



Efecto del thidiazuron y ácido indolbutírico en la propagación *in vitro* de dos variedades de frutilla (Oso Grande y Sweet Charlie) a partir de secciones foliares

Effect of thidiazuron and indole-butyrac acid in the *in vitro* propagation of two varieties of strawberry (Oso Grande and Sweet Charlie) from foliar sections

Pillco-Tancara-Hilda Corina*, Quezada-Portugal Jorge Ángel Nicolás

Datos del Artículo

Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. Estado Plurinacional de Bolivia.

***Dirección de contacto:**

Instituto Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés. Cota Cota. Calle 27. La Paz-Estado Plurinacional de Bolivia. Tel +591-67345121. La Paz. Estado Plurinacional de Bolivia

Hilda Corina Pillco-Tancara.

E-mail address: hildacorey@gmail.com

Palabras clave:

Thidiazuron, agregados celulares, callogenesis, explantes.

J. Selva Andina Res. Soc.
2017; 8(1):69-82.

Historial del artículo.

Recibido febrero, 2016.
Devuelto noviembre 2016
Aceptado noviembre, 2016.
Disponible en línea, febrero, 2017.

Editado por:
**Selva Andina
Research Society**

Resumen

Los agricultores dedicados al cultivo de frutilla indican que los rendimientos son bajos en comparación con otros países, este efecto es consecuencia de que siembran plantines que proceden de estolones ya que las frutillas se propagan vía asexual. Esta forma de reproducción convencional presenta desventajas como: la disminución del rendimiento, la pérdida de la calidad del fruto. Una alternativa para solucionar este problema es la micropropagación.

La presente investigación evaluó el comportamiento *in vitro* de dos variedades de frutilla (Oso Grande y Sweet Charlie) a partir de segmentos foliares con diferentes grados de maduración (juvenil y adulto) en dos épocas de introducción. Para inducir a la propagación *in vitro*, los medios de cultivo fueron suplementados con reguladores de crecimiento, utilizando dos concentraciones 4.54 y 9.08 μM de thidiazuron con la combinación de tres concentraciones 0, 0.98 y 2.5 μM de ácido indolbutírico.

Los explantes de segmentos de hojas que presentaban tejidos juveniles (mayo) llegaron a formar brotes. No ocurrió lo mismo con aquellas que procedían de tejido adulto (junio), por lo que se puede señalar que las que provinieron de tejido juvenil presentaron una mejor respuesta *in vitro*.

Se determinó que la combinación de 9.08 μM de thidiazuron con 0.98 μM de ácido indolbutírico, fue la más adecuada para la propagación *in vitro* de secciones foliares de hojas de frutilla en ambas variedades, ya que en este medio se obtuvo mayor formación de agregados celulares, para la formación de brotes en comparación con los demás tratamientos.

© 2017. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Strawberry farmers indicate that yields are low compared to other countries. This effect is due to the fact that they plant seedlings that come from stolons since the strawberries are propagated asexual. This conventional form of reproduction has disadvantages such as: decreased yield, loss of fruit quality. An alternative to solve this problem is micropropagation.

The present research evaluated the *in vitro* behavior of two varieties of strawberry (Oso Grande and Sweet Charlie) from leaf segments with different degrees of maturation (juvenile and adult) in two periods of introduction. To induce *in vitro* propagation, the culture media were supplemented with growth regulators, using two concentrations 4.54 and 9.08 μM of thidiazuron with the combination of three concentrations of 0, 0.98 and 2.5 μM of acid Indolebutyric acid.

Explants of leaf segments showing juvenile tissues (May) came to form buds. The same did not occur with those

Key words:

Tidiazuron,
cell aggregates,
callogenesis,
explants.

that came from adult tissue (June), so it can be noted that those that came from juvenile tissue had a better response in vitro.

It was determined that the combination of 9.08 μM thidiazuron and 0.98 μM indolbutyric acid was the most suitable for the in vitro propagation of leaf sections of strawberry leaves in both varieties, since in this medium more formation was obtained Of cell aggregates, for the formation of outbreaks compared to the other treatments.

© 2017. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

La reproducción vegetativa, mediante los métodos tradicionales es escasa para las necesidades actuales, a razón de que estos pueden persistir mayor tiempo y son difíciles en algunos casos, o a veces inviables. Debido a estas limitaciones se descubrió que las plantas pueden ser clonadas más rápidamente *in vitro* por métodos de micropropagación (Pierik 1990). La micropropagación es una rama de la biotecnología que brinda considerables posibilidades, la más relevante es acelerar la multiplicación vegetal de manera masiva en un espacio reducido con costos relativamente bajos, para satisfacer la demanda de material vegetal (Mronginski & Roca 1991).

Las plantas de frutilla provenientes de cultivo de tejidos producen mayor número de estolones que las plantas propagadas por métodos tradicionales, siendo uniformes, sobreviven mejor en el campo (Boxus *et al.* 1984). Los explantes para el cultivo de tejidos de frutilla pueden provenir de corona o estolones, aunque es más fácil la extracción, desinfección de explantes de estolones (Villegas 1990).

En un estudio realizado por Mamani-Sánchez (2005) en micropropagación en frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) en variedades (Oso Grande y Sweet Charlie) determinó, explantes de estolones se regeneraron en menor tiempo, en comparación a los de coronas, además determinó, medios apropiados

para la fase de multiplicación, Medio basal de Murashige & Skoog (M.S.) suplementando ácido indolbutírico (AIB) y bencil amino purina (BAP) para ambas variedades También determinó que para la fase de enraizamiento los medios M.S., diluidos al 50% y 75% promovieron crecimiento, desarrollo en las raíces y follaje.

A nivel internacional se han realizado investigaciones sobre el potencial de regeneración de discos de hoja de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) a través de embriogénesis directa, determinándose resultados positivos con explantes de discos de hoja que se cultivaron en M.S., como tratamiento refrigeración y oscuridad (Landi & Mezzetti 2005). Por otro lado en diferentes variedades se lograron resultados incorporando al medio de cultivo un regulador de crecimiento (RRCC), una citocinina para la regeneración, tidiazuron (TDZ) para la brotación de discos de hojas de frutilla (Husaini & Abdin 2007).

