

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
ESCUELA DE AGRICULTURA

"MICROPROPAGACION DE LA FRESA  
A PARTIR DE MERISTEMO"

Tesis que para obtener  
el título de Ingeniero  
Agrónomo presenta:  
Salvador Gutiérrez  
Jiménez.

GUADALAJARA, JAL.

1983



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Escuela de Agricultura

Expediente .....  
Número .....

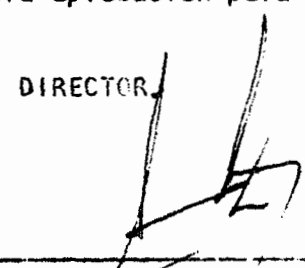
Julio 4, 1983.

ING. ANDRES RODRIGUEZ GARCIA  
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE AGRICULTURA  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

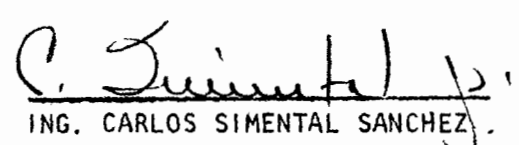
Habiendo sido revisada la Tesis del PASANTE \_\_\_\_\_  
SALVADOR GUTIERREZ JIMENEZ \_\_\_\_\_ titulada,  
"MICROPROPAGACION DE LA FRESA A PARTIR DE MERISTEMO."

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

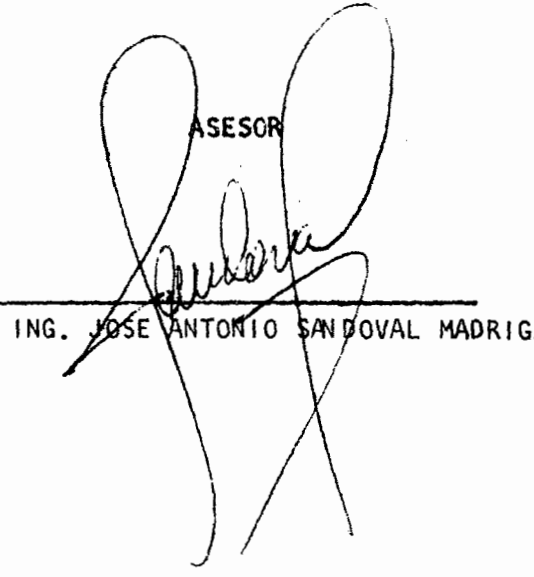
DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
ING. LUIS ALBERTO RENDON SALCIDO

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
ING. CARLOS SIMENTAL SANCHEZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
ING. JOSE ANTONIO SANDOVAL MADRIGAL

hlg.

A mi Dios...

A mis Padres

Filomeno y María Guadalupe.

A mi Hermana

María Eugenia.

A mis Amigos...

A ti Campesino...

para que algún día, no muy  
lejano, dejes de estar  
calcinado por el sol, a  
cuatro patas sobre el surco  
y con la cara llena de  
tierra.....

## AGRADECIMIENTOS

De una manera muy especial al M.C. Enrique de J. Arias J., que además de la atinada dirección tanto en el trabajo práctico - como en la escritura de éste, siempre tuvo una palabra de estímulo.

A los Ingenieros Luis Alberto Rendón, Carlos Simental y José Antonio Sandoval, por sus valiosas sugerencias.

A la Srta. Norma E. García Peñaloza por su extraordinaria y paciente labor mecanográfica.

A la Subdirección de Investigación y Docencia de la Comisión Nacional de Fruticultura, en particular al Laboratorio de Fitoproducción, en donde se llevó a cabo este trabajo.

A todos aquellos que intervinieron de alguna manera en la realización del trabajo.

A la Escuela de Agricultura de la Universidad de Guadalajara.

**REPORTE DE ANOMALIAS**

**CUCBA**

**A LA TESIS:**

**LCUCBA03613**

**AUTOR:**

**GUTIERREZ JIMENEZ SALVADOR**

**TIPO DE ANOMALIA:**

**Errores de Origen:**

**Tesis sin foliar**

## CONTENIDO

### INTRODUCCION

### OBJETIVOS

#### 1.- ANTECEDENTES.

- 1.1.- Taxonomía y descripción botánica.
- 1.2.- Origen y Dispersión.
- 1.3.- Valor Nutricional.
- 1.4.- Importancia de la Fresa en México.

#### 2.- REVISION DE LITERATURA.

- 2.1.- El Cultivo de Tejidos.
- 2.2.- Propagación Tradicional de la Fresa.
- 2.3.- Cultivo de Tejidos en Fresa.
- 2.4.- Micropropagación de la Fresa.

#### 3.- MATERIALES Y METODOS.

- 3.1.- Medio de Cultivo.
- 3.2.- Cultivo.
- 3.3.- Fase de multiplicación de los Brotes.
- 3.4.- Fase de enraizamiento.
- 3.5.- Modificación de la Metodología.
- 3.6.- Fase de Adaptación a Invernadero.

#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSION.

#### 5.- CONCLUSIONES.

#### 6.- BIBLIOGRAFIA.

## INTRODUCCION.

La propagación masiva por medio del cultivo de tejidos - viene a ser un método bastante promisorio y muy importante para muchas especies herbáceas y leñosas, de especial manera para la fruticultura actual. Ya se ha probado en 150 especies - aproximadamente (Rosati y Tognoni, 1979), habiéndose obtenido excelentes resultados y potencialmente es aplicable para todas las demás. Por éste método se tiene una multiplicación rápida de grandes cantidades de plantas, en las cuales se mantienen las características de la planta madre. Esta técnica permite controlar las condiciones ambientales que rodean a la planta durante el período de propagación, siendo imposible esto en el campo. Además se pueden producir plantas libres de organismos patógenos, factor determinante en la propagación de plantas.

La micropropagación permite que este material se pueda producir durante todo el año y en cantidades suficientes para surtir a los productores y en el caso específico de la fresa, el tener planta certificada producida en nuestro país vendría a bajar los costos de la misma, ya que los productores de fresa importan de los E.E.U.U., una gran cantidad de material, - la planta madre para vivero, que después propagan aquí en México.

Por esto y otras razones, la micropropagación está revolucionando el viverismo actual.

## OBJETIVOS.

Este trabajo presenta 3 objetivos fundamentales:

- Adaptación de la técnica de propagación masiva a nuestras - condiciones.
- Propagación masiva de plantas libres de virus.
- Reducir los costos de la propagación in vitro.

A más largo plazo se podría llegar a:

- Surtir a los viveristas de planta de calidad durante cual-- quier época del año.
- Dejar de importar planta de los E.E.U.U., que no siempre es tá en las mejores condiciones de sanidad.
- Liberación de la dependencia sobre todo científica, en este rubro, lo que conllevaría a la apertura de nuevas fuentes - de conocimientos profesionales y nuevas fuentes de trabajo.





Figura 1. ESQUEMA DE UNA PLANTA DE Fragaria x ananassa, Duch. (TOMADO DE EVANS, 1969).

## 1.- ANTECEDENTES.

### 1.1.- Taxonomía y Descripción Botánica.

La fresa se clasifica como:

- + Clase: Dicotiledónea
- + Subclase: Dialipétala.
- + Familia: Rosacea
- + Genero: Fragaria
- + Especie: *x anannasa* (Duchense).

Las plantas de este género son perennes, con un fruto del tipo llamado falso, que es alargado general<sup>l</sup>mente, ya que la parte comestible es un receptáculo ancho y succulento, con los aquenios, es decir los -- verdaderos frutos, incrustados en la superficie del receptáculo. Estos aquenios son pequeños, secos y duros, y tienen la semilla insertada en la pared del ovario, que es delgada (Seeling, 1975).

En 1966, Darrow, una de las mayores autoridades en fresa (Scotty Lawrence, 1975), enlista once especies de fresa en base a su número cromosómico ( $n=7$ ), ya que por las cruza, naturales y sobre todo artificiales, la botánica de la especie se ha hecho muy -- complicada.

Las especies están clasificadas en cuatro grupos cromosómicos:

Diploides.

- F vesca, L.
- F sempreflorens, Duch.
- F nilgerrensis, Schelcht.
- F daltoniana, Gay.
- F nubicola, Lindl.

Tetraploides.

- F. moupiensis, (Franch.) Card.
- F. orientalis, Losinsk

Hexaploides.

- F. moschata, Duch

Octoploides.

- F. Chiloensis, (L.) Duch.
- F. virginiana, Duch.
- F. ovalis, (lehn.) Rydb.

Las variedades comercialmente cultivadas pertenecen o se enclavan dentro de Fragaria x ananassa, Duch., que es el resultado de la hibridación de dos especies nativas de América, F. chiloensis (L.) Duch. y F. virginiana, Duch; por lo que tal especie es un octoploide (Darrow x Seeling, 1975).

## 1.2.- Origen y Dispersión.

El cultivo moderno de la fresa es relativamente reciente (S. XIX), pero las formas nativas se han adaptado a varios climas y se tienen especies originarias en todos los continentes, excepto en Africa y Oceanía.

Se tienen datos de que las fresas se conocen desde algunos siglos antes de Cristo. Se les atribuyen ciertas propiedades curativas y hasta la fecha prevalecen estas creencias.

Los escritores clásicos, Ovidio, Plinio y Virgilio, hacen referencia de la fresa común europea la F. vesca, - la cual fue cultivada en Francia e Inglaterra, por el S. XVII, siendo la fresa llamada "Alpina" la más popular, - la cual es originaria del Sur de los Alpes. Otra especie muy cultivada fue la F. moschata (Seeling, 1975).

Sin embargo, desde el S. XIV se tienen referencias de que había una colección de 1,200 plantas de fresa en los Jardines Reales del Louvre en Francia; por otro lado, en ese país se sabe que también se cultivaban en los jardines de las casas. En Inglaterra se cultivaban tipos similares a finales del S. XV. Amherst (1894) reporta -- que las fresas se mencionan como cultivo doméstico desde el año de 1440. Wilhelm y Sagen (1974) mencionan que se encuentra algún rastro de distribución de fresa, como -- fruto fragante, en la zona Anglo-Sajona por el S. VI -- (Seeling, 1975).

En este lado del Atlántico, los colonizadores de - Massachusetts conocen un frutillo de exquisito sabor que los naturales consumían bastante; era la F. virginiana. - Roger Williams en 1643 reporta que los indigenas tenían plantada y cultivada la fresa. Pero ya desde 1624 la F. virginiana emigra a Francia, a los jardines de Luis XIII.

Pasa a Inglaterra por el año de 1629; esta especie y otras nativas desplazan rápidamente a las viejas variedades europeas.

La otra especie originaria de América, la F. chilensis, la fresa chilena, fue descrita en los comienzos del S. XVI y por el 1557 ya era cultivada en jardines peruanos. Esta especie se encuentra distribuída desde la costa sur de Chile, al sur de los Andes, hasta las playas y montañas costeras de Norteamérica y las montañas de Hawaii. Es llevada a Francia por el capitán Frazer en 1712 y de ahí la trasladan a Inglaterra en 1727.

Aparentemente esta especie ya era cultivada por los aborígenes desde antes de la llegada de los españoles -- (Wilhelm y Sagen, 1974 - (Seeling 1975).

Hedrick en 1925 reporta que existió un catálogo de fresa en 1771. En el año de 1800 ya eran muchas las variedades cultivadas. Para 1834-1850, se reconocen las variedades cultivadas y se cae en cuenta que son de la especie de F. virginiana.

En 1838 se hace la primera hibridación artificial en América, por Charles M. Hovey, dando lugar a la variedad "Hovey" (Seeling, 1975).

Schiede y sus colegas (1839) escribieron extensamente acerca de la flora de México y describieron un tipo silvestre de fresa que se encontraba en las cercanías de los viejos volcanes vecinos a Jalapa, Ver., esta fresa es denominada Fragaria mexicana. Esta especie atrajo la atención de los viveristas norteamericanos y William R. Prince colectó la planta en México por el año de 1850. - En 1853, Prince introdujo a la F. mexicana dentro de las especies cultivadas y la llamó "Alpina Mexicana"; fue también conocida como la Mexicana siempre-verde. Por 50 años se cultivó en los E.E.U.U., esporádicamente, como una --

novedad. Lambertye (1864), observó y estudió la fresa -- mexicana y llegó a la conclusión de que era una forma de F. vesca. (Wilhelm y Sagen, 1974).

