

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIONEN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

ACLIMATIZACIÓN DE DOS VARIEDADES DE FRESA (*Fragaria x ananassa* Duch.) PROPAGADAS *In Vitro*, EN CONDICIONES DE INVERNADERO Y CAMPO

Claudia Berenice Espitia Flores

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis, titulada: **Aclimatización De Dos Variedades De Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) Propagadas *in Vitro*, En Condiciones De Invernadero Y Campo**, realizada por la alumna: **Claudia Berenice Espitia Flores**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

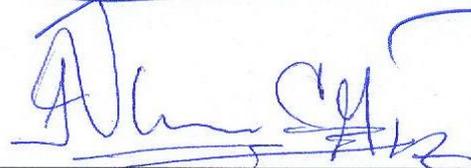
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. GREGORIO ARELLANO OSTOA

ASESOR:



Dr. F. VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ

ASESOR:



M.C. IGNACIO MIRANDA VELÁZQUEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero del 2015

**ACLIMATIZACIÓN DE DOS VARIEDADES DE FRESA (*Fragaria x ananassa*
DUCH.) PROPAGADAS *In Vitro*, EN CONDICIONES DE INVERNADERO Y
CAMPO**

Claudia Berenice Espitia Flores, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

En el CP se realizó la propagación masiva a través del cultivo *in vitro* para la obtención de plantas de fresa de dos variedades mexicanas, con la finalidad de abastecer la demanda nacional de planta madre. Una de las etapas críticas del cultivo *in vitro* es la aclimatización de plantas obtenidas a través de este método, debido a que durante este proceso las plantas llegan a sufrir cierto grado de estrés, antes de lograr su adaptación al nuevo ambiente. La mayor supervivencia de los individuos condiciona que la técnica llegue a ser rentable. Por lo que en la presente investigación se evaluó el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, así como la aclimatización de la fresa para la obtención de plantas. Con el objetivo de determinar las condiciones ambientales óptimas para lograr el establecimiento/aclimatización en invernadero de dos variedades de fresa propagadas *in vitro*, para que sean utilizadas por los productores de fresa, como planta madre, se evaluó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento de nueva generación y un regulador convencional, para el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, además de evaluar la aclimatización en invernadero. Los resultados muestran que el comportamiento de ambas variedades es diferente para el proceso de enraizamiento ya que se utilizó $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Triacantanol para la CP. Zamorana y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Brasinoesteroides para la variedad CP. Jacona, para obtener la aparición de la raíz, el BR $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ obtuvo el mayor número de raíces y en el enraizamiento *in vivo* el Radix[®] 1500, la actividad de la Catalasa, demostró que los días clave para el cuidado de las plantas son los primeros cinco días. La mayor actividad CAT se presentó en los primeros cinco días del proceso y su actividad fue mayor en los brotes que se adaptaron en la mezcla con Peat Moss, lo que significa que hubo mayor estrés en su establecimiento.

Palabras Clave: Brasinoesteroides, Enzimas Redox, *Fragaria x ananassa*, Micropropagación, Triacantanol.

ACCLIMATIZATION TWO VARIETIES STRAWBERRY (*Fragaria x ananassa* DUCH.) PROPAGATED *In Vitro*, IN GREENHOUSE AND FIELD CONDITIONS

Claudia Berenice Espitia Flores, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

In the CP mass propagation through tissue culture for the production of plants from two Mexican varieties, in order to meet domestic demand for mother plant was performed. One of the critical stages of the crop is *in vitro* acclimatization of plants obtained by this method because during this process the plants come to suffer some degree of stress, before achieving their adaptation to the new environment. The increased survival of individuals determines the technique becomes profitable. As in the present investigation *in vitro* rooting and *ex vitro* acclimatization and strawberry plants for obtaining assessed. In order to determine the optimum environmental conditions for the establishment / acclimatization in greenhouse two strawberry varieties propagated *in vitro*, to be used by strawberry growers, as the mother plant, the effect of different growth regulators were evaluated new generation and a conventional controller, during the *in vitro* and *ex vitro* rooting, in addition to evaluating greenhouse acclimatization. The results show that the behavior of both varieties is different for the rooting process since the addition of $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Triacontanol for CP. Zamorana and the variety CP. Jacona Brassinosteroids is $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to have the appearance of the root, showing the BR $\cdot 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ as many roots and rooting *in vivo* the Radix[®] 1500, catalase activity, demonstrated the key to plant care days are the first five days. Most CAT activity was presented in the first five days of the process and its activity was higher in the shoots that were adapted into the mix with Peat Moss, which means that there was more stress in their establishment.

Keywords: Brassinosteroids, Redox Enzyme, *Fragaria x ananassa*, Micropropagation, Triacontanol.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por brindarme día a día la oportunidad de seguir viviendo, por ser mi ayuda, fortaleza y consuelo a lo largo de la vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** y en especial al **Postgrado de Recursos Genéticos-Fruticultura**, por darme la oportunidad de estudiar en la institución de excelencia y calidad

A mi consejero **Dr. Gregorio Arellano Ostoa**, por su orientación y motivación para concluir este trabajo. Muchas Gracias.

Al **Dr. F. Víctor Conde Martínez**, por las sugerencias y dedicación que enriquecieron este trabajo. Gracias

Al **M.C. Ignacio Miranda Velázquez**, por su amistad, sencillez y dedicación en este trabajo. Gracias por su calidad humana.

A **mis amigos (as)**: Rocío Santiago, Israel Carrera, Carolina Gamiño, Ángel Aradillas, Fernando Hernández, Dulce Flores, Javier Bulbarela, Marisol Basilio y Nancy Toriz, por compartir con ellos buenos y malos momentos, consejos, alegrías, etc y a todos aquellos que en algún momento de su vida vieron en mi a un amigo, y supieron responder a la confianza que deposité en ellos.

A **Jonás Aradillas T.**, por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobre todo por su apoyo incondicional.

A **los laboratoristas**: al señor Guillermo Arellano, Mario Roque, a la señora Ángeles, a la señora Mari y a la señora Isi, que me brindaron su ayuda y amistad.

A todas las personas que de alguna forma me han apoyado para ir subiendo los peldaños que me he encontrado en la vida, desde aquellas que me dieron un consejo para seguir adelante hasta aquellas que me han ido formando de manera profesional

DEDICATORIA

A mis padres Erón Espitia Patiño y María Elena Flores Velázquez, por su apoyo incondicional, que hicieron todo para que yo pudiera lograr mis sueños. Gracias por enseñarme los valores, principios, el esfuerzo para lograr las metas, el trabajo y la constancia, estoy agradecida de todo corazón con estas dos personas que son únicas e inigualables en el mundo, con mucho cariño, respeto y admiración. Los amo

A mis hermanos Miriam Lizbeth y Pedro Heruviel, gracias por el apoyo que me brindaron, por ser incondicionales, por su confianza, por todo el amor que me brindan, pero sobre todo por la fortuna de tenerlos conmigo.

También está dedicada a mis abuelos paternos David Espitia Huijón† y Eustolia Patiño Álvarez† y a mis abuelos maternos J. Refugio Flores Sánchez†, por todas sus enseñanzas, consejos y sobre todo por el amor que me brindaron, y para María Consuelo Velázquez Hernández, por compartir buenos y malos momentos, por sus consejos y por el amor que me brinda sobre todas las cosas.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	Producción de Fresa en México	3
2.2	Características Generales del Cultivo de Fresa	3
2.3	Descripción Botánica de la Fresa	4
2.3.1	Calidad de la planta de fresa.	6
2.3.2	Formas de Propagación.....	6
2.4	Generalidades del Cultivo <i>In Vitro</i>	7
2.4.1	Medios de Cultivo.....	8
2.4.2	Etapas del Cultivo <i>In Vitro</i>	9
2.5	Factores que Influyen en el Cultivo <i>In Vitro</i>	10
2.5.1	Material Vegetal.....	10
2.5.2	Factores Físicos.....	11
2.5.3	Reguladores de Crecimiento	11
2.6	Ventajas y Limitaciones del Cultivo <i>In Vitro</i>	13
2.7	Aclimatización	13
2.7.1	Influencia de la Anatomía de las Plantas Propagadas <i>In Vitro</i> en la Aclimatización.....	15
2.8	Enzimas del Estrés	17
2.8.1	Catalasas (CAT)	18
2.9	Carbohidratos	19
III.	OBJETIVOS.....	21
3.1	General	21
3.2	Particulares	21
IV.	HIPOTESIS	21
V.	MATERIALES Y METODOS.....	22
5.1	Localización del Experimento.....	22

5.2	Material Vegetal.....	22
5.3	Tratamientos y Diseño Experimental.....	22
5.3.1	Enraizamiento <i>In Vitro</i>	23
5.3.2	Enraizamiento <i>In Vivo</i> y Aclimatización.....	24
5.4	Aclimatización.....	25
5.5	Variables Respuestas.....	26
5.5.1.	Vigor de la Planta.....	26
5.5.2.	Enraizamiento.....	26
5.5.3.	Porcentaje de Aclimatización.....	26
5.5.4.	Catalasas.....	26
5.5.5	Carbohidratos.....	27
5.6.	Análisis Estadístico.....	28
5.6.1	Enraizamiento <i>In Vitro</i>	28
5.6.2	Enraizamiento <i>In Vivo</i>	28
5.6.3	Aclimatización.....	29
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1	Cinética de Enraizamiento.....	30
6.2	Enraizamiento.....	33
6.2.1	Formación de Raíces Adventicias de Primer Orden, Segundo Orden y Longitud de la Raíz de Mayor Tamaño.....	33
6.2.2	Longitud y Diámetro de la Corona de los Brotes Enraizados <i>In Vitro</i>	40
6.2.3.	Formación de Brotes en el Enraizamiento <i>In Vitro</i>	42
6.2.4	Número de Hojas en Los Brotes Enraizados <i>In Vitro</i>	43
6.3	Enraizamiento <i>In Vivo</i>	44
6.3.1	Formación de Raíces Adventicias de Primer Orden.....	44
6.3.2	Longitud y Diámetro de la Corona de los Explantes en Enraizamiento.....	47
6.3.3	Número de Hojas Presentes en los Brotes Provenientes de Enraizamiento <i>In Vivo</i>	48
6.4	Fase de Aclimatización.....	49
6.4.1	Plantas Enraizadas <i>In Vitro</i> , En Fase de Aclimatización con Dos Sustratos.....	50
6.4.2	Plantas Enraizadas <i>In Vivo</i> , con dos Sustratos en Etapa de Aclimatización.....	53

6.4.3 Comparación de Los Sustratos para el Índice de Supervivencia.....	55
6.4.4 Supervivencia en Ambos Sistemas de Enraizamientos.	57
6.5 Comportamiento de la actividad de las Catalasas (CAT) durante la Aclimatización.	59
6.5.1 Comportamiento de las CAT en la Variedad CP. Zamorana.	60
6.5.2 Comportamiento de la CAT en la Variedad CP. Jacona.....	64
6.6 Fluctuación de los Carbohidratos en los Primeros 15 Días de la Aclimatización de Plantas de Fresa Obtenidas <i>In Vitro</i>	68
6.6.1 Fluctuación de los Carbohidratos para la Variedad CP. Zamorana.	68
6.6.2 Fluctuación de los Carbohidratos para la Variedad CP. Jacona.	70
6.7 Evaluación de Plantas Provenientes de <i>In Vitro</i> al Momento de Ser Llevadas a Campo.	72
6.7.1 Diámetro de las Plantas en Invernadero al Momento de Ser Llevadas a Campo.	72
6.7.2 Número de Hojas Presentes en la Plantas al Momento de Ser Llevadas a Campo.	74
6.7.3 Número y Longitud de Raíces Adventicias en las Plantas de Fresa al Momento de ser Llevadas a Campo.	76
6.7.4 Peso Fresco y Seco de las Plantas Llevadas a Campo.....	77
6.7.5 Comportamiento de las CAT y los Carbohidratos en las Plantas Llevadas a Campo.	81
VII. CONCLUSIONES.....	84
VIII. LITERATURA CITADA.....	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Medio Murashige y Skoog (MS).....	23
Cuadro 2. Tratamientos utilizados en el Enraizamiento <i>In Vitro</i>	24
Cuadro 3. Tratamientos utilizados <i>In Vivo</i>	25
Cuadro 4. Número de Raíces Adventicias de Primer Orden, Segundo Orden, Longitud de la raíz de mayor Tamaño y Presencia de Callo por Tratamiento en Cultivo <i>In Vitro</i>	36
Cuadro 5. Número de Raíces Adventicias de Primer Orden, Segundo Orden y Longitud de la Raíz de Mayor Tamaño, por Variedad Generadas en Cultivo <i>In Vitro</i>	40
Cuadro 6. Longitud y Diámetro de Corona de Explantes Enraizados <i>In Vitro</i>	41
Cuadro 7. Longitud y Diámetro de Explantes Enraizados <i>In Vitro</i> por Variedad	41
Cuadro 8. Brotación por Tratamiento de Enraizamiento <i>In Vitro</i>	42
Cuadro 9. Brotación por Variedad en Cultivo <i>In Vitro</i>	42
Cuadro 10. Número de Hojas de los Explantes Enraizados <i>In Vitro</i>	43
Cuadro 11. Número de las Hojas por Explante Generadas <i>In Vitro</i> por Variedad	44
Cuadro 12. Número de Raíces por Tratamiento en Enraizamiento <i>In Vivo</i>	45
Cuadro 13. Número de Raíces por Variedad en Enraizamiento <i>In Vivo</i>	46
Cuadro 14. Longitud y Diámetro de la Corona en los Tratamientos de Enraizamiento <i>In Vivo</i>	47
Cuadro 15. Longitud y Diámetro de las Variedad en el Enraizamiento <i>In Vivo</i>	47
Cuadro 16. Número de Hojas por Tratamiento en el Enraizamiento <i>In Vivo</i>	48
Cuadro 17. Número de Hojas por Variedad en el Enraizamiento <i>In Vivo</i>	49
Cuadro 18. Comparación del Índice de Supervivencia de la Variedad CP Zamorana para los tratamientos utilizados <i>In Vitro</i>	51
Cuadro 19. Comparación del Índice de Supervivencia de la Variedad Zamorana para dos Sustratos	51
Cuadro 20. Comparación del Índice de Supervivencia de la Variedad CP. Jacona.....	53
Cuadro 21. Comparación del Índic de Supervivencia de la Variedad CP. Jacona para los Sustratos Utilizados.	53
Cuadro 22. Comparación del Índice de Supervivencia en Enraizamiento <i>In Vivo</i> de la Variedad CP. Zamorana con Tres Tratamientos.....	54

Cuadro 23. Comparación del Índice de Supervivencia en el Enraizamiento <i>In Vivo</i> de la variedad CP. Zamorana para los Sustratos Utilizados.	54
Cuadro 24. Comparación del Índice de Supervivencia en Enraizamiento <i>In Vivo</i> de la Variedad CP. Jacona en Dos Sustratos.	55
Cuadro 25. Comparación del Índice de Supervivencia para el Enraizamiento <i>In Vivo</i> para CP. Jacona en dos Sustratos.	55
Cuadro 26. Comparación de Sustratos para el Enraizamiento <i>In Vitro</i>	56
Cuadro 27. Comparación de Sustratos para el Enraizamiento <i>In Vivo</i>	57
Cuadro 28. Supervivencia por Variedad en Ambos sistemas de Enraizamiento.	58
Cuadro 29. Diámetro de las Coronas de Plantas que se Encontraban en Invernadero para ser Llevadas a Campo.	73
Cuadro 30. Diámetro de Acuerdo a la Variedad y al tiempo que se Encontraban en Invernadero.	74
Cuadro 31. Número de Hojas Presentes en las Plantas de Fresa Listas para ser Llevadas a Campo.	75
Cuadro 32. Número de Hojas por Variedad y Tiempo en Invernadero para ser Llevadas a Campo.	75
Cuadro 33. Número de Raíces y Longitud de la Raíz más Grande por Variedad en Plantas de Fresa Propagadas <i>In Vitro</i> al Momento de ser Llevadas a Campo.	76
Cuadro 34. Número de Raíces y Longitud de la Raíz más Grande por Variedad y Tiempo en Invernadero al Momento de ser Llevadas a Campo.	77
Cuadro 35. Peso Fresco y Seco de la Raíz por Variedad al Momento de Ser Llevadas a Campo.	78
Cuadro 36. Comparación por Variedades y Tiempo de Estar en invernadero para Peso Fresco y Seco de la Raíz al momento de ser Llevadas a Campo.	79
Cuadro 37. Peso Fresco y Seco de la Parte Aérea de la Planta de Fresa por Variedad al Momento de Ser Llevadas a Campo.	80
Cuadro 38. Peso Fresco y Seco de la Parte Aérea por Variedad y Tiempo de Estar en Invernadero al Momento de Ser Llevadas a Campo.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de la planta de fresa. Fuente: Bonet-Gigante, 2010.....	6
Figura 2. Reacción catalizada por catalasa (Marín y Roustan, 2000).....	18
Figura 3. Efecto de ocho tratamientos sobre el enraizamiento de brotes de fresa de la variedad CP. Zamorana, cultivados <i>in vitro</i> . Los resultados son la media de tres experimentos, con 18 brotes y tres repeticiones por tratamiento.....	32
Figura 4. Efecto de ocho tratamientos sobre el enraizamiento de brotes de fresa de la variedad CP. Jaconá, cultivados <i>in vitro</i> . Los resultados son la media de tres experimentos, con 18 brotes y tres repeticiones tratamiento.....	32
Figura 5. Apariencia de la raíz de los brotes de la Variedad CP. Jacona enraizada con los diferentes tratamientos. A) Brote de eraizado con el tratamiento testigo, B) Brote enraizado con AIB, C) Brote enraizado con TRIA 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,D) Brote enraizado con TRIA con 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, E) Brote enraizado con TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,F) Brote enraizado con BR 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,G) Brote enraizado con BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y H) Brote enraizado con BR 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	38
Figura 6. Apariencia de la raíz de los brotes de la Variedad CP. Zamorana enraizada con los diferentes tratamientos. A) Brote de eraizado con el tratamiento testigo, B) Brote enraizado con AIB, C) Brote enraizado con TRIA 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,C) Brote enraizado con TRIA con 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, D) Brote enraizado con TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,E) Brote enraizado con BR 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,F) Brote enraizado con BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y G) Brote enraizado con BR 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	39
Figura 7. Apariencia de las raíces de plantas de fresa enraizadas <i>In Vivo</i> , las tres primeras fotos (A, B, C) son de la variedad CP. Jacona y las tres fotos posteriores (D, E, F) son de la variedad CP. Zamorana. A y D) Planta de fresa enraizada sin regulador de crecimiento, B y E) Planta de fresa enraizada con Radix® 1500, C y F) Plantas de fresa enraizadas con Raizone Plus® .	46
Figura 8. Plantas recién llevadas a la fase de Aclimatización en Invernadero. A) Plantas cubiertas con el vaso para mantener la humedad relativa y de esta manera ayudar a su adaptación al nuevo microambiente, B). Aspecto de una planta de fresa dentro del contenedor para mantener la humedad.	49
Figura 9. Plantas de Fresa Aclimatizadas, A) Planta de Fresa a los 20 días de estar en el invernadero, B) Estolón de una Planta Aclimatizada de Mes y Medio, C) Aspecto de las	

Plantas de Fresa Aclimatizadas a los 2 Meses y D) Planta de Fresa con Flor Después de 4 Meses de Encontrarse en el Invernadero.	59
Figura 10. Comportamiento de las CAT al paso de 15 días en plantas de Fresa Variedad CP. Zamorana, cultivadas <i>in vitro</i> , llevadas a condiciones invernadero, en un sustrato de Agrolita: Peat Moss (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).....	61
Figura 11. Comportamiento de la CAT en el paso de 15 días para fresa variedad CP. Zamorana cultivada <i>in vitro</i> y llevadas a condiciones de invernadero, en un sustrato de Agrolita: Fibra de Coco (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).....	63
Figura 12. Comportamiento de las CAT en Plantas de Fresa Variedad CP Jacona, Cultivadas <i>in vitro</i> y Ser Llevadas a Condiciones Invernadero, en un sustrato de Agrolita: Peat Moss (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).....	65
Figura 13. Comportamiento de la CAT en el paso de 15 días en Fresa variedad CP. Jacona cultivada <i>in vitro</i> , llevadas a condiciones invernadero, en un sustrato de Agrolita: Fibra de Coco (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).	67
Figura 14. Comportamiento de los Carbohidratos al paso de 15 días, en la parte aérea de fresa variedad CP. Zamorana, cultivadas <i>in vitro</i> , recién llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).	69
Figura 15. Comportamiento de los Carbohidratos al paso de los primeros 15 días en la raíz de Fresa variedad CP. Zamorana cultivada <i>in vitro</i> , llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).....	70
Figura 16. Comportamiento de los Carbohidratos en la parte aérea de fresa variedad CP. Jacona cultivada <i>in vitro</i> , recién llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).	71
Figura 17 . Comportamiento de los Carbohidratos al paso de los primeros 15 días en la raíz de Fresa variedad CP. Jacona cultivada <i>in vitro</i> , llevadas a condiciones invernadero. Cada	

punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).....	72
Figura 18. Fluctuación de los Carbohidratos en la Fase de Aclimatización a campo de Dos Variedades de Fresa Mexicanas, cada punto en la gráfica son medias de 3 repeticiones, con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).....	82
Figura 19. Fluctuación de la actividad de la Catalasa en la fase de aclimatización a campo de dos variedades de fresa mexicanas, cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 3 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).....	83
Figura 20. Plantas de Fresa en Campo, Provenientes de Cultivo <i>in vitro</i> . A) Planta de Fresa con Estolones, B) Planta en Producción.	83

I. INTRODUCCIÓN

En el 2013, Estados Unidos fue el primer productor de fresa a nivel mundial, ocupando México el quinto lugar con una superficie sembrada de 9 068 hectáreas, con un volumen de 360 426 toneladas y el tercero en exportaciones, debido a que el mercado mundial reconoce la calidad y sabor de la fresa mexicana; al año se exportan dos terceras partes de la producción nacional (SIAP, 2013).

La fresa se cultiva en 12 estados del país, de los cuales los que concentran la mayor superficie son: Michoacán, Baja California Norte, Jalisco y Guanajuato los que representan el 96% tanto de la superficie sembrada como de la producción, tiene un papel importante a nivel regional en dos aspectos: a) el número de empleos que genera en la época de cosecha, considerando que el número de mano de obra alcanza los 1185 jornales·ha⁻¹, considerando las etapas de vivero, plantación comercial e industrialización (Vega, 2007); b) las grandes inversiones en insumos utilizados para la producción. (CONAFRE, 2011).

Michoacán es el primer estado productor de fresa observado en el 2013, abarcando un 53.5 % de la producción correspondiente a 203 314 t.

El cultivo de fresa es de gran importancia socioeconómica por su demanda de mano de obra y porque genera una elevada proporción de los ingresos por divisas que el país obtiene a través de las exportaciones (Sánchez, 2008 b). La producción temprana y la exportación de frutos de buena calidad han significado un importante ingreso de divisas para México, mientras que en invierno participa con la exportación a la mitad del mercado estadounidense con fresa fresca y con un 90% de fresas congeladas (Juárez, 1998).

Las Universidades de California y Florida han creado variedades con una amplia adaptación climática, las cuales desafortunadamente proveen a México de planta madre certificada (Larson, 2000), lo que representa la dependencia de nuestro país por este concepto; además para establecerlas, es necesario pagar altos costos de regalías a la empresa concesionaria por el uso de

la planta y por lo tanto, hay una disminución de la rentabilidad del cultivo para el productor (Martínez-Bolaños *et al.*, 2008).

Con base a la problemática anterior el Colegio de Posgraduados ha obtenido nuevas variedades de fresa, entre las que destacan CP Zamorana (CP 02-01) y CP Jacona (CP 02-04), las cuales ya se encuentran registradas como variedades mexicanas en el catálogo del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción de Fresa en México

En la producción nacional de fresa, destacan por su participación en el volumen los estados de Michoacán, Baja California Norte y Guanajuato (SIAP, 2013). Este cultivo es importante por su valor de la producción y el número de empleos que genera. México, se ubicó en el segundo lugar con un rendimiento de 360 426 toneladas (FAOSTAT, 2012) y cercano a 42 toneladas por hectárea (SIAP, 2013). Este cultivo es considerado de gran importancia económica porque genera muchas divisas tanto por su producción, como por la venta para consumo en fresco en el interior y para exportación (ASERCA, 1998; Barrera y Sánchez, 2003).

Los viveristas mexicanos utilizan plantas de fresa certificadas para establecer sus campos en los meses de enero y febrero, y obtener plantas hijas, las cuales son cosechadas en agosto y septiembre y las venden a los productores como plantas “verdes” (Dávalos – González, 2003) La producción Nacional de planta de Fresa representa una superficie sembrada de 508 hectárea con un rendimiento de 337 056.10 (Toneladas/hectárea) con un valor de \$83 479.00, de los cuales el estado de Michoacán es el principal productor, seguido por Jalisco y Zacatecas con una superficie de 334, 170 y 4 hectáreas respectivamente (SIAP, 2013).

2.2 Características Generales del Cultivo de Fresa

La Fresa que conocemos fue introducida en Europa por los primeros colonos de Virginia en el siglo XIX (Ayesha *et al.* 2011), pero las especies silvestres son nativas de casi todo el mundo, con excepción de Asia, Nueva Zelanda y África (CONAFRE, 2011). El cultivo de las frutillas de fruto pequeño se extendió en Europa hasta el final del siglo XIX, momento en el que comenzaron a surgir híbridos entre especies europeas y americanas, con frutos de mayor tamaño conocidos como fresones (Kirschbaum y Hancock, 2000).

Las especies americanas *Fragaria chiloensis*, Duch. y *Fragaria virginiana*, Duch, han dado origen a través de cruzamientos a cultivares de frutos grandes que se conocen como *Fragaria x ananassa* Duch. (Maroto *et al.*, 1986).

La fresa se desarrolla en una amplia gama de climas que van desde las regiones del Ártico hasta las áreas tropicales, puede crecer en diferentes tipos de suelos y requiere una cantidad adecuada de materia orgánica para retener la humedad en el suelo (Ayesha *et al.* 2011). Actualmente se cuenta con híbridos o variedades que tienen una amplia adaptabilidad que pueden ser cultivadas en climas tropicales y subtropicales (Aspuria *et al.*, 1996; Larson y Shaw, 2000).

2.3 Descripción Botánica de la Fresa

El género *Fragaria*, pertenece a la familia *Rosaceae*, el cual agrupa unas 3000 especies de 107 géneros diferentes. Esta familia se trata de una de las de mayor importancia económica en el mundo.

La clasificación sistemática de la fresa es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Embryobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Suborden: *Rosanae*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosaceae*

Subfamilia: *Rosoideae*

Tribu: *Potentilleae*

Subtribu: *Fragariinae*

Género: *Fragaria*

Especie: *Fragaria x ananassa*.

A pesar de que existen diferentes variedades de fresa y que varían en forma, tamaño, apariencia de la planta, existen ciertas características presentes en todas las fresas. La aparición

de patrones de desarrollo en el suelo, el clima y las enfermedades que se deben en gran parte a la poliploidía altamente heterocigótica de la fresa (Darrow, 1966).

Es una planta rastrera (CONAFRE, 2011) denominada perenne considerada como herbácea, el tallo sobresale del terreno y es comúnmente llamado corona, siendo este un tallo acortado que tiene tejidos vasculares y por encima de él se forman otras coronas secundarias (Branzanti, 1989), la corona produce hojas a intervalos muy cercanos a lo largo del vástago, las flores en la posición terminal sobre el eje del vástago (es determinada), en los tallos florales no presenta hojas, apareciendo las flores de cinco pétalos blancos, que pueden ser perfectas (hermafroditas) o imperfectas (unisexuales) (Parker, 2000), y en la base de la corona se encuentra la raíz. El estolón es un tipo de tallo largo, y el de las flores y frutos es un tipo de tallo corto, producidas por la fresa en dos tipos de ramificaciones (Figura 1) (Hancock, 1999), los estolones crecen a lo largo del suelo, se forman del ápice apical de la planta y en su extremo final se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo puede originar raíces (Parker, 2000). Su sistema radicular es de extensión moderada, el cual por lo regular no rebasa los 30 cm de profundidad, teniendo un aspecto fibroso dividido en primarias y secundarias, siendo las primarias las que hacen el papel de soporte y nacen de la base de las hojas, las secundarias salen de las primarias y forman la masa radicular para la absorción de nutrientes y almacenamiento de sustancias de reserva (Sagñay, 2009; CONAFRE, 2011).