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de dos niveles de tidiazuron con y sin el ácido indolbutírico, en la propagación *in vitro* de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) a partir de secciones foliares. Además: *i*) comprobar la respuesta a la introducción *in vitro* de secciones foliares provenientes de tejidos con diferentes grados de maduración (juvenil y maduro), en dos variedades de frutilla: Oso Grande y Sweet

Charlie, *ii*) determinar el efecto de diferentes concentraciones de tiazuron sobre la propagación *in vitro* de secciones foliares de dos variedades de frutilla, *iii*) determinar el efecto de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico sobre la propagación *in vitro* de secciones foliares de dos variedades de frutilla.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se utilizaron dos variedades de frutilla: Oso Grande y Sweet Charlie, las que fueron colectadas de la carpa solar de la Facultad de Agronomía de la UMSA en el Campus Universitario de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

Tabla 1 Tratamientos resultantes de las combinaciones de factores y niveles para la organogénesis de las secciones foliares de las variedades de frutilla: Como resultado de las combinaciones de los tres factores de estudio fueron 12 tratamientos con 10 repeticiones haciendo un total de 120 unidades experimentales, con 1200 secciones foliares como explantes

Tratamiento	TDZ	IBA	Variedad
1	4.54 μ M	0 μ M	Oso Grande
2	4.54 μ M	0.98 μ M	Oso Grande
3	4.54 μ M	2.5 μ M	Oso Grande
4	4.54 μ M	0 μ M	Sweet Charlie
5	4.54 μ M	0.98 μ M	Sweet Charlie
6	4.54 μ M	2.5 μ M	Sweet Charlie
7	9.08 μ M	0 μ M	Oso Grande
8	9.08 μ M	0.98 μ M	Oso Grande
9	9.08 μ M	2.5 μ M	Oso Grande
10	9.08 μ M	0 μ M	Sweet Charlie
11	9.08 μ M	0.98 μ M	Sweet Charlie
12	9.08 μ M	2.5 μ M	Sweet Charlie

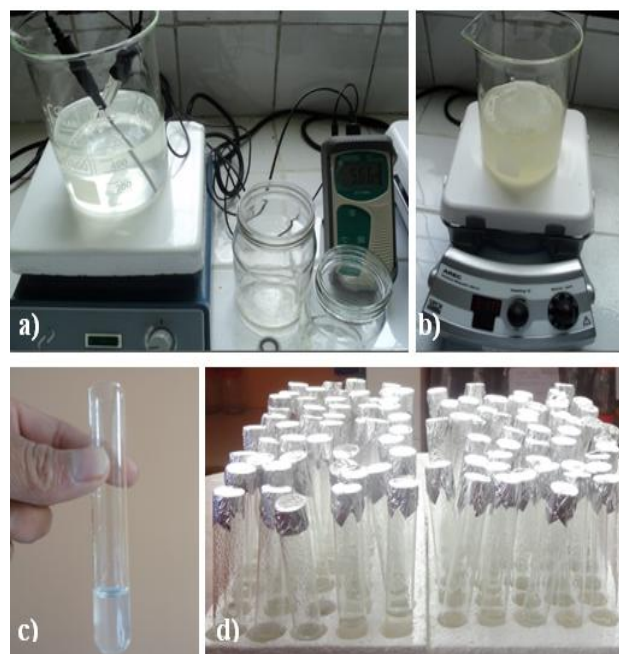
Fase de laboratorio

Preparación de medio de cultivo: El medio basal que fue utilizado para la fase de establecimiento fue el M.S., formulado por Murashige & Skoog (1962), compuesto por cinco soluciones: stock macronutrientes, micronutrientes, cloruro de calcio, quelatos de hierro, vitaminas y amino ácidos. Para la fase de establecimiento de secciones foliares de frutilla, el

medio de cultivo utilizado fue al 100% de la concentración del medio basal M.S., añadiendo las variaciones de los RRCC Tabla 1. (AIB y TDZ) de acuerdo con los tratamientos propuestos.

Al medio M.S., se añadieron 30 g L⁻¹ de azúcar (sacarosa comercial), ajustando el pH a 5.7 \pm 0.1 adicionándose bacto agar como agente gelificante, en una concentración de 5 g L⁻¹, posteriormente se procedió a distribuir el medio de cultivo, 5 mL de medio en los tubos de ensayo de 25*150 mm, luego fueron cubiertos con papel aluminio para su protección de una contaminación (figura 1). Finalmente se colocaron en frascos de vidrio de (300 y 500 mL) para su autoclavado a 120 °C y 15 PSI durante 15 min, luego fueron almacenados en la cámara de crecimiento. (Figura 2).

Figura 1 Preparación de medio de cultivo: a) Ajuste del pH, b) Calentamiento del medio de cultivo, c) Distribución del medio, d) Tapado con papel aluminio a los tubos de ensayo



También se preparó un medio de cultivo M.S., al 50% de concentración para el refrescamiento y descarga de RRCC de los explantes a la semana 10. A este medio se le añadió 30 g L^{-1} de azúcar (sacarosa comercial), 5 g L^{-1} de bacto agar y ajustando el pH a 5.7 ± 0.1 sin RRCC.

Figura 2 Autoclavado y almacenamiento del material para su traslado a la sala de crecimiento



Establecimiento in vitro de frutilla. Se realizaron dos introducciones de secciones foliares para la fase de establecimiento, la 1^{ra} introducción fue tejido foliar juvenil colectadas en un periodo de transición en mayo, para la 2^{da} fue tejido foliar maduro recolectas en junio en donde las plantas estaban en estrés a razón del inicio del invierno.

Lavado y desinfección de explantes. Las hojas recolectadas de la carpa solar, primeramente fueron lavadas con agua corriente, para su desinfección las hojas de frutilla fueron sumergidas en alcohol al 70% más III gotas de detergente líquido (agente tenso activo) durante 3 min, seguidamente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% que contenía III gotas de detergente líquido por un lapso de 8 min, de acuerdo a Hanhineva *et al.* (2008).