A fines del S. XIX llega a México una fresa más gran de que la nativa del país, con fines puramente domésticos y ornamentales. Posteriormente adquirió gran importancia - comercial hasta llegar a ocupar una de los principales lu gares en la producción nacional. Esta fresa era de la es- pecie F. chiloensis (Wilhelm y Sagen, 1974; DGEA, 1979). En 1972, la producción alcanza los más altos niveles y Mé xico ocupa el tercer lugar a nivel mundial, compitiendo - en producción con E.E.U.U., Italia y Polonia, aportando - el 10.1% de la producción mundial (DGEA, 1979).

### 1.3.- Valor Nutricional.

La fresa es una de las frutas más consumidas, tanto en fresco como industrializada en una gran variedad de - formas, por su agradable sabor. Incluso se le llegó a con siderar con propiedades altamente curativas para un sin- número de enfermedades de diversa índole.

En cuanto a su valor nutritivo, se presenta a conti- nuación una tabla (No. 1), de la composición química y su valor energético.

Por su importancia económica en varios países, incluí do el nuestro, ha sido objeto de muchas investigaciones - para mejorar su producción y calidad, tanto optimizando - los sistemas tradicionales como aplicando nuevas técnicas.

TABLA No. 1.- Composición química y valor energético de la fresa. (por cada 100 gr. de parte comestible).

Agua.....	90.5 gr.
Proteínas.....	0.9 gr.
Lípidos.....	0.4 gr.
Glúcidos.	
disponibles.....	5.3 gr.
solubles.....	5.3 gr.
fibra.....	0.6 gr.
Energía.....	27 Kcal.
Fierro.....	0.8 mg.
Calcio.....	35 mg.
Fósforo.....	28 mg.
Tiamina.....	0.02mg.
Riboflavina.....	0.04mg.
Niacina.....	0.0.5 mg.
Vitamina A.....	Trazas.
Vitamina C.....	54 mg.

Fuente: Tabelle di composizione degli alimenti. ROMA.1977.

#### 1.4.- Importancia de la Fresa en México.

A partir de 1950 la producción nacional de fresa tuvo un acelerado crecimiento a consecuencia de la fuerte demanda en el mercado de los Estados Unidos. El fenómeno estimuló el cultivo en varias zonas, en especial el Estado de Guanajuato, habiéndose generalizado más tarde en el Estado de Michoacán, lo que originó una expansión anárquica de la superficie cultivada a mediados de la década de los 60's. Así como también, una elevación constante en los rendimientos por unidad de superficie, debido esto a la rápida tecnificación de las labores y la especialización de la mano de obra. Todas estas circunstancias repercutieron drásticamente en el mercado, por desajustes

entre la oferta y la demanda en aquella época.

La zona del Bajío, en Guanajuato, y la zona de Zamora en Michoacán, se han mantenido a la cabeza como -- los principales productores-exportadores de fresa en -- nuestro país, a pesar de que existen otros estados en -- donde se cultiva y que tienen un gran potencial para -- ser los líderes en la producción nacional. Entre los que sobresalen, se encuentra Jalisco, y en menor proporción los de México, Querétaro, y Puebla (DGEA, 1979).

En 1978 la superficie total cosechada fue de 5 150 has., teniendo una producción de 75 000 tons., y siendo la utilidad de 373 millones de pesos; el número de jornales utilizados en ese mismo año fue de 3 435 000. Estos datos en general nos dan una ligera idea de la importancia económica del cultivo en nuestro país.

En cuanto al consumo nacional aparente, en 1978 se requirieron 55 876 tons., siendo el consumo per-cápita -- aproximadamente de casi 900 grs. (CONAFRUT, 1979).

Sin embargo, para cultivar esta especie se hace necesario utilizar planta de la llamada certificada, esto es, que esté libre de patógenos en general.

A pesar de la importancia del cultivo, en México no se cuenta con una producción masiva de plantas libres de enfermedades y se compra el material a viveristas de los Estados Unidos. (Villalobos y Ortega 1978).

En 1980 se importaron alrededor de 20 millones de -- plantas de fresa, pero las plantas importadas no siempre están libres de enfermedades, mucho menos de virus, sin embargo, la demanda es tan intensa que los viveristas no se dan abasto a todos los pedidos y muchos productores -- establecen viveros propios para satisfacer sus necesidades, que no siempre están en las mejores condiciones de --



sanidad y la planta obtenida no es de la mejor calidad (Dávalos 1983).

Esta situación ha llevado a buscar una metodología adecuada para desarrollar en nuestro país y bajo nuestras condiciones, una producción masiva de plantas de fresa libres de virus (Slowik y Villalobos 1975; Villalobos y Ortega 1978; Villalobos 1980); sin embargo, estos trabajos no se han reflejado en la producción comercial de planta en nuestro país, entre otras razones, porque aún están en investigación para perfeccionarlos.

## 2.- REVISION DE LITERATURA.

### 2.1.- El Cultivo de Tejidos.

Existe una confusión considerable y hay falta de uniformidad en la terminología del cultivo aséptico de vegetales. El término "cultivo de tejidos vegetales", aunque ha sido usado comunmente para abarcar todos los tipos de cultivo aséptico, debemos hacer un uso más restringido del mismo. Por lo que tomaremos la definición que hace Street (1977) para distinguir las diferentes terminologías usadas en los distintos tipos de cultivo aséptico, esto es posible de acuerdo al origen de la parte vegetal tomada para su cultivo.

El cultivo de plántulas o plantas bien constituidas y completas (cultivo vegetal), de embriones aislados, maduros e inmaduros (cultivo de embriones), de órganos aislados (cultivo de órganos, incluyendo aquellos que se derivan de puntas de raíces, meristemos apicales, primordios foliares, primordios florales o partes florales inmaduras, frutos inmaduros), de los tejidos provenientes de la proliferación de segmentos (explantes) de órganos vegetales (cultivo de tejidos o de callo), de células aisladas o pequeños agregados celulares que permanecen dispersos en un medio líquido (cultivo en suspensión).

En sí, el término cultivo de tejidos puede ser aplicado apropiadamente a cualquier cultivo que crece sobre un medio nutritivo.

Haciendo un poco de historia, ya desde 1898 Haberlandt trató de cultivar partes de vegetales, como células del tejido foliar, parénquima, epidermis y pelos epidérmicos de varias plantas, en un medio artificial

cial aséptico. Este intento falló y ahora en nuestros días ya se han desarrollado técnicas para el cultivo de tejidos (Street 1977; Hartman y Kester, 1980), tales como el rescate de plantas enfermas o infectadas por virus, obtención de líneas homocigóticas, esto es, líneas puras por medio del cultivo de haploides para mejoramiento genético (Rosati y Devereux, 1975; Boxus y Druart, 1979), multiplicación clonal rápida de especies valiosas y la conservación por largo tiempo de tal germoplasma, manteniéndolo en refrigeración (Zuccherelli, 1979).

Además el cultivo de tejidos nos ofrece otras ventajas como serían la propagación vegetativa de especies que por otros medios serían difíciles de propagar, aunque en este caso no es posible generalizarlo para todas las especies; producción y propagación durante todo el año de la especie, sin importar la época; ya que se pueden controlar las condiciones ambientales en el laboratorio y sin faltar la calidad y fitosanidad del material multiplicado (de Fossard, 1976; Ramborg, 1976; Bini, -- 1977; Bozzini, 1979; Rosati y Tognoni, 1979; Ingram, -- 1980, Levine, 1982).

Según algunos autores, esta técnica permite obtener varios millones de plantas al año a partir de un solo brote (Langhans, 1977; de Fossard, 1978) cuando se hace propagación masiva, teniendo por otro lado la ventaja de que un gran número de plantas ocupan un espacio reducido, hasta 25,000 plantas por  $mt^2$  (Centrale Orto frutticola alla Produzione, 1979).

En el caso de propagar planta con un alto grado de sanidad, sobre todo que estén libres de virus, se hace necesario el cultivo de meristemos; esto se fundamenta en que los ápices de las plantas jóvenes se encuentran en una acelerada división celular, con la que compite -

desfavorablemente el patógeno. Aunado a esto, los tejidos contenidos en el meristemo están indiferenciados, - por lo que no se han formado conductos fibrovasculares por los que se pueda traslocar el virus hasta el ápice; y por otro lado, en el meristemo hay una gran actividad metabólica debido, entre otras causas, a la división mitótica tan profusa, por lo que existe un medio intracelular poco favorable para la síntesis de la proteína utilizada en la replicación del patógeno, además, alguno de esos metabolitos pueden actuar como inhibidores de - los virus (Villalobos, 1980).

Se considera que además de cultivar meristemas, para lograr que la planta esté libre de virus, se combine con tratamientos de calor (Termo-terapia), para tener - la absoluta seguridad de que las plantas obtenidas es - tén libres de cualquier contaminación viral.

El tratamiento combinado, cultivo de meristemas y termoterapia, ha dado resultados con el 100% de efectividad (Langhans, 1977; de Fossard, 1978; Bozzini, 1979; Ingram, 1980), y para ratificar esta certificación es - conveniente hacer pruebas de indexado (Langhans, 1977; Boxus y Druart, 1979).

Dentro del cultivo de tejidos, la propagación in - vitro ha aportado, en estos últimos años, una notable - contribución en el sector de la multiplicación de las - plantas cultivadas tanto herbáceas como leñosas.

Inicialmente y por muchos años la atención de los investigadores se enfocó casi exclusivamente a plantas herbáceas; Murashige, en 1974, mencionó 110 especies todas herbáceas, las cuales al cultivarlas in vitro, ha-- bían dado resultados positivos, más nunca mencionó algu na planta leñosa.

Abbot en 1977, incorpora 40 especies leñosas a esa lista, que en el breve lapso de 3 años dieron resultados positivos (Rosati y Tognoni, 1979).

Potencialmente todas las especies se pueden propagar mediante esta técnica, sin embargo, no en todas se ha tenido el éxito deseado, por lo que se sigue investigando en tal cuestión.

Especialmente en leñosas, algunas especies forestales ya han sido propagadas con éxito,; en lo referente a frutales, algunas especies del tipo caducifolio han respondido bien a tal técnica (Bonga, 1979); (Boxus y Druart 1979; Durzan, 1979; Minocha, 1979; Németh, 1979; Zuccherelli, 1979).

Para el cultivo de tejidos in vitro, el medio nutritivo que se utiliza tiene cinco grupos de ingredientes - que son: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, vitaminas, reguladores del crecimiento y otros componentes orgánicos (Gamborg, 1976).

El seleccionar un medio de cultivo para una especie en particular es una de las cosas más difíciles de hacer pero también una de las primordiales. La decisión de emplear un determinado medio de cultivo va a depender de la especie y del tipo de células que se estén cultivando ya que la tasa de crecimiento y los rendimientos que se obtengan se pueden atribuir a varios factores que se encuentran en el medio y el tejido responderá de distinta manera (Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1976); estos factores serían por ejemplo; el pH, la metodología de la esterilización, en la que se puede afectar algún componente -giberelinas, por ejemplo-, o la adición de una ó mas hormonas, como también puede influir otro tipo de cosas, como la temperatura o la cantidad e intensidad de la luz

(Murashige y Skoog, 1962), en fin, hay que considerar un buen número de factores, que en un momento dado puedan darnos el éxito en la realización de un trabajo de este tipo.

A pesar de todas las ventajas que ofrece el cultivo de tejidos, hay que tener ciertos cuidados en el manejo de las plantas cultivadas in vitro, ya que se pueden dar mutaciones eventuales indeseables (Rosati y Tognoni, 1979; Zuccherelli, 1979) cosa que se puede evitar renovando el clon en multiplicación.

## 2.2.- Propagación tradicional de la fresa.

Las fresas se propagan por estolones o en los tipos de producción continua (que producen pocos estolones) -- por división de la corona. Generalmente se lleva a cabo la propagación por estolón. La propagación por semilla -- solo se emplea en los programas de mejoramiento genético, para desarrollar nuevos cultivares (Scott e Ink x Hartmann y Kester, 1980).

