

# Efecto de fitohormonas sintéticas y un extracto vegetal en el cultivo *in vitro* de *Fragaria x ananassa* Duch.

## Effect of phytohormones and a plant extract on in vitro culture of *Fragaria x ananassa* Duch.

Stefanía Giselle Venegas Tarancón <sup>1,2,3</sup>, María Victoria Usandivaras  <sup>1,4</sup>, Alicia Inés Mamani de Marchese  <sup>1,5</sup>, María Paula Filippone  <sup>1,2,6</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina. <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones científicas y técnicas. Tucumán, Argentina.

<sup>3</sup>✉ svtarancon92@gmail.com; <sup>4</sup>✉ victoriausandivara@gmail.com; <sup>5</sup>✉ al\_mam@yahoo.com.ar; <sup>6</sup>✉ paulafilippone2018@gmail.com



<https://doi.org/10.15446/acag.v73n2.113496>

2024 | 73-2 p 143-150 | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 | Rec.: 2024-03-15 Acep.: 2025-05-04

## Resumen

Las hormonas sintéticas son las más comúnmente empleadas en el cultivo de tejidos vegetales, sin embargo, las fuentes naturales de reguladores de crecimiento son una alternativa poco extendida y estudiada. En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes fitohormonas sintéticas y de un extracto de hojas de frutilla (EHF) en la implantación de ápices meristemáticos y en la capacidad para estimular el desarrollo *in vitro* de plantas completas del cultivar Camino Real de *Fragaria ananassa*. Para la implantación de meristemas se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog) suplementado con bencilaminopurina (BAP), ácido indolbutírico (AIB), ácido giberélico (AG) y el EHF. Una implantación de ápices del 100 % se obtuvo en los tratamientos con AG aplicados individualmente (0.1 y 0.05 mg.L<sup>-1</sup>), así como en las combinaciones AG 0.1 mg.L<sup>-1</sup>+BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup> y AG 0.05 mg.L<sup>-1</sup>+BAP 1 mg.L<sup>-1</sup>, y con las 3 concentraciones del EHF en combinación con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Los tratamientos con EHF y EHF+BAP presentaron menor porcentaje de contaminación y oxidación, respectivamente. El EHF mejoró el efecto del BAP tanto en micropagación como en enraizamiento. El enraizamiento directo en sustrato aceleró el desarrollo de raíces y permitió obtener vitroplantas en menor tiempo.

**Palabras clave:** compuestos fenólicos, frutilla, hormonas vegetales, meristema, micropagación.

## Abstract

Synthetic hormones are commonly used in plant tissue culture, but natural sources of growth regulators are a less studied alternative. This study evaluated the effect of different synthetic phytohormones and a strawberry leaf extract (EHF) on the implantation of meristematic apices and the *in vitro* development of whole plants of the Camino Real cultivar of *Fragaria ananassa*. Meristem implantation was carried out using MS medium (Murashige and Skoog) supplemented with benzylaminopurine (BAP), indolbutyric acid (IBA), gibberellic acid (GA), and EHF. A 100 % apex implantation rate was achieved in treatments where GA was applied individually at concentrations of 0.1 and 0.05 mg.L<sup>-1</sup>. The same result was observed in the following combinations: GA (0.05 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (0.5 mg.L<sup>-1</sup>), GA (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (0.5 mg.L<sup>-1</sup>), and GA (0.05 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), as well as in all treatments combining the three concentrations of EHF with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. EHF improved the effect of BAP in both micropagation and rooting. Direct rooting in the substrate accelerated root development and allowed the production of vitroplants in less time.

**Keywords:** Meristem, micropagation, phenolic compounds, phytohormones, strawberry.

## Introducción

La frutilla o fresa (*Fragaria x ananassa*) es uno de los berries con mayor valor económico a nivel mundial por su calidad organoléptica y nutricional, por lo que es un cultivo de alta relevancia en Tucumán y en Argentina en general (Tomas-Grau et al., 2020). La propagación comercial es agámica a partir de estolones, lo que favorece la acumulación de patógenos sistémicos que deterioran el cultivo (Vallith y Mondal, 2023). Por ello, el saneamiento mediante el cultivo *in vitro* de las células meristemáticas es una alternativa para obtener plantas sanas, vigorosas y en grandes cantidades (Bello-Bello et al., 2022). El meristema aislado se cultiva en un medio salino artificial y en condiciones especiales optimizadas para cada genotipo (Dhukate et al., 2021).

La contaminación y la oxidación del explanto son factores importantes a controlar, especialmente durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* (Neri et al., 2022), aunque el éxito de esta técnica se debe a sustancias reguladoras del crecimiento o fitohormonas. Las citoquininas, las auxinas y las giberelinas son los 3 reguladores del crecimiento más utilizados (Sarıdaş et al., 2021), y la determinación del tipo, concentración y balance resulta determinante para cada genotipo y objetivo perseguido con el cultivo *in vitro*. Como una alternativa más ecológica y económica, existen reportes del uso de fuentes naturales, como extractos vegetales o de microorganismos (Kulus y Miler, 2021). Estos pueden tener metabolitos con actividad hormonal, pero también pueden contribuir en la nutrición o en protección contra el estrés oxidativo y/o la contaminación (Nardi et al., 2016).

Previamente hemos purificado e identificado metabolitos bioactivos de hojas de frutilla (*Fragaria ananassa*) con capacidad antioxidante, antimicrobiana e inductora del crecimiento vegetal. 2 de los compuestos pertenecen al grupo de los taninos hidrolizables denominados HeT y HgT (Mamani et al., 2012), y el tercer compuesto es un éster de ácido graso trisacárido (SAGs) con actividad sobre la vía de respuesta a las auxinas (Grellet-Bourbonville et al., 2020). De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la combinación de diferentes reguladores de crecimiento sintéticos y de un extracto de hojas de frutilla (EHF), en el cultivo *in vitro* de una variedad comercial de frutilla (cultivar, cv. Camino Real de *Fragaria ananassa*).

