingreso a los invernaderos.
- Continuar con las etapas de micropropagación para establecer un protocolo completo para cultivo *in vitro* de fresa.
- Evaluar otros antioxidantes y diferentes tiempos y dosis de inmersión de los meristemos.

6. LITERATURA CITADA

- Altamirano R. 2004. El cultivo de la fresa para el ciclo otoño-invierno, en California, Estados Unidos de Norte América. [Tesis]. Universidad de Guadalajara. 25-30pp. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/63/Altamirano_Hernandez_Rosa_Celia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Carmona R. 2009. Fresa, *Fragaria ananassa*. Bayer CropScience. Colombia; [consultado 2018 SEP 06]. https://www.cropscience.bayer.co/~media/Bayer%20CropScience/Peruvian/County-Colombia-Internet/Pdf/Cartilla-FRESA_baja.ashx
- Darrow G. 1966. The Strawberry: History, Breeding and Physiology. The New England Institute for Medical Research. [consultado 2018 sep 13]; 1th ed. Canadá: Published simultaneously in Canada by Holt. 447p. https://specialcollections.nal.usda.gov/speccoll/collectionsguide/darrow/Darrow_TheStrawberry.pdf
- Esquivel A, Bonilla V. 2016. Establecimiento in vitro de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica [Tesis]. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 79 p. https://www.researchgate.net/publication/309474958_Establecimiento_in_vitro_de_Vaccinium_consanguineum_un_arandano_nativo_de_Costa_Rica
- Eurosemillas 2018. Cultivares de fresa [internet] Empresa Eurosemillas.Córdoba ES; [consultado 2018 SEP 06]. <http://www.eurosemillas.com/es/variedades/fresa/item/1-albion.html>.
- LLAUHEN 2014. Planta de frutilla [internet]. Grupo Llauhen Chile; [consultado 2018 SEP 06]. <http://www.llahuen.com/>
- MPPMC (Mejores productos para mejorar cosechas) 2018. Ficha técnica kasumin [internet]. Peru; [consultado 2018 sep 12]. http://www.farmagro.com.pe/media_farmagro/uploads/ficha_tecnica/kasumin_ficha_tecnica.pdf
- Ñahuinlla M. 2018. Optimización del protocolo de micropropagación in vitro con cuatro cultivares de fresa (*fragaria x ananassa* Duch.) [Tesis]. Universidad nacional Agraria la Molina. Lima-Peru. 67p. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3102REA>.

- Opazo Castro MC. 2012. Caracterización de xiloglucano endostransglicosilasa/hidrolasa (XTH) en frutilla chilena (*Fragaria chiloensis* l. (Mill.) y frutilla silvestre (*Fragaria vesca*). [Tesis]. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca (Chile). 1 p. <http://dspace.uta.cl/handle/1950/9250>
- Pastrano A. 2017. Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control [Tesis]. Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía La Torres, Sevilla. 28p. <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/68567/2014pastrincid.pdf?sequence=1>
- SA (Syngenta Agro) 2018. Ficha técnica Amistar® [internet]. Argentina; [consultado 2018 sep 12]. <https://www.syngenta.com.ar/>
- SAM (Summit Agro México) 2013. Ficha técnica Agry-gent plus 5000 [internet]. México; [consultado 2018 sep 12]. <https://www.summitagromexico.com.mx/>
- Sanchez B. 2005. Comportamiento in vitro de dos variedades de frutilla (*Fragaria Ananassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo [Tesis]. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia. 34p. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3102/%C3%B1ahuinla-arone-monica-endalencia.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Sánchez M, Salaverria J. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) [Tesis]. Laboratorio de Biotecnología; 4th ed. Maturín. Universidad de Oriente. 22p. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221549.pdf>
- UPEG (Unidad de Planificación y Evaluación de la Gestión) 2016. Análisis de coyuntura del cultivo de frutas en Honduras [internet]. Tegucigalpa: MDC; [consultado 2018 sep 05].
- Villalobos V, García A. 1982. Plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos [Tesis]. Agrociencia 48. Chapingo-México 118p. https://www.researchgate.net/...Villalobos...Plantas_de_Clavel...caryophyllus_Libres_d