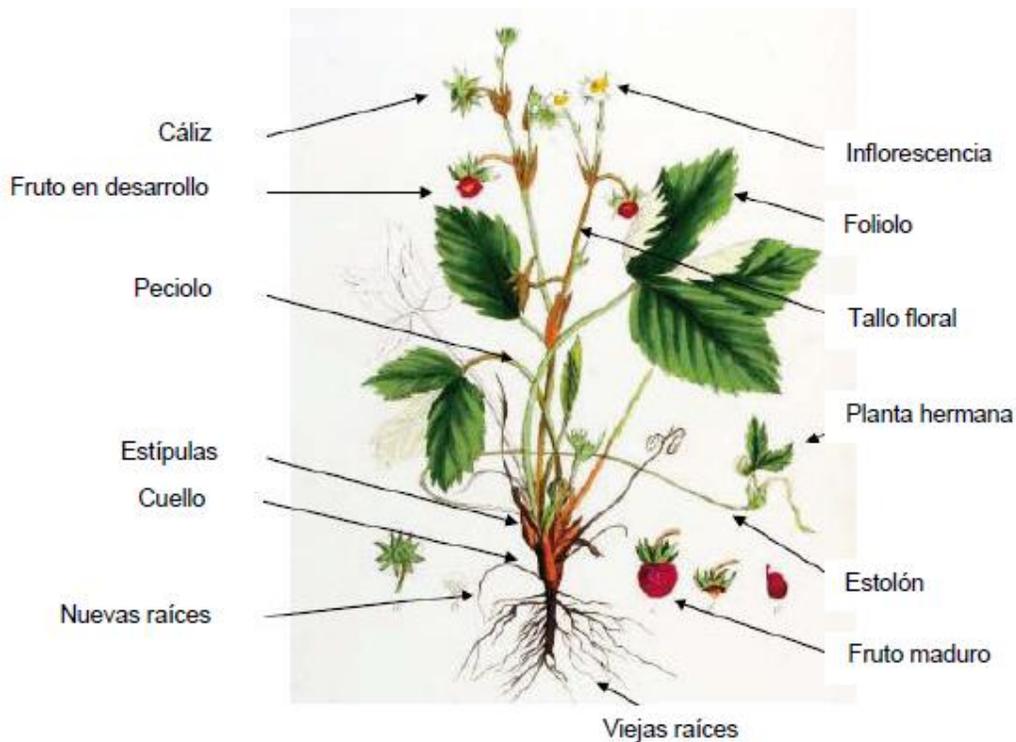


Figura1. Morfología general de la planta de fresa. Fuente: Bonet-Gigante, 2010

2.3.1 Calidad de la planta de fresa.

La planta es la base del cultivo, la calidad desde el punto genético y sanitario tienen un impacto directo en la producción (Sánchez- Sánchez, 2006). Stapleton *et al.* (2001) mencionan que para establecer rápidamente en el terreno de cultivo, tener una producción precoz y alto rendimiento las plantas deben ser aceptables en cuanto a: raíces abundantes, coronas múltiples y gruesas con muchas yemas diferenciadas y alto contenido de carbohidratos.

2.3.2 Formas de Propagación

La fresa cuenta con una propagación vegetativa rápida y segura debido a su sistema de crecimiento y formación de nuevas coronas y estolones. La forma más utilizada de propagar este cultivo es por medio de estolones mismos que son un brote delgado, largo, rastrero que se forma a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la base de la corona, se desarrollan en gran cantidad en épocas de alta temperatura, en el extremo del estolón se forma una roseta de hojas

que en cuanto hace contacto con el suelo emite raíces, lo que origina una nueva planta con caracteres idénticos que la planta madre (López e Inoue, 2001).

También se puede propagar por semilla, la plantita originada por semilla emite una raíz principal fina, blanca, que pronto se ramifica, después de formarse las primeras hojas y la corona primaria, se inicia la formación de raíces adventicias en los costados de la base de las hojas (López e Inoue, 2001)

2.4 Generalidades del Cultivo *In Vitro*

El cultivo de tejidos vegetales comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten al cultivo reproducirse en condiciones asépticas a nivel de órganos, tejidos o células mediante un medio de composición química definida e incubado bajo condiciones ambientales controladas (Pérez, 1998). Este consiste esencialmente en aislar una porción de la planta y proporcionarle artificialmente las condiciones apropiadas, para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido y de esta manera puedan producir un número mayor de plantas con relación al utilizado (Hurtado y Merino, 1991). Con este sistema de propagación masiva, se ha conseguido un gran éxito para la obtención de especies de alto valor económico, como lo son las ornamentales, algunos cultivos hortícolas y frutales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Existen diferentes razones que determinan que el cultivo *in vitro* constituya una tecnología interesante para la producción de plantas de interés (Altman y Loberant, 1998):

- 1.- Producción de plantas de sanidad controlada.
- 2.- Independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos.
- 3.- En relación a la demanda del mercado se puede establecer un sistema de producción definida.
- 4.- Cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar en campo.
- 5.- Conservación de germoplasma.
- 6.- La posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético.
- 7.-La producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción.
- 8.-Síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*.

9.-Obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química.

10.- Producción de plantas transgénicas.

La micropropagación se compone de cuatro etapas secuenciales. Establecimiento, proliferación, enraizamiento y aclimatación (Bouthern y Bron, 1994).

2.4.1 Medios de Cultivo.

Actualmente se cuenta con literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con protocolos correspondientes a muchas especies vegetales, también se tienen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y enraizamiento es dificultoso y se requiere de una intensa investigación para lograr su micropropagación o para obtener callos.

El medio de cultivo consiste en una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual se establecen *in vitro*. Son necesarios los siguientes componentes nutrimentales dentro del medio de cultivo: macronutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre), micronutrientes (Zinc, cobre, boro, cobalto, molibdeno, manganeso, hierro, etc), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y mioinositol, etc), aminoácidos (glicina o caseína hidrolizada), reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas, principalmente), agente gelificante y agua (López, 1990). Krikorian (1991) menciona que no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. Sin embargo, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes o reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones.

El pH del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de planta, las especies vegetales responden de diferente manera por lo que es necesario ajustarlo dependiendo del requerimiento de cada especie. El pH adecuado en un medio de cultivo estará en un rango de 4.5 - 7, siendo el pH 5.7 el más generalizado (Abdeinour y Vicent, 1993).

2.4.2 Etapas del Cultivo *In Vitro*

2.4.2.1 *Etapa 0. Preparación y Selección de Plantas Madre*

Esta etapa consiste en clasificar el material que se encuentra en condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas (Hartmann *et al.*, 1995).

2.4.2.2 *Etapa I. Establecimiento del Cultivo Aséptico*

Las plantas donadoras de los explantes se someten a una desinfección superficial, con productos químicos que sean tóxicos para los microorganismos, debido a que si no son eliminados podrían competir con el crecimiento y desarrollo del explante (Debergh y Zimmerman, 1991).

Durante la etapa de establecimiento, el explante pasa por un periodo inicial, donde se estabiliza después del estrés producido por el aislamiento de la planta donadora y por los tratamientos de desinfección. De tal manera se espera la división y elongación celular (Smith, 1992).

2.4.2.3 *Etapa II. Multiplicación*

Por lo general el medio de cultivo es similar al de la fase de establecimiento y es común utilizar citoquininas con el propósito de estimular la división celular e inhibir la dominancia apical para lograr el crecimiento de brotes (Razdan, 2003). El número de subcultivos y la composición del medio pueden afectar la estabilidad genética y la tasa de multiplicación de las plantas obtenidas (Hartmann *et al.*, 1995)

2.4.2.4 *Etapa III. Enraizamiento*

Para este procedimiento se deben transferir por unos días a un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y posteriormente se subcultivan en medio para la inducción de raíces

in vitro. Se recomienda que se disminuyan los niveles de citoquininas exógenas y se aumenten los de auxinas exógenas. Adicionalmente, se debe disminuir la concentración de las sales y de fuente de carbono (Razdan, 2003). Por otra parte, para tener mejores resultados en la aclimatación es necesario que en la fase *in vitro* se tenga un desarrollo radicular (Pierik, 1990). Se ha demostrado que las raíces de las plantas propagadas por este método generalmente pierden sus pelos radicales durante el proceso de aclimatización, pero ellas son importantes porque a partir de estas se desarrollan las nuevas raíces que son funcionales totalmente (Végvari, 2001).

2.4.2.5 Etapa IV. Aclimatización

Esta etapa es conocida como endurecimiento, es el proceso mediante el cual las plantas obtenidas en condiciones *in vitro* se transfieren gradualmente a un ambiente *ex vitro*, reduciendo gradualmente la humedad relativa que rodea la planta con el objetivo de lograr que la planta controle la transpiración y pueda adaptarse a un sustrato en condiciones de campo (Hartmann *et al.*, 1995).

2.5 Factores que Influyen en el Cultivo *In Vitro*

2.5.1 Material Vegetal

El estado fisiológico de la planta que dona el explante, influye significativamente en su capacidad morfogénica, por ejemplo, los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer y Chin 1983). De la misma manera la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis, mientras más joven y menos diferenciado sea el explante, mejor será la repuesta *in vitro* (Villalobos *et al.*, 1982). En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos generalmente han sido la fuente del explante (Villalobos, 1980). El tamaño del explante no tiene aparentemente la mayor influencia, solo que sea el caso de obtener plantas libres de virus, debido a que los meristemas son los que tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de patógenos (Villalobos *et al.*, 1982).

2.5.2 Factores Físicos

Los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores más estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre los 24 y 28°C. Se ha variado los regímenes de temperatura en el día y la noche (Chee y Pool 1982).

La luz es un factor fundamental en la morfogénesis. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad (Villalobos *et al.*, 1984).

2.5.3 Reguladores de Crecimiento

Son esenciales en los medios de cultivo ya que orientan al explante a la formación de nuevos brotes. Son sustancias extraídas de algún tejido vegetal o sustancia sintética, que tienen el efecto de regular el crecimiento. Dando así que los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos orgánicos distintos a los nutrientes que en cantidades pequeñas pueden alterar el proceso fisiológico de las plantas (Hurtado y Merino, 1991).

El desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción de factores externos e internos. Dentro de los internos se incluyen las hormonas o fitohormonas, las cuales se definen como señales químicas que facilitan la comunicación entre las células y coordinan sus actividades, el control hormonal lo realizan cinco grandes grupos principales: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. En los últimos años también se han aislado una serie de sustancias que también se pueden clasificar como hormonas vegetales. En este nuevo grupo de hormonas se incluyen: jasmonatos, poliaminas, salicatos y brasinoesteroides (Azcon-Bieto y Talón, 2001).

2.5.3.1 *Enraizadores*

Las auxinas son fitorreguladores que se encuentran en la mayoría de las plantas superiores. Son compuestos que poseen como característica principal un núcleo indólico sintetizado por la ruta metabólica del ácido shikímico a partir de triptófano (Alemán, 2000). Entre las principales funciones fisiológicas que cumplen las auxinas están el provocar la elongación en las células, retardo en la abscisión de hojas y frutos, diferenciación vascular, formación de raíces adventicias y laterales, entre otras (Jordán, 2006). Estas se sintetizan principalmente en regiones meristemáticas y se desplazan hacia otras zonas de la planta, esta se transporta a través del parénquima que rodea a los haces vasculares (García, 2005).

El compuesto más representativo es el ácido 3-indolacético (AIA) es la auxina natural más común (Pierik, 1990), la cual fue la primera auxina natural identificada, otras auxinas naturales identificadas son el 4-Cl-AIA y el ácido indolbutírico (AIB). También existen auxinas sintéticas como el ácido 2,4-d clorofenoxi acético (2,4-D) y el ácido naftalenacético (ANA), las cuales inducen efectos similares a las auxinas naturales, existiendo diferencias al usar diferentes concentraciones en la sensibilidad a la hormona (Sitbon y Perrot, 1997).

2.5.3.2 Reguladores de Crecimiento de Nueva Generación Utilizados como Enraizadores

2.5.3.2.1 Brasinoesteroides

Los Brasinoesteroides son reguladores muy potentes que incluso en bajas concentraciones expresan un amplio efecto sobre los tejidos vegetales en cultivo *in vitro*. Son compuestos de naturaleza esteroide, cuyo compuesto representativo constituye la brasinolida, aislada de *Brassica napus* (Adams, 1998). Entre sus principales funciones están el promover la elongación celular, incrementar la división celular, proliferación de follaje y germinación de la planta

(Castillo, 2004). Las concentraciones en el medio de cultivo de este regulador fluctúan entre 0.1 a 0.001 mg·L⁻¹ (Rossi, 2005).

2.5.3.2.2 Triacontanol

Es considerado como un potente regulador de crecimiento (Verma *et al.*, 2011) ya que puede actuar como un metabolito o mensajero secundario que se mueve rápidamente en el interior de las plantas influyendo de manera significativa en la producción de enzimas para el metabolismo de carbohidratos (Ries *et al.*, 1988)

2.6 Ventajas y Limitaciones del Cultivo *In Vitro*

Las principales ventajas residen en la posibilidad de utilizar una o pocas plantas madre para con ello mantener el genotipo, obtener un gran número de plantas en un espacio restringido y en un tiempo limitado, obtener plantas desvinculada con el ciclo vegetativo de ellas y obtener plantas libres de virus si se trabaja con ciertas precauciones (meristemos), (Baldini, 1992).

Las principales limitaciones es que son necesarias instalaciones costosas y en algunas especies no se justifica la inversión, el personal debe de tener adiestramiento específico, en algunos cultivares y en ciertos sistemas de cultivo, se pueden llegar a originar clases específicas de modificaciones genéticas y epigenéticas que pueden alterar las plantas producidas, en los frutales se ha observado juvenilidad (Bouthern y Bron, 1994).

2.7 Aclimatización

Es la última fase de la micropropagación, donde existe la mayor pérdida de las plántulas, debido a que el cultivo *in vitro* puede producir algunas modificaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas a las plantas propagadas por este método, que con lleva bajos porcentajes de sobrevivencia durante el proceso de aclimatación, es por ello que el paso a las condiciones *ex vitro*, es un paso crítico para muchas especies (Fila *et al.*, 1998). Thomas (1998), menciona que una de las causas de la pérdida de las plántulas es que generalmente son susceptibles a la rápida

deshidratación cuando se expone a una humedad relativa reducida, además de que deben pasar de heterotróficas a completamente autotróficas, a través de la fotosíntesis. Tienen que desarrollar raíces, brotes funcionales y aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos (Hartmann y Kester, 1995).

Dichas dificultades durante la aclimatación se deben a que el transplante es realizado desde un ambiente en el que las plantas se mantienen en una atmósfera con muy poco intercambio gaseoso, una humedad relativa cercana al 100%, una fuente exógena de carbohidratos metabolizables, a un ambiente *ex vitro* donde las condiciones no son controladas (Grout y Price, 1987). Al principio de esta etapa la plántula puede estar enraizada o no (Hartmann y Kester, 1995). Otra dificultad es que las condiciones del cultivo convencionales en el sistema *in vitro* son subóptimas para el desarrollo fotosintético. Generalmente presentan una baja intensidad de luz, una concentración de CO₂ menor a 100 ppm, durante el fotoperiodo (Neil *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 1990; Kozai, 1990).

Durante esta etapa, cerca del 20-50 % de las plantas se pierden, principalmente a tres grandes causas:

- 1.- La primera causa es una baja tasa fotosintética y un incompleto desarrollo autotrófico de las plantas *in vitro*, lo que influye en el cambio de nutrición provocado al momento de la transferencia, la hojas formadas *in vitro* son frecuentemente delgadas, blandas y poco activas fotosintéticamente, presentando pocas y pequeñas células de parénquima en empalizada, con baja eficiencia en el uso de la luz y con grandes espacios en el mezófilo (Kozai, 1990).

Aunque las hojas se encuentren verdes, en realidad no son capaces de efectuar fotosíntesis, lo que implica que la plántula debe iniciar nuevas hojas después de que ha sido removida del ambiente del medio de cultivo (Hartmann y Kester, 1995).

- 2.- Las plantas *in vitro* tiene una alta tasa transpiratoria, lo que provoca una gran pérdida de agua, debido a una delgada capa cuticular y un funcionamiento anormal del estoma (Kozai, 1990).

Gravina *et al.* (1995), mencionan que la planta que ha crecido en condiciones *in vitro*, presenta una cutícula poco desarrollada, debido a la alta humedad relativa presente en el tubo de cultivo utilizado (90-100%), lo que provoca una excesiva pérdida de agua postrasplante, además de que los estomas no operan adecuadamente, siendo la causa de mayor pérdida de agua en las primeras horas de la aclimatación.

3.- Existe una reducción en el ascenso del agua a través de las raíces y sistema vascular. Las raíces formadas *in vitro* son poco funcionales, presentando epidermis no suberizada y pocos pelos radicales (Kozai, 1990). Se puede observar claramente que las condiciones ambientales del cultivo influyen profundamente las características anatómicas y fisiológicas de las plantas *in vitro*, y éstas pueden ser las principales razones de la baja supervivencia y baja tasa de crecimiento en las plantas en el periodo de aclimatación (Morales, 1992).

Después de transferirse las plantas a condiciones *ex vitro*, las plantas tienen que corregir el bajo o nulo intercambio gaseoso, la producción de etileno y la baja densidad fotosintética, para aclimatizarse al nuevo ambiente, ya sea en invernadero o en el campo (Kadlecek *et al.*, 2001). Las concentraciones de etileno en los frascos de cultivo pueden llegar a afectar el crecimiento *in vitro* (Santamaría *et al.*, 2000).

Cuando las plantas son transferidas a condiciones *in vivo*, con radiaciones más altas, puede llegar a ocurrir un estrés por luz, incluyendo la fotoinhibición, sin embargo existen algunas especies que toleran mayores radiaciones sin presentar mayor estrés. El control de la luz, es esencial para la aclimatización, aumentando la tasa de sobrevivencia (Amancio *et al.*, 1999).

2.7.1 Influencia de la Anatomía de las Plantas Propagadas *In Vitro* en la Aclimatización.

Ocasionalmente se llegan a producir modificaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas que llegan a afectar a las plantas propagadas *in vitro*, como lo mencionan Gribaudo *et al.* (2001), estas plantas por lo general son más susceptibles a una rápida deshidratación cuando se exponen a una baja humedad relativa. Por su parte Ritchie *et al.* (1991) y Brainerd y

Bron (1994), coinciden en que las plantas micropropagadas presentan modificaciones particularmente en el estoma y la cutícula, presentando células en empalizada más pequeñas y más espacios aéreos en el mesófilo, produciendo con ello un alto porcentaje de mortalidad en la transferencia al invernadero.

2.7.1.1 Factores Morfológicos que Influyen en la Aclimatización.

La respuesta a la fotosíntesis de las plantas *in vitro*, es similar a la de las plantas de sombra, las cuales se encuentran caracterizadas por bajas tasas fotosintéticas y de igual manera una baja compensación de luz con puntos de saturación bajos. La anatomía de las hojas es de acuerdo a las características fisiológicas mencionadas, ya que el efecto de la luz en el desarrollo del parénquima en empalizada, es ciertamente un factor determinante anatómicamente. Sin embargo las deficiencias en las estructuras de los cloroplastos como el desarrollo de la grana, el nivel bioquímico y una baja actividad de la Rubisco, también contribuye a la limitación fotosintética (Amancio *et al.*, 1999).

Cuando las plantas son transferidas a condiciones *in vivo*, a radiaciones más altas, puede ocurrir estrés de luz, incluyendo la fotoinhibición y la fotooxidación de la clorofila. El control y la optimización de la luz son esenciales para la aclimatización satisfactoria (Amancio *et al.*, 1999). Los factores limitantes para la fotosíntesis de las plantas *in vitro*, son la baja concentración de CO₂ y la baja intensidad de la luz, un aumento simultáneo de estos factores generalmente hace posible mejorar la actividad de la fotosíntesis *in vitro* (Slavtcheva y Dimitrova 2000). Van y Debergh (1996), mencionan que lo importante en las plantas *in vitro*, son las reservas de hidratos de carbono para superar el estrés del trasplante.

La pérdida de agua en las plantas micropropagadas durante la aclimatización se ha atribuido al mal funcionamiento de los estomas y al poco contenido de cera epicuticular (Gribaudo *et al.*, 2001). Por otro lado, un porcentaje de humedad relativa demasiado alto implica la falta de desarrollo de una cutícula cerosa que proteja a la plántula de la pérdida de agua (Castillo, 2004).

Gribaudo *et al.* (2001) observaron que la cantidad de cera de la hoja de las plantas *in vitro* era baja, anormalmente estructurada y químicamente diferente a la cera de las plantas crecidas en el invernadero. Además evaluaron la presencia de cera epicuticular de la superficie adaxial de la hoja, determinando que la mayoría del agua que se perdió a través de la superficie adaxial fue debido a un cierre estomático imperfecto. Brainerdy Bron (1994), mencionan que en un corto tiempo de aclimatización con humedad, se involucra un cambio en el funcionamiento de los estomas el cual ocurre en menos de cinco días después de exponerlas a una baja humedad relativa, llevándose un mayor tiempo de aclimatización donde se involucra el desarrollo de la cera y la reorientación de los cloroplastos lo cual ocurre entre los 10 a 14 días. Romano *et al.* (1992) demostraron que los estomas de las plántulas *in vitro* se encuentran levantados alrededor de las células guarda comparados con los normales que son elípticos y con las células guarda hundidas.

Se menciona que las plantas micropropagadas tienen una pobre conexión raíz-tallo, debido a que el equilibrio del agua en los tejidos no depende únicamente de regular la transpiración, sino de un suministro adecuado de agua en las raíces, la estructura alterada, la absorción y transporte del agua es negativo, por lo que la captación del agua por parte de las raíces, junto con la pérdida de agua por los ápices, es de importancia primaria para el mantenimiento del equilibrio del agua durante la aclimatización de las plantas (Fila *et al.*, 1998).

2.8 Enzimas del Estrés

Los sistemas antioxidantes enzimáticos son un grupo variado de enzimas con la propiedad de ser capaces de eliminar o neutralizar los radicales libres y a las especies activas de oxígeno (De Paula, 1994; Loscos, 2007). Las principales enzimas son las superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y las enzimas del ciclo ascorbato-glutation (ASC-GSH) (Loscos, 2007; Montoliu, 2010). Estos sistemas antioxidantes, dotan a las células con una máquina altamente eficiente para la desintoxicación de O_2 y de H_2O_2 . El balance entre las actividades de las enzimas y moléculas en las células es crucial para determinar el nivel del estado estacionario de O_2 y H_2O_2 , (Rivera *et al.*, 2008). La exposición de las plantas a ROS pueden potenciar o reducir la capacidad antioxidante, dependiendo del tipo e intensidad del estrés aplicado, de la especie, del tejido vegetal analizado y de la edad de la planta (Foyer y Noctor, 2005).

2.8.1 Catalasas (CAT)

Se trata de una enzima que se encuentra en la mayoría de los organismos vivos que crecen en presencia de O₂ y es una de las de mayor poder catalizador que se conocen. La catalasa (E.C., 1.11.1.6; CAT) es una enzima tetramérica de 240 kDa, antioxidante que contiene un grupo hemoproteína, que se presenta en forma de tetrámero (conformado por 4 cadenas polipeptídicas de más de 500 aminoácidos cada una), que presenta en cada monómero un grupo Fe (III) en su centro catalítico, NADPH o un dominio de tipo flavodoxina para prevenir la acumulación de una forma inactivada de Fe (IV) (Perl-Treves y Perl, 2002) y se encuentra en todos los organismos aeróbicos (Martínez, 2011). Tienen la función clave en la protección de las células contra el estrés oxidativo por la dismutación del H₂O₂ a O₂ y H₂O sin necesidad de poder reductor. Como se puede mostrar en la Figura 2. La catalasa es activa tan sólo a altas concentraciones de H₂O₂ (Naya, 2007), generadas principalmente por la glicolato oxidasa y también por la urato oxidasa y la acil CoA oxidasa (Del Río *et al.*, 1992).



Figura2. Reacción catalizada por catalasa (Marín y Roustan, 2000).

La CAT está presente en los peroxisomas, citosol y mitocondrias de la célula, la cual desempeña un papel clave en el equilibrio del nivel de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), mediante su descomposición de agua y oxígeno (Igamberdlev y Lea, 2002). Esta actúa fundamentalmente sobre el peróxido de hidrógeno producido en la β-oxidación de los ácidos grasos (glioxisomas) y en la fotorrespiración (peroxisomas), que es donde se concentran altas cantidades de H₂O₂ (De Paula, 1994; Kuk, *et al.*, 2003; Vuleta, *et al.*, 2010). La función de la catalasa sería eliminar todo el exceso de H₂O₂ en situaciones de estrés oxidativo (Mittler, 2002), antes de que éste se difunda al citoplasma y pueda reaccionar con las biomoléculas (Montoliu, 2010)

La expresión de la enzima está regulada durante el desarrollo de la planta, pero también responde a diversas señales ambientales como el exceso de luz y las temperaturas extremas, ya que generalmente la enzima se inhibe tanto a temperaturas bajas como ante un shock térmico

(Dat, *et al.*, 2000). El papel protector de la catalasa en hojas, además de estar limitado por su baja afinidad y por su localización, está desfavorecido al ser fácilmente inactivada por la luz (Feierabend y Cols., 1992).

La reacción de la catalasa es una de las más rápidas conocidas en la naturaleza. Presenta una doble función ya que dependiendo de la concentración de H_2O_2 presente, los donadores de H_2 varían, siendo a bajas concentraciones compuestos como el etanol o compuesto fenólicos y a altas concentraciones es el propio H_2O_2 el que actúa tanto como donador como aceptor de moléculas de H_2 (Scandalios *et al.* 1997).

2.9 Carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos orgánicos constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno. En su forma más sencilla la fórmula general es $C_nH_{2n}O_n$. Varían desde azúcares simples que contienen de tres a siete átomos de carbono hasta polímeros muy complejos. Sólo las hexosas (azúcares de seis carbonos) y las pentosas (azúcares de cinco carbonos) y sus polímeros tienen importancia en la nutrición.

Los carbohidratos (polisacáridos) confieren a la pared celular dos importantes propiedades. La primera es la elasticidad de la pared, lo que permite que se pueda expandir durante el crecimiento celular, la segunda es la rigidez, la cual confiere la fuerza y la determina la forma de la célula (Abbott y Harker, 2004). Los azúcares como la glucosa, fructuosa y sacarosa son las principales componentes solubles presentes en la fresa madura y sus concentraciones dependen de las condiciones de crecimiento y el tipo de variedad (Cordenunsi *et al.*, 2002).

El contenido de carbohidratos de la planta hija de fresa influye en el establecimiento de la plantación y rendimiento de fruto (Schupp y Hennion, 1997). Una alta concentración de carbohidratos en la planta favorece la producción precoz y altos rendimientos (Stapleton *et al.*, 2001), por otrolado la ausencia de carbohidratos en las plantas, generan alteraciones en los

procesos metabólicos disminuyendo la actividad enzimática relacionada con el metabolismo de azúcares, respiración, reducción de nitratos y síntesis de proteínas (Brouquisse *et al.*, 1992).

III. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el proceso de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* en dos variedades de fresa probando diferentes reguladores de crecimiento y concentraciones, así como evaluar el proceso de aclimatización en condiciones de invernadero midiendo la actividad enzimática y el contenido de carbohidratos como indicadores de adaptación.

3.2 Particulares

- Evaluar el porcentaje y velocidad de enraizamiento en los sistemas *in vitro* e *in vivo* que permitan establecer estrategias adecuadas para la aclimatización de las plantas en invernadero en menor tiempo.
- Evaluar la cinética y calidad del enraizamiento en los sistemas *ex vitro* e *in vitro*.
- En ambos sistemas se evaluarán diferentes reguladores del crecimiento para promover el enraizamiento, así como diferentes procedimientos para lograr la mayor supervivencia de las plantas regeneradas *in vitro*.
- Determinar la actividad de las catalasas y el contenido de carbohidratos como posibles variables para evaluar la adaptación de las plantitas de fresa en condiciones de invernadero y campo.