La multiplicación por estolones es el sistema más -- sencillo, puesto que se hace naturalmente y se asegura -- la perpetuación de la especie y de las variedades conservando a las plantas con caracteres absolutamente idénticos. (Alisina, 1978).

En México se propaga por medio de estolones en los viveros comerciales, pero la planta producida en estos -- viveros tiene una calidad sanitaria bastante dudosa. Generalmente se le da poca importancia al origen de las -- plantas. (Salas, 1969).

Aunado a esto, la producción viverística es insuficiente; a todo esto se debe, como ya se ha mencionado, -- que la planta se compre en los E.E.U.U.

En el campo, en la plantación, que consiste en el --

transplante de estolones, se utilizan tres tipos de plantas:

+ Directa verde.- Esta planta es obtenida en viveros nacionales, utilizándose 100 000 plantas/ha. y plantándose por lo regular a doble hilera y a una distancia de 20-25 cms. durante el mes de agosto; en este sistema se tiene la desventaja del replante, el cual llega a ser de un 20%.

Esta planta se utiliza para producción de fruta.

+ Semi-directa refrigerada.- Este tipo se importa de E.E.U.U. y se utilizan alrededor de 20 000 plantas por ha., se plantan en los meses de abril y mayo. - La superficie despoblada es cubierta por los estolones que nacen durante los meses de julio y agosto, con este método se evita el replante, pero es más cara la planta. Esta planta se utiliza para producir más planta.

+ Directa refrigerada.- Esta planta puede ser nacional o de importación; se utilizan de 80 000 a 100 000 plantas por ha., las cuales deben tener al menos, 1 000 horas de refrigeración. Su plantación se inicia en marzo, teniendo buenas producciones de fruta durante noviembre y diciembre. Tiene la desventaja de su alto costo.

- Cultivo de tejidos en Fresa.

Al comenzar a hacer cultivo in vitro de fresa, el objetivo que se perseguía era el de obtener planta libre de virus. Se utilizaron diferentes técnicas y Belkengren y Miller (1962) fueron los primeros en reportar la eliminación de virus por medio de la termoterapia. Al ir progresando en el cultivo de meristemas "in vitro", se llegó a la conclusión de que por medio de esta técnica se po-

dría obtener planta libre de virus. Los mismos Belkengren y Miller y posteriormente Hilton (1970), sugieren que antes de colocar los meristemos in vitro se les de un tratamiento de calor, con este tratamiento combinado se tendrá un 100% de seguridad de que la planta está libre de cualquier patógeno. Hay algunas discrepancias, ya que algunos opinan que la eliminación de virus solamente por medio -- del cultivo de meristemos es definitiva. (Boxus 1977).

Aunque la termoterapia se considera un tratamiento -- no esencial para la eliminación de virus, sí se encontró un crecimiento más rápido de los meristemos que habían si do tratados con calor (Vine, 1968; Mullin, et.al.x Boxus, et.al., 1977; Zimmerman, 1980).

En 1973 Niski y Ohsawa, inducen el meristemo apical a tejido indiferenciado (callo) y obtuvieron alrededor de 50 plantas a partir de tal tejido.

Se han cultivado anteras con el fin de obtener plantas haploides para mejoramiento genético, y en principio se observaron cambios físicos y fisiológicos en el grano -- de polen (Rosati y Devereux, 1975; Maeda, et.al., 1978.)

#### 2.4.- Micropropagación de la Fresa.

Posteriormente a la fase de eliminar virus por medio del cultivo de meristemos se procedió a tratar de -- aprovechar la potencialidad de proliferación del meristemo para obtener el mayor número de plantas en el menor -- tiempo posible y completamente sanas.

Vine (1968), ya comenzaba a vislumbrar las posibilidades de la propagación masiva de plantas por medio del -- cultivo de meristemos, sin embargo, su objetivo primordial era el de obtener planta de fresa libre de virus. En 1972



Adams mejora el método descrito por Vine, obteniendo un gran resultado en la propagación masiva de fresa.

Boxus (1974) basándose en las experiencias de investigadores anteriores a él y especialmente en Adams, modifica algunos rangos hormonales sobre todo, y el método - en general, y reporta que por medio de su proceso se pueden obtener, en el término de un año varios millones de plantas, de  $15^6$  a  $25^6$ , partiendo de un meristemo.

En México se han hecho varios trabajos en lo que a micropropagación de fresa se refiere (Slowik y Villalobos, 1975; Ortega y Villalobos, 1978; Villalobos, 1980), siguiendo otros métodos variando ya sea nutrientes, vitaminas u hormonas y se ha logrado obtener planta libre de virus.

Boxus, et.al.(1977) reporta que la metodología descrita 3 años antes, se puede aplicar a cualquier variedad de fresa cultivada.

A partir de la publicación de Boxus en 1974, se han hecho pequeñas modificaciones al método sin cambiar la esencia del trabajo, logrando algunas mejoras en cuanto a manualidad y nutrición (Damiano 1977; Zuccherelli, 1979; Zimmerman, 1980).

### 3.- MATERIALES Y METODOS.

Las variedades empleadas en este trabajo fueron la -- "Tioga" y la "Aliso". Las plántulas de estas variedades fueron proporcionadas por el Instituto Sperimentale per la -- Frutticoltura de Roma (Italia), donde fueron obtenidas a -- partir de meristemos.

De estas 2 variedades la "Tioga", tiene especial importancia en nuestro país ya que es la más cultivada, (Dávalos 1983), además de que se cultiva en otros países, siendo por ejemplo en los Estados Unidos una de las variedades más cultivadas (Seeling 1975); la otra variedad tiene también importancia en otras zonas del mundo (Converse 1981).

La propagación masiva in vitro de fresa se llevó a cabo con la siguiente metodología.

#### 3.1. Medio de cultivo.

Como ya se mencionó antes, el medio de cultivo es a base de los elementos nutritivos que normalmente requiere una planta (Gamborg, 1976; Street, 1977); los componentes y sus proporciones se pueden apreciar en la Tabla 2

Como agente gelificante se utilizó Agar-Agar en una proporción de 7 grs/lt.; el pH se ajustó con solución KOH 0.1N., al 5.6.

Este medio nutritivo es el utilizado por Boxus - (1974) en el que la solución de macronutrientes de -- Knop reporta, que posteriormente fue modificada por Zuccherelli (1979); los macronutrientes y las vitaminas, son las reportadas por Murashige y Skoog (1962).

El Fierro ( $Fe SO_4 \cdot 7H_2O$ ) se añadió al medio con  $N_2EDTA$  (etilen-diamino-tetracetato de sodio) en forma de quelato, con el fin de asegurar su disponibilidad

TABLA 2

MEDIO NUTRITIVO EMPLEADO.	
MACROELEMENTOS	mg/lit medio
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1000
KNO <sub>3</sub>	250
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250
MICROELEMENTOS	
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16
ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.025
OTROS COMPONENTES	
Fe EDTA	10
VITAMINAS	
Inositol	100
Tiamina	0.1
Acido Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Glicina	2.0
FUENTE DE CARBONO	
Sacarosa	20 grs/lit.

y translocación en los tejidos en desarrollo (Street - 1977; de Fossard x Levine, 1982).

Las concentraciones hormonales variaron según la fase en que se encontrase el material. (Ver tabla 3).

El medio nutritivo completo se vació en frascos de vidrio refractario tipo Gerber, conteniendo de 20-25 ml., cada frasco; estos se taparon perfectamente y esterelizaron en autoclave a 120°C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos.

### 3.2.- Cultivo

En la metodología señalada por Boxus (1974) y -- Zuccherelli (1979), y seguida en este trabajo, se contempla una primera fase que es la de adaptación del tejido a las condiciones in vitro; en este caso el tejido ya estaba adaptado, puesto que el material se recibió en tubos de ensaye.

Por lo que se describirá a partir de la fase de multiplicación.

### 3.3.- Fase de multiplicación de los brotes.

Una vez gelificado el medio, se colocaron los explantes en posición vertical. Estos medían aproximadamente de 1 a 2 cm., teniendo de 1 a 5 brotes cada uno y algunos mostraban hojas perfectamente desarrolladas.

Esta siembra y todos los subsecuentes trasplantes se efectuaron en campaña de flujo laminar.

Las condiciones de crecimiento bajo las que fueron colocadas las plántulas se señalan a continuación:

Colocados en una cámara de crecimiento la luminosidad fue de 2,100 ± 100 lux, obtenida de lámparas fluorescentes Toshiba de 40 W. Plantalux; el fotoperíodo fue

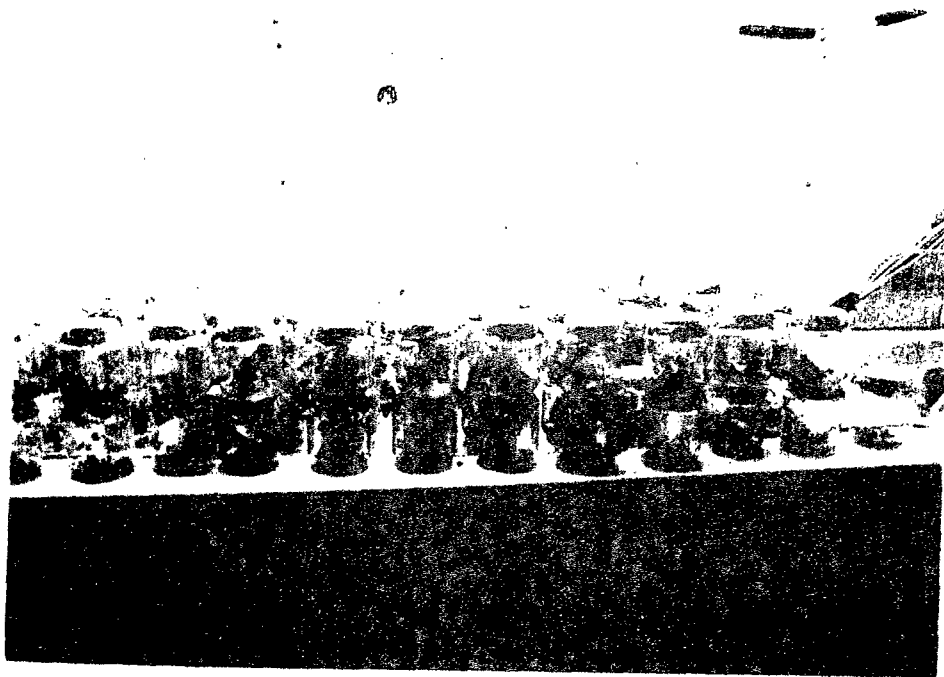


FIGURA 2.-CAMARA DE CRECIMIENTO

TABLA No. 3

CONCENTRACIONES HORMONALES UTILIZADAS.	
FASE DE ADAPTACION Y CRECIMIENTO.	
Auxinas (IBA)	1 mg/lit.
Citocinina (BA)	0.1 mg/lit.
Giberelina (GA <sub>3</sub> )	0.1 mg/lit.
FASE DE MULTIPLICACION	
Auxina (IBA)	1 mg/lit.
Citocinina (BA)	1 mg/lit.
Giberelina (GA <sub>3</sub> )	0.1 mg/lit.
FASE DE ENRAIZAMIENTO	
IBA	-----
BA	-----
GA <sub>3</sub>	-----

de 16 horas luz por 8 de oscuridad y la temperatura de 23° a 26°C durante el día y de 26° a 29°C por la noche.

La variación de la temperatura, al principio no se pudo controlar, posteriormente se pudo mantener con ayuda de un climatizador.

Periódicamente (cada 3 semanas aproximadamente) se estuvo transplantando el material a medio fresco, eliminándose, previamente al trasplante, las hojas maduras y seniles, partes necrosadas y en general tejido oxidado, esto para evitar la acumulación de sustancias tóxicas - perjudiciales al cultivo (Nitsh x Hernández, 1981). Las masas de brotes fueron divididas en grupos de 3 y 4 partes.

Se transplantaba todo aquel material que se mantuviera sin contaminación; aquellos que presentaban ataques de hongos y/o bacterias se eliminaron, obviamente para mantener la asepsia del cultivo.

Con esta fase se incrementa fuertemente la citocinina para inducir a una mayor proliferación de brotes y yemas auxiliares (Boxus, 1974; Pieniazek x Barba, 1981) -- (Ver tabla No. 3).