Proceso de introducción de los explantes al medio de cultivo. A partir de este procedimiento todo el trabajo se realizó en la cámara de flujo laminar, previamente esterilizada, con irradiaciones de luz

UV-baja durante 15 min. Una vez desinfectada las hojas de frutilla, se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril. Previo a la siembra, se hicieron cortes transversales a lo largo de la vena central de la hoja de un diámetro aproximado de $0.5 * 1.0 \text{ cm}$, estos explantes de secciones foliares fueron colocados con la superficie del envés en contacto con el medio de cultivo Figura 3, en cada uno de los tubos de ensayo de acuerdo con los diferentes tratamientos establecidos (con un total de 600). Posteriormente, los tubos fueron sellados con papel aluminio, plastifilm y rotulados (Figura 4), para finalmente colocarlas en gradillas y llevadas a la cámara de crecimiento colocados en un lugar donde no llegue luz directa (intensidad lumínica de $0.75 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante las 10 primeras semanas con el fin de reducir la oxidación y a una temperatura media de $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 3 Establecimiento del explante: a) Enjuagues de las hojas con agua destilada estéril dentro la cámara de flujo laminar, b) Tejido foliar que fue utilizado para la obtención de explantes, c) Cortes transversales a lo largo de la vena central de la hoja, d) Cortes de secciones foliares para la introducción a los medios de cultivo

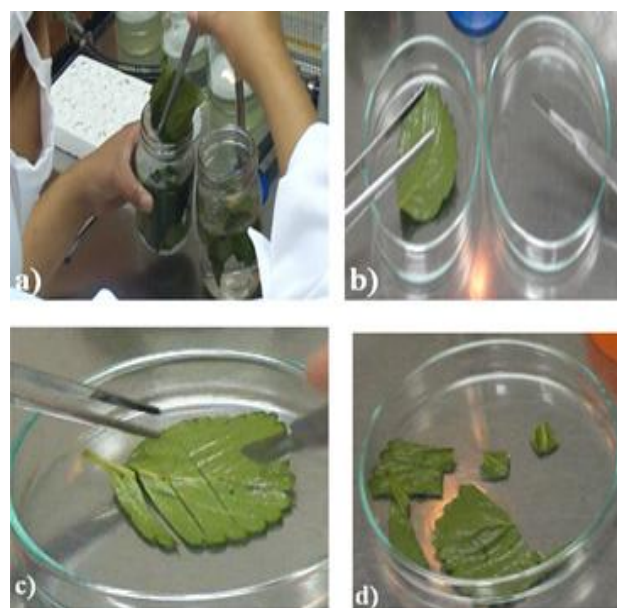


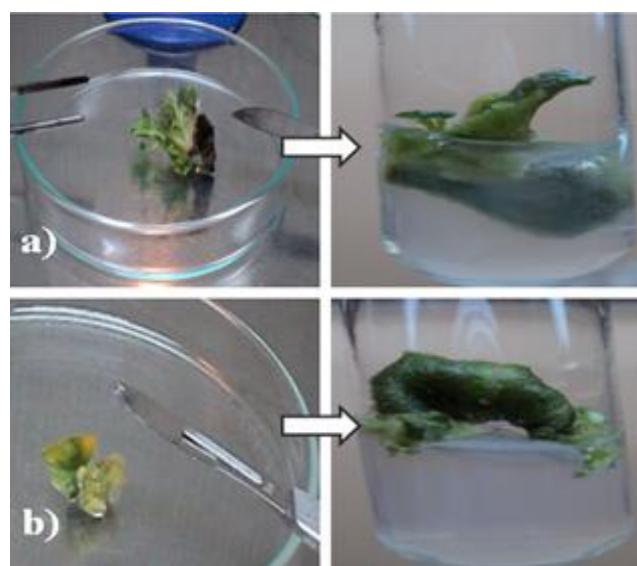
Figura 4 Explantes de secciones foliares cultivados con la superficie axial en contacto con el medio



Luego de 10 semanas, todos los explantes se cambiaron a un medio de cultivo M.S., al 50% para la descarga y mantenimiento viable del explante, los que fueron colocados en la cámara de crecimiento por 5 semanas con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad). La evaluación del presente trabajo de investigación fue por un periodo de 30 semanas Figura 5.

Análisis estadístico. Las variables contaminación, oxidación y sobrevivencia; se utilizó el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial (tipo de tejido y variedad) con 20 réplicas y para la evaluación del efecto de los diferentes tratamientos de medios de cultivo y la respuesta de dos variedades para su introducción a condiciones *in vitro*, se utilizó un arreglo lineal trifactorial con 10 repeticiones por tratamiento. Con sus respectivos análisis de varianza (ANOVA). Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de AIB, se aplicó una prueba Duncan ($\alpha=0.05$) para realizar comparaciones múltiples. La información se analizó empleando el programa estadístico (Mstatc-C 1998).

Figura 5 Cambio de medio de cultivo de los explantes a un medio de cultivo con M.S., al 50%: **a)** Explante con brote, el mismo que es transferido a un medio de cultivo para su refrescamiento, **b)** Explante con agregado, el mismo que es transferido a un medio de cultivo para su refrescamiento



Resultados

Efecto de dos tejidos foliares (juvenil y adulto) y variedades de frutilla, para su establecimiento en condiciones in vitro

Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica

Figura 6 Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica de dos tejidos foliares (juvenil y maduro) de frutilla

