

Aclimatación *ex vitro* de plántulas de *Fragaria x ananassa* Duch.

María Concepción Valencia Juárez
Diana Escobedo López
Luis Febronio Díaz Espino
Enrique González Pérez[§]

Campo Experimenta Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Colonia Roque, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110. (m.conchisvalencia@gmail.com; escobedo.diana.enrique@inifap.gob.mx; diaz.luis@inifap.gob.mx).

[§]Autor para correspondencia: gonzalez.enrique@inifap.gob.mx.

Resumen

En Guanajuato, México, los productores propagan fresa por vía asexual mediante el uso de estolones. Este tipo de propagación es problemática debido a que se facilita la transmisión de enfermedades directa e indirectamente a sus descendientes. Por esa causa, el objetivo del presente trabajo fue determinar el ambiente más favorable para la aclimatación de plántulas de fresa micropropagadas. Para la propagación *in vitro* dos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento fueron evaluados y para la aclimatación cuatro ambientes fueron probados bajo un diseño completamente al azar. El más alto porcentaje de tallos enraizados, número de raíces y longitud del tallo fue obtenido con LS + 0.2 mg L⁻¹ BA. El mejor ambiente de aclimatación fue bajo 75% de sombreo el cual promovió la más alta supervivencia (91.9%), longitud del tallo (28.1), número de folíolos basales (7.7) y biomasa fresca total (50.1 g). Estos resultados podrían facilitar la producción a gran escala de plantas de fresa generadas en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: ambientes, hormonas, micropropagación.

Recibido: noviembre de 2018

Aceptado: enero de 2019

Introducción

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), es un cultivo de importancia hortícola en el mundo. México fue el segundo exportador internacional de fresa en 2016 con 253 700 t (SAGARPA, 2017), producción que fue superada en 2017 al producir en una superficie de 11 132 ha, 390 299 t, donde Guanajuato contribuyó con 6.81% (26 597 t), con un rendimiento promedio de 25.8 t ha⁻¹, que está por debajo de la media nacional (38.7 t ha⁻¹) (SIAP, 2018).

El bajo rendimiento se debe al uso de variedades extranjeras (Dávalos-González *et al.*, 2017) y por enfermedades, principalmente virales (Contreras-Paredes *et al.*, 2014) y causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae* (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017). Esto es debido a que la fresa solo puede ser propagada por el método vegetativo que transmite directa o indirectamente a sus descendientes estos microorganismos (Boxus, 1999).

Para tratar de contribuir a mejorar las condiciones de producción del cultivo de fresa en Guanajuato, en el último lustro se han desarrollado variedades de fresa adaptadas a la región agroclimática de la región que presentan mayor rendimiento y características organolépticas (Dávalos-González *et al.*, 2017); no obstante, la propagación de las mismas sigue presentando problemas fitosanitarios lo que dificulta la adopción de estos materiales por los productores. Para asegurar la obtención de plantas libres de enfermedades, de mayor vigor y con alta pureza genética la propagación *in vitro*, representa una alternativa viable, que en fresa ha sido muy estudiada (Calvete *et al.*, 2009; Rekha *et al.*, 2013; Ling and Wetten, 2017; Diel *et al.*, 2017).

Sin embargo, aunque este método es un proceso muy simple es de gran importancia adaptar los protocolos de propagación a variedades mexicanas debido a que cada genotipo tiene una constitución genética propia que puede facilitar o complicar su propagación en condiciones *in vitro* Kozai (1991). Además, la fase de aclimatación sigue representando un reto ya que requiere de un ambiente controlado para lograr el establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas (Pospíloilová *et al.*, 1999; Jofre-Garfias *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2008). Condiciones que hacen incosteables la adopción de la tecnología por parte de los productores de fresa en México. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar en diferentes ambientes de aclimatación *ex vitro* algunos parámetros de condiciones ambientales, desarrollo y respuesta fisiológica de plantas de fresa micropropagadas.

Materiales y métodos

Material vegetal

En la primavera de 2017, 200 plantas de fresa de la variedad Nikté aparentemente sanas fueron colectadas de manera aleatoria de un lote comercial de 1 000 m² establecido en el área de estudio (Roque, Celaya, Guanajuato, 20° 34' 43'' latitud norte, 100° 49' 13'' longitud oeste, altitud 1 767 m). Los puntos de crecimiento fueron removidos, enjuagados bajo agua a chorro por 20 min y secados sobre papel, toalla estéril. Posteriormente con un escarpelo bajo un microscopio estereoscópico las yemas apicales (3-5 mm de grosor) fueron removidas de cada punto apical y usados como explante.