## Materiales y métodos

### Material vegetal y desinfección del explanto

Se colectaron estolones de 1-2 cm de plantas de la variedad Camino Real de *Fragaria ananassa*, de la colección de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de

la Universidad Nacional de Tucumán (FAZ-UNT). Los estolones fueron lavados con agua corriente (10 min), y desinfectados con 70 % (v/v) de etanol (1 min), 5 % de hipoclorito de sodio (5 min), y 3 enjuagues con agua destilada estéril.

### Obtención del EHF

La preparación del EHF se realizó de acuerdo con Grellet-Bourbonville et al., (2021); 10 g de hojas secas molidas se maceraron con 100 ml de metanol 80 % (v/v), durante 24 h a 25 °C y en agitación. El homogenato hidroalcohólico se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio al vacío a 50 °C. El extracto concentrado fue mantenido a 4 °C hasta el momento de su utilización. Posteriormente, fue diluido con agua destilada estéril de acuerdo con las concentraciones utilizadas.

### Implantación

Los medios utilizados se prepararon a partir de medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas y mioinositol (Neolab, Argentina), sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup> y phytigel 4 g.L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 5.8. Los medios fueron suplementados con bencilaminopurina (BAP), ácido giberélico (AG), ácido indol-butírico (AIB) y el extracto vegetal de hojas de frutilla (EHF). Los meristemas apicales se sembraron en tubos de vidrio de 40 cc y fueron mantenidos en condiciones controladas (25±2 °C, 16 hs de luz, de 45 µ mol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). A las 4 semanas se evaluó: contaminación (%), oxidación (%), implantación (%), coloración, diámetro (< de 0.5 cm, entre 0.5 y 1 cm, > a 1 cm) y morfología del brote.

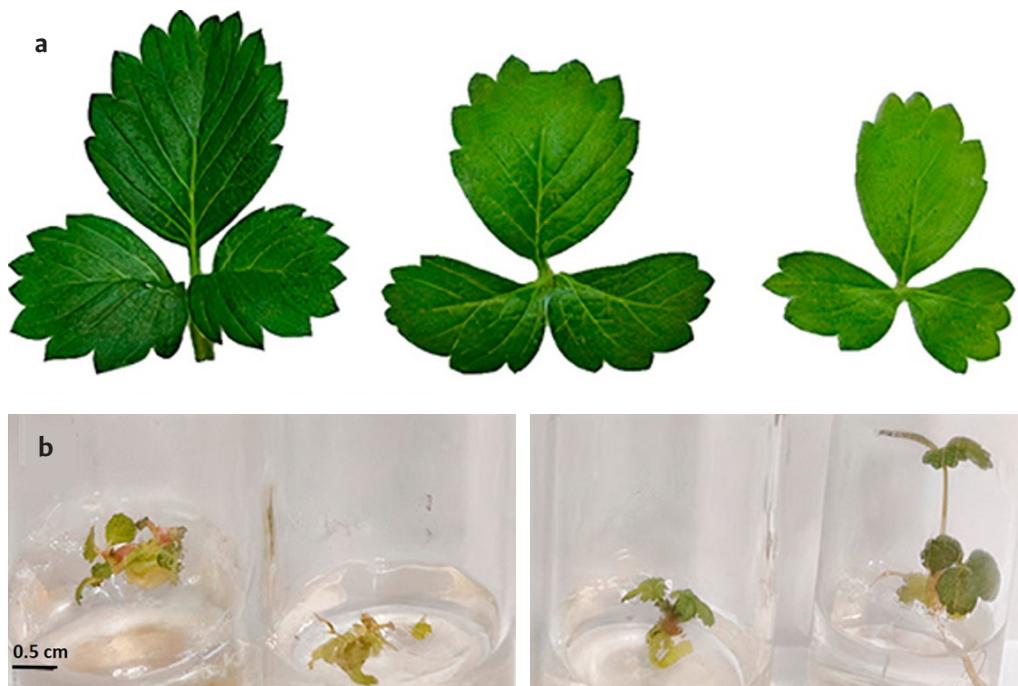
El índice de verdor se midió utilizando un medidor de clorofila Minolta SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japón), estos datos se expresaron como valores SPAD (valor numérico proporcional a la cantidad de clorofila en la hoja), tomando 10 hojas por tratamiento y con 3 repeticiones. La intensidad de color se clasificó en 3 categorías (pálido, medio e intenso), para los valores de SPAD menores de 40, entre 40 y 50 y mayores de 50, respectivamente. Para la evaluación de la morfología del brote se establecieron 2 categorías: normal y fuera de tipo. En la primera se ubicaron aquellos brotes con la morfología tipo de la especie y un crecimiento homogéneo, y en la segunda, brotes con crecimiento fuera de tipo, como hojas deformadas o desarrollo no uniforme en altura y diámetro (Figura 1).

### Tratamientos

**Ensayo 1.** Bencilaminopurina (BAP): 0.5, 1 y 2 mg.L<sup>-1</sup>.

**Ensayo 2.** Ácido giberélico (AG): 0.05 y 0.1 mg.L<sup>-1</sup>, solo y en combinación con BAP 0.5, 1 y 2 mg.L<sup>-1</sup>.

**Ensayo 3.** Ácido indol-butírico (AIB): 0.05, 0.2 y 0.5 mg.L<sup>-1</sup>, solo y en combinaciones con BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** a. Escala de color intenso, normal, pálido (de izquierda a derecha). b. Escala de desarrollo: fuera de tipo (izquierda) y normal (derecha). La barra en la parte inferior izquierda corresponde a 0.5 cm de longitud.

**Ensayo 4.** Extracto de hojas de frutilla (EHF): 0.01, 0.1 y 1 mg.PF.mL<sup>-1</sup>, solo y en combinación con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Se implantaron 10 meristemas por tratamiento con 3 réplicas.