IV. HIPOTESIS

Las plantas de fresa enraizadas en condiciones *ex vitro* se adaptarán y desarrollarán en menor tiempo en invernadero/campo que las plantas enraizadas *in vitro*.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Localización del Experimento

La primera parte del experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo *in vitro* de frutales e invernadero de cristal del PREGEP-FRUTICULTURA y los análisis bioquímicos se realizaron en un laboratorio de bioquímica del Postgrado en Botánica, ubicado dentro de las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México.

5.2 Material Vegetal

Los cultivares de fresa utilizados en el estudio fueron el CP. Jacona y CP. Zamorana, proporcionados por el posgrado de Fruticultura del Colegio de Postgraduados.

'CP Zamorana': Es altamente productiva de frutos grandes, de calidad y firmeza superior; producción precoz, con altos porcentajes de fruta con calidad de exportación; adecuada para consumo en fresco por su gran balance en sabor. Sensibilidad moderada a cenicilla (*Sphaerotheca macularis*) y mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) (Calderón, *et al.*, 2009). Registro definitivo en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNRVV-SNICS): FRE-001 – 070807.

'CP Jacona': Fruto grande y firme de excelente sabor adecuado para consumo en fresco; altamente productiva con altos porcentajes de fruto con calidad de exportación; producción precoz. Limitada sensibilidad a enfermedades como cenicilla (*Sphaerotheca macularis*) y mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) (Calderón, *et al.*, 2009). Registro definitivo CNRVV-SNICS: FRE-002 – 070807.

5.3 Tratamientos y Diseño Experimental

5.3.1 Enraizamiento *In Vitro*

Se utilizaron brotes previamente propagados *in vitro*, en este caso se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (Cuadro 1) al 50 % de sus macrosales y con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como AIB, Epibrassinolide® marca Sigma-Aldrich (Número de catálogo E1641) y 1-Triacoltanol marca Sigma-Aldrich (Número de catálogo T3777).

Cuadro1. Medio Murashige y Skoog (MS)

Nutriente	Concentración
Macronutrientes	mM
NH ₄ NO ₃	20.6
KNO ₃	18.8
Ca(NO ₃)·4H ₂ O	1.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
KH ₂ PO ₄	1.25
Micronutrientes	µm
H ₃ BO ₃	100
MnSO ₄ ·4H ₂ O	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1
Vitaminas	mg·L ⁻¹
Inositol	100
Ácido Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Ácido Ascórbico	100
Quelatos	µM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.72
EDTA	100
Sacarosa	30 g·L ⁻¹
Agar	7 g·L ⁻¹

Este medio fue la base de los diferentes tratamientos utilizados dentro del experimento (Cuadro 2), el cual fue ajustado a un pH de 5.7; esterilizándolo en la autoclave a 121°C y 15 psi de presión por 18 minutos.

Cuadro2. Tratamientos utilizados en el Enraizamiento *In Vitro*

Reguladores de Crecimiento	Concentraciones
1.-Testigo	
2.- AIB	0.3 mg·L ⁻¹
3.- 1-Triacontanol	2 µg·L ⁻¹
4.- 1-Triacontanol	5 µg·L ⁻¹
5.- 1-Triacontanol	10 µg·L ⁻¹
6.- Epibrasinolide [®]	0.1 mg·L ⁻¹
7.- Epibrasinolide [®]	0.01 mg·L ⁻¹
8.- Epibrasinolide [®]	0.001 mg·L ⁻¹

Los recipientes de cultivo consistieron en frascos de vidrio con una capacidad de 100 mL sellados con tapas y clinpack en donde se dispensaron 20 ml de medio de cultivo.

Las condiciones de incubación fueron de temperatura diurna de 25°C y nocturna de 20°C, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y una intensidad lumínica a nivel del cultivo de 47.3 µmol·m²·s⁻¹, la cual fue proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca. Las plántulas fueron mantenidas durante 4 semanas en el cuarto de incubación.

5.3.2 Enraizamiento *In Vivo* y Aclimatización

Se utilizaron brotes previamente propagados *in vitro*, con aproximadamente 2-3 cm de altura y tenían de 3-5 hojas cada uno, los brotes fueron pasados directamente a domos adicionándoles diferentes enraizadores comerciales como: Radix[®] 1 500 (Ácido Indol-3-Butirico, 1500 ppm) y Raizone Plus[®] (Alfanaftilacetamida 0.12% y Ácido Indol-3-Butirico 0.06% en Peso), comparándose dos tipos de sustratos como lo son el Peat Moss y la Fibra de Coco,

formando una mezcla homogénea de 2:1 con agrolita. Los tratamientos utilizados se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro3. Tratamientos utilizados *In Vivo*

Tratamiento
1.- Testigo
2.- Radix [®] 1 500
3.- Raizone Plus [®]

5.4 Aclimatización

En la fase de Aclimatización se utilizaron dos tipos de mezclas de sustratos Agrolita: Peat Moss y Agrolita: Fibra de Coco a una proporción 2:1 respectivamente.

Las plantas provenientes del enraizamiento *in vitro* se metieron en charolas con domos de cincuenta cavidades (5 x 5 cm), se les realizó un riego con Captan[®] 50 PH (N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1,2-dicarboximida 50.0 % en peso) a razón de 2mg·L⁻¹. Durante los primeros quince días que son en los que las charolas tienen aún los domos se realizaron dos riegos por semana con agua corriente, después de quitarles los domos se les realizaron riegos cada tercer día.

Para poder retirarles los domos a las plantas se les retiraron paulatinamente empezando a quitárseles por quince minutos durante tres días, los siguientes tres días se les retiran por periodos de una hora, los siguientes tres días por periodos de dos horas, posteriormente por periodos de tres a cuatro horas otros tres días y finalmente se les quitaron otros tres días por periodos de cinco a seis horas. Ya pasados los primeros quince días se les retiraron por completo los domos a las plantas provenientes de *in vitro* para el caso de las plantas de enraizamiento *in vivo* se les retiró por completo el domo al mes de haberse pasado las plantas en el invernadero.

Los riegos se realizaron cada tercer día a las plantas que ya no tenían los domos y se realizaba una fertilización a través del riego cada quince días este fue la mitad de la concentración de la solución del medio de Murashige y Skoog (1962).

5.5 Variables Respuestas

5.5.1. Vigor de la Planta

Para conocer el vigor de la planta se tomaron tres plantas de cada tratamiento ya cuando se encontraban en invernadero. Lavándose previamente para retirar el excedente del sustrato, midiéndoseles la raíz en centímetros desde el cuello de las plantas hasta el ápice radicular, de igual manera se pesaron las plantas en fresco y seco, dividiéndose en parte aérea y raíz, se pesaron en una balanza granataria, para el caso del peso seco las plantas se envolvieron en papel aluminio, para después ponerlas en la estufa a una temperatura constante de 80 °C durante 72 hrs.

5.5.2. Enraizamiento

En el enraizamiento se midió la longitud de la raíz más grande, así como la presencia de raíces primarias y secundarias presentes en cada explante.

5.5.3. Porcentaje de Aclimatización

Se tomó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas de fresa llevadas de *in vitro* a invernadero por tratamiento al mes de haber sido transferidas a este, dependiendo del tipo de sustrato en el que se encontraban.

5.5.4. Catalasas

La actividad de la catalasa se determinó en plantas en condiciones de aclimatización al momento del transplante, al día 1, 5, 10 y 15 días, de acuerdo al método de Aebi (1984), para ello se maceraron 100 mg de tejido fresco, con 400µL de buffer de extracción (Fosfato de potasio monobásico y dibásico 50 mM con pH 7.2; DTT (Ditiotreitol) 5mM, EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) 1mM y 1% (w/v) PVP (Polivinil-Pirrolidona)), se centrifugo a 10

000 revoluciones por 15 minutos a 4°C (Centrifuga Hettich Zentrifugen EBA 12 R); del homogeneizado obtenido se tomaron 20 µl que se mezclaron con 1.98 mL buffer de fosfatos (Fosfato de Potasio monobásico y dibásico 50 mM con pH 7.2) y 1 mL de Solución Madre (Fosfato de Potasio Monobásico y de Sodio Dibásico 50 mM pH 7.0 con H₂O₂ 30 mM). Cada muestra se leyó tres veces a una absorbancia de 240 nm en espectrofotómetro (Jenway 6305 Spectrophotometer).

5.5.5 Carbohidratos

Los carbohidratos solubles se determinaron por el método de Antrona (Witham *et al.*, 1971). Donde una solución de ácido sulfúrico y Antrona reaccionan con los carbohidratos, formando un complejo azul-verde, que se puede medir al espectrofotómetro (Steubing *et al.*, 2002), el procedimiento se describe a continuación.

El extracto de azúcares se hizo pesando 50 mg de material vegetal utilizando extracciones sucesivas en baño maría con etanol al 80%, y después se secó en estufa de vacío a 50°C y se resuspendió en 1 mL de agua destilada. Esta muestra se congeló a -20°C para después ser utilizado.

El material antes mencionado se descongeló y se colocaron 10 µl de la muestra en un tubo de ensaye haciendo una dilución de 1:200, agregando 2 mL de agua y 3 mL del reactivo de antrona frío a cada tubo y se mezclaron durante 5 minutos en frío, posteriormente se transfirió a un baño de agua a 100°C incubándose exactamente 10 minutos, se retiraron del agua caliente y se colocaron de nuevo en hielo, midiéndose la absorbancia a cada tubo a 625 nm teniendo tres repeticiones por muestra.

Se realizó una curva de calibrado con una concentración conocida de glucosa, graficando DO corregida de cada patrón en función de la concentración de los mismos, se determinó la concentración de carbohidratos totales en cada una de las muestras problema utilizando la curva anteriormente mencionada.

5.6. Análisis Estadístico

Para el diseño estadístico de la investigación se utilizó un diseño experimental factorial 2x8x3 completamente al azar para el caso del enraizamiento *in vitro*, para el enraizamiento *in vivo* se utilizó un diseño experimental factorial 2x3x3 completamente al azar, para el caso de la aclimatación de las plantas enraizadas *in vitro* se usó un diseño factorial 2x8x3 completamente al azar para cada variedad y para el enraizamiento *in vivo* se usó un diseño factorial 2x3x3 completamente al azar por cada variedad. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete computacional SAS (The SAS System for Windows 9.0).

5.6.1 Enraizamiento *In Vitro*

Se aplicaron ocho tratamientos con tres repeticiones, dando así un total de 24 unidades experimentales por variedad. La unidad experimental estuvo compuesta por seis explantes. El experimento a su vez se realizó seis veces en el tiempo. Se analizó con un análisis de varianza y las pruebas de medias de las variables respuesta mediante el método de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables de raíces de Segundo Orden, longitud y diámetro de la corona fueron previamente transformadas por la función $\arccos X^{1/2}$.

5.6.2 Enraizamiento *In Vivo*

Se aplicaron tres tratamientos con tres repeticiones, dando un total de nueve unidades experimentales por variedad. La unidad experimental estuvo compuesta por seis explantes. El experimento a su vez se realizó seis veces en el tiempo. Se realizó el análisis de varianza y las pruebas de medias de las variables respuesta mediante el método de Tukey ($p \leq 0.05$), previamente transformadas por la función $\arccos X^{1/2}$ las variables de raíces de segundo y tercer orden, longitud y diámetro de la corona.

5.6.3 Aclimatización

En este experimento para las plantas provenientes del enraizamiento *in vitro* se tomaron en cuenta los ocho tratamientos con dos sustratos y tres repeticiones y en el caso, la unidad experimental consto de seis plantas. El enraizamiento *in vivo* se aplicaron tres tratamientos con dos sustratos y tres repeticiones por variedad, la unidad experimental consto de seis plantas. El experimento se repitió 3 veces en el tiempo. Se realizó el análisis de varianza y las pruebas de medias de las variables respuesta mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), previamente fueron transformadas por la función $\arcsen X^{1/2}$ la variable porcentaje de sobrevivencia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cinética de Enraizamiento

En este experimento se evaluó la capacidad de los brotes de Fresa variedad CP. Zamorana y CP. Jacona, con ocho tratamientos, sobre el proceso de formación de raíces adventicias, donde se pretendió determinar el regulador de crecimiento y la concentración adecuada para inducir la formación de raíces en los brotes en el menor tiempo.

Se observó que para la variedad CP. Zamorana su periodo de aparición de la primera raíz de todos los explantes duro 20 días (Figura 3), en comparación de la variedad CP. Jacona (Figura 4) que duró 18 días a partir del establecimiento en el medio de cultivo para enraizamiento.

Apreciándose que existen diferencias entre tratamientos al inicio del proceso de enraizamiento para la variedad CP. Zamorana, donde el testigo inicia con la aparición de la primera raíz al tercer día en comparación del regulador de crecimiento convencional para enraizamiento que es el AIB donde inicio su aparición de la primera raíz en el décimo día, los tratamientos de TRIA 2, 5 y $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ iniciaron entre el tercer y cuarto día, mientras que los tratamientos de BR 0.1, 0.01 y $0.001\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ iniciaron del tercer al sexto día, donde el testigo alcanzo el máximo de su enraizamiento a los 20 días, el AIB en el día 19, los tratamientos con TRIA del día16 al día 19 y para los tratamientos con BR a partir del día 17 al día 20. Mientras que para la variedad CP. Jacona , la aparición de la primera raíz para el testigo inicia al séptimo día, el AIB al sexto día, los tratamiento con TRIA y BR iniciaron a partir del cuarto al sexto día, teniendo su máximo de enraizamiento el testigo al día 18, el AIB en el día 13, los tratamientos con TRIA del día 12 al día 15, mientras que los tratamientos con BR del día 9 al día 13, teniendo ambas variedades con todos los tratamientos el 100% de enraizamiento. Raya *et al.* (2009) mencionan que las raíces para portainjertos de vid, variedad ‘Freedom’ necesita de 5 días para que empiecen a emerger sus raíces, mientras que para la variedad ‘Saltcreek’ necesita de 10 días, lo cual coincide con Couprie *et al.* (2000), quienes señalan que la mayoría de los patrones de vid enraízan a los 10 días.

La respuesta obtenida para la velocidad del enraizamiento *in vitro* es similar a la que se tienen en *Gerbera jamesonii*, cuya emergencia de raíces en *in vitro* se presentó a los 4 y 5 días (Olivera *et al.*, 2000), concordando con Martínez *et al.* (2011) quienes encontraron en *Physalis peruviana* L. el inicio del enraizamiento a los cinco días de estar establecidos en el medio de cultivo, en *Lycopersicon esculentum* Mill, el desarrollo de las raíces se logró en 3.1 días utilizando un medio de cultivo MS al 50% de las macrosales adicionado con AIB (Enríquez *et al.*, 2001), en el caso de la línea Rb del Roble ‘Sainza’ en el tratamiento control (Sin NPA) adicionado con 123 μm de AIB se encontró la aparición de la primera raíz entre los primeros 8 a 10 días, al igual que para los tratamientos con 1,2 y 3 días de NPA (200 μM) en comparación del tratamiento con 5 días en NPA (200 μM) que se retardo la aparición hasta los 11 días, alcanzándose el máximo del enraizamiento en el tratamiento control a los 25 días de iniciado el proceso y los tratamientos con 1, 2 y 3 días de NPA tardo alrededor de 17 y 22 días mostrándose constante el proceso y el tratamiento con NPA durante 5 días solo alcanzó el 41% del enraizamiento a los 28 días (Arellano, 2004), en *Alnus* spp se aceleró el proceso de emergencia de raíces a partir de los 8 días completándose sobre el día 12, (San José, *et al.*, 2010). Por lo cual los brotes no tienen que estar en el medio de cultivo un período de 28 a 30 días como lo mencionan Thomas y Schiefelbein (2001) para todas las especies, por lo que las condiciones para inducir el enraizamiento se deben definir para cada especie. Tomando en cuenta que al disminuirse el tiempo de permanencia en el cuarto de incubación se logra disminuir un poco los costos (Raya *et al.*, 2009).

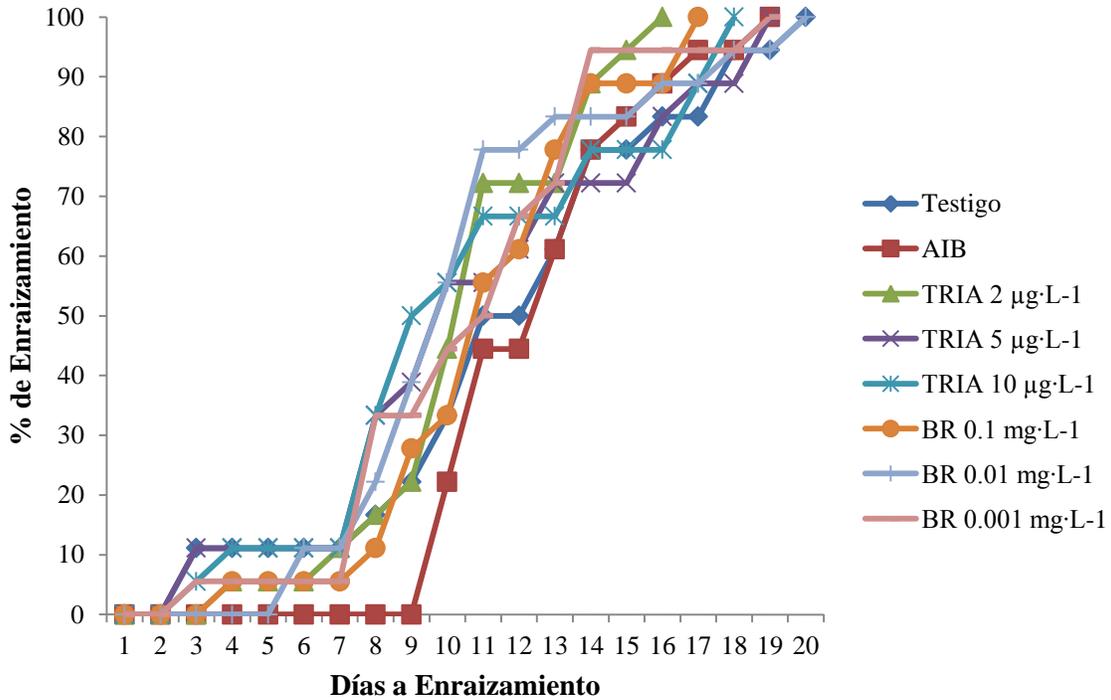


Figura3. Efecto de ocho tratamientos sobre el enraizamiento de brotes de fresa de la variedad CP. Zamorana, cultivados *in vitro*. Los resultados son la media de tres experimentos, con 18 brotes y tres repeticiones por tratamiento.

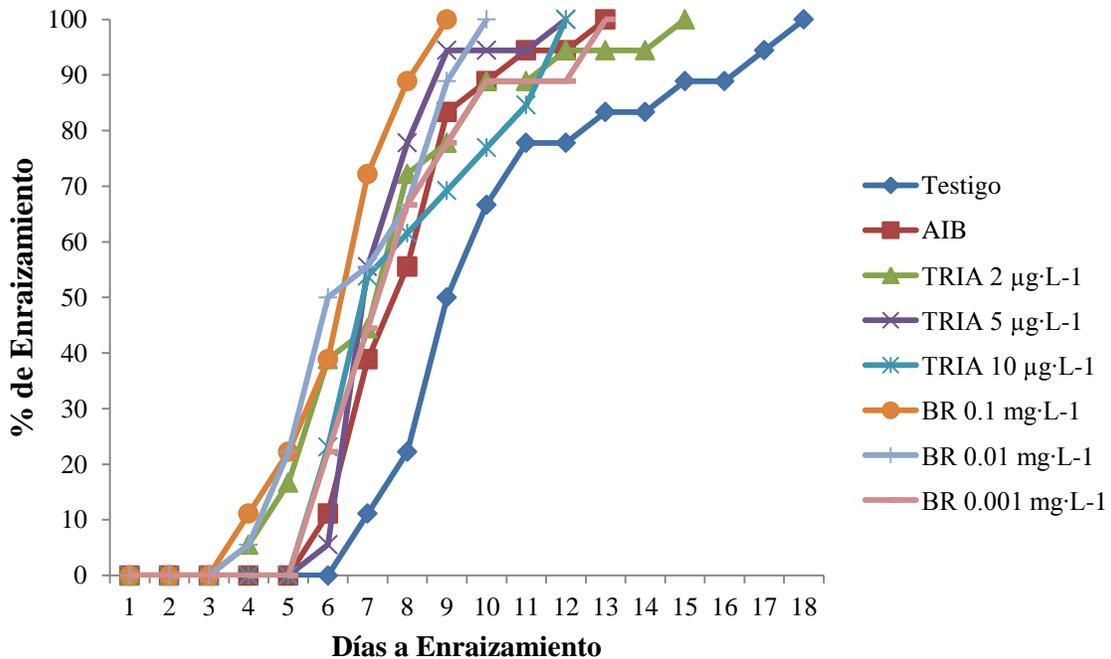


Figura4. Efecto de ocho tratamientos sobre el enraizamiento de brotes de fresa de la variedad CP. Jaconá, cultivados *in vitro*. Los resultados son la media de tres experimentos, con 18 brotes y tres repeticiones tratamiento.

6.2 Enraizamiento

La fase de enraizamiento *in vitro*, se llevó a cabo con distintos reguladores de crecimiento iniciándose la formación de la raíz adventicia, donde la intervención de las auxinas en el estado inicial del crecimiento de la raíz se divide en dos estados, cuando esta se encuentra activa e inactiva, se dice que está activa cuando se encuentra presente continuamente y proviene de brotes terminales o laterales, en estado inactivo, es cuando se encuentra alrededor de la raíz, que va de cuatro días más, no presentando ningún efecto adverso en la formación de estas. Pasando por esta etapa, se inicia la elongación de los primordios radicales, donde la nueva raíz atraviesa la corteza hasta que emerge de la epidermis del tallo, para lo cual, la raíz ya ha formado su sistema vascular que ya se encuentra fusionado a los tejidos vasculares del tallo, llegando a esta etapa no hay mayor respuesta de las auxinas (García *et al.*, 2007).

6.2.1 Formación de Raíces Adventicias de Primer Orden, Segundo Orden y Longitud de la Raíz de Mayor Tamaño.

Los datos obtenidos en el enraizamiento *in vitro* mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en la formación de raíces adventicias de primer orden donde el tratamiento de BR $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ tiene 7.5 raíces por brote donde mostró ser el tratamiento con mayor formación de raíces adventicias en comparación con el testigo que presenta 6.1 raíces por brote (Cuadro 4), en los demás tratamientos el número de raíces por brote no bajo de 6.4. Lo cual demuestra que la mayor formación de raíces adventicias es inducida por la adición de reguladores de crecimiento, la formación de raíces adventicias de primer orden en el testigo es normal aunque en proporciones bajas. En las Figuras 5 y 6 se pueden observar las diferencias que hay entre tratamientos donde el AIB presenta una formación de callo, el TRIA $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ tiene un grosor mayor y el tratamiento con BR $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ presenta mayor formación de raíces pero de menor tamaño. San José *et al.* (2010), encontraron que en *Alnus glutinosa*, obtuvieron un 75% de rizogénesis con AIB $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, incrementándose la velocidad de formación de raíces con la presencia de auxina, en la misma especie se encontró que con la inclusión del AIB en el medio se aumentó el número de raíces formadas, reduciéndose el tiempo requerido para obtener el pleno enraizamiento (Tremblay *et al.*, 1986). En *D. chrysotoxum* el promedio de raíces fue de 12.7 con

concentraciones de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB en un medio de cultivo MS, en concentraciones mayores de AIB el número de raíces comienza a decrecer sustancialmente (Gantait *et al.*, 2009). Enríquez *et al.* (2001), encontraron en *Lycopersicon esculentum* Mill la formación de 14.3 raíces adventicias formadas en un medio adicionado con AIB, lo cual difiere de los resultados obtenidos en donde el número encontrado de raíces adventicias se reduce a la mitad de lo mencionado por dichos autores. En aguacate criollo se presentó la mayor cantidad de raíces por brote en los brotes incubados en el MS con $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ más $0.125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AG_3 con 4.69 y 4.08 raíces en el MS con $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB más $0.125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AG_3 , presentando alta formación de callo en la base (Vidales, 2002), como se observó en el tratamiento con AIB. Para Roble ‘Sáinza’ con la aplicación de $125 \mu\text{M}$ de AIB durante 24 h se obtuvieron porcentajes de enraizamiento del 80.44 ± 5.24 con 2.4 raíces por brote (Arellano, 2004), Nogueira *et al.* (2014) reportan que en una concentración mayor de AIB ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en un medio MS con el 50% de las sales se tiene un mayor número de raíces (4) en comparación de una concentración de 0.1 y $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB con 3 raíces por explante y aumentando al 100 % de sales del medio se tiene mayor número de raíces por explante con 6 raíces para una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB y para 0.1 y $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se tienen alrededor de 3 raíces por explante y en el caso de *Eustoma grandiflorum* se tienen 7 raíces por explante en una concentración de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y cuando se tiene una concentración de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 10 raíces por explante (Viloria, 2009).

Para la formación de raíces adventicias de segundo orden no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$), sin embargo el tratamiento que más raíces tuvo fue el de BR $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con 3.1 raíces y el BR $0.001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fue el que presentó menor formación de raíces con 1.7 raíces por brote. En cuanto a la longitud de la raíz más grande se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$), donde los tratamientos de AIB, TRIA 2 y $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con 5.41, 5.29 y 5.03 cm respectivamente, presentan la raíz más grande en comparación del BR $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con 1.62 cm que fue el tratamiento que presentó la raíz más pequeña entre los tratamientos utilizados (Cuadro 4), los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Martínez *et al.* (2011) quienes encontraron un tamaño de la raíz de 6 cm, en comparación de Gantait *et al.* (2009) con $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB y $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en *D. chrysotoxum*, lograron un promedio de longitud de 9.6 cm. Arellano (2004), reporta una longitud media de raíces de 30.8 mm con un pulso de $125 \mu\text{M}$ de AIB durante 24 h, para Minirosa se tiene una longitud de 2.4 cm para aquellos explantes que no

tenían AIB y para el caso de los que se encontraban en una concentración de 0.1 y 1.0 mg·L⁻¹ de AIB se tiene una longitud de 0.5 cm con el 50 % de las sales del MS y cuando se aumenta al 100 % de las sales del MS el tamaño de la raíz disminuye con 1.5 cm para la ausencia de este regulador y para 0.1 y 1.0 mg·L⁻¹ se tienen un tamaño de 0.3 cm (Nogueira *et al.*, 2014). En el caso de *Eustoma grandiflorum*, se obtuvieron longitudes de 1.0 cm y 1.16 cm para 0.2 y 1.5 mg·L⁻¹ respectivamente (Viloria, 2009).

En el Cuadro 4 se puede apreciar que el único regulador de crecimiento que fomento la producción de callo fue el AIB con una media del diámetro del callo de 1.30 mm, ya que las auxinas estimulan la expansión celular que frecuentemente fomentan el desarrollo del callo (Weaver, 1990), lo cual puede ser un aspecto negativo para la etapa de aclimatización (Martínez, *et al.*, 2011) en cuanto a las variedades no se encontró diferencia significativa para esta variable.

Moré *et al.* (2001) mencionan que los brasinoesteroides tienen una probada actividad en el crecimiento vegetal, los que poseen grandes posibilidades de sustitución de los reguladores de crecimiento tradicional como las auxinas y citoquininas (Adams, 1998), por poseer capacidades de influir en diferentes procesos fisiológicos en las plantas, como la elongación, división celular, desarrollo vascular y reproductivo (Núñez M. y Robaina C., 2000), Marquartt y Adam (1991), observaron que los brasinoesteroides interactúan fuertemente de forma sinérgica con las auxinas para inducir la formación de raíces adventicias, resultado similar a lo que se muestra en la investigación, que de igual manera concuerda con Hernández *et al.* (1999), quienes señalan que en la propagación por esquejes de papa, los brasinoesteroides muestran una marcada influencia significativa sobre el número de raíces. Lo contrario a lo que expresan Ramírez *et al.* (2003) donde en esquejes de guayaba con Biobras.16 (0.05 ppm) presentan los valores más bajos de enraizamiento. En plátano macho se utilizó Biostan 4 mg·L⁻¹, BB-6 0.01 mg·L⁻¹ y BB-6 0.05 mg·L⁻¹ donde se obtuvieron 5.63, 5.42 y 4.95 raíces por explante de longitudes de 5.91, 6.79 y 5.19 cm respectivamente (Héctor *et al.*, 2007).