Desinfestación de explantes

Los explantes fueron desinfestados con etanol al 80% por 2 min, enjuagados con agua destilada estéril, secados sobre papel toalla y nuevamente desinfestados con hipoclorito de sodio al 1.5% por 3 min, después fueron enjuagados y secados otra vez (Boxus, 1999).

Establecimiento del cultivo

Para el enraizamiento, los meristemos apicales (4 ± 1 mm de longitud) fueron cultivados en dos medios de cultivo 1) Medio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementados con 30 g L^{-1} de sacarosa y 3 g L^{-1} de agar con diferentes variantes de la concentración de BAP + IBA + GA₃ (0.1, 1 y 0.1 mg L^{-1}), BAP + IBA + GA₃ (0.5, 1 y 0.1 mg L^{-1}) e IBA (1 mg L^{-1}); 2) Medio LS suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa y 7 g L^{-1} de agar más BA (0.2 mg L^{-1}). Se usó como control ambos medios sin PGRs. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de agregar el agar previo a la esterilización a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. De cada tratamiento 20 mL del medio fue vaciado en frascos de 150 mL de capacidad. Cinco repeticiones por tratamiento fueron plantados con cuatro explantes por repetición en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar (ESCO, EOJ/04-EHC, USA). Los cultivos se mantuvieron por cuatro semanas en una cámara de cultivo (INCUBATOR MOD-818, USA) a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, densidad del flujo fotónico fotosintético (PPFD) de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (luz blanca fluorescente) y un fotoperiodo de 16 h, diariamente. Los tallos fueron enraizados en medio LS sin hormonas bajo las mismas condiciones ambientales antes descritas.

Aclimatación

Las plantas completas (con 2-3 raíces y 1 ± 0.5 cm de longitud) fueron removidas del medio de cultivo, enjuagadas con agua destilada estéril, secadas sobre toallas de papel estéril y transferidas a macetas pequeñas de plástico de 0.5 L (40 macetas con una planta completa) de 10 cm de diámetro conteniendo una mezcla de turba, perlita y vermiculita (relación 1:1:1; v/v) previamente desinfestada a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Para mantener la alta humedad relativa las macetas fueron cubiertas con envases de plástico transparente de 1 L y mismo diámetro. Todas las plantas completas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones de la etapa de establecimiento. Los tallos enraizados (%), número de raíces, número de tallos secundarios y la longitud del tallo más alto (cm) fueron determinados 20 días después.

Al final del tratamiento de pre aclimatación arriba descrito, las plántulas fueron removidas de la cámara bioclimática y colocadas en un invernadero con malla de 50% de sombreo (Biomalla; Hdpe monofilament yarn, USA). Después de dos días dos perforaciones laterales fueron hechas en ambos lados de los envases transparentes los cuales fueron removidos al tercer día. En condiciones ambientales sin control de temperatura y humedad las plantas fueron irrigadas cada dos días (Schiappacasse *et al.*, 2006). En un diseño completamente al azar, cuatro tratamientos fueron establecidos: 1) 50% de sombreo con malla (10×5 hilos cm^{-2}), (2) 75% de sombreo con malla (17×5 hilos cm^{-2}), (3) cobertura plástica de polietileno con 70% de transmisibilidad y (4) a campo abierto (control). En cada ambiente se colocaron 10 macetas (repeticiones) con una planta. Durante el proceso de aclimatación las macetas fueron regadas tres veces por semana, y se aplicó 50 mL de la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) dos veces por semana.

En cada ambiente se monitoreo la temperatura (°C) y humedad relativa (HR) cada 30 min, con un HOBO 8K (Onset Computer Corporation, USA). La temperatura media, mínima y máxima fueron registradas y calculadas. Además, la PPF se midió al medio día en condiciones de cielo abierto, 20 cm por encima del estrato superior de la planta en tres días elegidos aleatoriamente durante el periodo experimental (mayo 15, junio 12 y julio 17) con un sensor cuántico (LI-190SA, LICOR, USA).

Evaluación de las plántulas

El porcentaje de supervivencia (SV), longitud del tallo (LT; medida del nivel del sustrato al ápice de la hoja más larga, cm), número de folíolos basales (NFB), biomasa fresca total (BFT, incluye hojas y raíces) de cinco plantas elegidas al azar por tratamiento 40 días después. Para checar la temperatura de la hoja en los diferentes tratamientos, en julio 2018, la temperatura de la hoja más ancha y larga (de seis plantas bien hidratadas) fue medida con un termómetro de infrarrojo (TN408LC ZyTemp, USA) al medio día con cielo despejado y sin viento.