## Multiplicación

Se evaluaron medios que consistieron en el medio basal MS, suplementado con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (M1) y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP+ 0.05 mg.L<sup>-1</sup> de AG (M2). Se realizaron 3 ciclos de multiplicación cada 4 semanas de cultivo. Se evaluó altura y número de brotes.

## Enraizamiento

El enraizamiento se realizó en: 1- en medio de cultivo *in vitro* con sales MS diluidas al 50 %, sacarosa 15 g.L<sup>-1</sup> y phytogel 4 g.L<sup>-1</sup> con el agregado de 0.75 mg.L<sup>-1</sup> de AIB y sin AIB; y 2- en sustrato estéril (*ex vitro*) (GrowMix Multipro, Terrafertil, Argentina). Los parámetros evaluados fueron: brotes enraizados, número y longitud de raíces, número de hojas, altura de plántula y días a rusticación.

## Aclimatación y rusticación

Los brotes enraizados *in vitro* se colocaron en sustrato estéril (GrowMix Multipro, Terrafertil, Argentina), protegidos con la cobertura plástica para su aclimatación durante 10 días. En ambos casos las vitroplantas fueron mantenidas en condiciones controladas de 24 °C, 70 % de HR, 16 h de luz.

## Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y posteriormente se aplicó la prueba de separación de medias mediante Test de Tukey a  $\alpha= 0.05$ , utilizando el software informático Infostat (Di Rienzo et al., 2020).

## Resultados

### Implantación de meristemas de frutilla

#### a. Efecto de hormonas sintéticas

El número de meristemas implantados fue inversamente proporcional a la concentración de BAP (0.5, 1 y 2 mg.L<sup>-1</sup>). El 100 % de los brotes desarrollados con BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup> presentaron morfología normal y cerca del 60 % un diámetro mayor a 0.5 cm, mientras que el 100 % de los brotes en BAP 2 mg.L<sup>-1</sup> presentaron morfología fuera de tipo, presencia de callos (Tabla 1) y el 51.1 % resultó inferior a 0.5 cm de diámetro (Tabla 2). En los ensayos con AG, ambas concentraciones aplicadas individualmente y las combinaciones de AG 0.1 mg.L<sup>-1</sup>+BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup> y AG 0.05 mg.L<sup>-1</sup> y BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> lograron un 100 % de implantación (Tabla 1).

Los tratamientos con AG 0.05 mg.L<sup>-1</sup> y la combinación AG 0.05 mg.L<sup>-1</sup> y BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> presentaron el mayor porcentaje de brotes color verde intermedio y desarrollaron brotes de mayor

**Tabla 1.** Efecto de diferentes concentraciones de hormonas/extracto vegetal (EHF) en la implantación de brotes y la proliferación de callos del cv. Camino Real de *Fragaria ananassa*

T	E	Hormonas/ Extracto	Implantación (%)	Presencia de callos (%)
T1	E1	BAP 0	68 <sup>C</sup>	0 <sup>B</sup>
T2	E1	BAP 0.5	89.10 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>
T3	E1	BAP 1	73.74 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>
T4	E1	BAP 2	66.21 <sup>C</sup>	100 <sup>A</sup>
T5	E2	AG 0.05	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
T6	E2	AG 0.1	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
T7	E2	BAP 0.5+AG 0.05	90.90 <sup>C</sup>	0 <sup>A</sup>
T8	E2	BAP 0.5+AG 0.1	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
T9	E2	BAP 1 + AG 0.05	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
T10	E2	BAP 1+AG 0.1	92.90 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>
T11	E2	BAP 2 + AG 0.05	90.90 <sup>C</sup>	0 <sup>A</sup>
T12	E2	BAP 2 + AG 0.1	88.20 <sup>D</sup>	0 <sup>A</sup>
T13	E3	AIB 0.05	71.40 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>
T14	E3	AIB 0.2	42.90 <sup>C</sup>	100 <sup>A</sup>
T15	E3	AIB 0.5	57.10 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>
T16	E3	BAP 0.5 + AIB 0.05	14.30 <sup>D</sup>	100 <sup>A</sup>
T16	E3	BAP 0.5 + AIB 0.2	71.40 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>
T17	E3	BAP 0.5 + AIB 0.5	14.30 <sup>D</sup>	100 <sup>A</sup>
T18	E4	EHF 1	81.78 <sup>D</sup>	0 <sup>A</sup>
T19	E4	EHF 0.1	88.89 <sup>C</sup>	0 <sup>A</sup>
T20	E4	EHF 0.01	94.12 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>
T21	E4	BAP 0.5+EHF 1	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
T22	E4	BAP 0.5+EHF 0.1	94.44 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>
T23	E4	BAP 0.5+EHF 0.01	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>

T: tratamientos evaluados y E: ensayos realizados. El análisis estadístico se realizó por ensayos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

tamaño. Morfológicamente se observó menor proliferación de brotes y desarrollo de raíces en los tratamientos solo con AG, mientras que en la combinación con BAP se produjo una multiplicación masiva de brotes, con una estructura “arrosetada” típica de la frutilla (Tabla 2).

En el medio adicionado con AIB los porcentajes superiores de implantación fueron con AIB 0.05 mg.L<sup>-1</sup> y la combinación AIB 0.2 mg.L<sup>-1</sup>+BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup>, lo cual alcanzó un 71.4 % en ambos casos (Tabla 1). En las tres concentraciones de AIB el 100 % de los brotes presentó una coloración verde pálida y, además, en la mayor concentración (0.5 mg.L<sup>-1</sup>), el 100 % de los brotes presentó una morfología fuera de tipo y desarrollo de brotes mayor o igual a 1 cm (Figura 2). En todos los tratamientos con AIB y AIB+BAP se produjo desarrollo de callos, y a excepción de AIB 0.2+BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup>, los brotes fueron iguales o menores a 1 cm (Tabla 2).