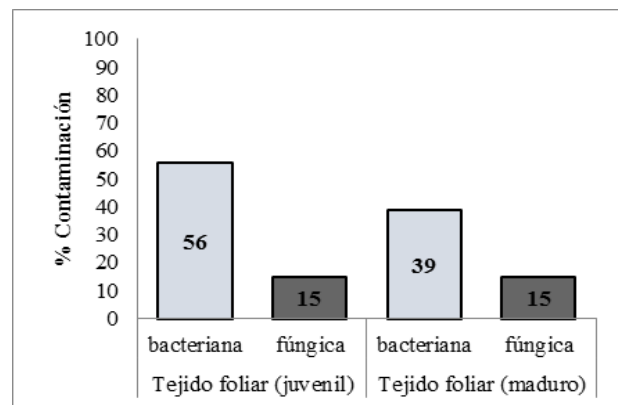
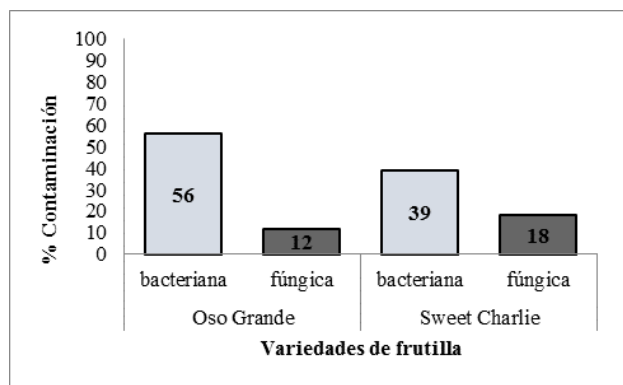
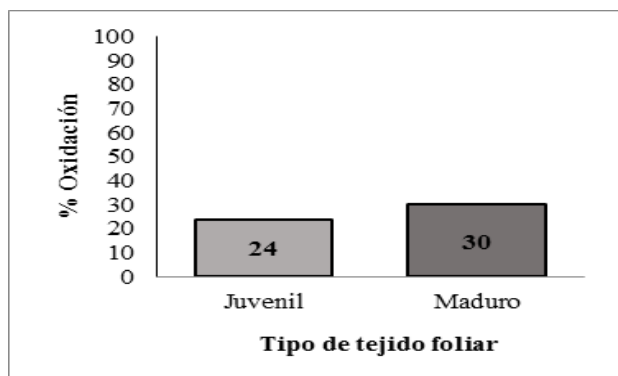


Figura 7 Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica en dos diferentes variedades de frutilla



Porcentaje de oxidación

Figura 8 Porcentaje de oxidación en dos tejidos foliares (juvenil y adulto) de frutilla



Efecto para la organogénesis de las secciones foliares de las variedades de frutilla:

Inicio y porcentaje de enrollamiento del explante (secciones foliares) para la formación del callo

Figura 9 Enrollamiento de secciones foliares para la formación del callo



Proliferación celular del callo

Inicio de formación de agregados en los callos

Figura 10 Inicio de formación de agregados en los callos de tejido foliar juvenil en función de diferentes concentraciones de TDZ

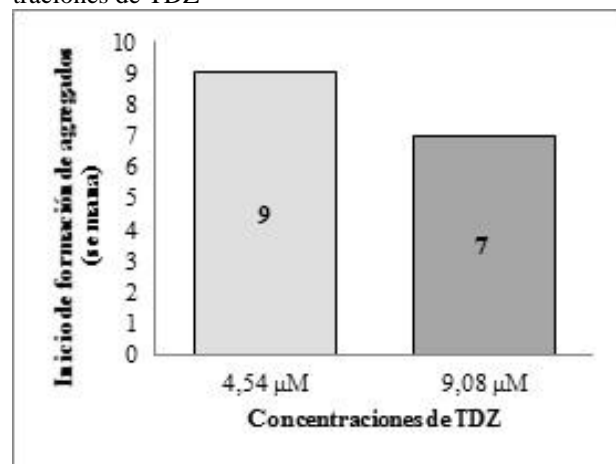


Figura 11 Formación de agregados en los callos de tejido foliar juvenil, en función de diferentes concentraciones de TDZ

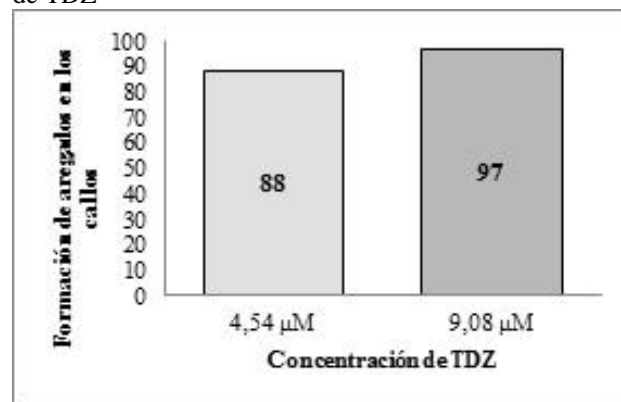


Figura 12 Formación de agregados en los callos de tejido foliar maduro, en función de diferentes concentraciones de AIB

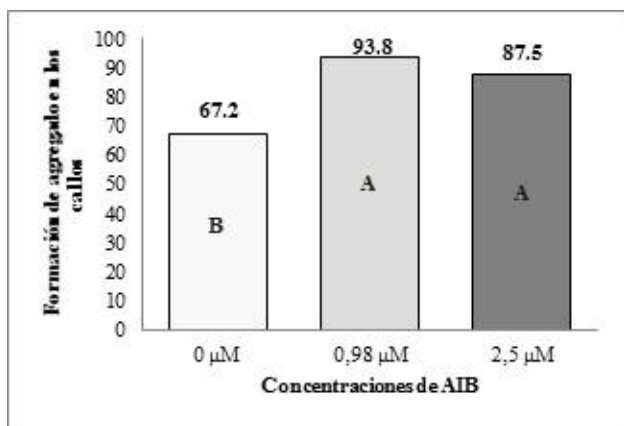
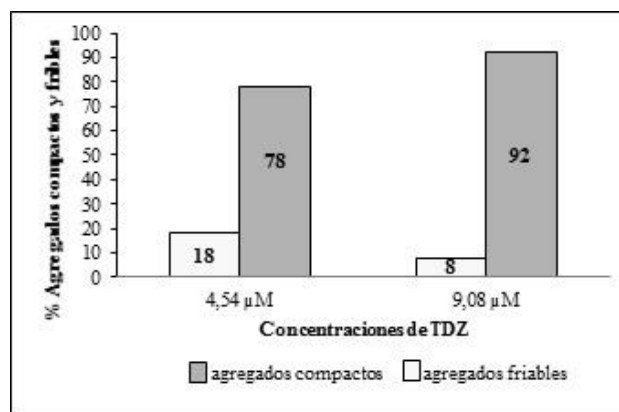