El Triacantanol mejora la eficiencia fisiológica de las células, el uso de este regulador de crecimiento en el enraizamiento de colza, estimuló en gran medida la formación de raíces adventicias en concentraciones que van de 1.0 a 10 mg·L⁻¹ (Huaxian *et al.*, 2006). Mientras que

Verma *et al.* (2011) encontraron que con el uso del triacontanol (Vipul[®]) en 1.0 ml·L⁻¹ en *Arachis hypogaea* L., para el cultivar PBS24030 se tiene rizogénesis solo con la adición de este regulador en el medio, mientras que para el cultivar M-13 se tiene que adicionar al medio MS 0.5 y 2.0 ml·L⁻¹ de TRIA y para *Costus speciosus* se obtuvieron brotes con dos o tres hojas y raíces con un medio basal B5 complementado con 2µg·L⁻¹ de TRIA (Malabadi *et al.*, 2005). Fraternali *et al.* (2002) encontraron en *Bupleurum fruticosum*, que la mejor concentración para la formación de raíces es la de 2 µg·L⁻¹ y en menor medida una concentración de 5 y 10 µg·L⁻¹ descartando la concentración más elevada de triacontanol (20 µg·L⁻¹), no solo se incrementó el número de raíces sino que también presentaron las longitudes superiores en comparación del control y del tratamiento con 20 µg·L⁻¹ de TRIA, datos que concuerdan con los obtenidos por Tantos *et al.*, (1999) en *Melissa officinalis* L, señalando que la aplicación del TRIA incrementa significativamente el número de raíces por planta en *Malus domestica* cv. JTE-E4 y *Cerasus fruticosa* cv. Probocskai y que el efecto de este regulador es mejorado con la adición de AIB a una concentración de 5 mg (Tantos *et al.*, 2001). En el caso de *Capsicum frutescens* y *Decalepis hamiltonii* W & A, se encontró que las concentraciones óptimas de TRIA para la fase de enraizamiento fueron las de 5 y 10 µg·L⁻¹ (Obul *et al.*, 2002).

Cuadro4. Número de Raíces Adventicias de Primer Orden, Segundo Orden, Longitud de la raíz de mayor Tamaño y Presencia de Callo por Tratamiento en Cultivo *In Vitro*.

Tratamiento	Primer Orden	Segundo Orden	Longitud (cm)	Callo (mm)
Testigo	6.1 ± 0.24 d	2.6 ± 1.99 a	4.2 ± 0.16 b	0.0000 ± 0 b
AIB	6.8 ± 0.22 abcd	2.7 ± 1.48 a	5.4 ± 0.16 a	1.3059 ± 1.30 a
TRIA 2µg·L⁻¹	7.2 ± 0.19 ab	2.7 ± 3.01 a	5.0 ± 0.19 a	0.0000 ± 0 b
TRIA 5 µg·L⁻¹	7.3 ± 0.17 ab	2.0 ± 0.92 a	5.2 ± 0.10 a	0.0000 ± 0 b
TRIA 10 µg·L⁻¹	6.4 ± 0.21 cd	2.1 ± 0.64 a	4.3 ± 0.24 b	0.0000 ± 0 b
BR 0.1 mg·L⁻¹	7.5 ± 0.16 a	3.1 ± 1.24 a	1.6 ± 0.26 e	0.0000 ± 0 b
BR 0.01 mg·L⁻¹	7.2 ± 0.19 abc	3.0 ± 1.19 a	2.8 ± 0.15 d	0.0000 ± 0 b
BR 0.001 mg·L⁻¹	6.6 ± 0.12 bcd	1.7 ± 0.70 a	3.7 ± 0.11 c	0.0000 ± 0 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos de la variable raíz de segundo orden fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.



Figura5. Apariencia de la raíz de los brotes de la Variedad CP. Jacona enraizada con los diferentes tratamientos. A) Brote de enraizado con el tratamiento testigo, B) Brote enraizado con AIB, C) Brote enraizado con TRIA $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, D) Brote enraizado con TRIA con $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, E) Brote enraizado con TRIA $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, F) Brote enraizado con BR $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, G) Brote enraizado con BR $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y H) Brote enraizado con BR $0.001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

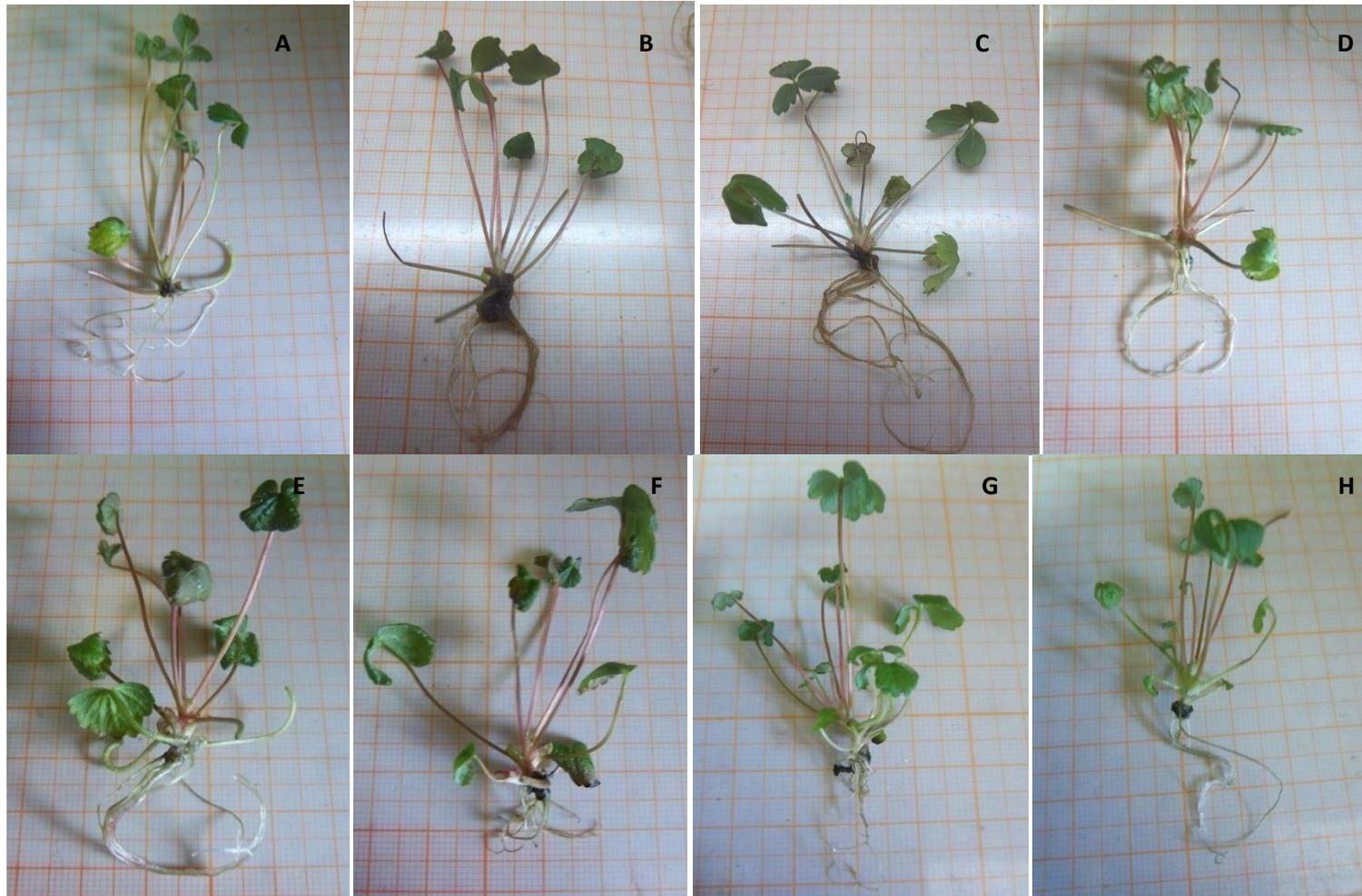


Figura6. Apariencia de la raíz de los brotes de la Variedad CP. Zamorana enraizada con los diferentes tratamientos. A) Brote de eraizado con el tratamiento testigo, B) Brote enraizado con AIB, C) Brote enraizado con TRIA 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, C) Brote enraizado con TRIA con 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, D) Brote enraizado con TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, E) Brote enraizado con BR 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, F) Brote enraizado con BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y G) Brote enraizado con BR 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

En la comparación entre variedades existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$), la variedad CP. Zamorana presentó mayor número de raíces adventicias de primer orden formadas con una media de 7.2 raíces por brote mientras que la variedad CP. Jacona tiene una media de 6.6 raíces, en cuanto a las raíces de segundo orden no existe diferencia significativa entre variedades ($p < 0.05$), y para la longitud de la raíz adventicia de la variedad CP. Zamorana presentó una media de 4.07 cm y la variedad CP. Jacona tiene una media de 3.85 cm, en cuanto a la aparición del callo no se encontró diferencia significativa entre variedades (Cuadro 5), por lo que se puede decir que la variedad CP. Zamorana presenta mejor respuesta para el enraizamiento *in vitro* teniendo mayor número de raíces de primer orden y con mayor longitud. Los resultados concuerdan con los mencionados por Rodríguez *et al.* (2012) que dice que la variedad CP. Jacona tienen una baja capacidad de producción de estolones en comparación de la Variedad CP. Zamorana en campo.

Cuadro 5. Número de Raíces Adventicias de Primer Orden, Segundo Orden y Longitud de la Raíz de Mayor Tamaño, por Variedad Generadas en Cultivo *In Vitro*.

Variedad	Primer Orden	Segundo Orden	Longitud (cm)	Callo (mm)
CP. Jacona	6.6065 \pm 0.22 b	2.5625 \pm 1.90 a	3.8571 \pm 0.28 b	0.1620 \pm 0.68 a
CP. Zamorana	7.2836 \pm 0.16 a	2.4688 \pm 1.16 a	4.0735 \pm 0.24 a	0.1644 \pm 0.66 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos de la variable raíz de segundo orden fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.2.2 Longitud y Diámetro de la Corona de los Brotes Enraizados *In Vitro*.

El tratamiento con AIB presentó mayor longitud en la corona con 0.8649 mm en comparación del tratamiento con BR. 0.1 mg·L⁻¹ que logro una longitud de 0.7524 mm en la corona, mostrando de esta manera que se tienen una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, en cuanto al diámetro de la corona no se encontró diferencia significativa (Cuadro 6). El factor que pudo haber influenciado en el alargamiento de la corona son los tratamientos, ya que el AIB presentó una gran cantidad de raíz adventicia lo que le ayudo a la adsorción de los nutrientes que se encontraban en el medio de cultivo favoreciendo el desarrollo de la corona en forma longitudinal ya que en el diámetro no se presentó diferencia.

Cuadro6. Longitud y Diámetro de Corona de Explantes Enraizados *In Vitro*.

Tratamiento	Longitud de la Corona (mm)	Diámetro de la Corona (mm)
Testigo	0.8487 ± 0.05 ab	0.4347 ± 0.11 a
AIB	0.8649 ± 0.05 a	0.4359 ± 0.13 a
TRIA 2µg·L⁻¹	0.8160 ± 0.05 abc	0.4329 ± 0.13 a
TRIA 5 µg·L⁻¹	0.8115 ± 0.05 abc	0.4518 ± 0.14 a
TRIA 10 µg·L⁻¹	0.7728 ± 0.06 bc	0.4358 ± 0.13 a
BR 0.1 mg·L⁻¹	0.7524 ± 0.05 c	0.4412 ± 0.13 a
BR 0.01 mg·L⁻¹	0.6699 ± 0.05 bc	0.4336 ± 0.10 a
BR 0.001 mg·L⁻¹	0.7790 ± 0.05 bc	0.4167 ± 0.10 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

Las variedades CP. Zamorana y CP. Jacona, presentaron valores muy similares por lo que no tienen diferencias significativas para las variables longitud y diámetro de la corona (Cuadro 7), tomando en cuenta que al momento de poner los brotes en los tratamientos todos tenían un diámetro y longitud muy similar, los cuales tenían de 0.3 ± 0.1 mm de diámetro, por lo que por el tiempo que llevaban en el medio y dado que el medio tenía como base las mismas sales minerales y solo cambiaba el regulador de crecimiento no se encontraron diferencias significativas.

Cuadro7. Longitud y Diámetro de Explantes Enraizados *In Vitro* por Variedad

Variedad	Longitud de la Corona (mm)	Diámetro de la Corona (mm)
CP. Jacona	0.8115 ± 0.05 a	0.4209 ± 0.11 a
CP. Zamorana	0.7919 ± 0.05 a	0.4498 ± 0.13 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.2.3. Formación de Brotes en el Enraizamiento *In Vitro*.

En el Cuadro 8 se observa la brotación que se presenta en los diferentes tratamientos, a pesar de que los tratamientos están diseñados para la formación de raíces adventicias no se encontró una proliferación masiva y ni en grandes cantidades, de esta manera el tratamiento con BR 0.01 mg·L⁻¹ el que tiene mayor cantidad de brotes formados, presentó 1.6 brotes por explante, el testigo y el BR 0.001 mg·L⁻¹ fueron los que presentaron menor brotación con 1 brote por explante.

Cuadro8. Brotación por Tratamiento de Enraizamiento *In Vitro*.

Tratamiento	Brotes
Testigo	1.0000 ± 0 b
AIB	1.4000 ± 0.51 ab
TRIA 2µg·L ⁻¹	1.2000 ± 0.42 ab
TRIA 5 µg·L ⁻¹	1.2000 ± 0.42 ab
TRIA 10 µg·L ⁻¹	1.3000 ± 0.48 ab
BR 0.1 mg·L ⁻¹	1.1000 ± 0.31 ab
BR 0.01 mg·L ⁻¹	1.6000 ± 0.51 a
BR 0.001 mg·L ⁻¹	1.000 ± 0 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey p≤ 0.05).

Para brotación entre variedades no se encontró diferencia significativa para ambas variedades teniendo brotaciones de 1.1 y 1.3 brotes por explante para CP. Jacona y CP. Zamorana respectivamente (Cuadro 9).

Cuadro9. Brotación por Variedad en Cultivo *In Vitro*.

Variedad	Brotes
CP. Jacona	1.1500 ± 0.36 a
CP. Zamorana	1.3000 ± 0.46 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey p≤ 0.05).

6.2.4 Número de Hojas en Los Brotes Enraizados *In Vitro*.

Los explantes presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para el número de hojas entre tratamientos, donde el testigo es el que presenta menor número de hojas con 5.3 por explante en comparación con los demás tratamientos que presentaron unas medias de 5.9 a 6.2 hojas (Cuadro 10), como se observa en todos los tratamientos con algún regulador de crecimiento no existió diferencia significativa, por lo que se puede decir que estos aparte de favorecer la formación de raíces adventicias también intervinieron en el desarrollo de la parte aérea de los explantes. Calderón *et al.* (1993) mencionan que a medida que aumentan los días del cultivo se incrementa la aparición de hojas. Para *Eustoma grandiflorum*, con una concentración de 0.2 y 1.5 mg·L⁻¹, se encontraron 14.33 y 14.66 hojas por explante (Viloria, 2009).

Cuadro10. Número de Hojas de los Explantes Enraizados *In Vitro*.

Tratamiento	Número de Hojas
Testigo	5.3631 ± 0.07 b
AIB	6.1369 ± 0.07 a
TRIA 2µg·L ⁻¹	6.1132 ± 0.07 a
TRIA 5 µg·L ⁻¹	5.9059 ± 0.07 a
TRIA 10 µg·L ⁻¹	6.2268 ± 0.09 a
BR 0.1 mg·L ⁻¹	5.9655 ± 0.07 a
BR 0.01 mg·L ⁻¹	6.0679 ± 0.06 a
BR 0.001 mg·L ⁻¹	5.9675 ± 0.09 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

A pesar que en las otras variables evaluadas no se presentó diferencia significativa para el caso de hojas, la variedad CP. Zamorana presentó menor número de hojas con una media de 5.8 en comparación de la variedad CP. Jacona que tienen 6.0 hojas por explante (Cuadro 11).

Cuadro11. Número de las Hojas por Explante Generadas *In Vitro* por Variedad

Variedad	Número de Hojas
CP. Jacona	6.0724 ± 0.07 a
CP. Zamorana	5.8599 ± 0.08 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 288 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.3 Enraizamiento *In Vivo*.

El tipo de auxina utilizada para el desarrollo de raíces juega un papel importante en el enraizamiento, siendo el AIB, una de las hormonas más utilizadas (Bielenin, 2003), Aparicio *et al.*, (2006), mencionan que esta auxina es recomendada para especies de difícil enraizamiento para promover el desarrollo de raíces adventicias.

6.3.1 Formación de Raíces Adventicias de Primer Orden.

En el enraizamiento *in vivo*, la formación de raíces adventicias de primer orden se encontró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), donde el tratamiento con Radix[®] 1500 presentó una media de 9.2 raíces, mientras que el testigo fue el que presentó menor número de raíces adventicias de primer orden, quien junto con el Radix[®] 1500 fueron los que presentaron mayor número de raíces adventicias de segundo orden con 16.3 y 12.9 raíces respectivamente, en comparación del enraizamiento *in vitro* en el enraizamiento *in vivo* se encontraron raíces de tercer orden donde los tratamientos Testigo y Radix[®] 1500 presentaron mayor número de raíces adventicias con 8.7 y 7.0 raíces respectivamente. Para la raíz mayor el mejor tratamiento fue el testigo con 4.3 cm de longitud y los tratamientos de Radix[®] 1500 y Raizone Plus[®] presentaron una media de 3.0 cm, lo que puede deberse a que el testigo presentó menor número de raíces adventicias de primer orden, que pudo favorecer a la formación de raíces de segundo y tercer orden de igual manera que favoreció el crecimiento de la raíz (Cuadro 12), el aspecto de la raíz se puede observar en la Figura 7.

En investigaciones previas realizadas de enraizamiento *in vivo* en diversas especies se ha encontrado que en el cultivar de trinitaria al enraizar estacas con AIB en una dosis de 2000 y

4000 ppm, se obtuvo un rango de enraizamiento del 66 al 88 % (Czekalski, 1989), mientras que para *Prunus persica*, se encontró el mayor porcentaje de estacas enraizadas con una concentración de 2000 ppm de AIB (Dutra *et al.*, 1999). Navarrete y Vargas (2005) reportan que diferentes dosis de AIB pueden tener efectos diferentes en la longitud de las raíces de las estacas de *Eucalyptus camaldulensis* pues al aplicar una dosis de 2000 ppm, se tuvo un promedio de 6.3 cm de longitud, mientras que aplicaciones de 0,1000 y 4000 ppm tenían una longitud de 10 cm. García *et al.* (2005) reportan que en *Gmelina arborea* la longitud de las raíces en estacas de esta especie se ve influenciada por la concentración usada de AIB, incrementándose hasta un 25 % cuando se usan 2.9 mg·g⁻¹, indicando que el uso de esta auxina en esta concentración se acelera el crecimiento de la longitud de las raíces. El porcentaje máximo de enraizamiento obtenido con Radix[®] en *Bursera linanoe* fue del 27 %, considerado como bajo, obteniéndose alrededor de una y tres raíces por estacas (Arellano *et al.*, 2014). En microtallos de *Tecomella undulata* el mejor resultado para el enraizamiento fue con una concentración de 200 mM de AIB, el cual fue suministrado a través de un pulso de 30 min en la parte basal del microtallo, donde prosiguieron a transferirlo a vasos de plástico con sustrato alcanzando un 80 % de sobrevivencia (Varshney y Anis 2011).

Cuadro12. Número de Raíces por Tratamiento en Enraizamiento *In Vivo*.

Tratamiento	Raíces Adventicias			Longitud de la Raíz (Cm)
	Primer Orden	Segundo Orden	Tercer Orden	
Testigo	4.6 ± 2.14 b	16.3 ± 9.25 a	8.7 ± 1.70 a	4.3 ± 0.15 a
Radix [®] 1500	9.2 ± 4.41 a	12.9 ± 6.88 a	7.0 ± 2.58 a	3.0 ± 0.17 b
Raizone Plus [®]	6.0 ± 3.73 b	7.5 ± 5.72 b	3.2 ± 1.50 b	3.0 ± 0.21 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 108 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos de las variables raíz de segundo y tercer orden fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

El comportamiento de ambas variedades fue muy similar solo se presentó diferencia significativa en la formación de raíces de segundo orden ($p \leq 0.05$), donde la variedad CP. Zamorana presentó menor número de raíces adventicias con una media de 10.5 raíces en comparación de la variedad CP. Jacona que presentó 14.0 raíces adventicias (Cuadro 13).

Cuadro13. Número de Raíces por Variedad en Enraizamiento *In Vivo*.

Variedad	Raíces Adventicias			Longitud de la Raíz (Cm)
	Primer Orden	Segundo Orden	Tercer Orden	
CP. Jacona	6.3 ± 3.32 a	14.0 ± 6.37 a	5.8 ± 1.94 a	3.5 ± 0.20 a
CP. Zamorana	6.9 ± 4.62 a	10.5 ± 9.43 b	6.8 ± 3.92 a	3.3 ± 0.18 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 108 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos de la variable raíz de segundo y tercer orden fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

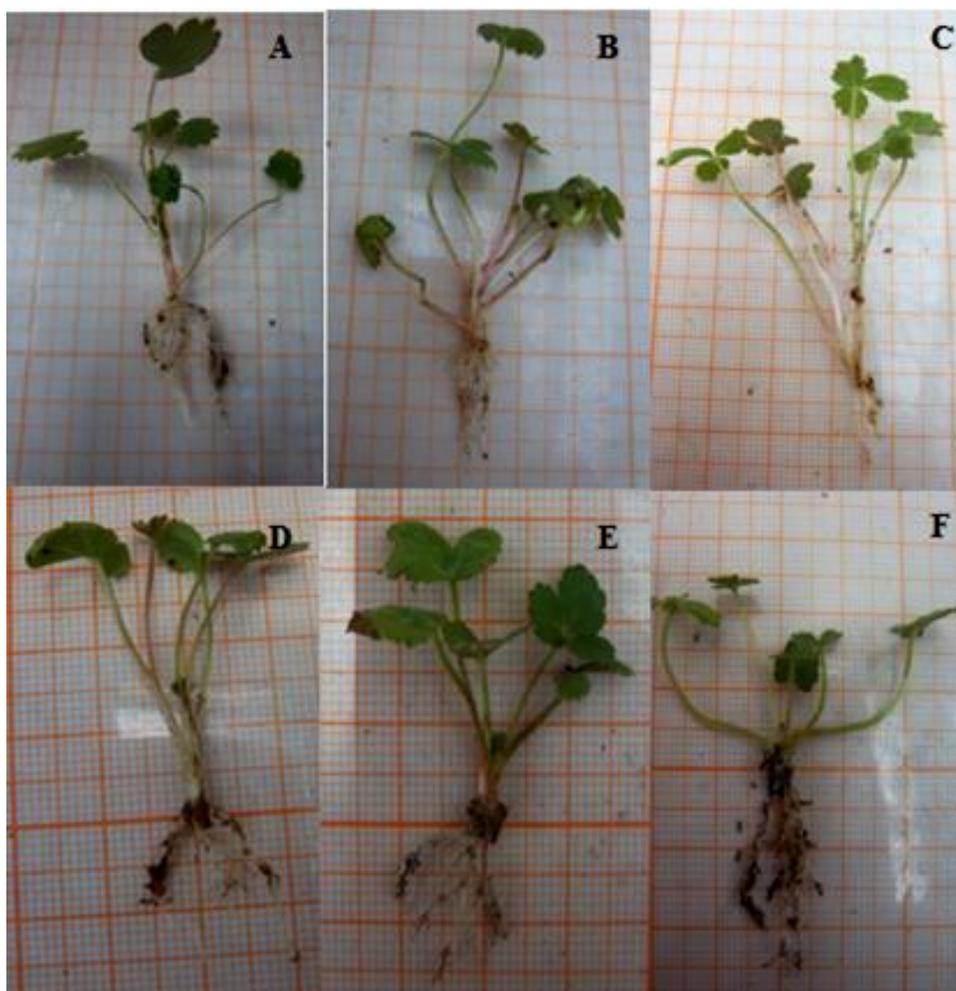


Figura7. Apariencia de las raíces de plantas de fresa enraizadas *In Vivo*, las tres primeras fotos (A, B, C) son de la variedad CP. Jacona y las tres fotos posteriores (D, E, F) son de la variedad CP. Zamorana. A y D) Planta de fresa enraizada sin regulador de crecimiento, B y E) Planta de fresa enraizada con Radix® 1500, C y F) Plantas de fresa enraizadas con Raizone Plus®.

6.3.2 Longitud y Diámetro de la Corona de los Explantes en Enraizamiento.

En el Cuadro 14 se observan los datos obtenidos para la longitud y el diámetro de la corona donde de igual manera que en el enraizamiento *in vitro* no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos utilizados para el enraizamiento, teniéndose resultados muy similares ya que en el cultivo *in vitro* y en el enraizamiento *ex vitro*, los brotes utilizados tenían diámetros muy similares los cuales eran de 0.3 ± 0.1 mm de diámetro.

Cuadro14. Longitud y Diámetro de la Corona en los Tratamientos de Enraizamiento *In Vivo*.

Tratamiento	Longitud de la Corona (mm)	Diámetro de la Corona (mm)
Testigo	1.19 ± 0.05 a	1.19 ± 0.14 a
Radix[®] 1500	1.10 ± 0.06 a	1.11 ± 0.13 a
Raizone Plus[®]	0.98 ± 0.04 a	1.19 ± 0.16 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 108 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

Entre variedades tampoco se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para las variedades CP. Jacona y CP. Zamorana respectivamente (Cuadro 15), teniendo como resultados datos muy similares, donde se tiene que tomar en cuenta que en el enraizamiento *in vivo* no se proporcionó sales minerales a los brotes que se encontraban en esta etapa por lo que las plantas sobrevivieron los primeros días con las reservas que habían acumulado en el medio de cultivo en el que se encontraban.

Cuadro15. Longitud y Diámetro de las Variedad en el Enraizamiento *In Vivo*.

Variedad	Longitud de la Corona (mm)	Diámetro de la Corona (mm)
CP. Jacona	1.00 ± 0.05 a	1.11 ± 0.12 a
CP. Zamorana	1.18 ± 0.05 a	1.21 ± 0.15 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 108 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los datos fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.3.3 Número de Hojas Presentes en los Brotes Provenientes de Enraizamiento *In Vivo*.

En el número de hojas para los explantes enraizados se encontró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), donde el testigo presentó mayor número de hojas con una media de 6.4, el tratamiento con Raizone Plus[®] presentó menor número de hojas con una media de 5.0 (Cuadro 16), en comparación de un trabajo con *Maxillaria tenuifolia* Lindl. (Von Thaden, 2012), donde la media de hojas fue mucho menor que las presentadas en las plantas de fresa, con Radix[®] 1500 se presentó una media de 2.6 hojas y con Raizone Plus[®] una media de -0.92 hojas y un control con una media de 1.76 hojas (Von Thaden, 2012). Esto no concordó con lo encontrado en la presente investigación, el Cuadro 12 muestra que el testigo fue el que presentó la longitud más grande, favoreciendo de esta manera que las plantas de fresa pudieran tener una mayor exploración en el sustrato ayudando de esta manera a la formación de la parte aérea.

Cuadro16. Número de Hojas por Tratamiento en el Enraizamiento *In Vivo*.

Tratamiento	Número de Hojas
Testigo	6.40 ± 1.15 a
Radix [®] 1500	5.67 ± 1.27 ab
Raizone Plus [®]	5.01 ± 1.31 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 108 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

La variedad CP. Jacona presentó menor número de hojas con una media de 5.2 en comparación con la variedad CP. Zamorana que presentó 6.1 hojas por brote (Cuadro 17), esto puede deberse a que las plantas de la variedad CP. Zamorana presentaron menor número de raíces adventicias de segundo orden, por lo que se podría decir que las reservas que destinó la variedad CP. Jacona para la formación de raíces adventicias de segundo orden la variedad CP. Zamorana la destino para la formación de hojas.