#### 3.4.- Fase de enraizamiento.

Para inducir al enraizamiento se deben eliminar las fuentes hormonales (Boxus 1974) (Zuccherelli, 1979), dejándose los explantes durante 4 semanas en este medio; - al final del lapso se pasaron a la fase de adaptación a invernadero.

#### 3.5.- Modificación de la Metodología.

Las rutas de multiplicación in vitro son dos: directa e indirecta (Abbot, 1978). Para este trabajo se -

siguió la ruta directa que pasa por diferentes fases como son la de adaptación, de multiplicación de brotes y enraizamiento, posteriormente se pasan al ambiente en plena tierra (in vivo). Esta ruta es la seguida por Boxus (1974), Damiano (1977) y Zuccherelli (1979) y la que tradicionalmente se sigue para hacer propagación masiva in vitro (Ver figura 3)

Pues bien, considerando que la fresa es una especie de alta capacidad rizógena, por un lado y por otro, que aunque no está muy claro el papel de las citocininas en el enraizamiento, se ha encontrado que influyen de una manera favorable en la formación de raíces laterales e incrementando el diámetro de la raíz primaria (Németh, 1979); y en este caso la cantidad de citocininas empleadas para la fase de multiplicación son suficientes para promover la proliferación y desarrollo de raíces.

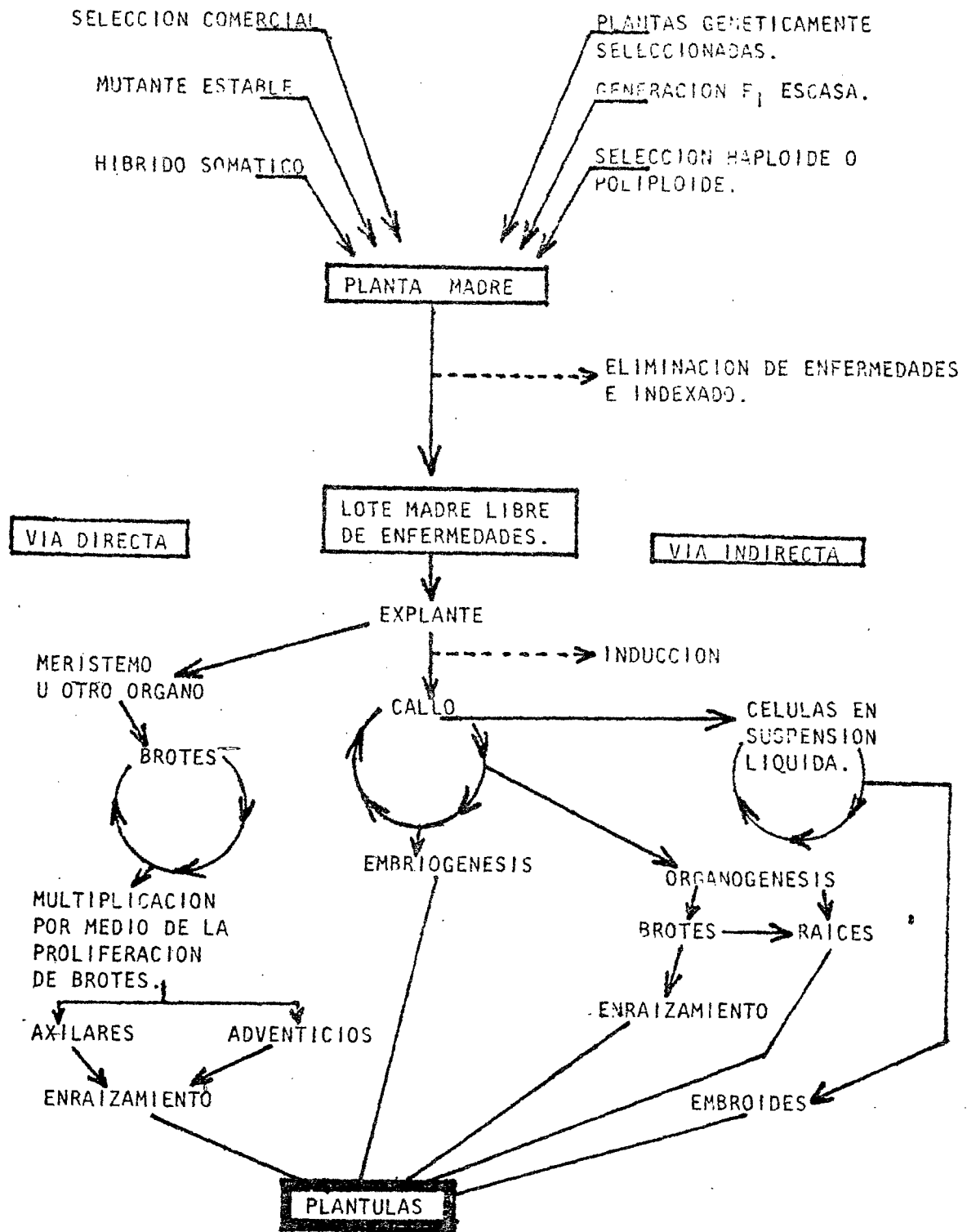
Además, Debergh y Maene (1981) consideran que el enraizamiento de los brotes in vitro es una labor particularmente delicada por el tipo de manejo que se debe hacer. Estos autores consideran que el proceso de enraizamiento in vitro se lleva aproximadamente un 35% de los costos totales de la planta producida in vitro.

Otros (Anderson y Neagher, 1978 x Debergh y Meane, 1981; y Donnan x Debergh y Meane, 1981) señalan hasta un 75% y un 56% del costo total en esta fase, respectivamente, mencionando diferentes especies.

Al dejar el explante durante más tiempo del recomendado (Boxus, 1974; Zuccherelli, 1979) en el medio de multiplicación, las plántulas producen raíces, por lo que consideramos que en un lapso de 10 a 11 semanas en este medio la planta ya estaba lista para pasarlas directamente a invernadero sin haber empleado el medio nutritivo -



FIGURA No. 3  
 RUTAS DE MULTIPLICACION Y REGENERACION DE PLANTAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS (MODIFICADO DE ABBOT, 1978).



de enraizamiento. ( Ver figura 4).

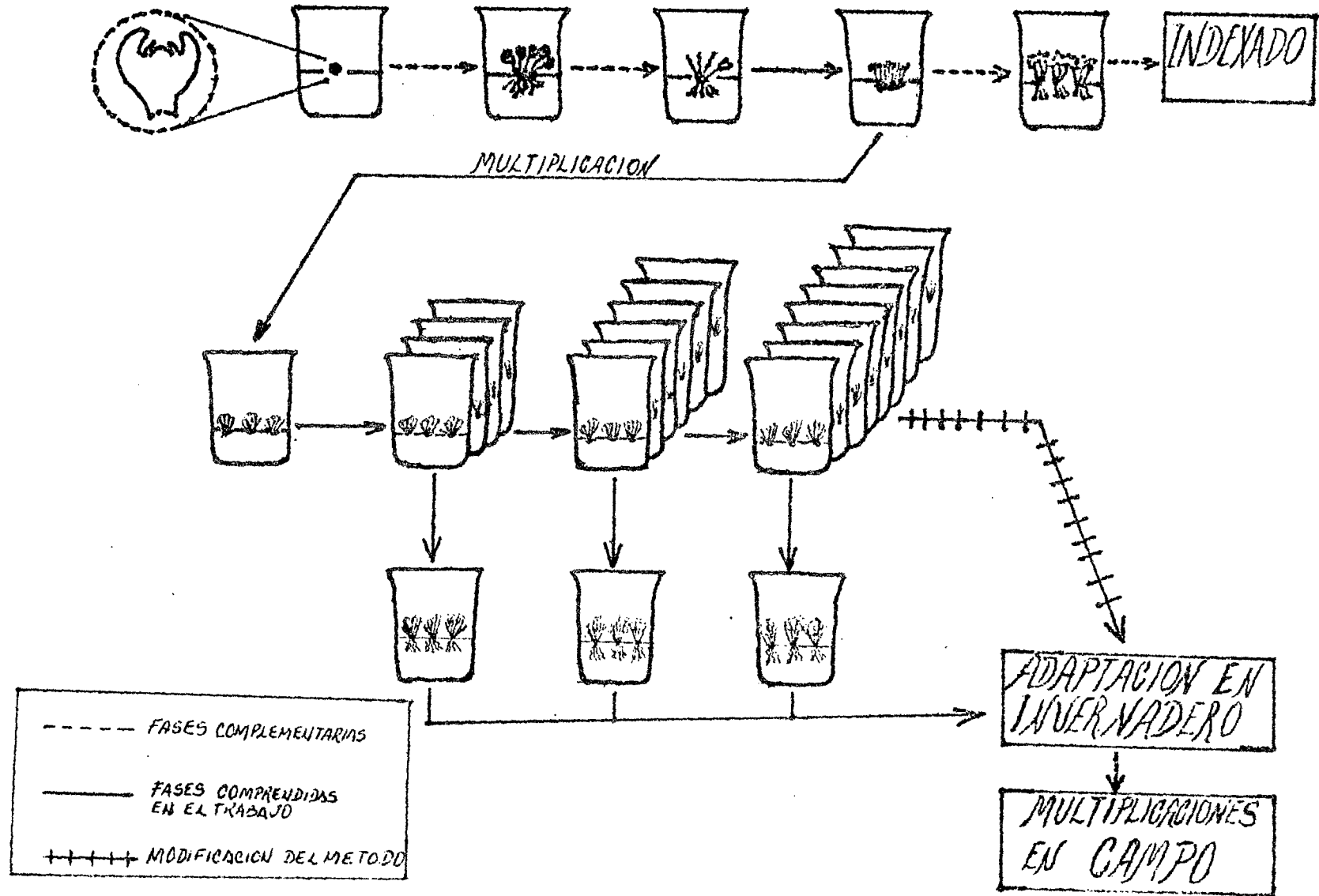
### 3.6.- Fase de Adaptación a Invernadero.

Las plántulas obtenidas in vitro se llevaron al invernadero y se colocaron en un sustrato formado en base a tierra de hoja, musgo y arena.

En este tiempo se les dieron riegos constantes hasta que la planta comenzó a producir estolones. Incluso - en algunas se observó producción de fruta.

FIGURA 4

ESQUEMA DE LA MICROPROPAGACION DE FRESA



#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSION.

##### Multiplicación de los Brotes.

Desde el momento de recibir el material y pasarlo a medio cultivo pasaron aproximadamente 17 días en los que las plántulas estuvieron bajo condiciones ambientales, lo que definitivamente afectó el desarrollo fisiológico normal de éstas. Además algunos brotes se presentaban alargados y blanquecinos, lo cual indica que probablemente estuvieron algún tiempo en refrigeración; también se presentaron algunas necrosis en el tejido.