## b. Efecto de un extracto de hojas de frutilla (EHF)

Los porcentajes de implantación fueron inversos a la concentración del extracto, desde 94.12 a 81.78 % para 0.01 y 1 mg.PF.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, lo que se incrementó en todos los casos en la combinación con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Tabla 1). En el medio suplementado solo con EHF, se obtuvieron brotes más pequeños, pero con morfología normal en comparación con la combinación con BAP (Tabla 2).

En los tratamientos con EHF (solo y en combinación con BAP) no se observó contaminación, comparado con el ensayo con BAP, en el que se produjo entre un 5.41 y 10.53 % de contaminación. El porcentaje de explantes oxidados fue del 5.88 %, 11.11 % y 18.75 %, para las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mg.PF.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores de oxidación fueron similares a los observados en el ensayo solo con BAP, pero superiores a los observados en BAP + EHF (Tabla 3).

## Multiplicación

En función de los resultados obtenidos en la etapa de implantación de meristemas, se seleccionaron los brotes implantados en los medios con BAP 0.5; BAP 0.5 + EHF 0.01 y EHF 0.01. A las 4 semanas de cultivo, los brotes que provenían de implantación en EHF+BAP generaron mayor número de brotes en los 2 medios de multiplicación evaluados, sin presentar diferencias significativas entre los medios de multiplicación (Tabla 4).

## Enraizamiento y rusticación

Para evaluar el enraizamiento se tomaron los brotes del medio BAP 0.5 mg.L<sup>-1</sup> manteniendo el origen de implantación (BAP, BAP+EHF y EHF), sin considerar los tratamientos. A las 4 semanas, el enraizamiento en sustrato directo fue del 100 %, independientemente del origen del brote, mientras que en los medios con AIB el enraizamiento fue bajo. En sustrato, el número de raíces y la longitud del sistema radicular fue superior y el inicio del enraizamiento fue más rápido que en el medio *in vitro* (Tabla 5). En ambos sistemas de enraizamiento, la longitud y número de raíces por brote fue superior en los brotes con EHF (solo y con BAP). El número de hojas y altura de plantas también resultaron superiores en los brotes enraizados en sustrato (Figura 3). La aclimatación de las vitroplantas fue superior al 95 %, en un lapso promedio de 10 días.

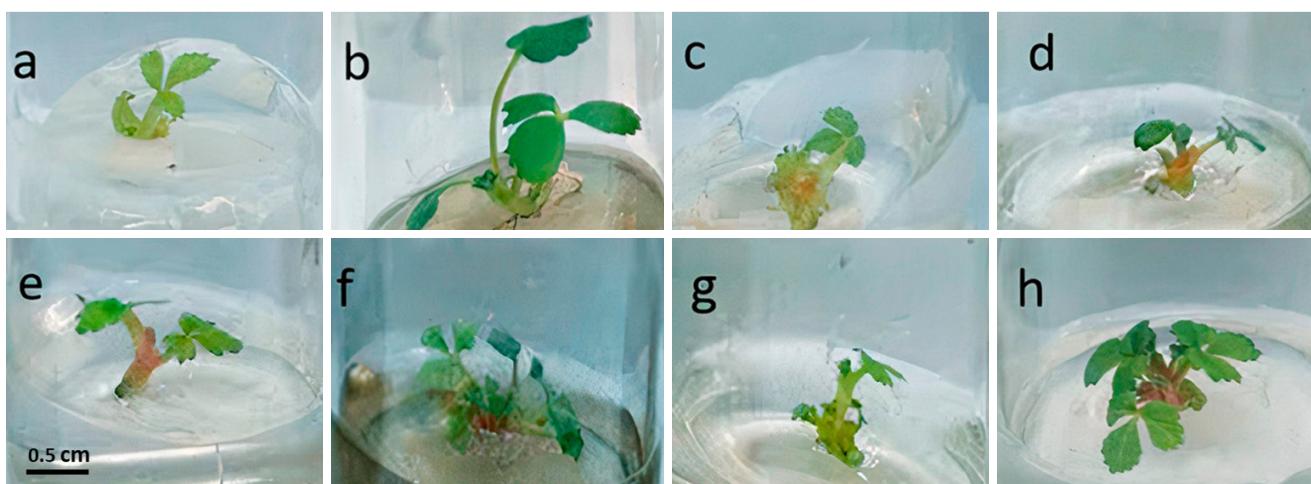
## Discusión

El tipo, concentración y combinación de fitohormonas más adecuada para la propagación *in vitro* debe ser determinado para cada genotipo. La bibliografía destaca la importancia de las fitohormonas, en

**Tabla 2.** Efecto de diferentes concentraciones de hormonas/extracto vegetal (EHF) en el desarrollo de los brotes del cv. Camino Real de *Fragaria ananassa*