Figura 14 Forma de los agregados del callo: Agregados del callo vistas de estereomicroscópio (10X)



Figura 15 Agregados compactos y friables de los callos de tejido foliar juvenil, en función de las concentraciones de TDZ



Número de agregados del callo

Figura 13 Número de agregados del callo de tejido foliar juvenil, en función de dos variedades de frutilla, concentraciones de TDZ y AIB

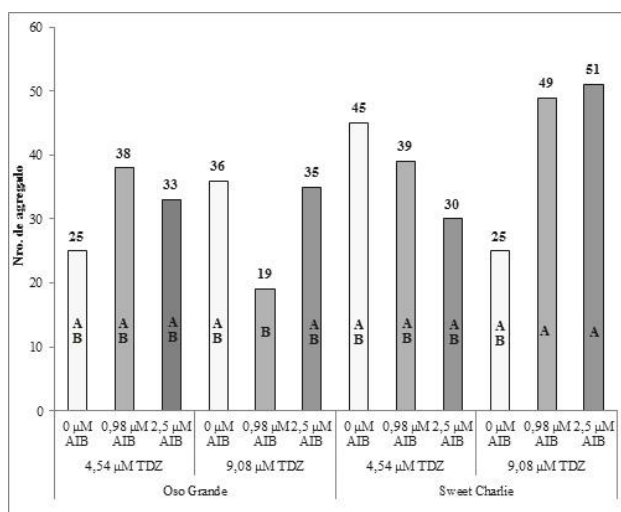
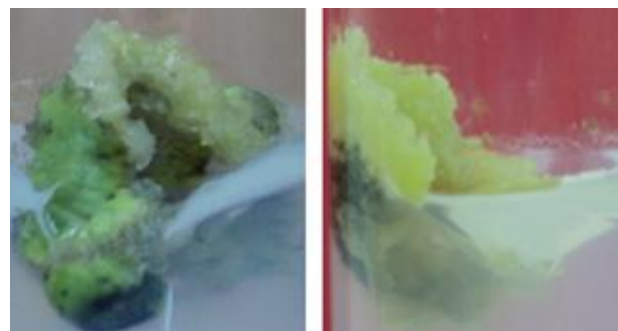


Figura 16 Callos con agregados compactos y friables
Izq.: Callo con agregado compacto; **Der.:** Callo con agregado friable



Formación de brotes a partir de la masa celular del callo

Figura 17 Hojas de frutilla: **Izq.:** Hojas de plantas jóvenes; **Der.:** Hojas de plantas maduras



Figura 18 Formación de brotes del callo: **a)** Callo con formación de brotes. **b) y c)** Desarrollo de brotes a partir de callos provenientes de explantes de secciones foliares de frutilla vistas en el estereomicroscópio (40X)

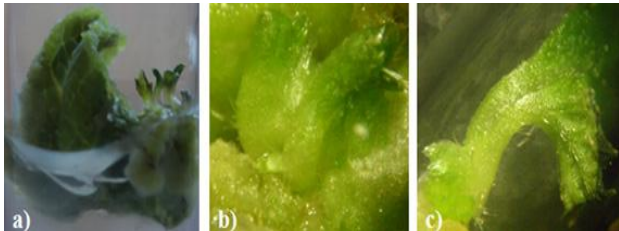
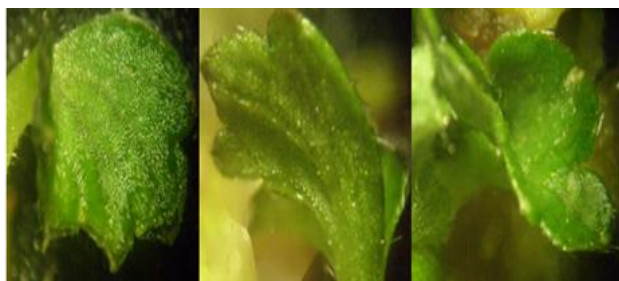


Figura 19 Estructuras foliares de los brotes: Desarrollo de tejido foliar de brotes a partir de callos provenientes de explantes de secciones foliares de frutilla vistas en el estereomicroscópio (40X)



Inicio y formación del brote

Figura 20 Efecto de la interacción de las concentraciones de TDZ y AIB, para el inicio de brotes

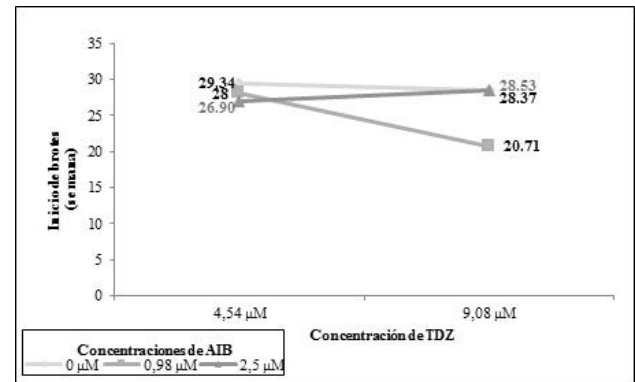


Figura 21 Efecto de la interacción de las concentraciones de TDZ y AIB para la formación de brotes

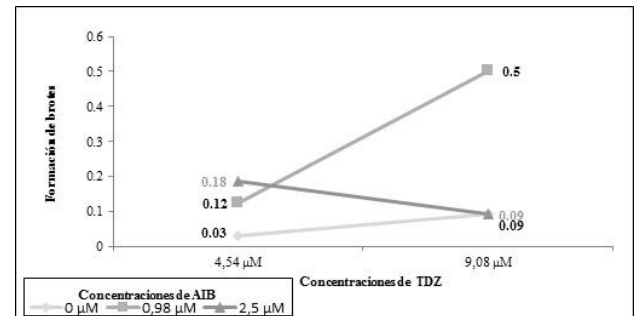


Figura 22 Formación de brotes por callo



Figura 23 Efecto de la interacción de las concentraciones de TDZ y AIB para el número de brotes por callo