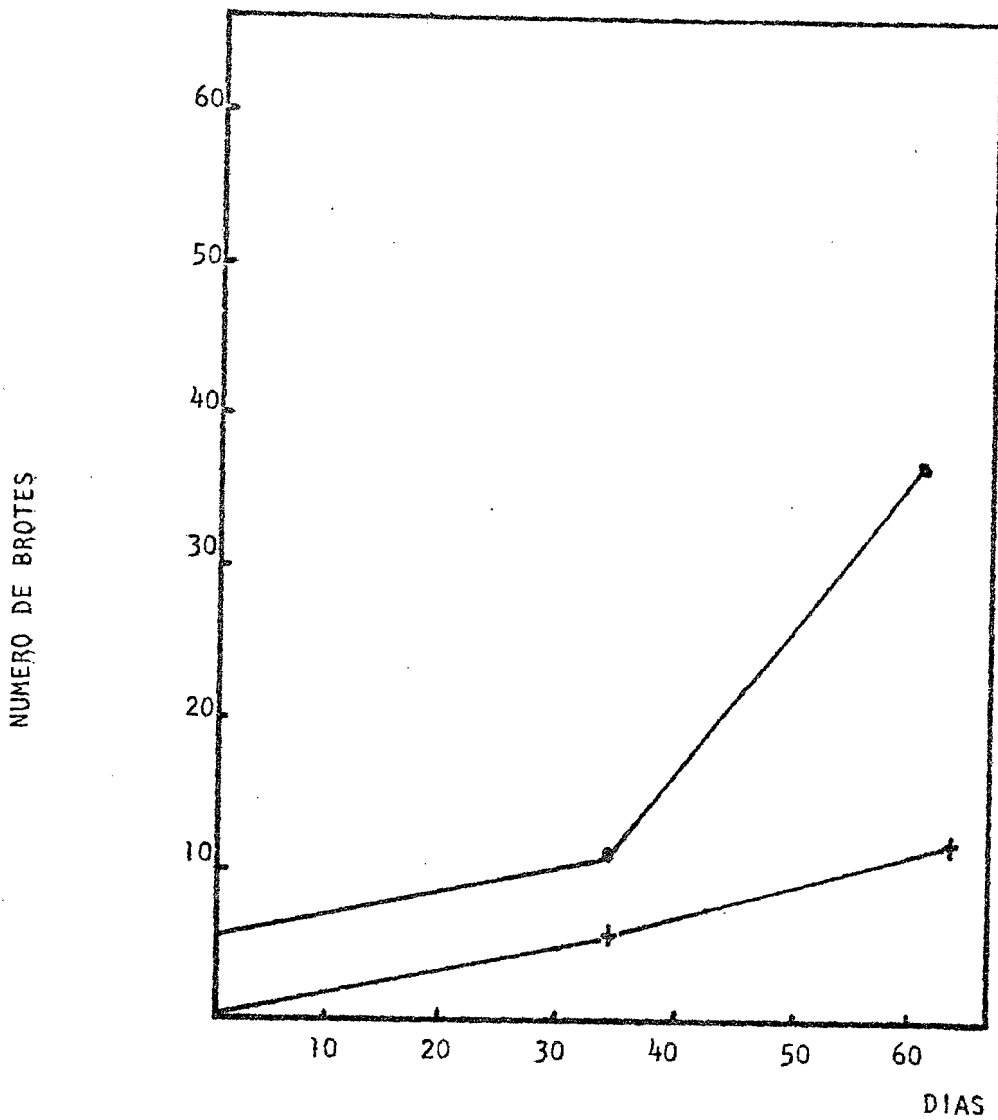
Esto influyó seguramente para que hubiera pérdidas de algunas plantas de los clones.

A los 37 días aproximadamente se transplantó el material a medio fresco y se hizo la primera división; en este momento se presentaba ya una ligera multiplicación de los brotes. También hubo que deshechar algunas plantas debido a contaminación.

Para los 60 días las plantas mostraban una tasa de multiplicación más o menos normal, influida seguramente por el nivel de citocininas (Boxus, 1974; Abbot, 1978; Debergh y Maene, 1981).

Después de 25 días se pasaron las plantas a medio fresco, siendo este el tercer trasplante y algunas plántulas mostraban pequeñas raíces (.5-.7 cms); por esto se confirmó lo reportado por Nemeth (1979), que las citocininas de alguna manera influyen en la producción de raíces. Estas raíces fueron eliminadas junto con partes necrosadas y hojas viejas.

En la gráfica 1 se puede observar el rango de multiplicación que presentaron ambas variedades en este lapso.



AFICA No. 1

MERO DE BROTES EN MULTIPLICACION OBTENIDOS EN LOS PRIMEROS 2 TRANSPLANTES.

TIOGA

ALISO

Debido a que el material estuvo expuesto a condiciones no adecuadas, como ya se mencionó, se decidió dejarlo un poco más de tiempo entre el tercer y cuarto trasplante para que acabara de ambientarse de nuevo a las condiciones de multiplicación en las que se estaba trabajando el material.

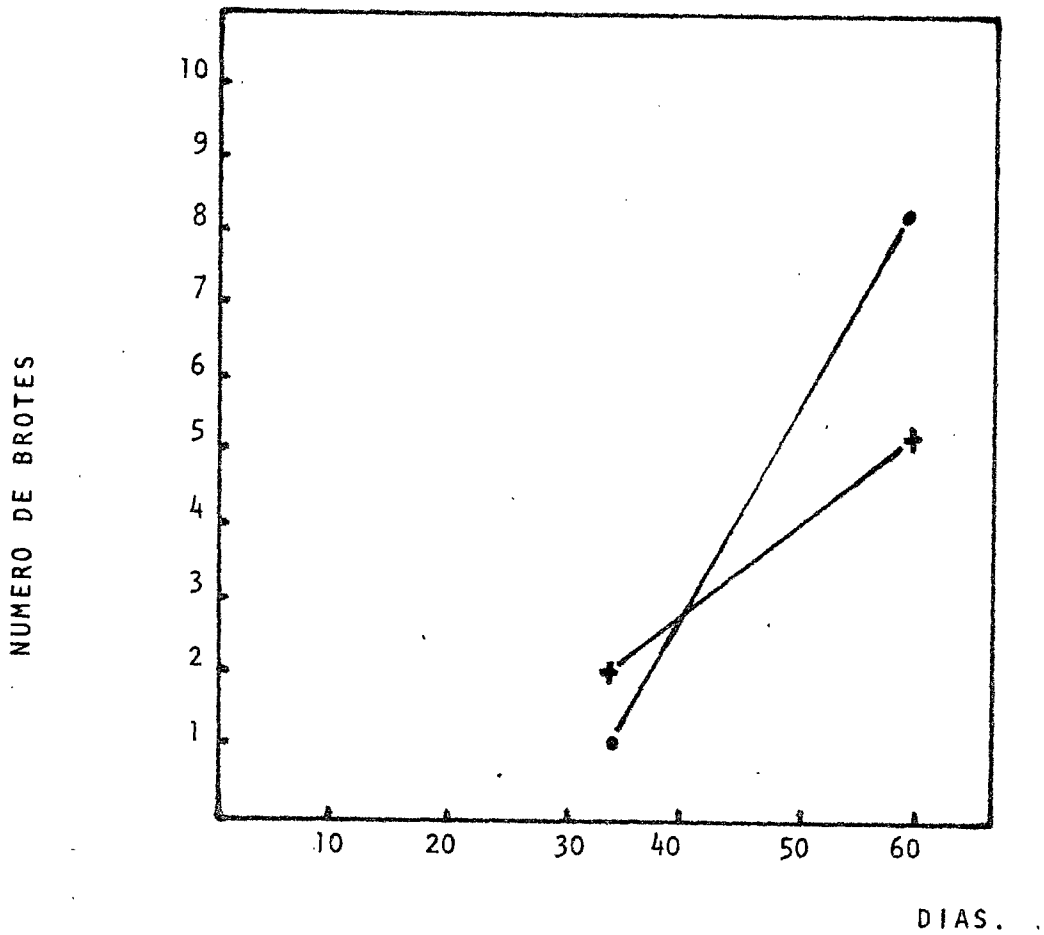
En la gráfica 2 se cuantifica el número de brotes - deshechados en este lapso a causa de la contaminación - provocada por hongos y/o bacterias.

Esta contaminación vino a afectar la potencialidad reportada (Boxus, 1974).

Tomando en cuenta desde el primer trasplante hasta el onceavo, la multiplicación de brotes fué distinta, en cuanto a su número, en las variedades.

Mientras que en la variedad "Aliso" se tuvo un total de 3850 brotes, en la "Tioga" se alcanzó un número de 5000 brotes (Gráfica 3), por lo que podemos observar que la última variedad tiene una tasa de multiplicación mayor que - la otra, coincidiendo así con los resultados reportados por Damiano, et. al. en 1979.

Como se puede apreciar en la Gráfica 4, el número de brotes se vió reducido debido a la contaminación; se nota claramente la cantidad, considerable, de plantas desechadas.

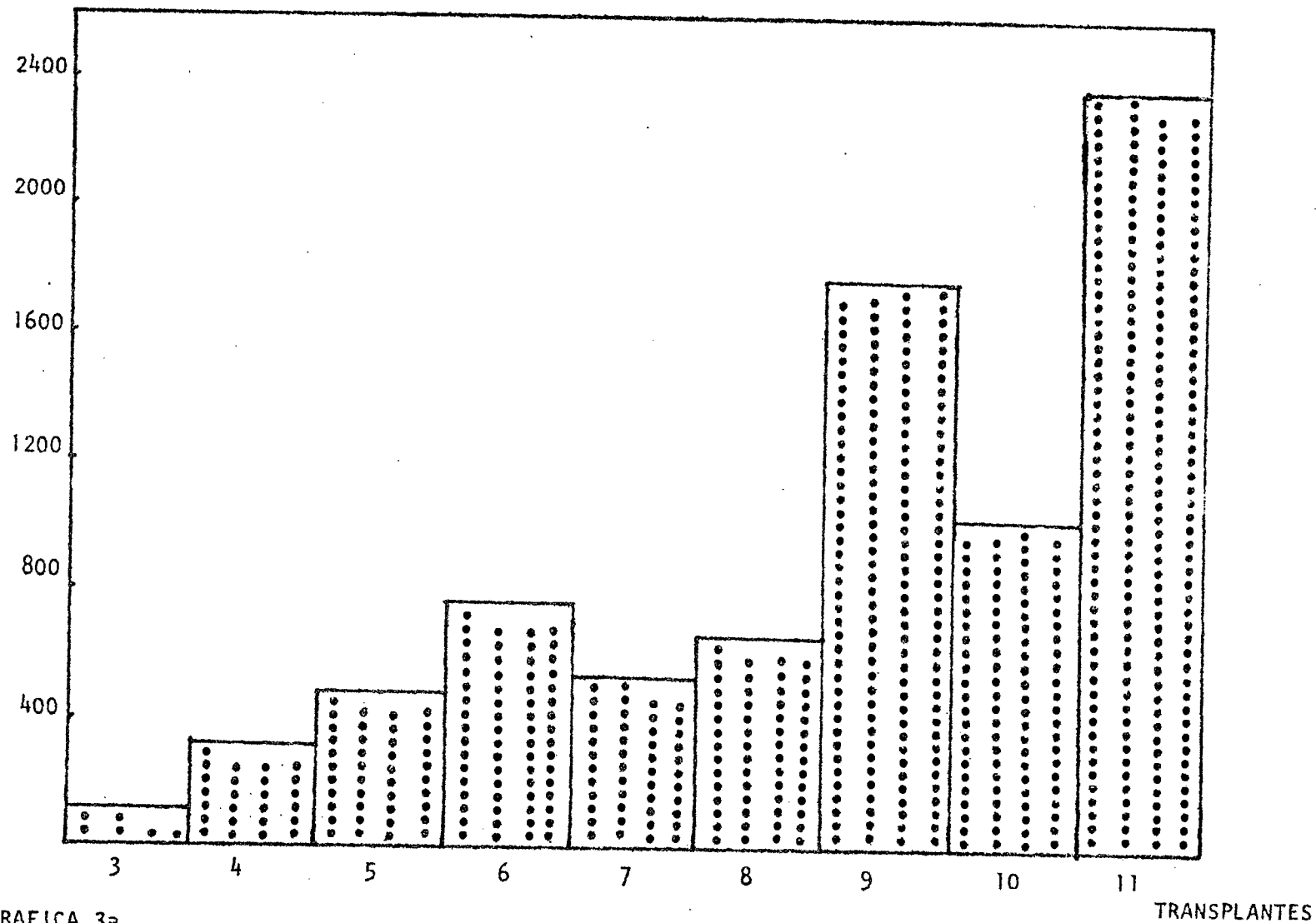


GRAFICA No. 2

PLANTAS DESHECHADAS POR CONTAMINACION EN LOS 2 PRIMEROS  
TRANSPLANTES.

● TIOGA

+ ALISO.