T	E	Color de brote			Diámetro de brote (cm)			Morfología del brote	
		P	N	I	>1	1-0.5	<0.5	Normal	Fuera de tipo
T1	E1	88 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>	11 <sup>A</sup>	0 <sup>C</sup>	35.50 <sup>C</sup>	64.50 <sup>A</sup>	77.77 <sup>B</sup>	22.22 <sup>B</sup>
T2	E1	40 <sup>D</sup>	60 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	9.10 <sup>B</sup>	59 <sup>A</sup>	31.90 <sup>D</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>C</sup>
T3	E1	100 <sup>A</sup>	0 <sup>C</sup>	0 <sup>B</sup>	27.30 <sup>A</sup>	34.10 <sup>C</sup>	38.60 <sup>C</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>C</sup>
T4	E1	50 <sup>C</sup>	50 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>	48.90 <sup>B</sup>	51.10 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>	100 <sup>A</sup>
T5	E2	29.40 <sup>F</sup>	70.60 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	35.30 <sup>B</sup>	17.60 <sup>G</sup>	47 <sup>B</sup>	64.70 <sup>D</sup>	35.30 <sup>B</sup>
T6	E2	60 <sup>D</sup>	30 <sup>D</sup>	10 <sup>A</sup>	10 <sup>F</sup>	20 <sup>F</sup>	70 <sup>A</sup>	90 <sup>B</sup>	10 <sup>D</sup>
T7	E2	70 <sup>C</sup>	30 <sup>D</sup>	0 <sup>B</sup>	30 <sup>D</sup>	30 <sup>E</sup>	40 <sup>C</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>E</sup>
T8	E2	100 <sup>A</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>B</sup>	23.10 <sup>E</sup>	61.50 <sup>A</sup>	15.40 <sup>E</sup>	78.80 <sup>C</sup>	21.20 <sup>C</sup>
T9	E2	46.70 <sup>E</sup>	53.30 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	50.10 <sup>A</sup>	45.90 <sup>D</sup>	7.14 <sup>F</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>E</sup>
T10	E2	61.50 <sup>D</sup>	38.50 <sup>C</sup>	0 <sup>B</sup>	23.10 <sup>D</sup>	61.50 <sup>A</sup>	15.40 <sup>E</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>E</sup>
T11	E2	100 <sup>A</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>G</sup>	60 <sup>B</sup>	40 <sup>C</sup>	0 <sup>E</sup>	100 <sup>A</sup>
T12	E2	93.30 <sup>B</sup>	6.70 <sup>E</sup>	0 <sup>B</sup>	33.30 <sup>C</sup>	50.70 <sup>C</sup>	25 <sup>D</sup>	0 <sup>E</sup>	100 <sup>A</sup>
T13	E3	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	39.3 <sup>C</sup>	60.5 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>
T14	E3	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>	100 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>
T15	E3	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>
T16	E3	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>
T16	E3	0 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	60.4 <sup>B</sup>	39.6 <sup>C</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>
T17	E3	0 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>	0 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>
T18	E4	85.71 <sup>B</sup>	14.28 <sup>E</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	15.55 <sup>F</sup>	81.9 <sup>A</sup>	91.90 <sup>A</sup>	7.60 <sup>D</sup>
T19	E4	97.35 <sup>A</sup>	6.66 <sup>F</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	50 <sup>D</sup>	50 <sup>C</sup>	68.80 <sup>B</sup>	31.30 <sup>C</sup>
T20	E4	43.75 <sup>D</sup>	56.25 <sup>C</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	37.50 <sup>E</sup>	62.50 <sup>B</sup>	64.30 <sup>B</sup>	35.70 <sup>C</sup>
T21	E4	33.33 <sup>E</sup>	66.67 <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	73.34 <sup>A</sup>	26.7 <sup>F</sup>	60 <sup>C</sup>	40 <sup>B</sup>
T22	E4	64.70 <sup>C</sup>	29.41 <sup>D</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	58.82 <sup>C</sup>	41.2 <sup>D</sup>	58.8 <sup>D</sup>	41.90 <sup>B</sup>
T23	E4	6.25 <sup>F</sup>	93.75 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	68.35 <sup>B</sup>	31.20 <sup>E</sup>	31.30 <sup>E</sup>	68.40 <sup>A</sup>

T: tratamientos; E: ensayo. Color del brote: P, pálido; N, normal e I, intenso. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).



**Figura 2.** Efecto de un extracto vegetal (EHF) en la implantación de meristemas de estolones de frutilla. Aspecto del brote desarrollado a las 4 semanas de cultivo en medio Murashige y Skoog (MS) sin suplementar (a), suplementado con EHF1, 0.1 y 0.01 mg.PF.mL<sup>-1</sup> (b, c y d, respectivamente); 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzylaminopurina (BAP) (e), y BAP+EHF 1, 0.1 y 0.01 mg.PF.mL<sup>-1</sup> (f, g y h, respectivamente). La barra ubicada en extremo inferior izquierdo corresponde a 0.5 cm de longitud.

**Tabla 3.** Concentraciones y combinaciones de BAP y EHF (ensayos 1 y 4). Porcentajes de contaminación y oxidación

T	E	Regenerados (%)	Oxidados (%)	Contaminados (%)
T2	E1	89.19 <sup>B</sup>	5.41 <sup>D</sup>	5.41 <sup>A</sup>
T3	E1	78.95 <sup>D</sup>	15.79 <sup>B</sup>	5.26 <sup>A</sup>
T4	E1	73.68 <sup>D</sup>	15.79 <sup>B</sup>	10.53 <sup>B</sup>
T18	E4	78.78 <sup>D</sup>	18.75 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
T19	E4	88.89 <sup>C</sup>	11.11 <sup>C</sup>	0 <sup>A</sup>
T20	E4	94.12 <sup>B</sup>	5.88 <sup>D</sup>	0 <sup>A</sup>
T21	E4	100 <sup>A</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>A</sup>
T22	E4	94.44 <sup>B</sup>	1.25 <sup>E</sup>	0 <sup>A</sup>
T23	E4	100 <sup>A</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>A</sup>

T: tratamientos evaluados; E: ensayos considerados. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

**Tabla 4.** Multiplicación *in vitro* de brotes del cv. Camino Real de *Fragaria ananassa*

Medio de multiplicación	Origen del brote	Brotes por explantes	Altura (cm)		
			>1	1-0.5	<0.5
BAP (0.5 mg. L <sup>-1</sup> )	EHF	3.85 <sup>ABC</sup>	55.84 <sup>A</sup>	14.54 <sup>E</sup>	29.61 <sup>C</sup>
	BAP	3.78 <sup>ABC</sup>	36.77 <sup>C</sup>	34.39 <sup>C</sup>	28.83 <sup>C</sup>
	EHF+BAP	4.44 <sup>AB</sup>	43.69 <sup>B</sup>	25.45 <sup>D</sup>	30.85 <sup>B</sup>
BAP+ AG (0.5 y 0.05 mg. L <sup>-1</sup> )	EHF	3.38 <sup>C</sup>	21.59 <sup>D</sup>	60.84 <sup>A</sup>	17.45 <sup>E</sup>
	BAP	3.44 <sup>BC</sup>	22.38 <sup>D</sup>	56.39 <sup>B</sup>	21.22 <sup>D</sup>
	EHF+ BAP	4.66 <sup>A</sup>	21.88 <sup>D</sup>	34.76 <sup>C</sup>	43.34 <sup>A</sup>