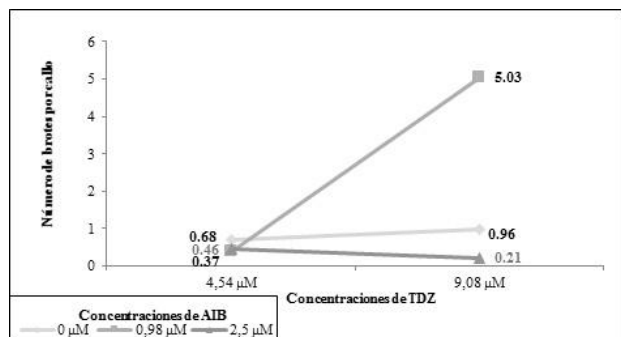
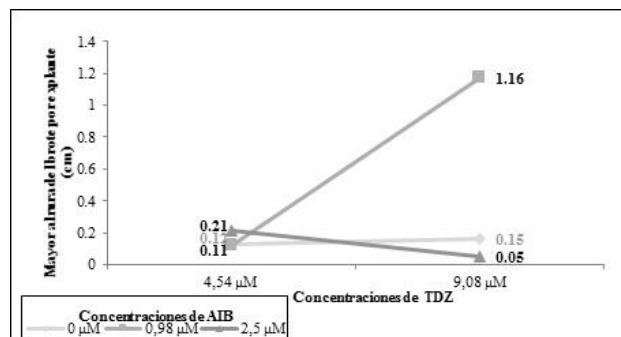


Figura 24 Efecto de la interacción de las concentraciones de TDZ y AIB para la mayor altura de brotes



Discusión

Efecto de dos tejidos foliares (juvenil y adulto) y variedades de frutilla, para su establecimiento en condiciones in vitro. Las dos variedades que se trabajó en la introducción en condiciones *in vitro*, se realizó este procedimiento en dos momentos fisiológicos diferentes del tejido foliar, utilizando: estado juvenil (introducción mayo) y maduro (introducción junio).

Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica

El análisis de datos fue evaluado la semana 6, porque la contaminación varió hasta esa semana. El resultado de dos tejidos foliares de frutilla en condiciones *in vitro* Figura 6, cuando se utilizó hojas

juveniles para la 1^{ra} introducción la contaminación general (bacteria, hongo) fue 71%, teniendo 56% de contaminación bacteriana, mientras la 2^{da} introducción en junio con hojas maduras la contaminación general fue menor de un 54%, presentando 39% de contaminación bacteriana. Posiblemente este resultado estuvo influenciado por la inmersión de las hojas de frutilla en la desinfección, es decir, que para la 1^{ra} introducción, en mayo, en el momento de la desinfección las hojas estaban muy comprimidas en las soluciones de desinfección de etanol e hipoclorito de sodio, porque se utilizaron menos soluciones desinfectantes. Para la 2^{da} introducción, en junio, la desinfección de las hojas de frutilla fue con bastante cantidad de solución de etanol e hipoclorito de sodio, evitando de esta manera que las hojas estén muy comprimidas. Al respecto, Muller (2006) indica que es muy importante el contacto del desinfectante sobre la superficie del explante, de esta manera se obtiene una desinfección, además, no se debe descuidar el método de siembra del explante, debido al efecto de densidad del desinfectante para la introducción, en este sentido explica que es necesario aplicar elevadas cantidades del agente desinfectante, al presentar una alta densidad de explantes. Para el factor que corresponde a las variedades (Figura 7), la variedad Oso Grande presentó mayor contaminación general (bacteria y hongo) para ambos tejidos foliares de un 68% en comparación con la variedad Sweet Charlie la que presentó 57%. La diferencia de los resultados posiblemente esté influenciada por el tamaño del explante. Scott *et al.* (1974) indican que el tamaño de las hojas de frutilla varía según la variedad, la variedad Oso Grande presenta hojas mucho más grandes que la variedad Sweet Charlie. Por su parte Jiménez (1998) mencionan que el tamaño del explante es muy importante en la desinfección debido a que mientras cuanto más

grande sea el explante mayores son los riesgos de contaminación. Al respecto Mamani-Sánchez (2005) indica que la alta pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo inducen a una alta contaminación de los explantes de frutilla, especialmente cuando éstos son extraídos de plantas provenientes de campo.

Porcentaje de oxidación. Al igual que la anterior variable de estudio, estos datos fueron evaluados en la semana 6, por los mismos motivos presentados, Figura 8 se evidencia que mayor porcentaje de oxidación entre los diferentes tejidos se presentó en hojas maduras, un 30% en comparación con hojas juveniles 24%. Así mismo, en hojas de tejido juvenil, 24% de oxidación, 2% murió por oxidación, las hojas de tejido maduro 30% de oxidación, 4% murió por la misma razón. En el presente estudio, los explantes (secciones foliares de frutilla) luego de la fase de establecimiento, fueron colocados en la sala de crecimiento en lugares donde recibían sólo luz de reflejo a razón de reducir la oxidación durante las 10 primeras semanas. Al respecto George & Sherington (1984), indican que la oxidación de fenoles se incrementa con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días o con una intensidad lumínica baja.

Formación de brotes. Es importante mencionar que de acuerdo con las evaluaciones se llegó a observar el desarrollo de brotes únicamente en tejidos (juveniles) provenientes de la 1^{ra} introducción, para ambas variedades (Oso Grande y Sweet Charlie).