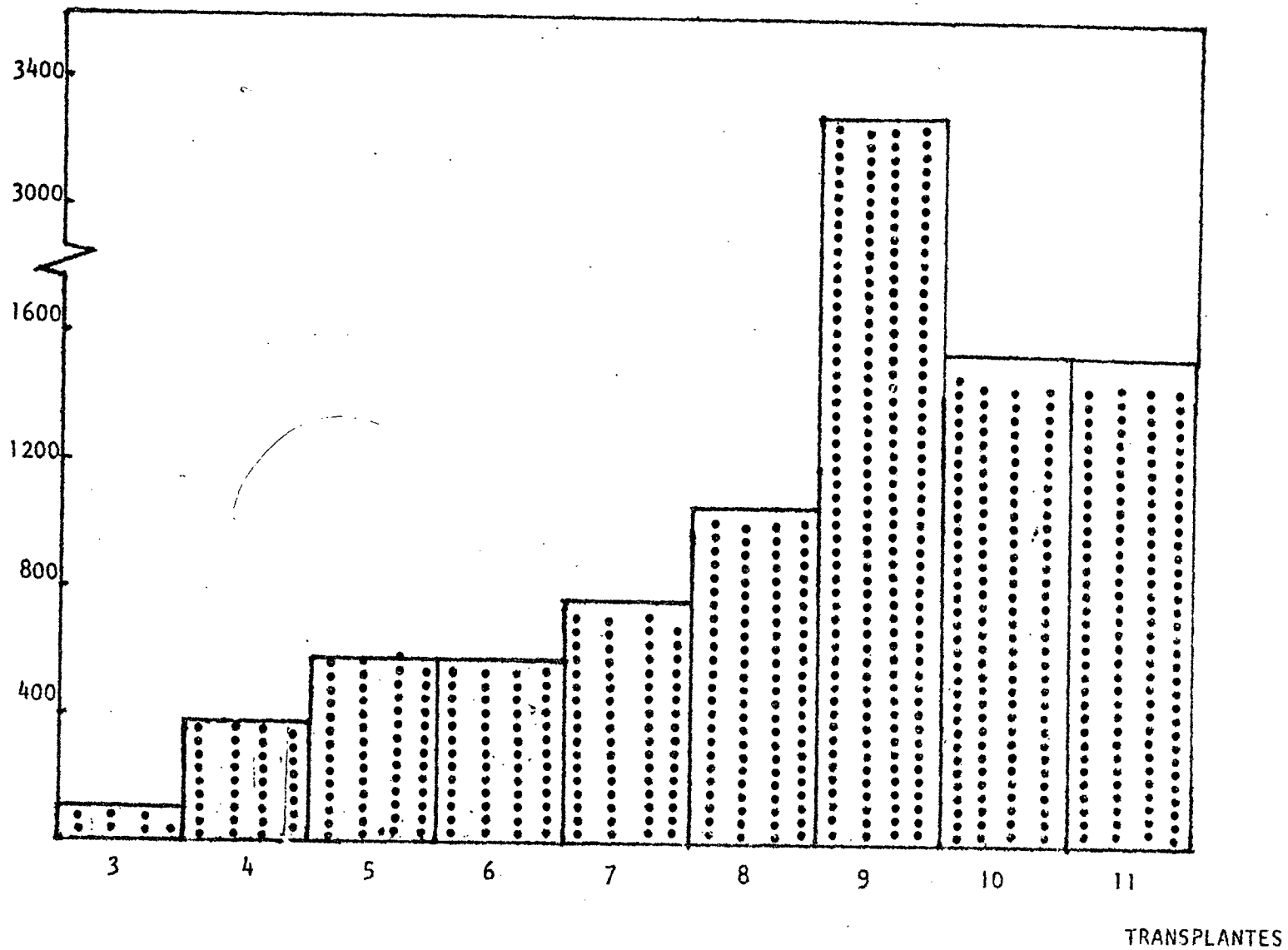


GRAFICA 3a.

NUMERO DE PLANTAS OBTENIDAS DE LA VARIEDAD "ALISO".

1 punto (•) = 10 plantas.

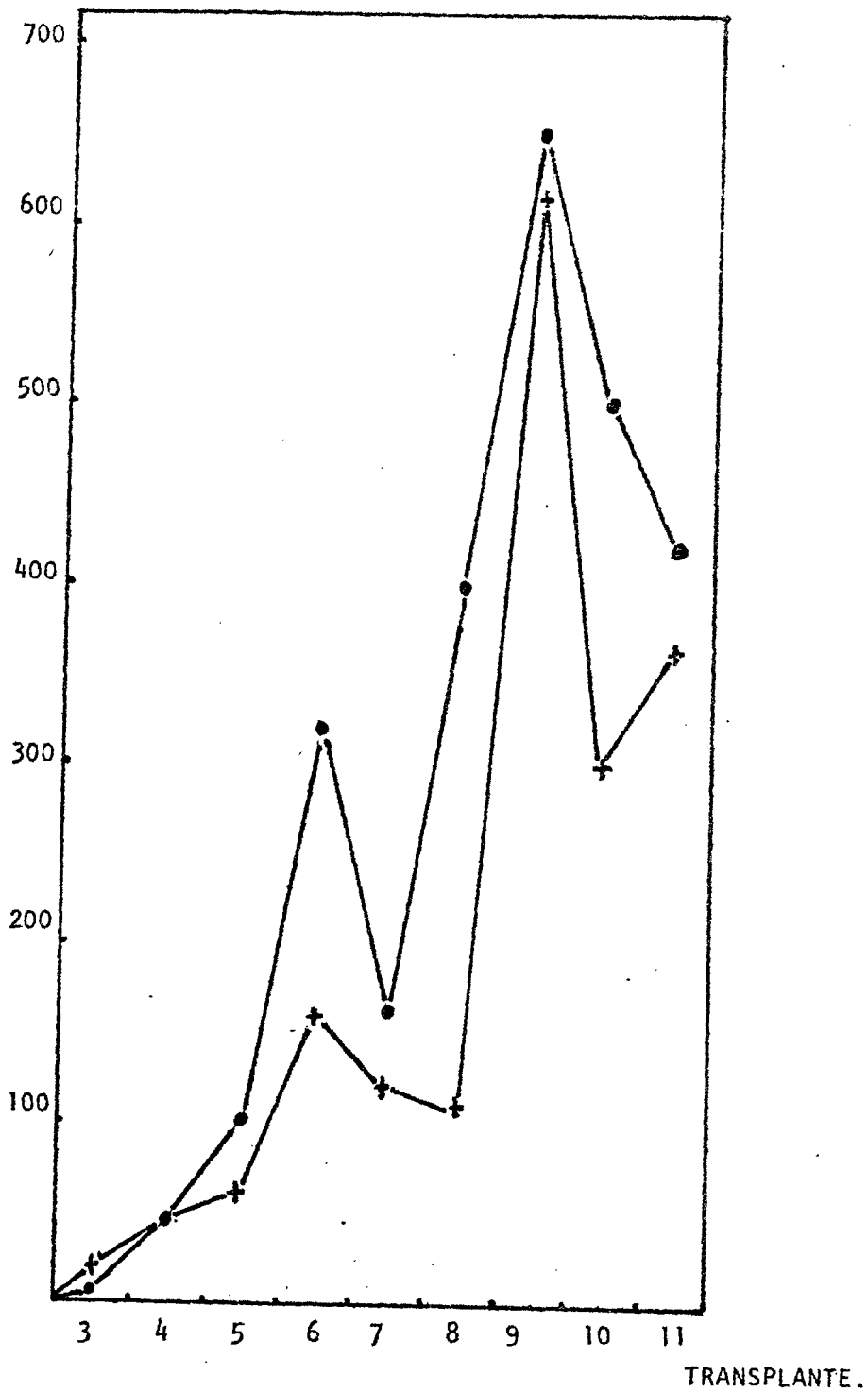




GRAFICA 3b.

NUMERO DE PLANTAS OBTENIDAS DE LA VARIEDAD "TIOGA"

1 punto (•) = 10 plantas



GRAFICA No. 4

PLANTAS DESHECHADAS POR CONTAMINACION.

● TIOGA  
+ ALISO

Además el hecho de que las plantas estén afectadas por patógeno hace que disminuyan su vigor (Smith, et al., 1970; Quak, 1977).

También se puede mencionar que las condiciones en la cámara de crecimiento, sobre todo las de temperatura, no fueron las óptimas y en ocasiones hubo variaciones hasta de  $\pm 8$  grados cuestión que merató la multiplicación de los brotes.

#### Enraizamiento.

Como se puede observar en la tabla 3 las hormonas se eliminan en esta fase, dejando los demás elementos del medio nutritivo en las mismas condiciones.

En ambas variedades se obtuvo un 100% de enraizamiento; a los 20 días, ya se tenían raíces bien formadas y 5 días después eran pasadas las plantas a invernadero (gráfica 5 ).

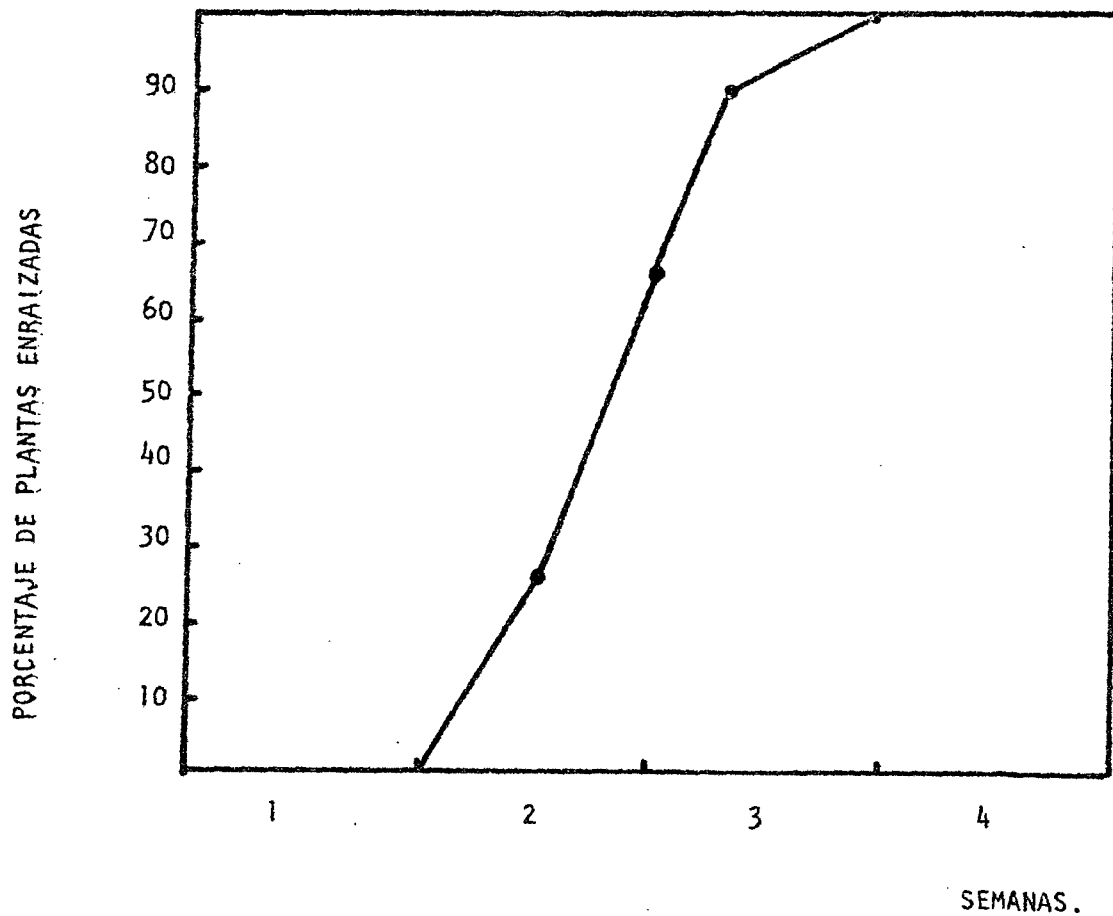
También en esta fase se tuvo el problema de contaminación, sin embargo las plantas no manifestaron alguna inhibición en la proliferación de raíces, aunque tuvieron que deshecharse por dicho problema.

Las plantas fueron pasadas a invernadero en el sustrato ya mencionado.

#### Modificación del Método.

Al considerar la facilidad de enraizamiento natural de la especie, se elimina como ya se pudo notar, cualquier hormona que estimule la emergencia y crecimiento de las raíces en el método reportado (Zuccherelli, 1979). Por lo que al haber dejado por algún tiempo más la planta en medio de multiplicación, ésta producía raíces.

La presencia de auxinas en este medio definitivamente



GRAFICA No. 5

TIEMPO EN QUE SE TUVO EL TOTAL DE PLANTAS ENRAIZADAS.

provocó el enraizamiento y la elongación radicular (Scott - 1972 y Hill, 1977 x Hernández, 1981), además, algo que también ya se tocó anteriormente, la cantidad de citocininas empleada influyó en este proceso de alguna manera (Németh, 1979), actuando sinérgicamente ambas hormonas.