Cuadro17. Número de Hojas por Variedad en el Enraizamiento *In Vivo*.

Variedad	Número de Hojas
CP. Jacona	5.26 ± 1.30 b
CP. Zamorana	6.10 ± 1.22 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 108 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.4 Fase de Aclimatización.

La fase de aclimatización es una etapa muy delicada en el cultivo *in vitro*, debido a que depende de ello el éxito de la técnica de micropropagación, ya que como lo mencionan Hurtado y Merino (1991), el éxito de todo el proceso del cultivo *in vitro* se resume en la adaptación de las plántulas a nuevas condiciones en el invernadero, y un alto número de plantas micropropagadas no sobreviven al paso desde el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Esta etapa se vuelve crítica debido a que las plantas *in vitro* se producen en condiciones de alta humedad relativa y baja intensidad lumínica, lo que implica un bajo contenido de cera epicuticular, por lo que las plantas provenientes de *in vitro* pierden agua rápidamente al encontrarse en condiciones externas ya que las plantas no dependen de su capacidad fotosintética, por lo que requieren de varios días para volverse autotróficas. En la Figura 8 se pueden observar las condiciones bajo las cuales las plantas fueron tratadas los primeros quince días para su adaptación.



Figura8. Plantas recién llevadas a la fase de Aclimatización en Invernadero. A) Plantas cubiertas con el vaso para mantener la humedad relativa y de esta manera ayudar a su adaptación al nuevo microambiente, B). Aspecto de una planta de fresa dentro del contenedor para mantener la humedad.

6.4.1 Plantas Enraizadas *In Vitro*, En Fase de Aclimatización con Dos Sustratos.

La mezcla de materiales inertes con materiales orgánicos es importante ya que se obtienen buenas propiedades físicas y químicas, donde la materia orgánica es un componente activo y su incorporación en el sustrato inorgánico mejora el espacio poroso e incrementa la retención de humedad así como la capacidad de intercambio catiónico (Moreno, 2002). La razón de esto es porque los materiales ya sean orgánicos e inorgánicos presentan diferentes tipos de poros como diferentes funciones por lo que sus propiedades varían de acuerdo a las proporciones de la mezcla (Gutiérrez – Castorena *et al.*, 2011).

6.4.1.1 CP. Zamorana

La variedad CP. Zamorana presentó un alto porcentaje de sobrevivencia al ser llevadas las plantas obtenidas *in vitro* a invernadero, observándose una diferencia significativa entre los tratamientos que se realizaron para el enraizamiento, donde se encontró que TRIA 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ obtuvo el mayor porcentaje con el 97.45 % en comparación del TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que tuvo un 56.71 % de sobrevivencia de las plantas aclimatizadas y fue estadísticamente igual al TRIA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (71.29 %), mientras que los demás tratamientos oscilaron entre un 88 a 94 % (Cuadro 18). Al comparar la sobrevivencia entre los sustratos se observa que el Peat Moss obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia (94.96 %) mientras que el sustrato a base de Fibra de Coco únicamente un 76.38 %, observándose que el mejor sustrato fue el Peat Moss. Es adecuado controlar factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones, para evitar el exceso de transpiración de las plantas jóvenes, hasta que logren un adecuado desarrollo de sus estomas y cutícula, es necesario mantener una alta humedad relativa (Sánchez, 2000). Karpov (2004) menciona que en brotes axilares de *Yucca aloifolia* L., enraizados con AIB se obtuvo un 87.1% de sobrevivencia al ser pasados al suelo. Shiau *et al.* (2002) establecieron plántulas de *Anoectochilus formosanus* Hayata donde alcanzaron un 90 % de sobrevivencia después de transferirlas a condiciones *ex vitro* en recipientes cerrados con un sustrato de Fibra de Coco, posteriormente pasadas a Peat Moss y vermiculita (1:1 v/v)

Para *Eucalyptus gransis* y *E. urophylla* se encontraron porcentajes de sobrevivencia del 75 y el 85 %, donde las condiciones para llegar a este resultado fueron que las plantas al sacarse del cultivo *in vitro* medían de 3 a 7 cm de longitud con 3 raíces como mínimo, se colocaron en bolsas de suelo arcillo arenoso como sustrato y se colocaron en un vivero que proporcionaba un 70 % de sombra, donde el riego fue por aspersión durante 15 días, se fertilizaron a los 25 días de iniciada la aclimatización y se realizaron aspersiones con Oxiclورو de Cobre cada 7 días (Martínez *et al.*, 2011).

Cuadro18. Comparación del Índice de Sobrevivencia de la Variedad CP Zamorana para los tratamientos utilizados *In Vitro*.

Tratamiento	Sobrevivencia	Porcentaje
Testigo	16.83 ± 2.85 a	93.51 ± 15.87 a
AIB	17.00 ± 2.44 a	94.44 ± 13.60 a
TRIA 2µg·L⁻¹	17.50 ± 0.83 a	97.45 ± 4.51 a
TRIA 5 µg·L⁻¹	12.66 ± 5.95 ab	71.29 ± 33.81 ab
TRIA 10 µg·L⁻¹	9.66 ± 5.95 b	56.71 ± 35.55 b
BR 0.1 mg·L⁻¹	16.16 ± 1.47 a	90.50 ± 7.67 a
BR 0.01 mg·L⁻¹	15.66 ± 1.36 a	88.19 ± 8.22 a
BR 0.001 mg·L⁻¹	16.67 ± 1.86 a	93.28 ± 10.51 ^a

Los valores son medias de 6 réplicas de 144explantos cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

Cuadro19. Comparación del Índice de Sobrevivencia de la Variedad Zamorana para dos Sustratos

Sustrato	Sobrevivencia	Porcentaje
Peat Moss	16.79 ± 1.47 a	94.96 ± 6.14 a
Fibra de Coco	13.75 ± 5.16 b	76.38 ± 28.71 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 144 explantos cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.4.1.2 CP. *Jacona*.

En el Cuadro 20, se observa que el porcentaje de sobrevivencia fue alta para la variedad CP. *Jacona* al ser transferidas a condiciones invernadero, se encontró que el mayor porcentaje de sobrevivencia fue para el tratamiento con TRIA $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con un 97.91 % de sobrevivencia y el tratamiento con TRIA $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ presentó el menor porcentaje de sobrevivencia con un 67.82 %. Esto puede deberse a que los reguladores de crecimiento ayudan a la división celular de las plantas por lo que existe una rápida regeneración de ellas, haciendo que las nuevas hojas y raíces aparezcan más rápido favoreciendo de esta manera la aclimatización de las plantas generadas en cultivo *in vitro*. Para los sustratos utilizados no se encontró diferencia significativa el porcentaje fue del 90.62 % para Peat Moss y un 86.34 % para Fibra de Coco (Cuadro 21) por lo que se puede decir que en esta variedad lo que afectó su porcentaje de sobrevivencia fue regulador utilizado.

En *Cardiospermum halicacabumen* un sustrato compuesto por vermicompost y tierra de jardín (1:1) transferidas para endurecer las plantas, en condiciones controladas o bien en una cámara de crecimiento, como lo son una humedad relativa alta, la intensidad de la luz y la temperatura, donde duraron 4 semanas, posteriormente se pasaron a macetas con el sustrato antes mencionado contando al mes con un 80 % de sobrevivencia, valor que en la mayoría de los tratamientos y con ambos sustratos son superiores (Jahan *et. al.*, 2014). En ciruelo y fresa se encontraron porcentajes de sobrevivencia del 81 y 77 % a los 30 días de haberse transplantado, con el paso del tiempo el porcentaje de sobrevivencia empezó a disminuir encontrando a los 60 días un 71 % de sobrevivencia para fresa y un 69 % para ciruelo, donde observaron que se obtuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia en un microambiente de cubierta de polietileno transparente en comparación de la cámara de nebulización (Arellano y González, 1985).

Cuadro20. Comparación del Índice de Supervivencia de la Variedad CP. Jacona.

Tratamiento	Supervivencia	Porcentaje
Testigo	17.33± 1.63 a	96.29±9.07 ab
AIB	16.83± 1.94 a	93.28±10.51 ab
TRIA 2µg·L ⁻¹	17.66± 0.51 a	97.91±2.28 a
TRIA 5 µg·L ⁻¹	16.50± 1.22 a	93.05±6.27 ab
TRIA 10 µg·L ⁻¹	13.66± 2.65a	67.82±22.60 b
BR 0.1 mg·L ⁻¹	17.00± 1.09 a	93.75±5.53 ab
BR 0.01 mg·L ⁻¹	15.00± 4.42 a	84.25±24.99 ab
BR 0.001 mg·L ⁻¹	14.66± 6.28 a	81.48±34.90ab

Los valores son medias de 6 réplicas de 144 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$.

Cuadro21. Comparación del Índice de Supervivencia de la Variedad CP. Jacona para los Sustratos Utilizados.

Sustrato	Supervivencia	Porcentaje
Peat Moss	16.62± 2.06 a	90.62±16.49 a
Fibra de Coco	15.54± 3.92a	86.34±21.79a

Los valores son medias de 6 réplicas de 144 plantas cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arccos X^{1/2}$.

6.4.2 Plantas Enraizadas *In Vivo*, con dos Sustratos en Etapa de Aclimatización.

6.4.2.1 CP. Zamorana.

Las plantas enraizadas *in vivo* presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para la supervivencia encontrándose porcentajes que van del 50.92 al 90.0 % de supervivencia donde el porcentaje más bajo fue para el testigo y el más alto fue para el Radix[®] 1500 respectivamente (Cuadro 22). Esto se puede deber a que las plantas con Radix[®] 1500, presentan mayor número de raíces ayudándoles de esta manera a las plantas para su supervivencia. Para los sustratos utilizados durante el enraizamiento *in vivo*, no se encontraron diferencias significativas entre ellos, observándose que para Peat Moss obtuvo el 82.96 % de supervivencia y cerca del 59.87 %

para el sustrato a base de Fibra de Coco (Cuadro 23). En estacas de *Symphoricarpos microphyllus* H.B.K. se tuvo un porcentaje de sobrevivencia del 77.6 % con Radix® 10 000 seguido del Raizone Plus® con un 44.3 % (Quintero *et al.*, 2008), los cuales son menores a los porcentajes obtenidos en esta investigación.

Cuadro22. Comparación del Índice de Sobrevivencia en Enraizamiento *In Vivo* de la Variedad CP. Zamorana con Tres Tratamientos.

Tratamiento	Sobrevivencia	Porcentaje
Testigo	9.16 ± 4.35b	50.92 ± 24.19b
Radix® 1500	16.16 ± 1.83a	90.00 ± 10.18a
Raizone Plus®	13.16 ± 3.18a	73.33 ± 17.91a

Los valores son medias de 6 réplicas de 54 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

Cuadro23. Comparación del Índice de Sobrevivencia en el Enraizamiento *In Vivo* de la variedad CP. Zamorana para los Sustratos Utilizados.

Sustrato	Sobrevivencia	Porcentaje
Peat Moss	14.88 ± 4.01 a	82.96 ± 22.38 a
Fibra de Coco	10.77 ± 3.63a	59.87 ± 20.17a

Los valores son medias de 6 réplicas de 54 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.4.2.2 CP. Jacona.

La variedad CP. Jacona no presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) donde el Radix®1500 presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia con un 60.37 % y el testigo presentó el 53.70 % de sobrevivencia en comparación de la variedad CP. Zamorana la que presentó mayor porcentaje de sobrevivencia con el Radix®1500 (90 %) porcentaje superior al que se observa en esta variedad lo que demuestra que existe diferencia entre variedades (Cuadro 24). Y para los sustratos utilizados tampoco se apreció diferencia significativa ($p \leq 0.05$) donde Peat Moss obtuvo el 61.42 % y para Fibra de Coco el 41.97 % de sobrevivencia, porcentajes menores a los obtenidos en CP. Zamorana (Cuadro 25).

Cuadro24. Comparación del Índice de Supervivencia en Enraizamiento *In Vivo* de la Variedad CP. Jacona en Dos Sustratos.

Tratamiento	Supervivencia	Porcentaje
Testigo	10.00 ± 5.01a	53.70 ± 23.48 ^a
Radix[®] 1500	11.00 ± 2.36a	60.37 ± 14.34 ^a
Raizone Plus[®]	7.50 ± 4.63a	41.02 ± 25.89 ^a

Los valores son medias de 6 réplicas de 54 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

Cuadro25. Comparación del Índice de Supervivencia para el Enraizamiento *In Vivo* para CP. Jacona en dos Sustratos.

Sustrato	Supervivencia	Porcentaje
Peat Moss	11.44 ± 3.90 a	61.42 ± 19.98 a
Fibra de Coco	7.55 ± 3.71b	41.97 ± 20.62a

Los valores son medias de 6 réplicas de 54 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.4.3 Comparación de Los Sustratos para el Índice de Supervivencia

Un medio ideal de propagación, debe estar provisto de suficiente porosidad para permitir una buena aireación y una alta capacidad de retención de agua, debe tener un buen drenaje y estar libre de patógenos (Hartmann *et al.*, 2002)

6.4.3.1 Enraizamiento *In Vitro*.

Para las plantas que fueron enraizadas *in vitro* existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), entre los sustratos para ambas variedades donde la CP. Zamorana presentó el mayor porcentaje de supervivencia con Peat Moss con un 93.0 % de supervivencia y de igual manera fue la que presentó menor porcentaje de supervivencia del 76.3 % con Fibra de Coco, en comparación de la variedad CP. Jacona donde no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

para ambos sustratos, teniendo un 81.5 y un 87.1 % para Fibra de Coco y Peat Moss respectivamente (Cuadro 26).

Cuadro26. Comparación de Sustratos para el Enraizamiento *In Vitro*.

Sustrato	CP. Zamorana		CP. Jacona	
	Sobrevivencia	Porcentaje	Sobrevivencia	Porcentaje
Peat Most	16.75 ± 1.48 a	93.05 ± 8.23 a	15.68 ± 4.04 a	87.15 ± 22.47 a
Fibra de Coco	13.750 ± 4.62 b	76.38 ± 25.70 b	14.68 ± 4.57 a	81.59 ± 25.39 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 144 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

6.4.3.2 *Enraizamiento In Vivo.*

Para el enraizamiento *in vivo* se encontró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), para la variedad CP. Zamorana donde la sobrevivencia para Peat Moss fue de un 82.1 % en comparación de la sobrevivencia en Fibra de Coco donde se encontró un 42.5 % de sobrevivencia, para la variedad CP. Jacona no se encontró diferencia significativa donde los porcentajes fueron de 55.5 y 31.4 % para Peat Moss y Fibra de Coco respectivamente (Cuadro 27), en trabajos realizados anteriormente con diferentes sustratos sobre el crecimiento de las plantas de fresa se encontró que el mejor fue una mezcla de Fibra de Coco con tezontle en una proporción 1:3, ya que encontraron que mientras más se subía la proporción de Fibra de Coco el valor del área foliar disminuía, encontrando que se tenían resultados similares estadísticamente con una mezcla de Fibra de Coco con vermiculita en la misma proporción (1:3), (López *et al.*, 2005). La mezcla de turba y perlita o vermiculita es de las más usadas en la agricultura en virtud que favorece el enraizamiento de las plantas y esquejes / estacas y facilita la absorción de nutrientes a las nuevas raíces, ya sea por flujo de masas o por difusión (Benton, 2005).

Cuadro27. Comparación de Sustratos para el Enraizamiento *In Vivo*.

Sustrato	CP. Zamorana		CP. Jacona	
	Sobrevivencia	Porcentaje	Sobrevivencia	Porcentaje
Peat Moss	14.77 ± 3.30 a	82.10 ± 18.38 a	10.00 ± 5.52 a	55.56 ± 30.68 a
Fibra de Coco	7.66 ± 5.12 b	42.59 ± 28.46 b	5.66 ± 4.06 a	31.48 ± 22.56 a

Los valores son medias de 6 réplicas de 54explantas cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

Como se observó en los Cuadros 26 y 27 en ambos casos el porcentaje de sobrevivencia fue mayor en Peat Moss que en Fibra de Coco en el caso de plantas que provenían de enraizamiento *in vitro* se tuvieron mayores porcentajes de sobrevivencia que en las plantas que se pusieron a enraizar directamente en el sustrato, esto puede deberse a que como mencionan Alarcón y Urrestarazu (2006), la Fibra de Coco tiene buena capacidad de retención de humedad, alta capacidad de aireación, pH ligeramente ácido y algunos nutrientes asimilables son muy bajos, como el nitrógeno, calcio y magnesio, mientras que fosforo y potasio son elevados, al igual que sodio y cloruros, en comparación del Peat Moss donde este sustrato tiene una elevada porosidad total, buena capacidad de aireación, una alta disponibilidad de agua y una relación C/N entre 40 y 50, con un contenido de materia orgánica de 68-82 %, con un pH de 5.5 – 6.5 por lo que a las plantas provenientes de cultivo *in vitro* que vienen de condiciones totalmente controladas, el sustrato les ayuda a poder absorber nutrientes por el contenido de materia orgánica en comparación de la Fibra de Coco que por la relación C/N y la CE elevada no permite que las plantas absorban los nutrientes de manera adecuada lo que repercute en la aclimatización de las plantas.

6.4.4 Sobrevivencia en Ambos Sistemas de Enraizamientos.

Las plantas de fresa propagadas *in vitro* presentan mayor porcentaje de sobrevivencia cuando se realiza un enraizamiento *in vitro* (85%) en comparación de los brotes que fueron enraizados *in vivo*, 71 % (Cuadro 28), presentado diferencia significativa para los dos tipos de enraizamiento, lo cual concuerda con lo mencionado por Ruscitti *et al.* (2000) quienes dicen que la práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* tiene una gran importancia, debido

a que tienen como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir a las condiciones del trasplante al suelo, ya que una buena formación de sistema radical y crecimiento de las raíces es fundamental para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero, por lo que se puede decir que la etapa de enraizamiento es necesaria para el incremento de la resistencia al estrés de humedad y enfermedades para el establecimiento de las reservas de alimentos necesarios en el período de transición y para el desarrollo de la capacidad autotrófica. La apariencia verde de las plantas no es suficiente para poder realizar la fotosíntesis, debido a que aunque los pigmentos fotosintetizadores estén presentes, las enzimas están en ocasiones ausentes o inactivas (Izquierdo *et al.*, 2001). En brotes enraizados de *S. rebaudiana* se reportó una tasa de sobrevivencia del 70 % (Sivaram y Mukudan, 2003).

Cuadro28. Sobrevivencia por Variedad en Ambos sistemas de Enraizamiento.

Enraizamiento	CP. Zamorana		CP. Jacona	
	Sobrevivencia	Porcentaje	Sobrevivencia	Porcentaje
<i>In Vitro</i>	18.21 ± 5.66 a	85.46 ± 20.60 a	18.18 ± 5.53 a	85.98 ± 21.66 a
<i>In Vivo</i>	13.41 ± 4.83 b	71.94 ± 24.00 b	9.58 ± 4.44 b	51.62 ± 22.81 b

Los valores son medias de 6 réplicas de 162 explantes cada una. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). Los porcentajes fueron previamente transformados para su análisis estadístico mediante la función $\arcsen X^{1/2}$.

En la Figura 9 se pueden apreciar plantas de fresa aclimatizadas, desde aquellas que solo tienen 20 días de encontrarse en el invernadero (A), hasta aquellas que ya se encuentran en floración (D) y con estolones (B).



Figura9. Plantas de Fresa Aclimatizadas, A) Planta de Fresa a los 20 días de estar en el invernadero, B) Estolón de una Planta Aclimatizada de Mes y Medio, C) Aspecto de las Plantas de Fresa Aclimatizadas a los 2 Meses y D) Planta de Fresa con Flor Después de 4 Meses de Encontrarse en el Invernadero.

6.5 Comportamiento de la actividad de las Catalasas (CAT) durante la Aclimatización.

Kaedleček *et al.* (2001) Mencionan que durante la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro*, éstas pueden sufrir reacciones de estrés provocadas tanto por remover su sistema radicular del medio con agar y al colocarlas en el sustrato, como por el incremento considerable en la intensidad de luz en condiciones externas. Es probable que estos factores sean los causantes de que el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro* se vea interrumpido temporalmente.

6.5.1 Comportamiento de las CAT en la Variedad CP. Zamorana.

6.5.1.1 CAT en el Proceso de la Aclimatización en Peat Moss.

En el caso de las catalasas en la variedad CP. Zamorana se puede observar en la Figura 10, que al quinto día es donde presentan mayor actividad, donde todos los tratamientos siguen una tendencia, observándose que al primer día presentan una actividad baja, la cual va aumentando hasta el quinto día, donde llega a la mayor actividad empezando a descender a partir de ese momento. Para TRIA la actividad en el día cero inicia en 6.26 unidades, sufriendo un aumento drástico para el quinto día y descendiendo a los niveles iniciales para el décimo día, y ya para el día 15 la actividad de la CAT sube un poco llegando a 9.09 unidades, esto se puede deber a que es el día en el que se les retira definitivamente los domos a las charolas, etapa donde las plantas se encuentran adaptadas a su nuevo ambiente donde se encontró un porcentaje de sobrevivencia de 97 % para este tratamiento, mostrando que la CAT se activó en el momento crucial para la planta logrando de esta manera su sobrevivencia, teniendo así un buen porcentaje de sobrevivencia, en BR se observó un comportamiento similar al de TRIA donde el único punto donde ocurrió un cambio fue para el quinto día, donde la actividad de la CAT fue menor con 40.99 unidades presentando un 96 % de sobrevivencia, mostrando de igual manera que en TRIA la enzima empieza actuar en el momento en que las plantas se encuentran más estresadas y lograr la sobrevivencia de las plantas, en el caso del enraizamiento *in vivo* se observó que la actividad de la CAT en los primeros cinco días se mantuvo elevada puesto que en este tiempo también se están formando las raíces adventicias de estos brotes, así que para el día 10 y 15 la actividad de la CAT fue muy similar a la de las plantas que fueron enraizadas *in vitro* teniendo de esta manera que la actividad de la catalasa descendió (9.09 unidades), teniendo un 74 % de sobrevivencia, debido a que como también se están formando las raíces adventicias las plantas presentaron mayor actividad en los primeros días mostrando de esta manera que las plantas que son enraizadas *in vivo* sufren de mayor estrés al inicio de la aclimatización logrando porcentajes de sobrevivencia más bajos en comparación de los obtenidos en las plantas que fueron enraizadas *in vitro*.

En *Arachis hypogaea* L., la actividad de la CAT en $U \cdot g^{-1}$ por peso fresco se encontró que la actividad en el control fue de 7.59 y para las plantas de esta especie tratadas con TRIA a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 $ml \cdot L^{-1}$ de vipul[®]) la actividad de la CAT oscilo entre 85.74 a 155.96, presentándose mayor actividad en las plantas que tenían menor concentración de TRIA (Vermaet *al.*, 2011). En plantas de *Abrus precatorius* la actividad de la CAT en el proceso de aclimatación durante los primeros 49 días, sugiere una sobre regulación de los mecanismos de protección de plantas en contra del estrés oxidativo, donde la actividad de la CAT al día cero inicia en 131.6 ± 6.09 aumentando, en el día 14 la actividad fue de 270.0 ± 5.77 y al día 49 la CAT presentó una actividad de 398.0 ± 5.61 $mmol \cdot mg^{-1} \cdot (prot.) \cdot min^{-1}$ (Perveen *et al.*, 2013), donde estos resultados no concuerdan con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde se puede observar que la actividad registra un pico a los cinco días y posteriormente empieza a descender, mostrando que las plantas de fresa muestran mayor actividad en el momento más crítico de la aclimatización.

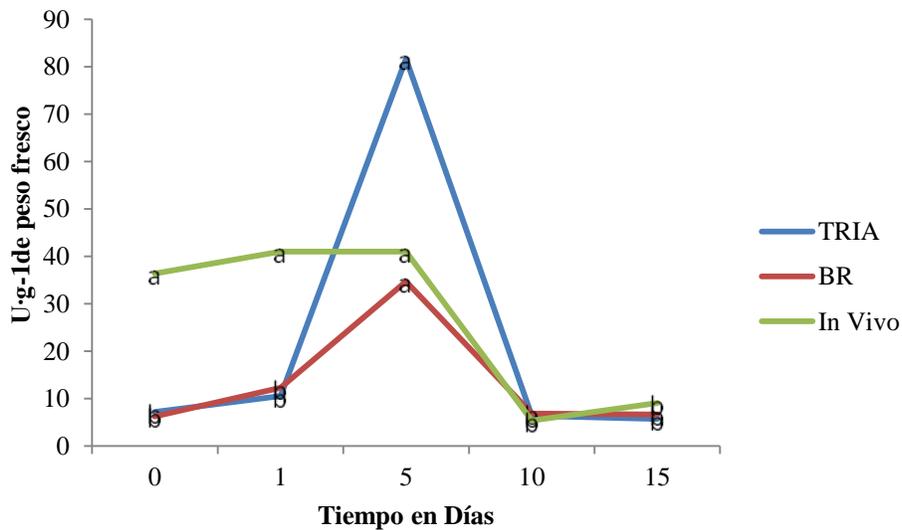


Figura10. Comportamiento de las CAT al paso de 15 días en plantas de Fresa Variedad CP. Zamorana, cultivadas *in vitro*, llevadas a condiciones invernadero, en un sustrato de Agrolita: Peat Moss (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

6.5.1.2 CAT en el Proceso de Aclimatización en Fibra de Coco.

La actividad de la Catalasa para la variedad CP. Zamorana, en Fibra de Coco se observó que dicha actividad fue constante, mientras que para el caso del tratamiento de enraizamiento *in vitro* con TRIA, y con inicio en el día cero se observaron actividades de 9.26 unidades, disminuyendo para el quinto día a 5.9 unidades, mientras que para el día 10 sufrió un aumento a los niveles iniciales y para el día 15 obteniendo un valor similar al del quinto día, presentando un porcentaje de sobrevivencia del 100 %. Para el tratamiento con BR la actividad fue mayor al inicio comparada con el tratamiento con TRIA, con BR en el día cero la actividad de la catalasa fue de 35.42 unidades y para el resto del periodo de monitoreo en el proceso de aclimatización, la actividad de la catalasa fue idéntica a la actividad con el tratamiento con TRIA, pero en este caso el porcentaje de sobrevivencia fue menor con un 88 %. En el enraizamiento *in vivo* la actividad de la catalasa fue mayor que para las plantas que fueron enraizadas *in vitro* para el día cero la actividad fue de 35.42 unidades, disminuyendo en los días posteriores donde para el día 15 la actividad aumentó (Figura 11), teniendo un porcentaje de sobrevivencia del 30 %, en este sustrato los valores observados fueron más bajos en comparación del Peat Moss donde los porcentajes fueron mayores, esto puede deberse a que aparte de luchar por sobrevivir las plantas luchan contra la CE eléctrica elevada del sustrato, lo cual nos dice que se tiene una cantidad elevada de sales, impidiendo el buen desarrollo de las plantas ya que a altas concentraciones de sales los sistemas radicales de ellas pueden verse afectados.

En *Tacitus bellus* las isoenzimas CAT fueron detectadas por el método de Woodbury *et al.* (1971), en explantes primarios no se registró ninguna actividad de la CAT, mientras que en la formación de yemas de los brotes existió un pequeño aumento en la producción de la actividad de la CAT, de igual manera para el décimo día durante la organogénesis (28.71 ± 3.40), para el día 20 el contenido de CAT bajo a 20.43 ± 76 , mostrando que para el día 40 el contenido subió a 26.11 ± 2.63 y para el día 60 la actividad presente de la CAT en la organogénesis fue de 25.21 ± 0.81 (Mitrovíc *et al.*, 2012), comportamiento similar al obtenido por los explantes que fueron enraizados *in vivo* donde la actividad de la CAT varió aumentando y disminuyendo paulatinamente, no siguiendo una tendencia como lo fue para las plantas que ya estaban enraizadas *in vitro*. Caso contrario a lo obtenido en *Cardiospermum halicacabum* donde en las

primeras dos semanas se tenía una actividad alrededor de $160 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$, aumentando a $200 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$ a las 4 semanas en plantas aclimatizadas (Jahan *et al.*, 2014).