Efecto para la organogénesis de las secciones foliares de las variedades de frutilla:

Inicio y porcentaje de enrollamiento del explante (secciones foliares) para la formación del callo. El enrollamiento del explante para la formación de callo se da de igual manera en las variedades y todos los tratamientos con TDZ y AIB. Al mismo

tiempo, se observó que el enrollamiento del explante (figura 9) empezó desde la semana 3 para ambos tejidos foliares (juvenil y maduro) hasta aproximadamente la semana 7. Este resultado se debe al efecto del contacto de la parte axial de la sección foliar con el medio y por los cortes de forma transversal a lo largo de la vena central de las hojas. Los resultados son respaldados por landi & mezzetti (2005) quienes indican que las láminas de hojas de frutilla se cortan a lo largo de la vena de la hoja y se cultiva con la superficie axial en contacto con el medio para la regeneración.

Proliferación celular del callo

Inicio de formación de agregados en los callos. En la Figura 10 para las distintas concentraciones de TDZ el inicio de formación de agregados en los callos se da mucho antes con la concentración más alta de TDZ (9.08 μM) empezando en la semana 7, en comparación con la otra concentración de TDZ (4.54 μM) que empezó la semana 9 mucho después. Así, se puede determinar que el tratamiento de 9.08 μM de TDZ es el mejor, ya que con esta concentración los agregados del callo se iniciaron antes. Hurtado & Merino (1987) indican que las respuestas del callo en un cultivo están en relación con el origen del tejido usado para la inducción y de la composición del medio de cultivo.

Formación de agregados en los callos. En la Figura 11 mediante la comparación de medias, se evidencia que el medio con la concentración 9.08 μM de TDZ presentó mayor formación de agregados en los callos 97%, en relación con la concentración 4.54 μM de TDZ de 88%. Este resultado indica que en los medios de cultivo con la concentración de TDZ 9.08 μM , la mayoría de los callos provenientes de secciones foliares presentaron agregados. Es probable que los promedios altos de estos resultados se deban a que el crecimiento del callo esté relacionado con

el medio de cultivo, en cuanto a su composición de RRCC, como indica Dodds & Bar-Joseph (1983).

La prueba Duncan al 0.05% muestra que no existen diferencias estadísticas entre los medios que contienen 0.98 y 2.5 μM de AIB respectivamente, resultando a la vez mejores, respecto al medio sin AIB en cuanto a la formación de agregados de los callos (Figura 12). Cabe recalcar que la semana 11 todos los explantes fueron transferidos a otro medio nuevo M.S., al 50%, sin RRCC, con el fin de refrescamiento y descarga de RRCC de los explante. Hurtado & Merino (1987) mencionan que el callo toma de 3 a 8 semanas para alcanzar el tamaño suficiente, y para cambiar a otro medio nuevo ya que es necesario la transferencia a un medio nuevo con frecuencia, porque la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido. Por su parte Landi & Mezzetti (2005) indican que es muy importante la transferencia de los callos provenientes de secciones foliares de frutilla a un nuevo medio sólo con M.S., a una concentración de 50% con el fin de ofrecer refrescamiento de los callos.

Número de agregados del callo. La prueba de Duncan al 0.05% muestra que se destacan 3 interacciones, una es la obtenida entre Oso Grande con 9.08 μM de TDZ y 0.98 μM AIB donde se registró el menor número de agregados por callo (19) de todos los tratamientos evaluados. Por otro lado, los tratamientos de 9.08 μM de TDZ y 0.98 μM AIB del mismo modo para TDZ 9.08 μM y 2.5 μM AIB ambos para la variedad Sweet Charlie presentaron mayor número de agregados por callo con 49 y 51 respectivamente. El resto de los tratamientos tuvo un comportamiento similar entre ellos (Figura 13).

Cabe recalcar que en esta variable se utilizó una lupa para contabilizar el número de agregados del callo. También en la evaluación de esta variable se

determinó que los agregados fueron circulares de un tono de color verde (Figura 14). Al respecto Hurtado & Merino (1987), indican que la coloración del tejido también varía: aun derivando de la misma especie, se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otro pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café y rojo.

Porcentaje de agregados compactos y friables de los callos de dos tejidos foliares (juvenil y maduro).

En la Figura 15 los medios de cultivo con la concentración de 9.08 μM de TDZ obtuvieron mayor porcentaje 92% de callos con agregados compactos y a la vez el menor porcentaje de agregados friables 8%, en comparación con el otro tratamiento de TDZ. Los resultados de estas variables de agregados friables y compactos determinan que el mejor tratamiento es la concentración 9.08 μM de TDZ a razón de obtenerse mayor porcentaje de agregados compactos con esta concentración de TDZ, también un menor porcentaje de agregados friables. Se debe recalcar que los agregados friables fueron difíciles de manipular por su textura, a la vez estos no llegaron a tener una óptima reacción después del cambio de medio para refrescamiento y descarga de RRCC, a razón de que los agregados friables se separaron y dispersaron en el medio al momento del cambio. Al respecto Hurtado & Merino (1987) indican que los callos son masas celulares que pueden presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. También indican que algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares.

También hay recalcar que agregados compactos presentaron óptima reacción, luego del cambio del medio a refrescamiento y descarga de RRCC. Al

respecto, Hurtado & Merino (1987), indican que un callo homogéneo consiste en un solo tipo celular y raramente se encuentra. Asimismo indican que los callos con masas celulares compactas y duras, tienen células íntimamente unidas (Figura 16).

Formación de brotes a partir de la masa celular del callo. En el presente trabajo de investigación la formación de brotes sólo se dio para la 1^{ra} introducción realizada con material vegetal de hojas de frutilla proveniente de tejido joven, estas hojas fueron un poco más pequeñas en comparación con las hojas de la 2^{da} introducción realizada en junio las que provenían de plantas más maduras. Otra característica de diferenciación fue que las hojas de frutilla para la primera introducción eran de un color verde claro, a la vez por ser tejido joven estas presentaron un brillo en las hojas, lo cual no se vio en las hojas de la segunda introducción (Figura 17).