Análisis estadístico

Las variables respuesta fueron sometidas a un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2009) y a comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables medidas en porcentaje fueron transformadas con la fórmula $\arcsen \sqrt{100/X}$.

Resultados y discusión

Establecimiento del cultivo

El tratamiento de LS con 0.2 mg L^{-1} de BA presentó el más alto número de tallos enraizados (90%), número de raíces (4.3) y produjo las plantas con tallos más largos (2.85 cm) (Figura 1B), seguido de los tratamientos con MS + BAP + IBA + GA₃, mientras que los medios control con MS y LS no presentaron desarrollo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de los tratamientos con PGRs sobre la producción de plántulas de fresa después de 20 días de incubación *in vitro* y 15 días en sustrato.

Tratamiento (mg L^{-1})	Núm. de tallos enraizados (%)	Núm. de raíces	Longitud del tallo (cm)
MS + BAP (0.1) + IBA (1) + GA ₃ (0.1)	45 ± 4.4 b	2.6 ± 0.4 b	1.7 ± 0.2 b
MS + BAP (0.5) + IBA (1) + GA ₃ (0.1)	40 ± 5.7 b	1.2 ± 0.6 c	1.6 ± 0.2 b
MS + IBA (1)	20 ± 2.7 c	0 ± 0 d	0 ± 0 c
LS + BA (0.2)	90 ± 2.2 a	4.3 ± 0.3 a	2.8 ± 0.5 a
Control 1 (MS sin PGRs)	0 ± 0 d	0 ± 0 d	0 ± 0 c
Control 2 (LS sin PGRs)	0 ± 0 d	1.6 ± 0.4 bc	1.4 ± 0.2 b

NTE= número de tallos enraizados; NRPP= número de raíces por plántula; LT= longitud del tallo. Las medias con error estándar ± dentro de la columna seguida por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



Figura 1. Etapas de micropropagación de plántulas de *Fragaria x ananassa* Duch. (Var. Nikté). A) planta donante usada para la obtención de explantes; B) explante de fresa con desarrollo foliar y raíz después de 40 días en medio de inducción (LS + BA 0.2 mg L⁻¹); C) plántula de 45 días de edad en periodo de pre-aclimatación (25 ±1 °C y 60% HR); D) plantas en periodo de pre-aclimatación, con perforaciones laterales en cubierta plástica para el control de HR.

En investigaciones realizadas por otros autores (Boxus, 1999; Hanhineva *et al.*, 2005; Jan *et al.*, 2013) se indica que el ácido indol butírico (IBA) en concentraciones de 0.5-2 mg L⁻¹ se logra la regeneración de plántulas de fresa a partir de meristemos apicales, lo que se corrobora con los resultados encontrados en este estudio a una tasa de regeneración menor (40-45%) que la obtenida con el uso de BA (6-benzyl-adenina) donde se alcanzó 90% de tallos enraizados.

El BA resultó ser el regulador de crecimiento responsable de la mejor proliferación de tallos como lo indicaron Jofre-Garfias *et al.* (2006). En horticultura, las auxinas se usan para promover el enraizamiento porque estimulan la división celular en el cambium y la diferenciación en el xilema y floema (Beyl y Trigiano, 2008) y como esperado en el control (sin reguladores de crecimiento) no hubo desarrollo debido a que la concentración endógena de PGRs en el explante fue insuficiente.

Aclimatación

Durante los 15 días dentro de la cámara bioclimática 100% de las plántulas sobrevivieron, algunas plantas mostraron elongación del tallo y emisión de brotes (Figura 1C). Resultados similares fueron reportados en fresa (Debnath, 2005) y en otros cultivos (Rohr *et al.*, 2003). Después de remover la cobertura plástica, todas las plantas sobrevivieron durante siete días bajo sombreado (malla de 75%), sin presentar desarrollo aparente (Figura 1D). Preece y Sutter (1991); Roberts *et al.* (1990) recomiendan que para maximizar la supervivencia después de transferir las plántulas a condiciones

in vivo, es necesario asegurar un periodo de 2-4 semanas con alta humedad relativa. Asimismo, Debnath (2005) indica que para alcanzar una tasa de supervivencia y rápida aclimatación en condiciones de invernadero se debe mantener la humedad relativa de 90-95%. Este método ha sido usado para la aclimatación exitosa de *gladiolus grandiflorus* (González *et al.*, 2014).