Los brotes provenientes de la implantación de meristemas en medios suplementados con EHF, BAP+EHF y BAP fueron multiplicados 3 veces en M1 y M2. Los datos de la tabla corresponden al primer ciclo de multiplicación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

**Tabla 5.** Enraizamiento de brotes del cv. Camino Real de *Fragaria ananassa*

Medio de enraizado	Origen del bote	BR (%)	NR		LR (cm)		NH		A		DA
			7d	14d	7d	14d	7d	14d	7d	14d	
Sustrato	BAP	100 <sup>A</sup>	1.02 <sup>B</sup>	16.44 <sup>C</sup>	0.50 <sup>B</sup>	2.80 <sup>B</sup>	7.48 <sup>A</sup>	8.8 <sup>A</sup>	1.62 <sup>A</sup>	3.54 <sup>B</sup>	25 <sup>A</sup>
	EHF	100 <sup>A</sup>	4.40 <sup>A</sup>	33.36 <sup>C</sup>	1.79 <sup>A</sup>	3.20 <sup>B</sup>	6 <sup>C</sup>	8 <sup>B</sup>	2.23 <sup>A</sup>	6.29 <sup>A</sup>	14 <sup>B</sup>
	BAP+EHF	100 <sup>A</sup>	3.00 <sup>C</sup>	47.10 <sup>A</sup>	1.04 <sup>B</sup>	5.20 <sup>A</sup>	5 <sup>C</sup>	7 <sup>C</sup>	2.30 <sup>A</sup>	6.50 <sup>A</sup>	14 <sup>B</sup>
Medio de enraizado	Origen del bote	BR (%)	NR		LR (cm)		NH		A		DA
			21d	28d	21d	28d	21d	28d	21d	28d	
MS	BAP	16.70 <sup>D</sup>	3.10 <sup>C</sup>	8.75 <sup>D</sup>	0.33 <sup>A</sup>	1.50 <sup>BC</sup>	3.90 <sup>A</sup>	7 <sup>A</sup>	1.20 <sup>B</sup>	2.40 <sup>D</sup>	40 <sup>C</sup>
	EHF	100 <sup>A</sup>	3.50 <sup>C</sup>	11.20 <sup>C</sup>	0.66 <sup>A</sup>	1.70 <sup>BC</sup>	4.20 <sup>BC</sup>	6 <sup>B</sup>	1.82 <sup>AB</sup>	3.73 <sup>B</sup>	30 <sup>F</sup>
	BAP+EHF	80.40 <sup>B</sup>	4.30 <sup>B</sup>	12.60 <sup>A</sup>	0.82 <sup>A</sup>	2.10 <sup>AB</sup>	4.30 <sup>BC</sup>	6 <sup>B</sup>	1.60 <sup>B</sup>	3.40 <sup>C</sup>	35 <sup>E</sup>
AIB (0.75 mg. L <sup>-1</sup> )	BAP	12.90 <sup>E</sup>	3.00 <sup>A</sup>	9.00 <sup>CD</sup>	0.34 <sup>A</sup>	1.20 <sup>C</sup>	4.80 <sup>A</sup>	6.80 <sup>AB</sup>	1.15 <sup>B</sup>	3.20 <sup>BC</sup>	47 <sup>A</sup>
	EHF	48.60 <sup>C</sup>	6.00 <sup>A</sup>	11.60 <sup>B</sup>	0.54 <sup>A</sup>	1.80 <sup>ABC</sup>	4.80 <sup>A</sup>	60 <sup>B</sup>	2.40 <sup>A</sup>	2.80 <sup>DC</sup>	42 <sup>B</sup>
	BAP+EHF	48.70 <sup>C</sup>	5.00 <sup>B</sup>	12.20 <sup>AB</sup>	0.77 <sup>A</sup>	2.50 <sup>A</sup>	4.65 <sup>A</sup>	6.20 <sup>AB</sup>	1.60 <sup>B</sup>	4.80 <sup>A</sup>	37 <sup>D</sup>

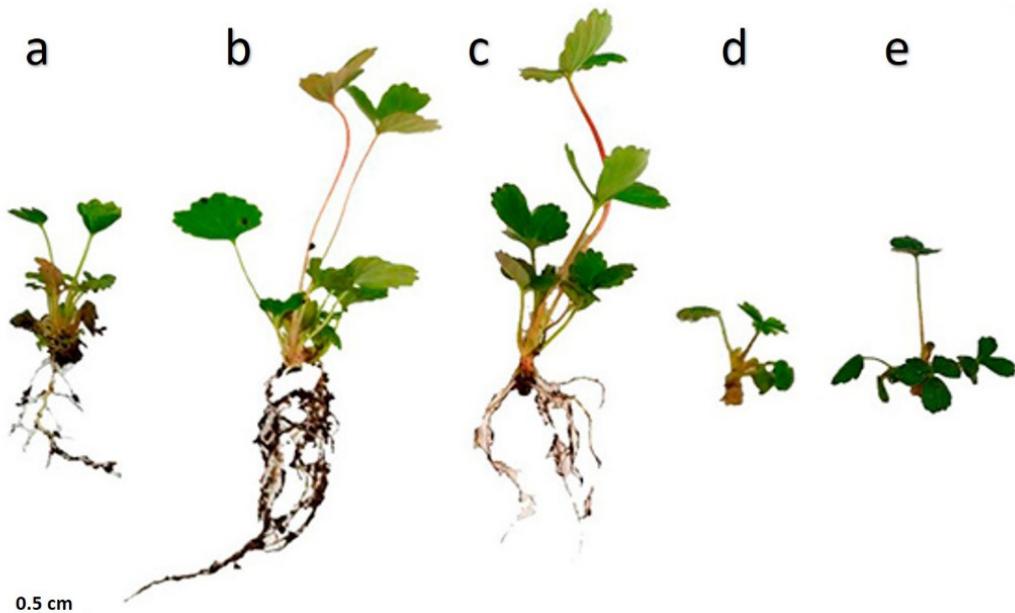
Efecto del enraizamiento directo en sustrato y del AIB en el enraizamiento *in vitro* de brotes micropropagados después de 3 ciclos de multiplicación. BR: porcentaje de brotes enraizados; NR: número de raíces por brote; LR: longitud radicular (cm); NH: número de hojas; A: altura de planta; DA: días transcurridos hasta la aclimatación. Por la diferente velocidad de enraizamiento, los datos de los brotes enraizados en sustrato se tomaron a los 7 y 14 días, y en el caso del enraizamiento *in vitro* se tomaron a los 21 y 28 días. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