Al respecto, Mamani-Sánchez (2005) indica que los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas en crecimiento activo tienen un mejor desarrollo que aquellos de plantas adultas, al mismo tiempo afirma que a medida que más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar mejor será la respuesta *in vitro*. En la formación de brotes a partir del callo (Figura 18) se observó también la formación de tejido foliar en el brote, en donde se determina que cada formación de brote presenta una hoja que posteriormente va desarrollándose (Figura 19).

Inicio y formación del brote. En la Figura 20 los medios de cultivo con 9.08 μM de TDZ en combinación con la concentración intermedia de 0.98 μM de AIB indica que el inicio de formación de brotes se dio en la semana 21, en comparación con la concentración 4.54 μM de TDZ en el cual el inicio de formación de brote se da en la semana 28. En este sentido 9.08 μM de TDZ y 0.98 μM de AIB es la ideal interacción, generando un inicio de formación

de brotes más rápido. Al respecto, Landi & Mezzetti (2005) mencionan que las interacciones entre las auxinas y citocininas presentan un desarrollo para las vitroplantas de hojas de frutilla, a la vez el equilibrio entre las auxinas y citocininas controla la formación, brotes y tejido de callo *in vitro* y afirman que al trabajar con TDZ y AIB se promueve una eficiencia de regeneración de brotes a partir de secciones foliares de frutilla.

La Figura 21 muestra que los medios de cultivo con 9.08 μM de TDZ en combinación con la concentración intermedia de 0.98 μM de AIB, obtuvieron un 50% de formación de brotes en relación con la concentración 4.54 μM de TDZ el cual sólo llegó a formar 12%. De esta manera la mejor interacción para la mayor formación de brotes es 9.08 μM de TDZ y 0.98 μM de AIB. Este resultado concuerda con Landi & Mezzetti (2005) quienes determinan que los explantes de secciones foliares de frutilla presentaron callos y brotes cuando el TDZ es combinado con auxinas.

Número y altura de brotes por callo. En la presente investigación se debe recalcar que el número de brotes por callo aumentó consecutivamente, es decir que en algunos casos la cantidad de brotes se compactaba en el tubo de ensayo, siendo esta una respuesta favorable para una fase de multiplicación y obtención de mayor cantidad de vitroplantas (Figura 22). Se midió la mayor y la menor altura de brote que se desarrollaron por explante, pero se presentan solamente los resultados de la mayor altura porque los resultados generales de la menor altura son iguales.

En la Figura 23 los medios de cultivo con la concentración 9.08 μM de TDZ combinado con 0.98 μM de AIB promovió mayor número de brotes por callo, lo que manifestó una mejor respuesta con un promedio de 5 brotes por explante, en cambio para

la concentración 4.54 μM de TDZ con 0.98 μM de AIB se formaron brotes por callo pero en cantidades muy pequeñas. Estos resultados presentan similitud con Husaini & Abdin 2007 quienes indican que el TDZ a una concentración de 9.08 μM induce la regeneración a través de la organogénesis de explantes de hojas de frutilla y promueve la formación de brotes. Por otro lado, Landi & Mezzetti (2005) determinan que la combinación de TDZ con 0.98 μM de AIB resultó muy eficaz para la organogénesis con explantes de secciones foliares de frutilla, promoviendo la formación de mayor número de brotes.

Mediante los resultados expuestos en la Figura 24 se observa que los medios de cultivo con la concentración de 9.08 μM de TDZ combinados con 0.98 μM de AIB, promovió el mejor promedio de altura de 1.2 cm en comparación con la concentración 4.54 μM de TDZ con 0.98 μM de AIB la cual presentó un promedio de altura muy bajo, al igual que las demás combinaciones de AIB y TDZ. Por su parte, Hurtado & Merino (1987) indican que las citocininas promueven la división celular, al igual que las auxinas que ejercen una cierta actividad sobre esta división y diferenciación celular. Así mismo, los autores señalan que para lograr el control del tamaño y apariencia del tejido u órgano, este control está regido en gran proporción por los gradientes de reguladores de crecimiento.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés con la presente investigación.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, Unidad de Biotecnología Vegetal. Agradecemos al Ing. William Murillo por su colaboración y por brindar la facilidad de acceso a material vegetal de las Estación Experimental de Cota Cota, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés.

Literatura citada

- Boxus P, Damiano C, Brasseur E. Strawberry. In: Ammirato DA, Evans PV, Sharp WR, Yamada Y (Eds). Handbook of Plant Cell Culture Vol 3. Crop Species (p. 453-486). Macmillan, New York. 1984.
- Dodds JA, Bar-Joseph M. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. Phytopathology. 1983; 73: 419-23.
- George EF, Sherrington PD. Plant propagation by Tissue Culture. Eastern Press. England. 1984. p. 709.
- Hanhineva K, Rogachev I, Kokko H, Mintz-Oron S, Venger I, Kärenlampi S, et al. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. Phytochemistry. 2008; 69(13):2463-81.
- Hurtado D, Merino M. Cultivo de tejidos Vegetales. 1^{ra} ed, D.F. Editorial Continental. 1987. p. 95.
- Husaini AM, Abdin MZ. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2007; 43(6):576-84.
- Jiménez E. Propagación y mejora genética de plantas de por Biotecnología. Ed. Rev. Santa Clara, Cuba. 1998. p. 10-20.

- Landi L, Mezzetti B. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. Plant Cell Rep. 2005; 25:281-8.
- Mamani-Sánchez B. Comportamiento *in vitro* de dos variedades de frutilla (*fragaria anassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia. 2005. p. 90.
- Mronginski LA, Roca W. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 1991. p. 127.
- Mstatc-C Software, Version 2.6 Drinkwater N, Crop and Soil Science Department; Michigan State. 1998.
- Müller J. Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. Sys Bot Monogr. 2006; 76: 1-341.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962; 15: 473-97.
- Pierik RLM. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 1990. p. 326.
- Scott DH, Darrow GM, Lawrence FJ. Variedades de la fresa: variedades de la fresa en los EEUU. Eds. Strawberry varieties in the United States . México, AID. 1974. p. 22.
- Villegas MA. Micropropagación de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) In: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Roma. 1990. p. 91-95.
-