Algunas plantas presentaron hasta 11 raíces, variando desde 7 hasta 16 y con una longitud de hasta 8 cm.

Al tener esta respuesta de las plantas a las 9 semanas de estar en el medio de multiplicación se evitó así el proceso de transplante de enraizamiento in vitro, detalle que ahorró tiempo y gasto de material, además de mano de obra.

Sin embargo, había que tomar en cuenta algunos detalles que son tratados en la parte de conclusiones.

#### Adaptación a Invernadero.

Al llegar a este punto, se siguió el método reportado - por Damiano (1977), en el que antes de pasar a invernadero se individualizan las plantas, motivo por el cual la manipulación es más fácil ya que éstas están más grandes y son más fácilmente separables.

Tanto en las plantas que se pusieron en medio de enraizamiento in vitro, como las que se dejaron en medio de multiplicación (en la modificación al método), se obtuvieron resultados similares.

En la tabla núm. 4 se comparan diferentes parámetros entre las plantas que se enraizaron directamente y aquellos - que siguieron la metodología señalada.

	PLANTAS ENRAIZADAS IN VITRO SIN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO			PLANTAS ENRAIZADAS IN VITRO EN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO		
LONGITUD inicial DE HOJAS (CM)	0.5	-	0.8	0.5	-	0.8
final	9.5	-	16.5	10.0	-	16.5
LONGITUD inicial DE PECIOLOS (CMS)	1.5	-	5.5	1.5	-	6.0
final	10.5	-	16.5	10.0	-	16.0
NUMERO MEDIO DE ESTOLONES POR PLANTA	15 <sup>a</sup>			14 <sup>b</sup>		
TIEMPO EN QUE COMENZARON A PRODUCIR ESTOLONES.	4.5 meses			4 meses		
TIEMPO EN QUE COMENZARON A PRODUCIR FRUTA	5 meses			5 meses		

TABLA No. 4

COMPARACION DEL COMPORTAMIENTO DE LAS PLANTAS EN INVERNADERO.

a) varió desde 11 hasta 33

b) varió desde 10 hasta 23



FIGURA 5.- VARIEDAD "ALISO" EN FASE DE MULTIPLICACION IN VITRO.



FIGURA 6.- VARIEDAD "TIOGA" EN FASE DE MULTIPLICACION IN VITRO.





FIGURA 7.- PLANTAS ENRAIZADAS IN VITRO DE AMBAS VARIEDADES.

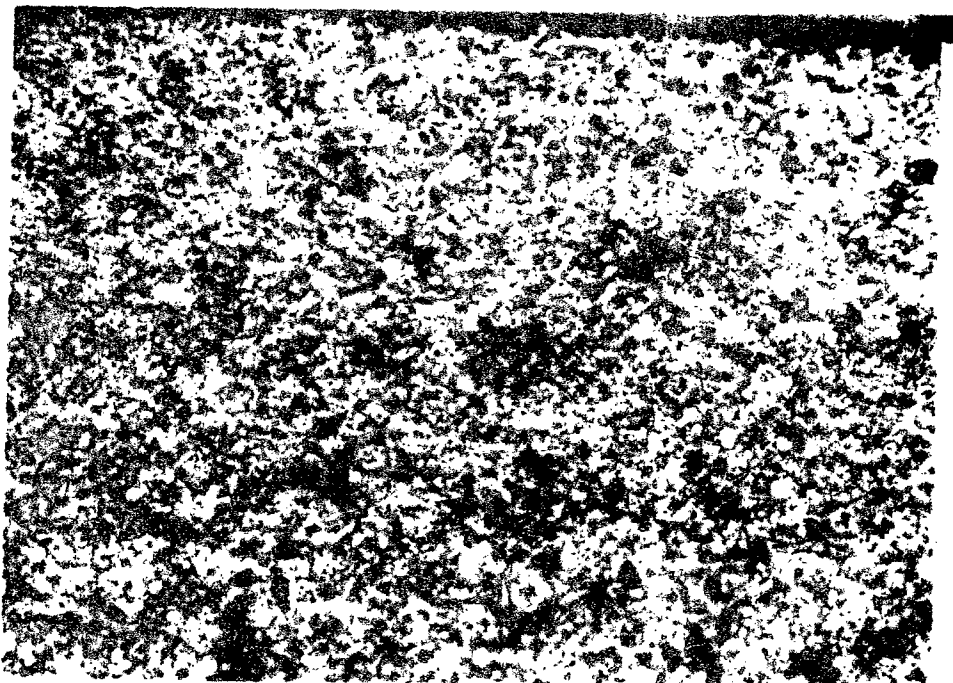


FIGURA 8.- PLANTAS EN FASE DE ADAPTACION A INVERNADERO.



FIGURA 9 - ASPECTO GENERAL DE LAS PLANTAS EN INVERNADERO

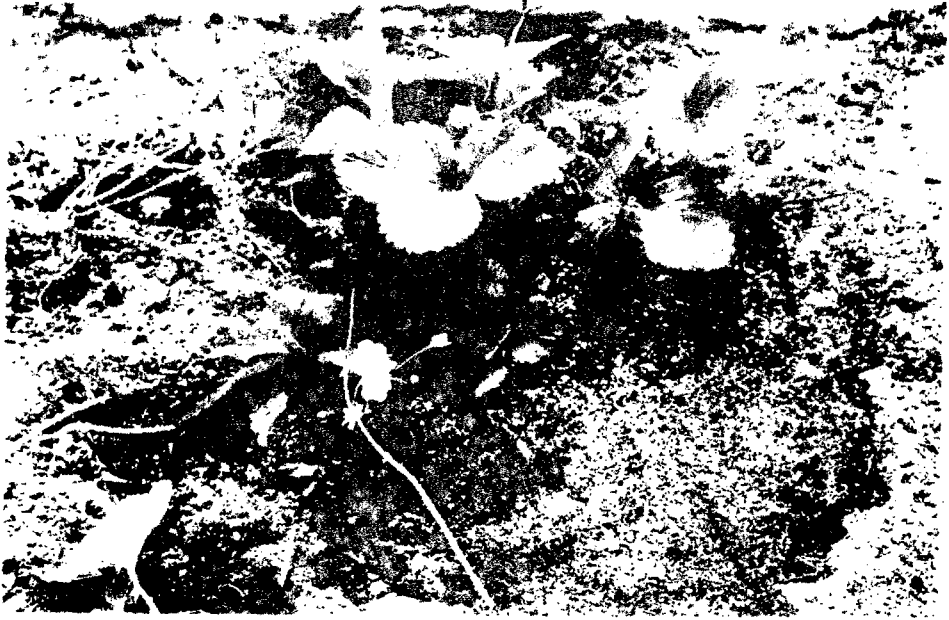


FIGURA 10.- PLANTA PRODUCIENDO ESTOLONES.

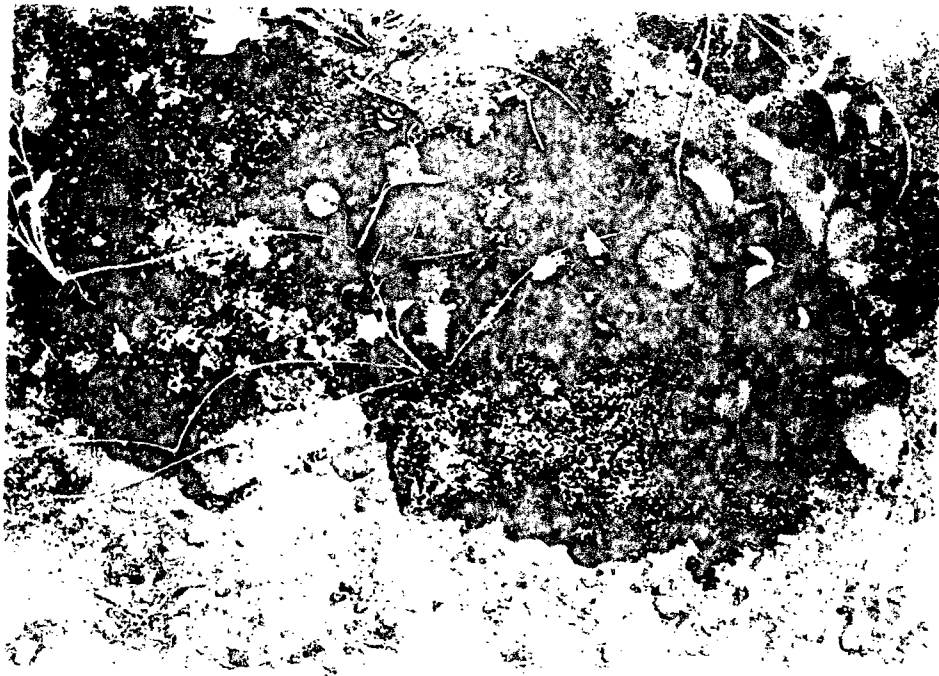


FIGURA 11.- DETALLE DE ESTOLONES PROVENIENTES DE UNA SOLA PLANTA.

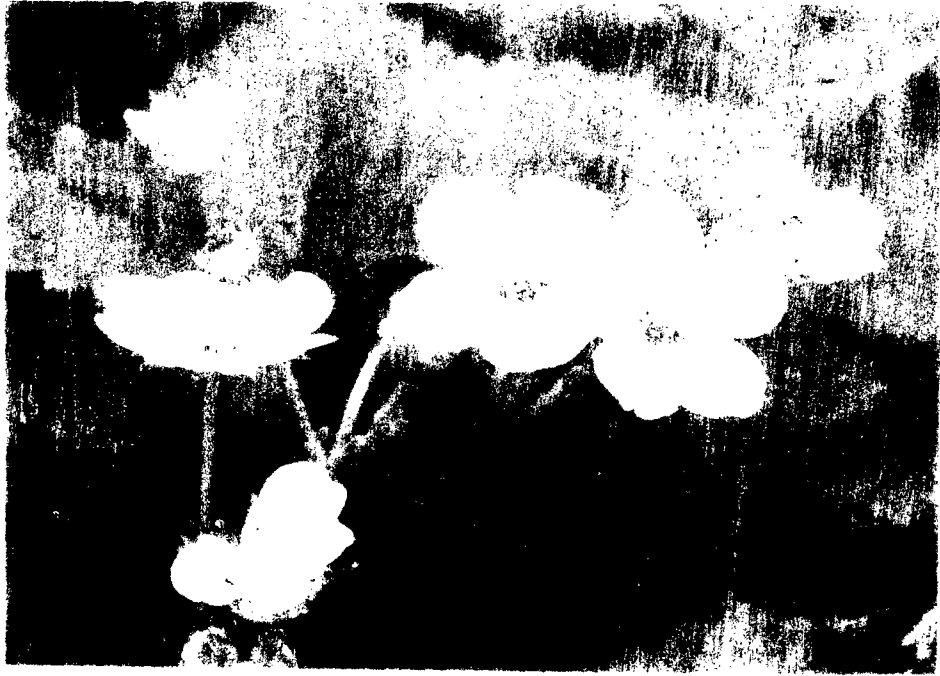


FIGURA 12 - FLOREACION EN PLANTAS CUARTADAS EN UNO Y DOS AÑOS

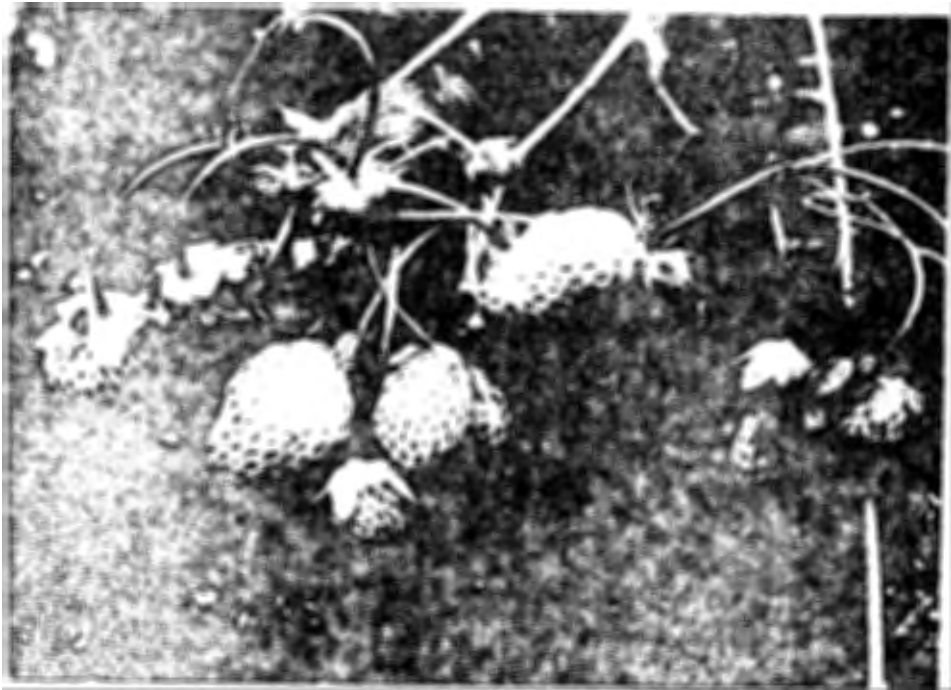


FIGURA 13.- FRUCTIFICACION DE LAS PLANTAS EN INVERNADERO.  
(NOTESE EL NUMERO DE FRUTOS EN UN RACIMO).