especial el balance auxina/citoquinina. La citoquinina mayormente utilizada en frutilla es el BAP, a concentraciones cercanas a 0.5 mg. L<sup>-1</sup> (Madumali et al., 2021; Kulus y Tymoszuk, 2024), lo que coincide con los resultados de este trabajo, en el que se obtuvo el mayor porcentaje promedio de implantación de meristemas con BAP 0.5 mg. L<sup>-1</sup> y mejor desarrollo del brote, respecto a las 2 concentraciones evaluadas. Este efecto fue también observado por Shelepova et al. (2021), quienes determinaron que elevadas concentraciones de citoquininas producían una disminución en el número de brotes micropropagados.

El uso de fuentes naturales de reguladores de crecimiento producidos por plantas y/o microorganismos es una alternativa sustentable para favorecer el crecimiento en las plantas y tolerar situaciones de estrés (Furio et al., 2019; Iparraguirre et al., 2020; Lami et al., 2020; Delisle-Houde et al., 2022). Por otro lado, la aplicación de fuentes naturales

permite reducir los costos e incrementar la eficiencia de los protocolos de micropropagación (Navarro et al., 2023; Velázquez-Kú et al., 2016). Además, la suplementación con sustratos orgánicos promueve la implantación exitosa y, por su parte, el desarrollo de brotes cultivados funciona como fuente de aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono, ácidos grasos y hormonas de crecimiento (Carranza-Álvarez et al., 2021; Faize et al., 2021).

En este trabajo, el efecto benéfico del EHF en la implantación de meristemas fue inversamente proporcional a la concentración, lo cual podría relacionarse con un efecto inhibitorio de los compuestos del EHF cuando se encuentran en elevadas concentraciones. Efectos similares fueron determinados por Kulus y Miler (2021), quienes reportaron un efecto inhibitorio de extractos de sésamo asociado a su elevada concentración de compuestos fenólicos, en comparación con



**Figura 3.** Efecto de un extracto vegetal (EHF) en el enraizamiento *in vitro* de brotes de frutilla. Aspecto de la plántula a los 14 días del enraizamiento en sustrato directo (a, b y c), y en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (d y e, con el agregado de 0.75 mg.L<sup>-1</sup> AIB y sin AIB, respectivamente). En sustrato directo se observó el efecto de brotes provenientes de la multiplicación con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (a), EHF (b) y BAP + EHF (c), respectivamente. La barra ubicada en extremo inferior izquierdo corresponde a 0.5 cm de longitud.

extractos de avena, arroz o coco. La combinación con BAP mejoró el efecto del EHF o de BAP aplicados individualmente, lo que podría indicar un efecto sinérgico que abriría potenciales posibilidades para mejorar la micropagación de frutilla u otras especies vegetales. Los brotes generados a partir de meristemas implantados en medios suplementados con EHF (solo y con BAP) mejoraron el comportamiento en los ciclos de multiplicación y enraizamiento. El sistema de enraizamiento directo en sustrato resultó más eficiente al incrementar la velocidad de enraizamiento. En forma similar a lo observado en implantación y multiplicación, los brotes provenientes de meristemas implantados en EHF y BAP+EHF mostraron en forma significativa una mayor cantidad y longitud de raíces que los brotes BAP, lo que indicaría que el efecto “inducido” por el EHF en la implantación de meristemas se podría conservar hasta el final del proceso de multiplicación.

## Conclusiones

El comportamiento del cv. Camino Real de *Fragaria ananassa* en la multiplicación *in vitro* depende del tipo, concentración y combinación de BAP, AIB, AG y el extracto de hojas de frutilla (EHF), reportado por primera vez como suplemento en el cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos indican que el EHF, solo y/o en combinación con BAP, tiene efectos positivos en el cultivo *in vitro* de la frutilla, lo cual mejora los efectos del BAP, controlando la contaminación y la oxidación de los explantes, lo que, a su vez, alienta a seguir investigando sobre dichos efectos en este y otros genotipos de frutilla u otras especies vegetales.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina por el financiamiento.