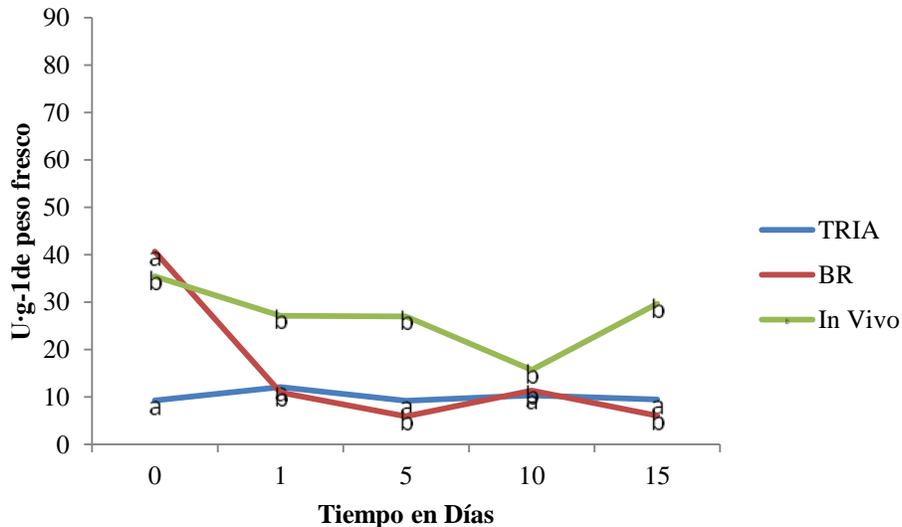


Figura11. Comportamiento de la CAT en el paso de 15 días para fresa variedad CP. Zamorana cultivada *in vitro* llevadas a condiciones de invernadero, en un sustrato de Agrolita: Fibra de Coco (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Lo que se puede observar en la Figura 10 y 11 es que la actividad de la CAT, tiene tendencias diferentes para los sustratos utilizados al momentos de la aclimatización, en el caso de la actividad en Peat Moss se puede ver que existe una mayor actividad en el momento de la aclimatización, en este se aprecia que inicia baja y al día cinco esta sufre una mayor actividad marcando un pico en los días posteriores esta actividad disminuye en comparación de la Fibra de Coco, en la cual la actividad de la enzima se muestra más constante lo que se puede relacionar con los porcentajes de sobrevivencia en los Cuadros 26 y 27, en los cuales se constata que la actividad que presentan las plantas en Peat Moss es mayor pero de igual manera se tiene mayor porcentaje de sobrevivencia, en comparación que en Fibra de Coco donde se mantuvo constante y encontrándose el porcentaje más bajo, lo cual nos indica que en los primeros días de ser trasplantadas las plantas, lucharon por sobrevivir, tal vez se activan las enzimas proporcionando mayores porcentajes de sobrevivencia. Como se mencionó anteriormente la Fibra de Coco tiene un nivel de aireación, estructura facilitando en ambos casos el movimiento del agua, evitando pérdidas de agua innecesarias, encharcamientos, posibles condiciones anaeróbicas (Alarcón,

2006) y según Roselló *et al.* (1999), presenta problemas debido a su alta acidez. Caso contrario al Peat Moss el cual no presenta problemas con acidez y tiene un gran contenido de materia orgánica y buena aireación.

6.5.2 Comportamiento de la CAT en la Variedad CP. Jacona.

La catalasa tiene una velocidad de reacción alta, pero una baja afinidad por H₂O₂, de ese modo solo elimina la mayor parte de H₂O₂ (Dat *et al.*, 2000). El aumento de la actividad de la catalasa también sugiere un rol importante en la fotorrespiración, desintoxicándose del peróxido de hidrógeno a través del sistema de transporte electrónico de la mitocondria (Scandalios, 1990).

6.5.2.1 CAT en el Proceso de Aclimatización en Peat Moss.

La actividad de la CAT en la variedad CP. Jacona en Peat Moss es similar a la observada en CP. Zamorana, en este caso en el tratamiento con TRIA la actividad en el día cero inicia en 10.71 unidades, para el día uno la actividad sufrió un drástico aumento, ya para los días posteriores la actividad empezó a disminuir observándose en el día 15 valores similares a los del día cero, lográndose un 97 % de sobrevivencia de las plantas adaptadas a su nuevo ambiente, para el tratamiento con BR la actividad inicio igual a la presentada por TRIA, mostrando un incremento al día cinco y empezando a disminuir los días posteriores tendencia similar a la encontrada en la variedad CP. Zamorana, en CP. Jacona se obtuvo un 96 % de sobrevivencia para este tratamiento. En el enraizamiento *in vivo* la actividad inicio igual a la actividad del enraizamiento *in vitro* con 10.71 unidades en el día cero, sufriendo un ligero aumento para los días posteriores, mostrando en el día 10 una pequeña disminución y restableciéndose la actividad para el día 15 mostrando valores similares a los de los días 1 y 5 (Figura 12), en este caso el porcentaje fue del 83 %, comportamiento diferente al que presentó la variedad CP. Zamorana, en el cual la tendencia de los primeros días fue alto con 40.09 unidades y para el día 10 y 15 esta disminuyó, lo cual se reflejó en los porcentajes de sobrevivencia observándose un mayor porcentaje en la variedad CP. Zamorana.

Caso contrario a lo que paso en *Tylophora indica* donde la actividad de la catalasa fue en aumento en el paso del tiempo, con la densidad de flujo de fotones fotosintéticos más alto (PPFD 300), la actividad de la catalasa fue mayor que en PPFD 50 donde esta fue menor y se presentó la actividad desde el día 0, la actividad fue de alrededor de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, elevándose la actividad al día 28 fue de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, y en PPFD al día 0 no se presentó la actividad de la catalasa, llegando al día 28 con una actividad de $225 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína (Faisal y Anis, 2010), en *Tecomella undulata* observaron que la actividad de la CAT iba en aumento en la fase de aclimatización alcanzando su mayor actividad en el día 28 (Varshney y Anis, 2011), lo que no paso en la presente investigación ya que hasta los primeros cinco días la actividad de la catalasa fue en aumento, llegando a este día donde empezó a declinar mostrando que la planta ya no se encontraba tan susceptible a las condiciones invernadero donde se encontraban las plantas.

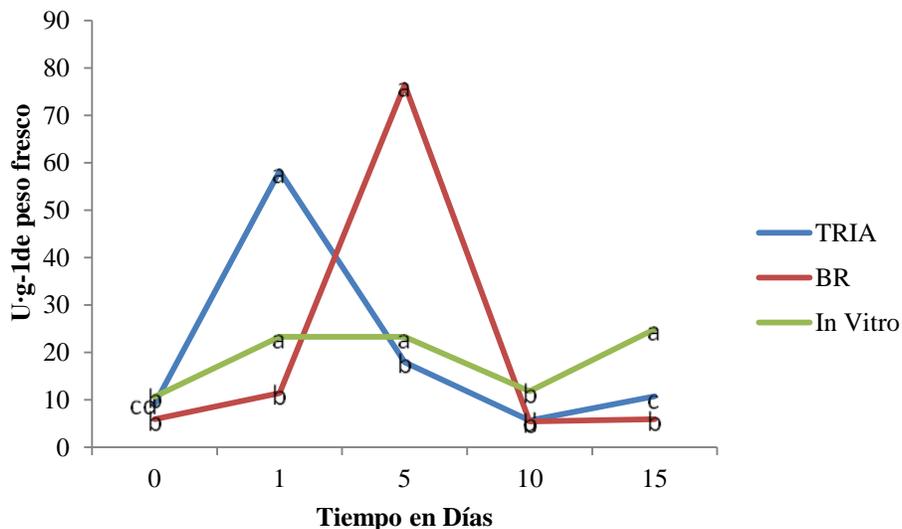


Figura12. Comportamiento de las CAT en Plantas de Fresa Variedad CP Jacona, Cultivadas *in vitro* Ser Llevadas a Condiciones Invernadero, en un sustrato de Agrolita: Peat Moss (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

6.5.2.2 CAT en el Proceso de Aclimatización en Fibra de Coco.

En la Figura 13 se observan valores de CAT muy bajos en Fibra de Coco, comparado a lo observado para los obtenidos en Peat Moss, para el tratamiento con TRIA la actividad inicio con 10.94 unidades, al primer día de encontrarse en condiciones diferentes a las que se encontraban

acostumbradas las plantas la actividad aumento y a partir del quinto día esta empezó a disminuir, hasta llegar a 4.52 unidades para el día 15, lográndose de esa manera un porcentaje de sobrevivencia del 100 %. Para el tratamiento con BR el comportamiento fue muy similar al obtenido en el tratamiento con TRIA, en lo único que cambia la actividad es que para el día uno esta disminuye en lugar de aumentar y para el día cinco los valores aumentan un poco llegándose de esta manera al día 15 con valores bajos de CAT, donde el porcentaje de sobrevivencia (88 %) se ve repercutido por la disminución de la actividad de la enzima en el día uno, mientras que para el enraizamiento *in vivo* la actividad fue mayor presentando un valor de 28.35 unidades para el día cero, disminuyendo para el día uno y para los días posteriores esta actividad aumentó donde en el día 15 la actividad casi fue la doble a la presentada en el día cero, mostrando de esta manera que la formación de raíces adventicias y el sustrato utilizado repercutieron en el porcentaje de sobrevivencia, solo se logró obtener un 27 %. El comportamiento de la actividad para el enraizamiento *in vitro* fue similar al observado para la variedad CP. Zamorana, mientras que el comportamiento para el enraizamiento *in vivo*, se mantuvo más constante debido a que la actividad no tiende a subir en los últimos días como sucede en la variedad CP. Jacona lográndose un porcentaje más alto de sobrevivencia en este enraizamiento.

Varshney y Anis (2011) trabajaron con *Tecomella undulata* donde la actividad de la catalasa fue aumentando durante el período de aclimatización, llegando a su valor máximo a los 28 días de la transferencia, donde sugieren que las plantas micropropagadas desarrollan una sistema fotosintético funcional, para reducir el estrés oxidativo durante el periodo de la aclimatización. Al día cero la actividad fue de $90 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$, aumentando hasta el día 28 donde la actividad fue de $350 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$, caso contrario a lo ocurrido en la investigación donde al inicio la actividad empezó a aumentar, pero llegado el día cinco la actividad de la catalasa empezó a disminuir.

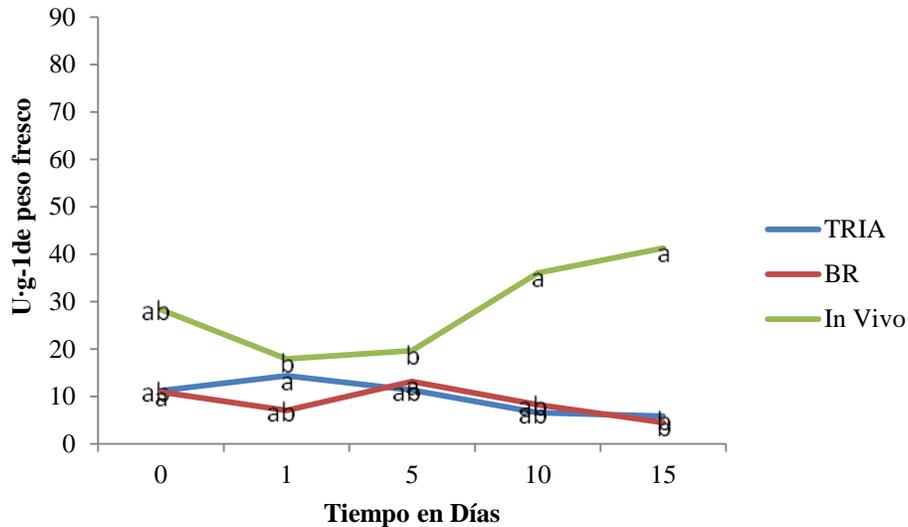


Figura13. Comportamiento de la CAT en el paso de 15 días en Fresa variedad CP. Jacona cultivada *in vitro*, llevadas a condiciones invernadero, en un sustrato de Agrolita: Fibra de Coco (2:1 v/v). Cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 9 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Al igual que en la variedad CP. Zamorana se pudieron observar valores de sobrevivencia mayores en Peat Moss que en Fibra de Coco, y el comportamiento de la actividad de la CAT en Peat Moss esta fue mayor que en Fibra de Coco, donde la actividad se mantuvo constante, mostrando que en Fibra de Coco las enzimas no responden de igual manera que en Peat Moss, lo cual nos da como consecuencia que en la sobrevivencia se obtuvieron porcentajes menores en Fibra de Coco, porque las plantas que se encontraban en dicho sustrato no fueron capaces de desarrollar las enzimas para protegerse del estrés, lo que les causo mayor mortandad, esto puede deberse a que la Fibra de Coco tiene un pH acido, una CE alta y contenidos bajos de N, lo que no le permite a la planta desarrollarse de la manera adecuada y protegerse de los factores ambientales existentes en el invernadero, en comparación del Peat Moss, donde el sustrato tiene contenido de materia orgánica y un pH que oscila entre 3.5 y 8.5, teniendo una buena retención de agua y aireación (INFOAGRO, 2010) por lo que la planta tiene mejores condiciones, favoreciendo de esta manera que las plantas de fresa que se encontraban en este sustrato tuvieran mayor actividad de catalasas en los momentos cruciales de la aclimatización, por lo que se obtuvieron mayores porcentajes de sobrevivencia.

6.6 Fluctuación de los Carbohidratos en los Primeros 15 Días de la Aclimatización de Plantas de Fresa Obtenidas *In Vitro*.

6.6.1 Fluctuación de los Carbohidratos para la Variedad CP. Zamorana.

6.6.1.1 Carbohidratos en la parte Aérea.

Las plantas que fueron llevadas a invernadero tratadas previamente con BR tienen un comportamiento similar a las plantas que fueron enraizadas *in vivo*, en el tratamiento con TRIA el contenido de carbohidratos al día cero se tiene $0.067 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, para el día uno el contenido de carbohidratos aumentó pero sigue estando por debajo de los valores obtenidos por los otros dos tratamientos, mientras que para el quinto y décimo día el contenido de carbohidratos disminuyó observándose valores similares y para el día 15 el contenido de carbohidratos aumento a $0.118 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, mostrando contenidos de carbohidratos mayores a los otros dos tratamientos. En el tratamiento con BR al momento de trasplante o día cero estas plantitas inician con $0.178 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, para el día uno este contenido disminuyó un poco, para los dos muestreos siguientes el contenido de carbohidratos aumentó manteniéndose por debajo de los obtenidos en el día cero y para el día 15 el contenido de carbohidratos disminuyó a $0.106 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Para las plantas enraizadas *in vivo* en el contenido de carbohidratos se presentaron altibajos durante la aclimatización, iniciando en $0.129 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, aumentando para el día uno, disminuyendo para el día 5, al día 10 el contenido vuelve a aumentar y para el día 15 el contenido vuelve a disminuir a un valor menor que con el que se inició (Figura 14) se puede observar un antagonismo con el contenido de carbohidratos y la actividad de la catalasa. Verma *et al.* (2011) indicaron que en *Arachis hypogaea* L. el contenido de carbohidratos en comparación del control son altamente significativos con las diferentes concentraciones usadas (0.5 , 1.0 y $2.0 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ de Vipul[®]) así como en combinación con BA, con valores que van de 0.568 a $15.217 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco, valores mayores a los encontrados en la presente investigación.

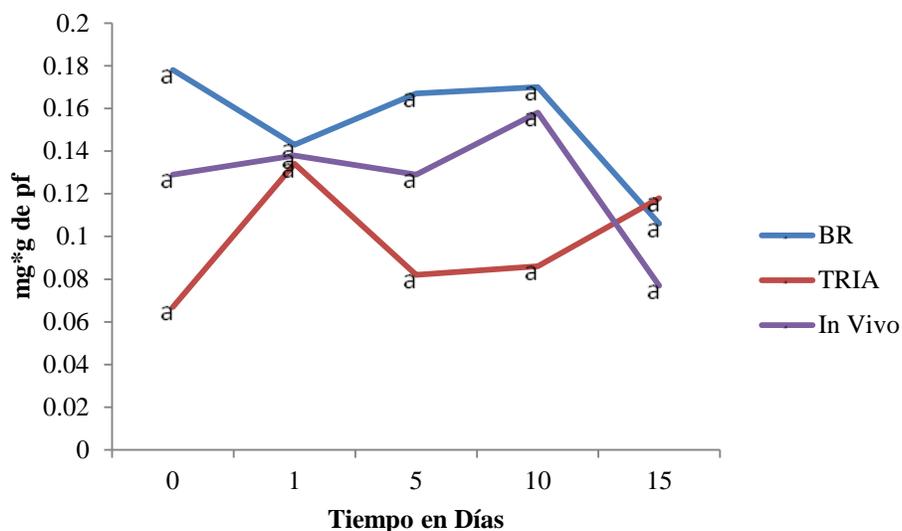


Figura14. Comportamiento de los Carbohidratos al paso de 15 días, en la parte aérea de fresa variedad CP. Zamorana, cultivadas *in vitro*, recién llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

6.6.1.2 Carbohidratos en la Raíz.

El contenido de Carbohidratos en la raíz para las plantas que fueron enraizadas *in vitro* se tiene que para el tratamiento con TRIA al día cero las plantas contienen $0.133 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, empezando disminuir a partir del día cinco hasta llegar al día 15, encontrándose contenido de carbohidratos a la mitad de los encontrados al inicio. Las plantas tratadas con BR al día cero tenían un contenido de carbohidratos de $0.105 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, para los próximos cinco días el contenido de los carbohidratos empezó a aumentar mostrando un pico, empezando a descender desde ese momento hasta llegar al día 15 donde los valores encontrados fueron similares a los del inicio (Figura 15). En la raíz de fresa con aplicación de urea con 0, 1 y 2 % se obtuvieron 0.020 , 0.025 y $0.027 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MF y con la aplicación de sacarosa del 0 y 8 % se obtuvieron 0.023 y $0.024 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MF (Carrillo *et al.*, 2005), se obtuvieron contenidos de carbohidratos menores a los obtenidos en las plantas obtenidas de cultivo *in vitro*.

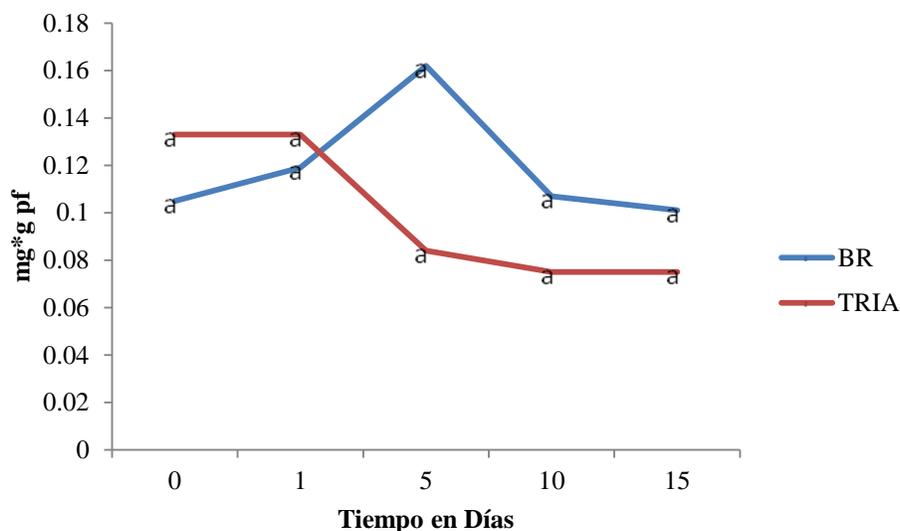


Figura15. Comportamiento de los Carbohidratos al paso de los primeros 15 días en la raíz de Fresa variedad CP. Zamorana cultivada *in vitro*, llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para esta variedad el contenido de carbohidratos se puede observar para los tratamientos en la parte aérea y la raíz tienen un comportamiento similar, la variedad presenta un promedio de 5.85 mg·g de pf en hojas y 7.28 mg·g de pf en raíces para las plantas enraizadas *in vitro*, para las plantas enraizadas *in vivo* tenían 6.10 hojas, para las plantas que fueron llevadas a campo se tiene que presentaron 8.56 hojas, observando que a partir del número de las hojas el contenido de carbohidratos es mayor mostrando que la planta tiene una mayor tasa fotosintética almacenando mayor contenido de carbohidratos.

6.6.2 Fluctuación de los Carbohidratos para la Variedad CP. Jacona.

6.6.2.1 Carbohidratos en la Parte Aérea.

En la Figura 16 se muestra que las plantas con enraizamiento *in vitro* e *in vivo* se tiene un comportamiento similar en la fluctuación del contenido de carbohidratos para la parte aérea de las plantas, en el tratamiento con TRIA las plantas inician con 0.151 mg·g⁻¹, al día uno este contenido disminuyó un poco, para el día cinco el contenido aumento encontrando un contenido menor al del inicio, para los días siguientes el contenido empezó disminuir llegando al día 15 con la mitad del contenido de carbohidratos inicial, el tratamiento con BR inició con 0.127 mg·g⁻¹,

disminuyendo de manera drástica hasta llegar a la mitad del contenido de carbohidratos inicial en el quinto día, observándose un aumento a partir de ese momento encontrándose contenidos de carbohidratos similares a los iniciales en el día 15, para las plantas enraizadas *in vivo* se inició con 0.143 mg·g⁻¹, disminuyendo para el día uno, mostrando aumento en el quinto día y para los días posteriores este contenido de carbohidratos disminuyó encontrándose contenidos inferiores a los iniciales en el proceso de la aclimatización.

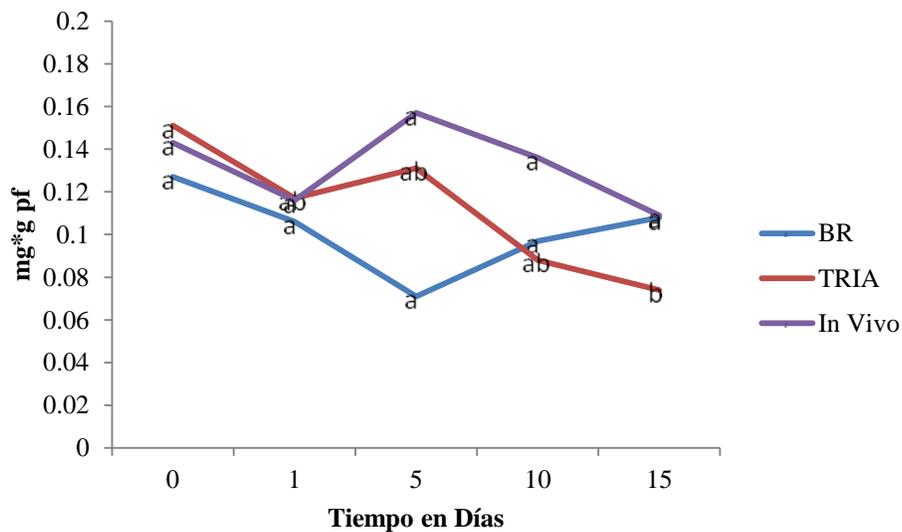


Figura16. Comportamiento de los Carbohidratos en la parte aérea de fresa variedad CP. Jacona cultivada *in vitro*, recién llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

6.6.2.2 Carbohidratos en la Raíz.

El contenido de carbohidratos para la raíz en el tratamiento con TRIA inicio con 0.079 mg·g⁻¹, aumentando ligeramente el contenido de carbohidratos, para el quinto día el contenido de carbohidratos fue similar al encontrado al inicio, y para los días 10 y 15 el contenido aumentó mostrando valores mayores a los iniciales casi al doble, el tratamiento con BR inicio con 0.139 mg·g⁻¹, observándose un comportamiento similar al encontrado con el tratamiento con TRIA pero con contenidos de carbohidratos mayores (Figura 17).

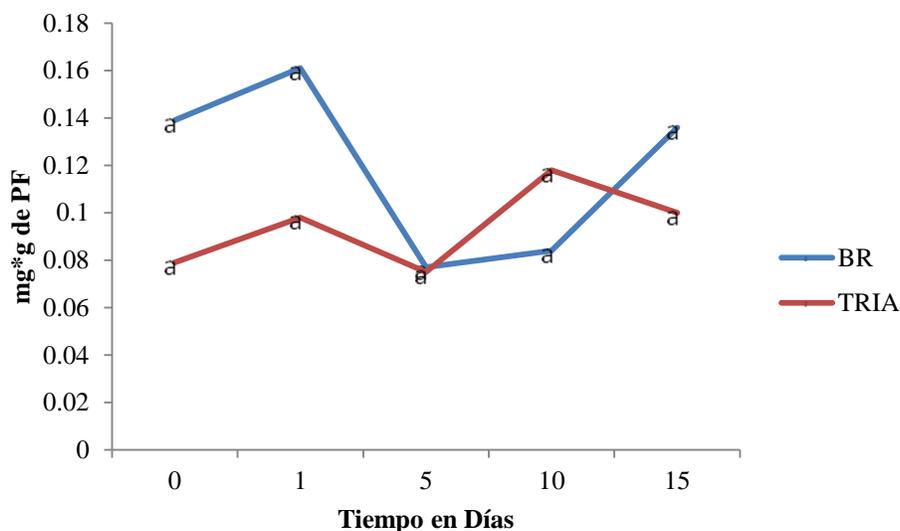


Figura17 . Comportamiento de los Carbohidratos al paso de los primeros 15 días en la raíz de Fresa variedad CP. Jacona cultivada *in vitro*, llevadas a condiciones invernadero. Cada punto en la gráfica son medias de 9 repeticiones, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

El contenido de carbohidratos en la variedad CP. Jacona muestran que para el tratamiento con BR el comportamiento de los carbohidratos en la parte aérea y la raíz presentan un comportamiento similar mostrando una sinergia en comparación del comportamiento para el tratamiento con TRIA donde existe un antagonismo con la parte aérea y la raíz, para el caso del enraizamiento *in vivo* se tiene que las plantas de la variedad CP. Jacona presentaban 5.26 hojas y en el caso de las plantas que fueron llevadas a campo contaban con 10.12 hojas observándose que a mayor cantidad de hojas existe mayor contenido de carbohidratos totales.

6.7 Evaluación de Plantas Provenientes de *In Vitro* al Momento de Ser Llevadas a Campo.

6.7.1 Diámetro de las Plantas en Invernadero al Momento de Ser Llevadas a Campo.

El diámetro presentó diferencia significativa para ambas variedades ($p \leq 0.05$), donde TRIA $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ indicó un diámetro de 5.01 mm y con BR $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtuvo un diámetro de 5.07 mm los valores son altos para la corona de fresa de la variedad CP. Zamorana. El tratamiento de AIB presentó menor tamaño del diámetro con 3.48 mm, mientras que para la

variedad CP Jacona presenta el mayor diámetro para el tratamiento TRIA 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el tratamiento de TRIA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con 3.46 mm (Cuadro 29), observándose que las variedades respondieron de manera distinta a los diferentes tratamientos utilizados para el enraizamiento.

Cuadro29. Diámetro de las Coronas de Plantas que se Encontraban en Invernadero para ser Llevadas a Campo.

Tratamiento	Diámetro (mm)	
	CP. Zamorana	CP. Jacona
Testigo	3.76 \pm 1.03 ab	4.23 \pm 1.40 abc
AIB	3.48 \pm 0.52 b	4.47 \pm 2.12 abc
TRIA 2$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4.02 \pm 0.58 ab	5.20 \pm 2.78 a
TRIA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4.31 \pm 1.39 ab	3.46 \pm 0.98 c
TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.01 \pm 1.06 a	3.91 \pm 1.07 bc
BR 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	4.46 \pm 0.53 ab	4.78 \pm 2.14 ab
BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	5.07 \pm 1-03 a	3.91 \pm 1.10 bc
BR 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	3.77 \pm 0.85 ab	4.19 \pm 1.56 abc

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Las plantas que fueron llevadas a campo contaban con dos tiempos de permanencia en el invernadero, donde para ambas variedades se presentó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), las plantas que tenían mayor tiempo de permanencia en invernadero tuvieron mayor diámetro con 4.67 y 5.67 mm para CP Zamorana y CP. Jacona, respectivamente, teniendo menor diámetro las plantas que tenían menor permanencia en el invernadero (Cuadro 30). Resultados que son lógicos ya que al tener mayor tiempo en el invernadero las plantas ya tenían un período más largo de aclimatización, por lo que ya se encontraban fotosintéticamente activas, favoreciendo de esta manera la formación de reservas que contribuyeron al desarrollo de la corona.