## 5.- CONCLUSIONES.

- En lo referente al método en sí tiene grandes ventajas, más se hace necesario investigar y seguir trabajando en la optimización del mismo, cuestión que da la pauta para realizar un gran número de investigaciones posteriores a diferentes niveles.
- En base a los resultados obtenidos, avalados por el éxito - que se ha tenido en otros trabajos, se puede pensar en que la metodología ha sido mejorada en una pequeña parte, aunque hay que revisar algunos detalles, lo que nos daría mayor información que complementarían este trabajo, y estos puntos serían:
  - a) Tiempo adecuado y mínimo en la fase de enraizamiento directo.
  - b) Buscar concentraciones, rangos hormonales precisos para favorecer la emisión y elongación de raíces.
  - c) Probar diferentes sustratos en la adaptación a invernadero.
  - d) Llevar las plantas a pleno campo para evaluar su capacidad estolonífera.
  - e) También evaluar su capacidad en cuanto a producción de fruta y su calidad.
  - f) Hacer un análisis económico de tal modificación, evaluando, ahorro de material y mano de obra contra número de plantas y tiempo, por ejemplo.
- Por la potencialidad que promete el método se hace más evidente la falla en la manipulación que se tuvo a lo largo -- del trabajo y en las diferentes fases del mismo.
- Las condiciones en las que estuvieron las plantas, tanto en laboratorio como en el invernadero, causaron pérdida de gran



des cantidades de material, además que se menoscabó y afectó la fisiología de las plantas, por lo que su multiplicación - también se vió restringida.

- Superando lo mencionado en los dos puntos anteriores el método puede llevarse a niveles comerciales, o sea proveer a los viveristas del país, como se hace ya desde hace tiempo en diferentes países. Esto sería la aplicación final de este trabajo.

Todo esto encaminaría y seguramente con pasos firmes y gigantados a la realización del último objetivo del trabajo para poder liberarnos, al menos en algún punto de esto, de la dependencia extranjera y así dejar de ser, como diría el Dr. --- Ernst Feder "el campo e industria de fresa que tienen los Estados Unidos en México".

## 6.- BIBLIOGRAFIA.

- Abbot, A. 1978. Practice and Promise of micropropagation of woody species. Acta Hort. 79: 113-127.
- Adams, An Improved Medium for Strawberry Meristem Culture. J. Hort. Sci. 47, 263-264.
- Alisina, L. 1978. Cultivo de fresas y fresones. Ed. Sintes, S.A. España.
- Barba, A.A. 1981. Propagación vegetativa "in vitro" de los portainjertos EM-26 y MM-106 del manzano (*Malus sylvestris*, Mill.). Estudios Preliminares. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias, UNAM. México.
- Belkengren, R.O. y Miller, P.W. 1962. Culture of apical meristem of Fragaria vesca strawberry plants as a method of excluding latent A virus. Plant Dis. Repr. 46, 119-121.
- Bini, G. 1977. La propagazione clonale "in vitro" (micropropagazione). L'Informatore Agrario. 48:28637-28645.
- Bonga, J.M. 1979. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala, F. y col. (Ed.) 253-264.- Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.
- Boxus, Ph. 1974. The Production of Strawberry Plants by "in vitro" micro-propagation. J. Hort. Sci., 49, 209-210.
- Boxus, Ph. y Druart, Ph. 1979. Micropropagation, an industrial propagation method of quality plants true type and at reasonable price. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala, F. y col. (Ed.) 265-269. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.

- Boxus, Ph., QUOIRIN, M. y Laine, J.M. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue cultere. En: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell. Tissue and Organ Culture. Rienert, J. and Bajaj, Y.P.S. (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
  
- Bozzini, A. 1979. Plant cell cultures and their possible impact in improving crop production in the developing world. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala, F. y col. (Ed.) 3-9. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.
  
- Centrale Ortofrutticola alla Produzione. 1979. Laboratorio per la Propagazine "in vitro" delle Piante Orto-Floro-Frutticole. En: 2a. Giornats sulla Micropropagazione. Cesena, Italia.
  
- CONAFRUT. 1979. Estadísticas básicas nacionales. Subdirección de Operación Frutícola. México.
  
- Converse, R.H. 1981. The Israeli Strawberry industry Hort -- science 16 (1).
  
- Damiano, C. 1977. La ripresa vegetativa di piantine di fragola provenienti da coltura "in vitro". Frutticoltura. 2,3-7.
  
- Damiano, C. 1978. Il carbone attivo nella coltura "in vitro" - della Fragola. Frutticoltura. 5:49-50.
  
- Damiano, C. Laneri, U., Arias, E. J. 1979. Nota preliminare sulla utilizzazione dell'azoto nitrico ed ammoniacale in coltura in vitro di Fragola. Ann. Ist.Sper. Frutticoltura -- (Vol.10).

- Dayalos, P. 1983. Comunicación Personal.
- Debergh, P.C. y Maene. L. J. 1981. A scheme for commercial - propagation of ornamental plants by tissue culture. -- Scientia Horticulturae 14: 335-345. The Netherlands.
- De Fossard, R. 1976. Tissue culture for plant propagators. - University of New England Printery. Australia.
- De Fossard, R. 1978. Nuclear stocks, multiplication rates and economic considerations of tissue culture propagation of horticultural species. En: Proceedings of Symposium of - Plant Tissue Culture. Science Press (Ed.), 439447. Peking.
- D.G.E.A. 1979. Programa siembra exportación de fresa para la temporada 1978-1979.
- Durzan, D.J. 1979. Prospects for mass propagation of economi- cally important conifers by cell and tissue culture. En:- Plant; Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala F. y col. (Ed.) 283-288. Elsevier North-Holland Biomedical -- Press. The Netherlands.
- Gamborg, O., Murashige, T., Thorpe, T. y Vasil, L. 1976 Plant tissue culture media. In vitro. 12 (7): 473:478.
- Hartmann, H. y Kester, D. 1980. Propagación de Plantas. Prin- cipios y Prácticas. C.E.C.S.A. 2a. Ed. México. pp.639-66 6.690-692.
- Hernández, P.L. 1981. Propagación Masiva "in vitro" de Dos -- cultivares de Violeta Africana (Saintpaula Ionantha, -- Wendl). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias.UNAM.ME- XICO.

- Hussey, C. 1980. "In Vitro" propagation. En: Tissue Culture - Methods for Plants Pathologists. Ingram, D.S. y Helgeson, J.P. (Ed.) 51-61. Blackwell Scientific Publications Oxford.
- Ingram, D.S. 1980. Tissue culture methods in plant pathology. En Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Ingram, D.S. y Helgeson, J.P. (Ed.) Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Langhans, R.W., Horst, R.K. and Earle, E.D. 1977. Disease-free Plants via Tissue culture Propagation. Hortsci. Vol.12 (12): 149-150.
- Levine, B.S. 1982. Desarrollo metodológico para la propagación vegetativa "in vitro" del aguacatero. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala, UNAM. México.
- Maeda, E., Villalobos, A. y Sugiura, T. 1978. Fine structure of regenerating cells in Fragaria anther cultures, Japan J. Breed. 28 (2): 143-146.
- Minocha, S.C. 1979. Cell and tissue Culture in the Propagation of Forest Trees. En: Plant Cell Cultures: Results and -- Perspectives. Sala F. y col. (Ed) 295-303. Elsevier North Holland Biomedical Press. The Netherlands.
- Mullin, R.H. y Schlegel, D.E. 1976. Cold Storage maintenance of strawberry meristem plants. HortSci. 11 (2):100-101.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid - growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15.

- Németh, G. 1979. Benziladenine-stimulated rooting in fruit-tree rootstocks cultured "in vitro". Z. Pflanzenphysiol. Bd. 95 S: 389-396.
  - Nishi, S. y Ohsawa, K. 1973. Mass production method of virus free strawberry plants through meristem callus. JARQ.7 (3): 189-194.
  - Quak, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. En: - Applied and fundamental Aspects of plant Cell, Tissue - and Organ culture. Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (Ed.) Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. Germany.
  - Rosati, P. and Devereux, M. 1975. Anther culture of strawberry. Hort Sci. 10:119-120.
  - Rosati, P. y Tognoni, F. 1979. Propagazione su vasta Scala - delle Specie Ortoflorofrutticole: Tecnica de coltura ed organizzazione del laboratorio. En: Incontro su: "Tecniche di Colture "in vitro" per la Propagazione su vasta scala delle specie Ortoflorofrutticole". Pistoia, Italia.
  - Sala F., Parisi, B. Cella, R. y Ciferri, O. 1979. Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Elsevier North-Holland Biomedical Press, The Netherlands.
- Salas, V.M. 1969. La fresa y el desarrollo agrícola de la zona de Zamora. Banco Nacional Agropecuario. México.
- Scott, D.H. y Lawrence, F.J. 1975. Strawberries. En: Advances in Fruit Breeding. Janick, J. and Moore, J.N. (Ed.) 71-97 Purdue Univ. Press. Indiana. U.S.A.
  - Seeling, E.A. 1975. Fruit an Vegetables Facts and Pointers: Strawberries. United Fresh an Fruit and Vegetables Ass. (Ed.) U.S.A..

- Slowik, B. y Villalobos, A.V. 1975 Ensayo de la metodología del cultivo de meristemas de fresa, Notas breves de Genética, 181-184, Araciencia, No. 21. Chapingo, México,
- Smith, S.H., Hilton R.E. y Frazier, N.W. 1970. Meristem culture for elimination of Strawberry viruses. Calif. Agric. 24 (8); 9-10.
- Street, H. 1977. Plant tissue and cell culture. Ed. H.E. -- Street. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Villalobos, A.V. 1980. Plantas libres de Virus. Ciencia y Desarrollo. Año VI. No. 33. 36-49. México.
- Villalobos, A.V. y Ortega, O.C. 1978. Cultivo Meristemático de Fragaria spp. "in vitro". Nueva Epoca, No. 10. Chapingo, México.
- Wilhelm, S. y Sagen, J.E. 1974. A History of the Strawberry. - University of California. Division of Agricultural Sci.
- Zimmerman, R.H. 1980. Fruit plants micropropagation at Beltsville Fruit Laboratory and in North America. Riv. Ortofrutticola Italiana. 64: 241-256.
- Zuccherelli, G. 1979. Moltiplicazione "in vitro" dei portinnesti clonali del pesco. Frutticoltura. 2:15-20.
- Zuccherelli, G. 1979. Tecniche di Propagazione Industriale delle Piantine di Fragola de Colture "in vitro" per il Vivaio. En: Incontro Nazionale S.O.I. sulla "Cultura della Fragola". 169-178. Ferrara, Italia.

## LITERATURA CONSULTADA

- Deylin, R. 1980, Fisiología Vegetal. Ed. Omega. España.
- Evans., L.F. 1969. The Induction of Flowering. *Fragaria*. Cornell Univ. Press.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.