## Referencias

- Bello-Bello, J. y Spinoso Castillo, J. (2022). Utilización de nanopartículas de plata en la micropagación de plantas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 16(30), 1e-14e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>
- Carranza-Alvarez, C.; Trinidad-García, K. L.; Reyes-Hernández, H.; Castillo-Pérez, L. J. y Fortanelli-Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropagación de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia*, 23(1), 5-12. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805>
- Delisle-Houde, M.; Dubé, P.; Barro, A.; Tremblay, V. y Tweddell, R. J. (2022). Silver maple (*Acer saccharinum* L.) leaf: A potential source of antibacterial compounds to control phytopathogenic bacteria in horticulture crops. *HortScience*, 57(12), 1529-1533. <https://journals.ashs.org/hortscl/view/journals/hortscl/57/12/article-p1529.xml>
- Dhukate, M. R.; Kher, M. M.; Vadawale, A. V. y Giri, P. (2021). Protocol for micropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. ‘Sweet Charlie’ and ‘Winter Dawn’). *Environmental and Experimental Biology*, 19(1), 1-6. <https://doi.org/10.22364/eeb.19.01>
- Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M. y Robledo, C. W. (2020). InfoStat (versión 2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

- Faize, M.; Faize, L.; Burgos, L.; Critchley, A. T. y Alburquerque, N. (2021). Application of *Ascophyllum nodosum*-based soluble extract on micropropagation and regeneration of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. *Plants*, 10(07), 1354. <https://doi.org/10.3390/plants10071354>
- Furio, R. N.; Salazar, S. M. y Martínez-Zamora, G. M. (2019). Brassinosteroids promote growth, fruit quality and protection against *Botrytis* on *Fragaria × ananassa*. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 801-810. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01704-3>
- Grellet Bournonville, C.; Filippone, M. P.; Di Peto, P. D. L. Á.; Trejo, M. F.; Couto, A. S.; Mamani de Marchese, A. y Castagnaro, A. P. (2020). Strawberry fatty acyl glycosides enhance disease protection, have antibiotic activity and stimulate plant growth. *Scientific Reports*, 10(1), 8196. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65125-7>
- Grellet-Bournonville, C. F.; Di Peto, P. D. L. Á.; Cervino Dowling, A. M.; Castagnaro, A. P.; Schmeda-Hirschmann, G.; Díaz Ricci, J. C. y Filippone, M. P. (2021). Seasonal variation of plant defense inductor ellagitannins in strawberry leaves under field conditions for phytosanitary technological applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(42), 12424-12432. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03810>
- Iparraguirre, J.; Masciarelli, O.; Llanes, A. y Luna, V. (2020). Biofertilization with *Macrocystis pyrifera* algae extracts combined with PGPR-enhanced growth in *Lactuca sativa* seedlings. *Journal of Applied Phycology*, 32, 4361-4371. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02202-4>
- Kulus, D. y Miler, N. (2021). Application of plant extracts in micropropagation and cryopreservation of bleeding heart: An ornamental-medicinal plant species. *Agriculture*, 11(6), 542. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060542>
- Kulus, D. y Tymoszuk, A. (2024). Advancements in in vitro technology: A comprehensive exploration of micropropagated Plants. *Horticulturae*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010088>
- Lami, M. J.; Adler, C.; Caram-Di Santo, M. C.; Zenoff, A. M.; Cristobal, R. E.; Espinosa-Urgel, M. y Vincent, P. A. (2020). *Pseudomonas stutzeri* MJL19, a rhizosphere-colonizing bacterium that promotes plant growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1321-1336. <https://doi.org/10.1111/jam.14692>
- Madumali, H. K. C.; Abeythilakarathna, P. D. y Seran, T. H. (2021). Rooting performance of in vitro microshoots of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) as influenced by plant growth regulators. *AGRIEST: Journal of Agricultural Sciences*, 15(2), 69-73. <https://doi.org/10.4038/agriest.v15i2.79>
- Mamani, A.; Filippone, M. P.; Grellet, C.; Welin, B.; Castagnaro, A. P. y Díaz Ricci, J. C. (2012). Pathogen-induced accumulation of an ellagitannin elicits plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(11), 1430-1439. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-11-0306>
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nardi, S.; Pizzeghello, D.; Schiavon, M. y Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: Physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73, 18-23. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>
- Navarro, Q. R.; De Oliveira Corrêa, D. y Behling, A. (2023). Effect of microalga *Desmodesmus subspicatus* and plant growth regulators on the in vitro propagation of *Cattleya warneri*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 153, 77-89. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02442-x>
- Neri, J. C.; Meléndez-Mori, J. B.; Tejada-Alvarado, J. J.; Vilca-Valqui, N. C.; Huaman-Huaman, E.; Oliva, M. y Goñas, M. (2022). An optimized protocol for micropropagation and acclimatization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) variety 'Aroma'. *Agronomy*, 12(4), 968. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040968>
- Sarıdaş, M. A.; Baktemur, G.; Taşkın, H. y Kargı, S. P. (2021). Effect of plant hormones on micropropagation potential of superior strawberry genotypes and their parents via shoot-tip culture. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 20(3), 63-75. <https://doi.org/10.24326/asphc.2021.3.7>
- Shelepova, O. V.; Dilovarova, T. A.; Gulevich, A. A.; Olekhovich, L. S.; Shirokova, A. V.; Ushakova, I. T.; Zhuravleva, E.; Konovalova, L. y Baranova, E. N. (2021). Chemical components and biological activities of essential oils of *Mentha × piperita* L. from field-grown and field-acclimated after in vitro propagation plants. *Agronomy*, 11(11), 2314. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112314>
- Tomas-Grau, R. H.; Hael-Conrad, V. y Requena-Serra, F. J. (2020). Biological control of strawberry grey mold disease caused by *Botrytis cinerea* mediated by *Colletotrichum acutatum* extracts. *BioControl*, 65, 461-473. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10003-4>
- Vallith, A. S. y Mondal, R. (2023). Micropropagation of strawberry crop (*Fragaria × ananassa*): A review. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 38(1), 41-44. <https://doi.org/10.18805/BKAP529>
- Velázquez-Kú, N. V.; Quijano-Ávila, J. D. C. y Rodríguez-Ávila, N. L. (2016). Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación in vitro de orquídeas silvestres del estado de Campeche. *Revista del Centro de Graduados e Investigación*, 31(63), 27-31. <https://www.researchgate.net/publication/312054411>