Cuadro 30. Diámetro de Acuerdo a la Variedad y al tiempo que se Encontraban en Invernadero.

Tiempo en Invernadero (Meses)	Diámetro de la Corona (mm)	
	CP. Zamorana	CP. Jacona
2	3.79 ± 0.86 b	2.86 ± 0.47 b
4	4.67 ± 0.98 a	5.67 ± 1.25 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.7.2 Número de Hojas Presentes en la Plantas al Momento de Ser Llevadas a Campo.

No hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para ambas variedades en cuanto al número de hojas (Cuadro 31), obteniéndose resultados similares a los obtenidos por Sushan (1959), quien observó que en condiciones de invernadero en el híbrido de *Cattleya x Trimos* se tuvo una formación de 6 a 7 hojas en 12 meses y hasta 9 hojas a los 22 meses, estos resultados se obtuvieron en fresa para ambas variedades en plantas que tenían 2 y 4 meses de estar en condiciones de invernadero. En *Paulownia tomentosa* en un sustrato con turba y agrolita (3:1) al paso de un mes se presentaron valores de 7.88 hojas por planta (Sánchez, 2008 a). Para el caso de *Heliconias* la mayor cantidad de hojas se obtuvo cuando se plantaron en la mezcla de turba-perlita a los 75 ddt para *H. collinsiana* tuvo 6.3 hojas, *H. nickeriensis* produjo 4.3 hojas y la variedad Golden Torch tuvo 5.1 hojas (Hernández, 2013), valores por debajo de los obtenidos en la presente investigación. Muchas hojas de especies vegetales formadas *in vitro* no son capaces de seguir creciendo en condiciones *ex vitro* por lo que son reemplazadas por nuevas hojas (Preece y Sutter, 1991; Dietrich *et al.*, 1992; citados por Pospisilova *et al.*, 1999). Sánchez (2008 a), observó en *Paulownia tomentosa* 2 y 3 hojas al momento de ser traspasadas a condiciones *ex vitro*, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación donde se tiene un promedio de 7 a 9 hojas para las plantas que son traspasadas a condiciones *ex vitro*. En caña de azúcar se tiene a los 35 y 42 días un número de hojas de 6.2 y 8.0 respectivamente (Peñate *et al.*, 2007) y para plantas de yuca se obtuvieron 7.58 hojas e inoculadas las plantas con *Glomus manihotis* 23.67 hojas (Calderón *et al.*, 2000).

Cuadro31. Número de Hojas Presentes en las Plantas de Fresa Listas para ser Llevadas a Campo.

Tratamiento	Número de Hojas	
	CP. Zamorana	CP. Jacona
Testigo	7.76 ± 0.08 a	9.33 ± 2.25 a
AIB	7.99 ± 0.01 a	9.50 ± 1.76 a
TRIA 2µg·L ⁻¹	9.48 ± 0.01 a	10.33 ± 0.51 a
TRIA 5 µg·L ⁻¹	8.15 ± 0.02 a	9.66 ± 1.63 a
TRIA 10 µg·L ⁻¹	9.57 ± 0.11 a	9.16 ± 1.16 a
BR 0.1 mg·L ⁻¹	8.28 ± 0.06 a	9.16 ± 1.47 a
BR 0.01 mg·L ⁻¹	8.90 ± 0.11 a	8.83 ± 2.13 a
BR 0.001 mg·L ⁻¹	8.79 ± 0.26 a	9.00 ± 1.89 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Para la variedad CP. Zamorana no se encontró diferencia significativa para el tiempo de permanencia en el invernadero en comparación de la variedad CP. Jacona donde las plantas que tenían más tiempo en el invernadero presentaron más hojas con 10.1 hojas por planta y para los dos meses se tenían 8.6 hojas por planta (Cuadro 32).

Cuadro32. Número de Hojas por Variedad y Tiempo en Invernadero para ser Llevadas a Campo.

Tiempo en Invernadero (Meses)	Número de Hojas	
	CP. Zamorana	CP. Jacona
2	8.65 ± 0.10 a	8.62 ± 1.31 b
4	8.56 ± 0.06 a	10.12 ± 1.56 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.7.3 Número y Longitud de Raíces Adventicias en las Plantas de Fresa al Momento de ser Llevadas a Campo.

Las plantas contaban con un número de raíces muy similar por lo que no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para los diferentes tratamientos utilizados para el enraizamiento *in vitro*, ya que se encontraban bajo las mismas condiciones de invernadero (Cuadro 33), Boucherin y Bron (1994) citados por Fuentevilla (2004) señalan que las raíces nacidas en el medio de cultivo *in vitro* son extremadamente frágiles y al ser traspasadas a un sustrato mueren. Haciéndose necesario esperar a la formación y crecimiento de nuevas raíces para que la planta se nutra, por lo que al encontrarse en esta etapa bajo las mismas condiciones no se favoreció a ninguna de las plantas provenientes de cultivo *in vitro*, con ningún tratamiento adicional, formándose de esta manera las nuevas raíces por las reservas con las que contaban las plantas, son las raíces formadas *in vitro* la base para la formación de nuevas raíces adventicias. La variedad CP. Jacona no presentó diferencia significativa para ningún tratamiento en comparación de la variedad CP. Zamorana donde el tratamiento que presentó mayor longitud fue el TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con 17.04 cm donde el testigo fue el que menor longitud presentó con 11.17 cm. Para *Paulownia tomentosa* se encontró que tenía una longitud de raíz de 17.833 cm en un sustrato formado por tezontle, bagazo y suelo (2:1:1)

Cuadro33. Número de Raíces y Longitud de la Raíz más Grande por Variedad en Plantas de Fresa Propagadas *In Vitro* al Momento de ser Llevadas a Campo.

Tratamiento	Número de Raíces		Longitud de la Raíz más Grande (cm)	
	CP. Zamorana	CP. Jacona	CP. Zamorana	CP. Jacona
Testigo	9.18 \pm 0.17 a	11.50 \pm 2.58 a	11.17 \pm 2.30 c	12.72 \pm 3.92 a
AIB	10.89 \pm 0.13 a	11.50 \pm 2.07 a	12.50 \pm 1.01 bc	13.77 \pm 5.27 a
TRIA 2$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10.50 \pm 0.17 a	11.83 \pm 5.91 a	13.52 \pm 2.58 abc	13.04 \pm 4.39 a
TRIA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	9.56 \pm 0.14 a	11.83 \pm 2.48 a	12.93 \pm 2.64 bc	11.70 \pm 3.03 a
TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	13.16 \pm 0.19 a	10.00 \pm 2.00 a	17.04 \pm 3.71 a	13.64 \pm 2.31 a
BR 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	9.65 \pm 0.01 a	10.50 \pm 4.37 a	13.53 \pm 1.14 abc	12.62 \pm 3.76 a
BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	10.96 \pm 0.03 a	8.33 \pm 0.81 a	15.22 \pm 2.71 ab	12.31 \pm 3.30 a
BR 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	10.46 \pm 0.44 a	9.83 \pm 1.47 a	12.83 \pm 2.42 bc	14.83 \pm 3.92 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Las plantas presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los diferentes tiempos de permanencia en el invernadero, donde las plantas que tenían cuatro meses en el invernadero presentaron mayor número con 11.3 y 11.8 para CP Zamorana y CP. Jacona respectivamente, de igual manera se encontró que las longitudes de las raíces más largas de ambas variedades presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), donde la variedad CP Zamorana presentó una longitud de 14.62 cm a los cuatro meses de permanecer en el invernadero y la variedad CP. Jacona 16.05 (Cuadro 34).

Cuadro34. Número de Raíces y Longitud de la Raíz más Grande por Variedad y Tiempo en Invernadero al Momento de ser Llevadas a Campo

Tiempo en Invernadero (Meses)	Número de Raíces		Longitud de la Raíz más Grande (cm)	
	CP. Zamorana	CP. Jacona	CP. Zamorana	CP. Jacona
2	9.71 ± 0.12 b	9.45 ± 2.08 b	12.57 ± 2.32 b	10.11 ± 2.16 b
4	11.35 ± 0.19 a	11.87 ± 3.51 a	14.62 ± 2.97 a	16.05 ± 2.05 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.7.4 Peso Fresco y Seco de las Plantas Llevadas a Campo

6.7.4.1 *Peso Fresco y Seco de la Raíz*

En el Cuadro 35 se pueden observar los valores del peso fresco de la raíz para la variedad CP. Jacona, la cual mostró valores uniformes para todos los tratamientos utilizados en comparación de la variedad CP. Zamorana donde se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), los tratamientos de TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, teniendo un comportamiento similar para el peso seco de la raíz donde ambas variedades presentaron comportamientos esperados para esta variable donde la variedad CP. Zamorana presentó el peso más alto para el tratamiento de TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y para la variedad CP. Jacona el testigo fue el que presentó el mayor peso con 0.40 g (Cuadro 35). Para el caso de Yuca a los 70 ddt se tiene un peso seco del sistema radical de 0.09 ± 0.01 g (Calderón *et al.*, 2000), valores que son superados por los obtenidos en la presente investigación, como se puede observar los valores de la variedad CP.

Jacona son más similares, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el número de raíces y longitud de la raíz, en comparación de la variedad CP. Zamora, la cual presentó un número similar de raíz pero diferente longitud de ellas, lo que hace que los pesos frescos y secos de ellas sean diferentes entre sí, lo cual se le puede atribuir al efecto que presentaron los diferentes reguladores de crecimiento en la formación de las raíces adventicias de primer orden, para el caso de *A. thaliana* con TRIA (0.3 μM), al paso de 21 días de germinadas las semillas el peso fresco de la raíz fue de 91.2 mg (Ya y Chiang, 2002) y para Minirosa se encontró que aumentando la concentración de sales del medio MS y de AIB, se tienen mayor peso seco de las raíces al paso de 60 días con un peso de 1.2 g al 100% de las sales del MS y una concentración de 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en comparación de 0.6 g en la misma concentración de sales del MS, pero sin la adición de AIB y para una concentración del medio del 50 % se tienen valores de 0.8 g para 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y para el tratamiento sin AIB se tienen pesos de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nogueira *et al.*, 2014).

Cuadro35. Peso Fresco y Seco de la Raíz por Variedad al Momento de Ser Llevadas a Campo.

Tratamientos	Peso Fresco de la Raíz (g)		Peso Seco de la Raíz (g)	
	CP. Zamorana	CP. Jacona	CP. Zamorana	CP. Jacona
Testigo	0.69 \pm 0.42 c	1.24 \pm 1.05 a	0.14 \pm 0.02 bcd	0.40 \pm 0.35 a
AIB	0.70 \pm 0.37 c	1.09 \pm 0.89 a	0.08 \pm 0.02 d	0.34 \pm 0.25 ab
TRIA 2$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.08 \pm 0.45 bc	1.16 \pm 1.01 a	0.17 \pm 0.02 abcd	0.33 \pm 0.25 ab
TRIA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.65 \pm 0.34 c	0.75 \pm 0.63 a	0.13 \pm 0.02 cd	0.19 \pm 0.15 b
TRIA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.74 \pm 0.62 a	0.80 \pm 0.50 a	0.39 \pm 0.04 a	0.22 \pm 0.16 b
BR 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.27 \pm 0.28 ab	0.97 \pm 0.84 a	0.29 \pm 0.01 abc	0.28 \pm 0.21 ab
BR 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.72 \pm 0.69 a	0.82 \pm 0.50 a	0.34 \pm 0.03 ab	0.22 \pm 0.18 b
BR 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.79 \pm 0.21 bc	0.93 \pm 0.76 a	0.24 \pm 0.03 abcd	0.28 \pm 0.22 ab

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

De igual manera las plantas que tenían cuatro meses en el invernadero presentan mayor peso en comparación de las plantas que tenían 2 meses (Cuadro 36), como ya fue mencionado anteriormente las plantas con más tiempo en el invernadero desarrollaron más su sistema radicular favoreciendo así mayor peso fresco y seco de la raíz.

Cuadro36. Comparación por Variedades y Tiempo de Estar en invernadero para Peso Fresco y Seco de la Raíz al momento de ser Llevadas a Campo.

Tiempo en Invernadero (Meses)	Peso Fresco de la Raíz (g)		Peso Seco de la Raíz (g)	
	Zamorana	Jacona	Zamorana	Jacona
2	0.81 ± 0.48 b	0.31 ± 0.16 b	0.12 ± 0.01 b	0.09 ± 0.06 b
4	1.35 ± 0.59 a	1.63 ± 0.48 a	0.33 ± 0.02 a	0.47 ± 0.16 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.7.4.2 Peso Fresco y Seco de la Parte Aérea

El peso fresco de la parte aérea de las plantas de fresa que se encontraban listas para ser transferidas a campo para la variedad CP. Jacona se encontraron diferencias significativas, donde el testigo fue el que presentó mayor peso para la parte aérea y para la variedad CP. Zamorana el TRIA $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ presentando mayor peso para la parte aérea, teniéndose resultados de peso seco para la variedad CP. Zamorana uniformes, no encontrándose diferencia significativa y para la variedad CP. Jacona el BR 0.001 presentó mayor peso seco de la parte aérea (Cuadro 37). En yuca se presentó un peso seco de la parte aérea de 0.46 ± 0.06 g (Calderón *et al.*, 2000), los cuales son superiores a los presentados en las plantas de fresa, al igual que en el peso fresco y seco de la raíz para la parte aérea la variedad CP. Zamorana, presenta valores distintos donde el TRIA $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, el BR 0.1 y 0.01, son los que tienen mayor cantidad de agua en el tejido de la planta presentando los valores más altos para el peso fresco, Arellano (1994), encontró en brotes de vid con una concentración de calcio de 2.5 mM un peso fresco y seco de 418 y 54 mg respectivamente, para el caso de Minirosa el peso seco de las plantas a los 80 días en una concentración de 0.01, 0.1, 1.0 y $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presento un peso constante de 0.3 g (Nogueira *et al.*, 2014). En *Salvia officinales* la aplicación de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de TRIA, incrementa el peso fresco de los brotes en un 20-25% (Naeem *et al.*, 2012). Peñate *et al.* (2007) reportaron pesos de 7.07 y 8.71g en plantas de caña a los 53 y 42 días y pesos secos de 0.73 y 0.81 g, respectivamente. Para plantas hijas de fresa en vivero ubicado en Zirahuén, Michoacán se obtuvieron pesos frescos de 16.64, 16.04, 20.97 y 23.51 g, para las variedades CP Zamorana, CP Jacona, Festival y Albion y para las mismas variedades pero para el vivero de Tanaquillo, Michoacán se tienen 11.52, 6.01,

14.23 y 14.49 g respectivamente y en pesos secos para el vivero de Zirahuén se tienen pesos de 4.74, 5.28, 5.49 y 5.98 g y en el caso del vivero de Tanaquillo los valores fueron de 2.95, 1.62, 3.33 y 3.62 g respectivamente para las variedades antes mencionadas (Rodríguez *et al.*, 2012), valores muy altos comparados con los obtenidos en las plantas propagadas a través del cultivo *in vitro*, ya que los pesos de estas plantas es de planta adulta y que se encuentra en producción.

Cuadro37. Peso Fresco y Seco de la Parte Aérea de la Planta de Fresa por Variedad al Momento de Ser Llevadas a Campo

Tratamientos	Peso Fresco de la Parte Aérea (g)		Peso Seco de la Parte Aérea (g)	
	CP. Zamorana	CP. Jacona	CP. Zamorana	CP. Jacona
Testigo	0.86 ± 0.27 d	1.70 ± 1.26 a	0.09 ± 0.12 a	0.16 ± 0.04 ab
AIB	1.00 ± 0.40 bcd	1.44 ± 1.03 ab	0.11 ± 0.12 a	0.15 ± 0.03 ab
TRIA 2µg·L⁻¹	1.05 ± 0.27 bcd	1.54 ± 0.94 ab	0.09 ± 0.10 a	0.17 ± 0.04 ab
TRIA 5 µg·L⁻¹	0.92 ± 0.35 cd	1.01 ± 0.65 b	0.08 ± 0.09 a	0.12 ± 0.01 ab
TRIA 10 µg·L⁻¹	1.95 ± 0.86 a	1.27 ± 0.58 ab	0.18 ± 0.10 a	0.12 ± 0.02 ab
BR 0.1 mg·L⁻¹	1.54 ± 0.38 ab	1.30 ± 0.94 ab	0.09 ± 0.09 a	0.12 ± 0.02 ab
BR 0.01 mg·L⁻¹	1.50 ± 0.73 abc	1.23 ± 0.69 ab	0.18 ± 0.15 a	0.07 ± 0.01 b
BR 0.001 mg·L⁻¹	0.7267 ± 0.22 d	1.33 ± 0.89 ab	0.07 ± 0.05 a	0.23 ± 0.03 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Para la comparación de los tiempos en invernadero de las plantas, se encontró que las plantas que tenían cuatro meses en invernadero presentaron mayores pesos frescos y secos para la parte aérea igual que para la raíz (Cuadro 38), argumentando de igual manera que para la parte de la raíz que las plantas con mayor tiempo en el invernadero tuvieron mayor tiempo para la formación de su parte aérea, presentando hojas, tallos más grandes que las que tenían menor tiempo.

Cuadro38. Peso Fresco y Seco de la Parte Aérea por Variedad y Tiempo de Estar en Invernadero al Momento de Ser Llevadas a Campo.

Tiempo en Invernadero (Meses)	Peso Fresco de la Parte Aérea (g)		Peso Seco de la Parte Aérea (g)	
	Zamorana	Jacona	Zamorana	Jacona
2	0.94 ± 0.34 b	0.60 ± 0.20 b	0.07 ± 0.08 b	0.07 ± 0.01 b
4	1.45 ± 0.70 a	2.10 ± 0.52 a	0.17 ± 0.12 a	0.23 ± 0.01 a

Los valores son medias de 48 explantes por cada variedad. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

6.7.5 Comportamiento de las CAT y los Carbohidratos en las Plantas Llevadas a Campo.

La fluctuación de los carbohidratos en las plantas llevadas a campo muestran comportamientos diferentes entre las dos variedades, para la variedad CP. Jacona se observa una tendencia a disminuir en el día cero se encontró un contenido de carbohidratos de $0.180 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de pf, al día uno el contenido aumentó y a partir de ese momento el contenido de carbohidratos empezó a disminuir, encontrándose en el día 15 valores por la mitad de los encontrados al día cero. Para la variedad CP. Zamorana empezó en el día cero con $0.152 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de pf, para el día cinco el contenido incremento drásticamente al doble del encontrado en el día cero, para el día 10 el contenido disminuyó a los valores iniciales, empezando a aumentar para el día 15, el contenido aumento alrededor de 1/3 (Figura 18).

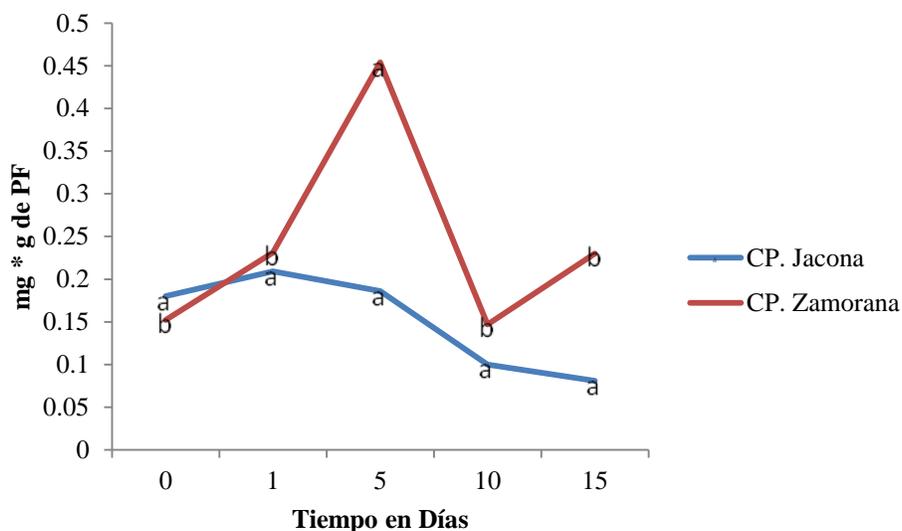


Figura18. Fluctuación de los Carbohidratos en la Fase de Aclimatización a campo de Dos Variedades de Fresa Mexicanas, cada punto en la gráfica son medias de 3 repeticiones, con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Las plantas que fueron llevadas a campo mostraron un comportamiento similar para ambas variedades, iniciando con 6 unidades aproximadamente, disminuyendo hasta el día 10 cerca de la mitad de la actividad de las enzimas, empezando desde ese momento a aumentar la actividad de las CAT, encontrándose los valores más altos en este momento cerca del doble al encontrado en un inicio (Figura 19). Comportamiento que es similar en *Abrus precatorius* (Perveen *et al.*, 2013), *Cardiospermum halicacabum* (Jahan *et al.*, 2014), *Tylophora indica* (Faisal y Anis, 2010) y *Tecomella undulata* (Varshney y Anis, 2011), donde la actividad de la CAT en el proceso de aclimatación durante los primeros 49 días, sugiere una sobre regulación de los mecanismos de protección en contra del estrés oxidativo (Perveen *et al.*, 2013).

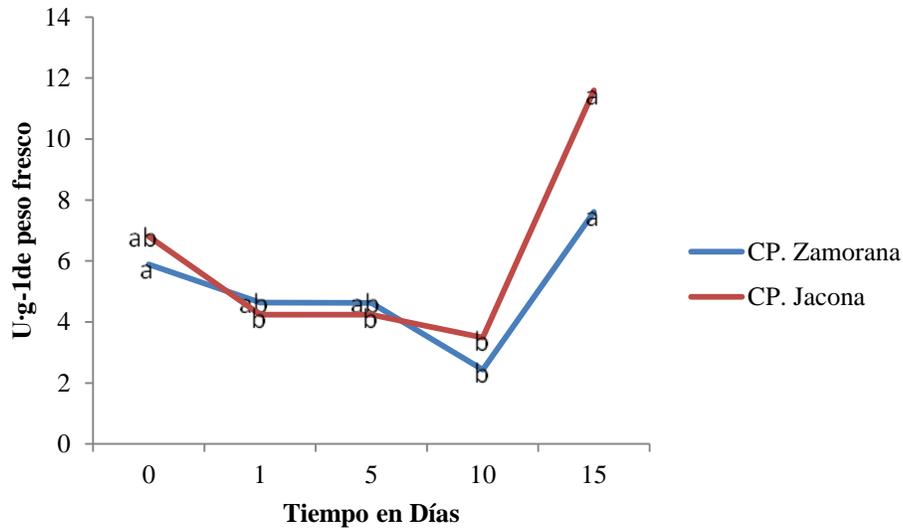


Figura19. Fluctuación de la actividad de la Catalasa en la fase de aclimatización a campo de dos variedades de fresa mexicanas, cada punto en la gráfica son medias de 15 lecturas con 3 repeticiones cada una, con una prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Las plantas de fresa propagadas en cultivo *in vitro* tienen un buen desarrollo en el campo como se muestra en la Figura 20 las plantas tienen un buen aspecto, mostrando gran capacidad de generación de estolones (Figura 20 A), así como de producción (Figura 20 B) donde se puede apreciar un fruto de buen tamaño.



Figura20. Plantas de Fresa en Campo, Provenientes de Cultivo *in vitro*. A) Planta de Fresa con Estolones, B) Planta en Producción.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ La cinética de enraizamiento de ambas variedades fue diferente, encontrando que para la variedad CP. Zamorana el regulador que acortó el tiempo de aparición de raíces fue el TRIA $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que para la variedad CP. Jacona fue el BR $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Con estos resultados se logró reducir 15 días la permanencia de las plantas en el cuarto de incubación.
- ❖ El uso de BR a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, permitió obtener mayor número de raíces de primer y segundo orden, seguido por el TRIA con 2 y $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que aumentó además la longitud.
- ❖ Se logró con el Radix[®] 1500 un adecuado enraizamiento *in vivo* con el mayor número de raíces adventicias de primer, segundo y tercer orden.
- ❖ Con el enraizamiento *in vitro* se favoreció positivamente la aclimatización de las plantas, obteniéndose mayores porcentajes de sobrevivencia.
- ❖ La mezcla a base de Peat Moss favoreció el proceso de la aclimatización bajo las condiciones ambientales probadas.
- ❖ La actividad de la CAT es antagónica a la fluctuación de los carbohidratos durante la aclimatización, teniendo como punto principal que se debe de tener un especial cuidado durante los primeros cinco días del proceso.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abdelnour, E.A. y Vicent E. J. 1993.** Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Apuntes del curso de Micropropagación vegetal de especies Tropicales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba, Costa Rica. 25 p.
- Abbott, J. A. and Harker, R.F. 2004.** Texture. In “The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks”. Agriculture Handbook, 66, USDA, ARS.
- Adams, G. 1998.** Recent progress in chemistry, biochemistry and application of brassinosteroids. Institute of Plant Biochemistry. Halle, Alemania. York meeting: brassinosteroids and gibberellins. Extraído el 26 de Junio de 2014 de http://192.129.24.144/licensed_materials/00898/free/meeting/york98/p08.pdf
- Aebi, M. 1984.** Catalase *In Vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121-126.
- Alarcón, A.L. 2006.** Diagnóstico y Manejo Nutricional en Cultivos sin Suelo. En: Alarcón, V.A.L. (Coor.). Compendio de Horticultura N0.17: Cultivos sin Suelo. Ediciones de Horticultura, S.L. 69-82 pp.
- Alarcón, A.L. y M. Urrestarazu. 2006.** Cultivo en Coco. En: Alarcón, V.A.L. (Coor.). Compendio de Horticultura No. 17: Cultivos sin Suelo. Ediciones de Horticultura, S.L. 117-130 pp.
- Alemán, S. 2000.** Propagación vegetativa (cap. 4). Extraído el 28 de Junio de 2014, del sitio web de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Cuba: <http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTEGNOLOGIA/silvia2/Paginas%20de%20la%20portada%20tema%20IV.htm>.
- Altman, A. and Loberant, B. 1998.** Micropropagation: clonal plant propagation *In vitro*. En: Agricultural Biotechnology. Arie Altman Ed. Marcel Dekker, New York, U.S.A. Chapter 2: 19-40.
- Amancio S., Rebordao J.P. and Chaves M.M. 1999.** Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 58:31-37.
- Aparicio R, A., E.O. Ramírez G. y H. Cruz J. 2006.** Multiplicación clonal de *Pinus jaliscana* Pérez de la Rosa a través del establecimiento y manejo de setos para la producción de estacas. Foresta Veracruzana 8(1):17-22.
- Arellano O., G. 1994.** Absorción de Calcio Durante la Proliferación *In Vitro* de Vid cv. Málaga Blanca. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. De México. 91p.

- Arellano O., G. 2004.** Aspectos Bioquímico y Moleculares del Enraizamiento *In Vitro* de Brotes con Características Juveniles y Adultas de *Quercus robur* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela Escuela Politécnica Superior, Departamento de producción Vegetal. Santiago de Compostela. 250 p.
- Arellano O., G y González B., S. 1985.** Efecto del Recipiente, Intensidad de Luz y Microambiente en el Establecimiento a Suelo de *Fragaria x ananassa* Duch. Y *Prunus cerasifera* obtenidas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Cuautitlan Izcalli, Edo. De México, 122 p.
- Arellano O, G., S. González B. y G. Arellano H. 2014.** El Lináloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), Especie Maderable Amenazada: Una Estrategia Para su Conservación. *Agroproductividad* 7(3): 42-51p.
- ASERCA.1998.** De nuestra cosecha. Fresa. La producción en México y la generación de divisas. *Claridades Agropecuarias*. 55: 3-14.
- Aspuria, J. R., Y. Fujime., and N. Okuda. 1996.** Strawberry and other small fruits for the highlands of the Philippines. *Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ.* 48:1-6.
- Ayesha R., Fátima, N., Ruqayya, M., Faheem, H., Mahmood, K., Ahmad, L., Saifullah, K., Ali, U. and Kamal A. 2011.** Influence of different growth media on the fruit quality and reproductive growth parameters of strawberry (*Fragaria ananassa*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (26): 6224 – 6232.
- Azcon- Bieto, J. y M, Talon. 2001.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc. Graw-Hill Interamericana. España 522 p.
- Barrera C., G. y B. C. Sánchez. 2003.** Caracterización de la cadena agroalimentaria/agroindustrial nacional, identificación de sus demandas tecnológicas: Fresa. *In: Programa Nacional Estratégico de Necesidades de Investigación y de Transferencia de Tecnología. Fundación Produce Michoacán.* Pp.1-34
- Baldini, E. 1992.** Arboricultura general. Primera edición. Madrid, Mundi-Prensa. 379p.
- Benton ,J.J. 2005.** Hydroponics a practical guide for the soilless grower. 2nd. Ed. CRC. PRESS, Boca Raton, Florida, USA. 409 p.
- Bielenin, M.2003.**Rooting and gas exchange of conifer cuttings treated with indolebutyric acid. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*.11:99-105.
- Bonet - Gigante, J. 2010.** Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en *Fragaria* diploide para la mejora del cultivo de la fresa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona, España.

- Boutherin, D. y Bron G. 1994.** Multiplicación de plantas hortícolas. Primera edición. Zaragoza, Acribia. 225p.
- Brainerd, D. y Bron , G. 1994.** Multiplicación de plantas horícolas. Zaragoza Acribia. 225p.
- Branzanti E.C.1989.** La Fresa. Ediciones Mundi-Prensa. España. 386p.
- Brouquisse, R., F. James, A. Pradet, and P. Raymond. 1992.** Asparagines metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta* 188: 384-395 pp.
- Calderón B, X., F. Pérez y A. Rotella. 1993.** Micropropagación de una Especie Chilena en Peligro de Extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (*Magnoliopsidae*, Gomortegaceae). *Bosque* (Chile), Vol 14 (1):23-28.
- Calderón, L.D., Gómez, L., Blanco, F y Uribe L. 2000.** La Inoculación con *Glomus manihotis* Sobre el Crecimiento y Desarrollo de Plantas de Yuca Producidas *In Vitro*, en la Fase de Aclimatización. *Agronomía Costarricense* 24(2); 25-29.
- Calderón, Z. G., J. Rodríguez A., O. Carrillo M., M. Lara Ch. y R. Vega del R. 2009.** 'CP Zamorana' y 'CP Jacona', dos nuevas variedades de fresa para el subtrópico. 55 Reunión Anual de la Sociedad Interamericana para la Horticultura Tropical. Barquisimeto, Venezuela. 12-16 Oct.9p.
- Carrillo M, O., J. Rodríguez A., R. Cano M. y A. López J. 2005.** Aplicación Foliar de Urea y Sacarosa y Su Efecto en el Acondicionamiento de Plana de Vivero y Producción de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) 'CP 99-3A'. *Agrociencia*. 39(2):195-204.
- Castillo A. 2004.** Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA.Las Brujas. Extraído el 1 de junio de 2014. http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad_382.pdf.
- Chee, R. and Pool, R.M. 1982.** The effects of growth substances and photoperiohort. 16: 17-27.d on the development of shoot apices of *Vitis* cultures *in vitro*. *Scientia*
- CONAFRE. 2011.** Plan rector nacional. 43 pp. [En línea]. [http://conafresa.com/index.php?option=com_content&task=view\(id=16\(ltemid=32](http://conafresa.com/index.php?option=com_content&task=view(id=16(ltemid=32). [Consulta: 1 de Mayo de 2014].
- Cordenunsi, B. R., Do Nascimento, O.J.R., Genovese, M. I., and Lajolo, F. M. 2002.** Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of Strawberry fruits grown in Brazil. *J. of Agric. and Fodd Chem.*, 50, 2581-2586 pp.
- Couprie I, N Ollat, J.P. Tandonnet, C. Poizat, y J.P. Doazan. 2000.** Concentração de sacarose no enraizamento *In Vitro* de morangueiro. *Hort.Brasil*. 20:186-191.

- Czekalski, M. 1989.** The influence of auxins on the rooting of cuttings of *Bougainvillea glabra* Choisy. Acta Horticulturae 251:345-352.
- Dávalos-González, P.A. 2003.** Strawberry production in México. Pp.223-226. *In*: Childers, N.F. (Ed.). The strawberry. A Book for growers, Others. Dr. Norman F. Childers Publications. Florida, USA. 246 p.
- Darrow G. M. 1966.**The strawberry. The new England institute for medical research. United states of America. 435 p.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breuseguem, F. 2000.** Dual actions of the active oxygen species during plant stress responses. Cell mol life Sci. Vol. 57: 779-795 pp.
- Debergh, P.C. and Zimmerman R.H. 1991.** Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. U.S.A.479 p.
- De Paula, M.M.1994.** Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de Girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Peredovik) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de bioquímica y biología molecular II. Madrid, España.
- Del Río, L.A., Sandalio, L-M., Palma, J.M., Bueno, P. and Corpas, F.J. 1992.** Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and celular implications. Free Rad Biol. Med. 13:557-580 pp.
- Dutra, L., Schwengber, J., Tonietto, A. y Kersten, E. 1999.**Enraizamiento de estacas de ramos de Pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch). Agrociencia 5(2): 93-95.
- Enríquez del V, J.R., Carrillo C, G., Sánchez G, P., Rodríguez M, M.N. y Medoza C. M.C. 2001.** Efectos de los Ácidos Acetilsalicílico e Indolbutírico en el Enraizamiento *In Vitro* y Rendimiento de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).Fitotecnia Mexicana 24(1):71-78.
- Faisal M. y M. Anis. 2010.**Effect of lighth irradiations on photosynthetic machinery and antioxidative enzymes during ex vitro acclimatization of *Tylophora indica* plantlets. Journal of Plant Interactions 5(1): 21-27.
- FAOSTAT. 2012.**Organización de las Naciones Unidas Redes de innovación... 60 para la Agricultura y la Alimentación. Comercio. [http:// faostat.fao.org/site/345/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx); 15 de febrero de 2014.
- Feierabend, J., Schaan, C. and Hertwing, B. 1992.** Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. Plant Physiol 100: 1554-1561 pp.

- Fila, G., Ghashghaie J., Hoarau J. and Cornic G. 1998.** Photosynthesis, leaf, conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiologia Plantarum* 102 (3): 411-418.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005.** Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28: 1056-1071 pp.
- Fraternale D., Giamperi L., Ricci D. and Rocchi M.B.L. 2002.** Micropropagation of *Bupleurum fruticosum* : The effect of triacontanol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:135-140 pp.
- Fuentevilla, C. 2004.** Propagación *in vitro* en algunas especies de *Leucocoryne*. Facultad de Agronomía. Área de Hortalizas y Flores. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso de Chile. Quillota, Chile. 71 p.
- Fujiwara, K., Kozai T. y Watanabe I. 1990.** Fundamental studies on environments plant tissue culture vessels. Measurements of carbon dioxide concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. In: Collected papers studies on the effects of physical environment in the tissue culture vessels on the growth of plantlets *In Vitro*. Chiba (Japan), Chiba University. Pp. 38-46.
- Gantait, S., Mandal, N. y Das, P. 2009.** Impact of auxins and activated charcoal on *in vitro* rooting of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Cv. Golden Boy.
- García, A. 2005.** Metodología para la Evaluación de Sistemas de Manejo Incorporando Indicadores de Sustentabilidad. Revista CEPAL, Valparaíso-Chile. Pp 15-16.
- García, R., J. Vargas H., V. Cetina A. y A. Villegas. 2005.** Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizamiento de *Gmelina arborea*. Revista Fitotecnología 20:319-326.
- García, M., Hernández, R., Bustios, S., Esteves, M., Echevarria, Y., Cruz, R., Leon, L. y Del Busto, A. 2007.** Algunas experiencias en la utilización del *Aloe vera* L. en la preparación de medios de cultivo. Departamento de Biología y Departamento Agropecuario de la Universidad de Pinal del Río, Cuba. 28 p.
- Gravina, A., Major G. y Piestund D. 1995.** Introducción al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Primera edición. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica. 33p.
- Gribaudo, I., Novello, V. and Restagno, M. 2001.** Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. Nebbiolo). *Vitis*. 40 (3): 137 – 140.

- Grout, B.W.W. and Price F. 1987.** The establishment of photosynthetic independence of strawberry cultures prior to transplanting. In *Plant Micropropagation in Horticultural Industries: Preparation, Hardening and Acclimatization Process* (eds Ducate, G., Jacobs, M. and Simeon, A.), Belgium Plant Tissue Culture Group, Presses Universitaires, Liege, pp. 55-60.
- Gutiérrez-Castorena, M.C., Escobar H., Ortiz S., Anicua S. y Hernández L. 2011.** Relación Porosidad.Retención de Humedad en Mezclas de Sustratos y su Efecto sobre Variables Respuesta en Plántulas de Lechuga. *Revista Chapingo.Serie Horticultura* 17:183-196.
- Hancock, J. F. 1999.** Strawberries. Cabl Publishing. New york, USA.237p.
- Hartmann, H. y Kester D. 1995.** Propagación de plantas. Cuarta edición. México, C.E.C.S.A. 760p.
- Hartmann, H., Kester D.E., Davies F.T. and Geneve R. 2002.** Plant propagation principles and practices. 6^a ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, U.S.A. 747 p.
- Héctor, E., Torres, A., Algoe, S., Cabañas, M. y López, A. 2007.** Propagación *In Vitro* del Plátano Macho (*Mussa* sp. AAB)Clón Sobrino con los Bioestimuladores Cubanos BB-6 y Biostan Como Sustitutos de los Reguladores del Crecimiento. *Cultivos Tropicales*, 28(1):13-18.
- Hernández M, E. 2013.** Embriogénesis Somática *In Vitro* y Aclimatación de Plántulas Obtenidas por Organogénesis Directa en *Heliconia* spp. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. 139p.
- Hernández, M.M., Moré, M. y Nuñez, M. 1999.** Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*. 20(4): 41-44.
- Huaxian, Y., Cuihua, G., and Chianli, Z. 2006.**The Role of Triacotane in Adventitious Root Induction of Rape Explant. Department of Biology, Sichuan University, Chengdu, Chengdu Seventh Middle School.
- Hurtado, M. y M. E. Merino. 1991**Cultivo de tejidos vegetales. México, Editorial Trillas, 256 p.
- Igamberdlev A.U and Lea P.J. 2002.** The role of peroxisomas in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism.*Phytochemistry*. 60 : 651-674.
- INFOAGRO (Información Agrícola, ES). 2010.** Cultivo de Tomate (en línea). España, Editorial Agrícola Española, S.A. Consultado 22 octubre 2014.

- Izquiero, H., Disotuar, R. and Quiones. 2001.** Effectiveness of different chemical agents in the disinfection of *Allium sativum* L. to its *in vitro* implantation. Efectividad de diferentes agentes químicos en la desinfección de (*Allium sativum* L.) para su implementación *in vitro*; La Habana (Cuba).
- Jahan, A.A., M. Anis. and I. M. Aref. 2014.** Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. differentiated from hypocotyls in *in vivo* and *ex vitro* environment. *Biotechnology Reports* 4: 66-72,
- Jordán M, C.J. 2006.** Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocinas. In C. Saqueo. F.A., *Fisiología Vegetal* (p.28). La Serena: Ediciones Universidad de la Serena.
- Kaedleček, P., Ticha, I., Haisel, d., Capková, V., and Schafer, C. 2001.** Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161:695-701.
- Karpov, P. 2004.** Clonal Propagation of *Yucca aloifolia* L. *Acta Univeritatis Latviensis, Biology.* 676:177-182.
- Kirschbaum, D.S. and J.F. Hancock. 2000.** The Strawberry Industry in South America. *HortScience.* 35 (5) : 807 – 811.
- Kozai, T. 1990.** High technology in protected cultivation. In. *Collected papers studies on the effects of physical environment in the tissue cultura vessels on the growth of plantlets in vitro.* Chiba (Japan), Chiba University. Pp. 57-65.
- Krikorian, A. 1991.** Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. y Mroginski, L. (Ed). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* CIAT, Cali, p 95-125.
- Kuk, Y.I., Shin, J.S., Burgos, N.R., Hwang, T.E., Han O., Cho, B.H.- Jung, S. and Guh, J.O. 2003.** Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science.* Vol. 43: 2109-2117.
- Larson, D. K. 2000.** Comportamiento y Manejo de la Fresa: Desarrollo de Programas para Máxima Calidad y Rendimiento en México. In: *Memoria del Simposio Internacional de Fresa.* J. Z. Castellanos y F. Guerra O. Hart. (Editores). Zamora, Michoacán, México
- Larson, K. D., and D. V. Shaw. 2000.** Soil fumigation and runner plant production: A synthesis of four years of strawberry nursery field trials. *Scientia Horticulture.* 35:642-646.
- López, P.C. 1990.** Medios de Cultivo. En: *Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales.* (Cadmó H.R. y Villalobos A.V.M., Eds.) FAO. Roma. Pp. 15-19.

- López G., P.E. e Inoue, K. 2001.** Obtención y Multiplicación de lantitas de Fresa Libres de Virus. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Zacatepec, Morelos, México.
- López P, L., R. Cárdenas N., P. Lobit., O. Martínez C. y O. Escalante L., 2005.** Selección de un Sustrato para el Crecimiento de Fresa en Hidroponía. Rev. Fitotecnia Mexicana. Vol.28 (2):171-174.
- Loscos, J. 2007.** Metabolismo de ascorbato y tioles en leguminosas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Departamento de Nutrición Vegetal. Estación experimental de Aula Dei. Zaragoza, España.
- Malabadi R.B., G.S. Mulgund and K. Nataraja. 2005.** Effect of triacontanol on the micropropagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. using rhizome thin sections. *in vitro* Cellular and Developmental Biology 41:29-132.
- Marín, I., Roustan. I. 2000.** Purificación y determinación de actividad enzimática de la catalasa en *Staphylococcus aureus*. Encuentro año XXXII, Vol. 52: 56.64 p.
- Maroto, J.V., B. Pascual, J. Alargarda, y S. López Galarza. 1986.** Mejora de la precocidad del cultivo de fresón (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv Pájaro) mediante aplicaciones invernales de ácido giberélico. ITEA 63:36 – 38.
- Martínez-Bolaños M., D. Nieto. Ángel, D. Téllez-Ortiz, J. Rodríguez-Alcanzar, Ma. T. Martínez-Damián, H. Vaquera-Huerta, y O. Carrillo-Mendoza. 2008.** Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x anannassa* Duch.) de cultivares Mexicanos y Estadounidenses. Revista Chapingo Serie Horticultura. Vol. XIV (2): 113-119.
- Martínez M, O.M., Pastelín S, M.C., Ventura Z, E., Castañeda C, O., González A, M.T., Guevara V, M., Luna G, A. y Díaz R, C. 2011.** Alargamiento y Enraizamiento de Vitroplantas de Cereza del Perú (*Physalis peruviana* L.). Tropical and Subtropical Agroecosystems. 13: 537-542.
- Martínez R, R., H.S. Azpíroz R., J.L. Rodríguez O., V.M. Cetina A. y M.A. Gutiérrez E. 2005.** Aclimatación de Plantas Obtenidas *In Vitro* de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden. Ra Ximhai 1(3): 591-597.
- Marquardt, V. and Adam G. 1991.** Recent advances in brassinosteroids research. In : Chem. Plant Prot-Berlin, Spring Verlag. P. 103-139.
- Mitrovic A., D. Janošević., S. Budimir and J. Bogdanovic P. 2012.** Changes in antioxidative enzymes activities during *Tacitus bellus* direct shoot organogenesis. Biologia Plantarum 56(2):357-361.

- Mittler, R. 2002.** Oxidative Stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. Vol. 7 :405-410 pp.
- Morales, G. 1992.** Antecedentes de aclimatación de las plantas propagandas *in vitro* y proposición de un sistema comercial para clavel. Taller de Licenciatura. Lic. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. 83 p.
- Moré O., Hernández M., Nuñez M., Estévez A., y González M. 2001.** Empleo de dos Análogos de Brasinoesteroides en la Formación de Callos Embriogénicos en Papa (*Solanum tuberosum* L.), Cultivos Tropicales, vol. 22, no 4, p. 29-35.
- Moreno – Álvarez, J.M. 2002.** La materia Orgánica y la Capacidad de Retención de Humedad en Sustratos. Agric. Orgán.1:23-25.
- Montoliu, A. 2010.** Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. Universitat Jaume I. Departament de Ciències Agràries I del Medi Natural. Castellón de la Plana, España.
- Murashige, T. and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Naeem M., Masroor M., Khan A. and Moinuddin. 2012.** Triacetonol: a potent plant growth regulator in agriculture. Journal of Plant Interactions. Vol.7(2):129-142.
- Navarrete L, M y J. Vargas H. 2005.** Propagación asexual de clones de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH, utilizando raíz en diferentes concentraciones. Revistas Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Medio Ambiente. XI (002):111-116
- Naya, L. 2007.** Respuesta fisiológica, bioquímica y molecular de las leguminosas a estreses abióticos. Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC). Departamento de Nutrición Vegetal. Estación experimental de Aula Dei. Zaragoza, España.
- Neil, A., Israel Z. and Richard B. 1987.** Effects of CO₂ and O₂ on photosynthesis and growth of autotrophic tobacco callus. Plant. Physiology. 84; 1055-1058.
- Nogueira D. J.D., Leite A. J., Bosco de O. A. y Ronaldo V. F. 2014.** Multiplicação e enraizamento *in vitro* de Minirosa. Revista Ciência Agronômica. Col.45(1): 68-73.
- Nuñez, M. y Robalna C. 2000.** Brasinoesteroides. Nuevos Reguladores del Crecimiento Vegetal con Amplias Perspectivas para la Agricultura. IAC. Campinas, 83p.
- Obul R, B., Giridhar P, and Ravishankar A. 2002.** The effect of triacetonol on micropropagation of *Capsicum frutescens* and *Decalepis hamiltonii* W & A. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 71: 253-258 p.

- Olivera O, V.Z., Gutiérrez A, E. M. y Andrade M, R. 2000.** Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación a invernadero. *Bioagro* 12:75-80.
- Parker R. 2000.** La ciencia de las plantas. Editorial Paraninfo Thomson Learning.p. 467 – 470.
- Peñate L., Concepción O., Aragón C., Rodríguez R., González O, J.L., Escalona M., Cid M. y Pina D. 2007.** Evaluación del efecto de tres condiciones de cultivo *in vitro* en la calidad de plántulas de caña de azúcar propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 7 (3): 161-169.
- Pérez, J. 1998.** Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. 391 p.
- Pérez-Molphe. B.E.M., Ramírez M.R., Nuñez P.H.G. y Ochoa A.N. 1999.** Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales para la conservación de germoplasma. En: Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes (FOMES 97-1-5, ED.). pp. 129-134.
- Perl-Treves R. and Perl A. 2002.** Oxidative stress: an introduction. In *Oxidative Stress in Plants*. Van Montagu M., Inze D., Taylor and Francis Books Ltd, London and New York.
- Perveen, S., Anis, M., and Aref, I. M. 2013.** Lipid Peroxidation, H₂O₂ Content, and Antioxidants During Acclimatization of *Abrus precatorius* to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 57 (3): 417-424.
- Pierik, R. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid. Mundi-Prensa. 326 p.
- Pospišilová, J., Tichá, I., Kadleček, D. y Plázkova, Š. 1999.** Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-9497.
- Prececes, J. E. and Sutter, E.G. 1991.** Acclimatization of micropropagated plants to be greenhouse and field. En *Micropropagation* Kluwer Academic. Publisher. Dordrecht.
- Quintero S, A.I., Rodríguez T, D.A., Guízar N, E. y Bonilla B, R. 2008.** Propagación Vegetativa de la Vara de Perilla (*Symphoricarpos microphyllus* H.B.K). *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(1): 21-28.
- Ramírez, A. Cruz, N. y Franchialfaro, O. 2003.** Uso de Bioestimuladores en la Reproducción de Guayaba (*Psidium guajava* L.) Mediante el Enraizamiento de Esquejes. *Cultivos Tropicales*. 24(1):59-63.
- Raya M, Y.A., Villegas M, A. y Arellano O, G. 2009.** Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Fitotecnia Mexicana*. 32(2): 111-117.

- Razdan, M.K. 2003.** Introduction to plant tissue culture. 2^a ed. Enfield. New Hampshire, U.S.A. 375 p.
- Ritchie, G., Short, K. and Davey, M. 1991.** *In vitro* acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. Journal of experimental botany 42 (245): 1557 -1563.
- Ries S. K. 1985.** Regulation of Plant Growth With Triacantanol CRC. Crit Rev. Plant Sci. 2: 239-285.
- Rivera F., Buente L.L.O., Bet, Días de León F. y Pérez F. 2008.** Especies reactivas de oxígeno en las plantas: En Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas (Konigsher M.). Manual Moderno. 501-517 pp.
- Rodríguez B, G., Calderón Z, G., Jaen C, D y Curiel R, A. 2012.** Capacidad de Multiplicación, Productividad e Indicadores de Calidad de Consumo de Nuevas Variedades Mexicanas de Fresa. Revista Chapingo Serie Horticultura. Vol 18 (1):113-123.
- Romano, A., Noronha, C., and Martins L, M.A.1992.** Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber*. Annals of botany. 70(6): 531-536.
- Roselló, A., A. Domínguez., R. Girona. Y M. Ruiz. 1999.** Comparación de Diversos Sustratos para su Utilización en Viveros Ecológicos. Lagascalía 25:176-177.
- Rossi, L. 2005.** Hormonas vegetales: desarrollo y crecimiento brasinoesteroides. Curso de Fisiología Vegetal. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía. 63 p. Extraído el 25 de Junio de 2014 de <http://www.upch.edu.pe/facien/fc/dcb/fisiovegetal/Hormonas%20vegetales%201y2+Otros.ppt>
- Russcitti M., L. Marinucci, M. Nuñez, W. Abedini, and Sharry, S. 2000.** Enraizamiento *in vivo* e *in vitro* de *Pelagonium graveolens*, L'Herit. www.Biotecnologiavegetal.ecampo.com Junio 2014.
- Sagñay, N. 2009.** Control de calidad de frutilla (*Fragaria vesca*) deshidratada por método de microondas a tres potencias. Tesis de licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 114p
- Sánchez, O. 2000.** Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile.322p.
- Sánchez F. J. 2008 a.** Aclimatización de Plantas de Paulownia (*Paulownia tomentosa*), En 13 Sustratos. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 98 p.

- Sánchez, R. G. 2008 b.** La Red de Valor Fresa: Sistema de Inteligencia de Mercados. Fundación Produce Michoacán. 145p.
- Sánchez-Sánchez, J.L. 2006** Producción orgánica de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), en tubos de PVC. Universidad Autónoma de Sinaloa, 1-4 p.
- San José, M.C., Janeiro, L.V. and Corredoira, E. 2010.** Micropropagación del Aliso Común para la Conservación de su Germoplasma. Spanish Journal of Rural Development. 31-38.
- Santamaría, J., Murphy, K., Leifert, C. and Lumsden, P. 2000.** Ventilation of cultured vessels: I. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of *Delphinium In Vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 75 (3): 320-327.
- Scandalios G. 1990.** Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Adv Genet 28:1-41.
- Scandalios, J.G., Guan, L and Polidoros, A.N. 1997.** Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In : Scandalios J.G. ed. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 343-406 pp.
- Schupp, J., and B. Hennion. 1997.** The quality of strawberry plants in relation to carbohydrate reserves in roots. Acta Hort. 439: 617-621 pp.
- Shiau, Y., Sagare, E., Chen, U., Yang, S. and Tsay, H. 2002.** Conservation of *Anoectochulis formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *In Vitro* culture of seeds. Bot Bull Acad Sin 43:123-130.
- Shushan, S. 1959.** Developmental Anatomy of an Orchid, *Cattleya x Trimos*. In: Carl Withner (ed.) The Orchids a Scientific Survey. New York. The Ronald.
- SIAP, 2013.** Cierre de Producción Agrícola por Cultivo. <http://www.siap.gob.mx/> (Consultada: Abril 18, 2014).
- Sitbon, F. and Perrot R, C. 1997.** Expresion of auxin-regulated genes. Physiologia Plantarum 100: 443-455pp.
- Sivaram L., and Mukundan U.2003.** *In Vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 39(5):520-523.
- Slavtcheva, T. and Dimitrova, V. 2000.** Gas exchange with *In Vitro* cultivated grapevine plants during acclimatization period. Acta Horticulture 526: 357-363.

- Smith, R.H. 1992.** Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press, Inc. California, U.S.A. 171 p.
- Stapleton, S.C., C. K. Chandler, D. E. Legard, J. E. Price , and J.C. Sumler. 2001.** Transplant source affects fruiting performance and pests of 'Sweet Charlie' strawberry in Florida. Horticultural Technology. 11:61-65.
- Steubing, L., R Godoy y M. Alberdi. 2002.**Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria S.S. Santiago de Chile.
- Styer, D. J. and Chin, C. K. 1983.** Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews 5: 221-277.
- Tantos Á., Mészáros A., Kissimon J., Horváth G. and Farkas T. 1999.** The effect of triacontanol on Micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. Plant Cell Reports 19:88-91 pp.
- Tantos Á., Mészáros A., Szalai J., Horváth G. and Farkas T. 2001.**Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. Plant Cell Reports 20:16-21.
- Tremblay, F.M., Perinet, P. and Lalonde, M.1986.** Tissue culture of *Alnus* spp. With regard to symbioses. In: Bajaj, Y.P.S. (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 1. Trees I. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg.
- Thomas, P. 1998.**Humid incubation period and plantlet age influence in acclimatization and establishment of micropropagated grapes. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 34:52-56.
- Thomas, P. and Schiefelbein W, J. 2001.** Microcutting leaf area, weirth and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantles *In Vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 61:189-198.
- Van H., J.M. and Debergh, P.C. 1996.** Impact of sugar concentration *In Vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spaththphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.* 96:298. 304.
- Varshney A. and M. Anis. 2011.** Improvement of shoot morphogenesis *In Vitro* and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. *Acta Physiol plant* 34(3): 859-867.
- Vega D.R. 2007.** Historia de la Introducción del Cultivo de la Fresa al Valle de Zamora, Michoacán (1938 - 2006). Segunda Edición. Fundación Produce Michoacán, México.
- Végvari, G. 2001.** Morphological changes of *In Vitro* apple plants during acclimatization. *Acta Horticulturae.* 616:515-519.

- Verma A., C.P. Malik., V.K. Grupta and B.K. Bajaj. 2011.** Effects of *In Vitro* triacontanol growth antioxidant enzymes, and photosynthetic characteristic in *Arachis hypogaea* L. Brazilian Society of Plant Physiology 23:271-277.
- Vidales F. I., 2002.** Efecto de los Reguladores de Crecimiento en los Procesos de Organogénesis y Embriogénesis Somática de Aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México, 170p.
- Viloria R., B. 2009.** Enraizamiento *In Vitro* y Aclimatación de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán. 53 p.
- Villalobos A., V.M. 1980.** Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México) 33:35-49.
- Villalobos A., V.M., Thorpe, T.A. y Yeung, E.C. 1982.** El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México) 51:43-59.
- Villalobos A., V.M., Leung D., W.M. and Thorpe, T.A. 1984.** Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiate pine. *Physiol. Plant.* 61:497-504.
- Von Thaden U., H.A. 2012.** Evaluación de Sustratos y Enraizadores para la Propagación Vegetativa de *Maxillaria tenuifolia* Lindl. Y *stanhopea tigrina* Bateman. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Sierra de Juárez, Ixtlán de Juárez, Oaxaca, 43p.
- Vuleta, A., Jovanovic, S.M., Darka Seslija, D. and Tucic, B. 2010.** Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumila* L. *Journal of plant ecology.* Vol. 1 (3): 59-69.
- Weaver R., J. 1990.** Reguladores de Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Séptima Reimpresión. Editorial Trillas, México. 622 p.
- Witham, F. H. ; D.F. Blaydes and R.M. Devlin. 1971.** Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, USA. 245 p
- Ya W. H. and Chiang S. L. 2002.** Induction of early bolting in *Arabidopsis thaliana* by triacontanol, cerium and lanthanum is correlated with increased endogenous concentration of isopentenyl adenosine (iPAOs). *Journal of Experimental Botany.* Vol. 53(368): 505-512.