En los ambientes evaluados la temperatura media y máxima del aire fue similar a la intemperie y bajo cubierta plástica y en promedio 5.5 °C más baja en malla sombra de 50 y 75% (Cuadro 2). La temperatura mínima fue similar en todos los ambientes (11.7-14.9 °C).

Cuadro 2. Temperatura media, humedad relativa y PPFD en cuatro ambientes de aclimatación de plántulas de fresa micropropagadas durante 60 días.

Ambiente	Temperatura (°C)			HR (%)	PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Media	Máxima	Mínima		
Sombreo con malla 50%	20.1 \pm 0 c	30.7 \pm 0 b	12.5 \pm 0.2 b	47.8 \pm 0.6 b	953.2 \pm 36.4 b
Sombreo con malla 75%	19.9 \pm 0.4 d	28.1 \pm 0.2 c	11.7 \pm 0.4 b	54.2 \pm 0.8 a	418.6 \pm 16.7 a
Cobertura plástica	26.3 \pm 0 a	36.3 \pm 0.3 a	14.9 \pm 0.3 a	54.9 \pm 0.4 c	1282.4 \pm 46.5 c
Campo abierto (control)	25.6 \pm 0 b	36.1 \pm 0.1 a	12.1 \pm 0.3 b	41.9 \pm 0.4 c	1940.2 \pm 21.8 d
LSD	0.6	0.5	0.9	4.2	116.2

Las medias con error estándar \pm dentro de la columna seguida por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). HR= humedad relativa; PPFDF= densidad del flujo fotónico fotosintético; DMS= diferencia mínima significativa.

En este sentido, Boxus (1999) reporta que la temperatura máxima para el crecimiento de fresa es de 22 °C de día y de 15 °C de noche, por lo tanto, la aclimatación de fresa en los ambientes evaluados en la época de primavera-verano en El Bajío Guanajuatense es posible. Sin embargo, a la intemperie este proceso es más complicado ya que no solo la temperatura es crucial para la aclimatación, sino que la humedad relativa es de alta importancia (Kozai, 1991).

Al respecto, en los ambientes la HR más baja se registró a la intemperie (41.9), mientras que bajo malla sombra la HR fue superior al 50%. En el ambiente con 75% de sombreado (Cuadro 3) la mayor altura de planta (AP) posiblemente fue debido a la menor PPFDF (418.6 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$; Cuadro 2) y basado en el hecho de que la fresa obtenida *in vitro* es muy sensible a los cambios drásticos de temperatura y radiación (Laforge *et al.*, 1991). Esta es la razón por la que en ambientes con alta PPFDF, o a la intemperie (1940.2 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) la LT se reduce (Cuadro 3, Figura 2A y 2B).

Cuadro 3. Variables de crecimiento de plántulas de fresa de 60 días de edad micropropagadas bajo cuatro ambientes de aclimatación.

Tratamiento	SV (%)	LT (cm)	NFB (#)	BFT (g)	TH (°C)
Sombreo con malla 50%	80.1 \pm 0 b	24.7 \pm 0 a	7.5 \pm 0.2 ab	47.1 \pm 1 b	23.4 \pm 0.4 c
Sombreo con malla 75%	91.9 \pm 0.4 a	28.1 \pm 0.2 a	7.7 \pm 0.4 ab	50.1 \pm 1.5 a	21.8 \pm 0.7 c
Cobertura plástica	26.3 \pm 0 c	16.3 \pm 0.3 b	8.1 \pm 0.3 a	19.7 \pm 0.8 d	30.1 \pm 1 a
Campo abierto (control)	5.6 \pm 0 d	16.1 \pm 0.1 b	4.1 \pm 0.3 b	23.5 \pm 1.2 c	28.6 \pm 1.2 b
DMS	0.6	0.5	0.9	10.2	6.05

SV= supervivencia, LT= longitud del tallo más alto; NFB= número de folíolos basales; BFT= biomasa fresca total. TH= temperatura de la hoja. Las medias con error estándar \pm dentro de la columna seguida por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



Figura 2. Etapas de aclimatación de plántulas de *Fragaria x ananassa* Duch. (Var. Nikte). A) plántulas en aclimatación bajo sombreo de 75%; B) planta de 10 meses de edad en producción en invernadero; y C) planta de la variedad Nikté en etapa de propagación.

En este sentido, Laforge *et al.* (1991) indican que la PPDF óptima para el desarrollo de fresa es de 1 650-3 000 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y para la aclimatación exitosa la PPDF debe ser incremental a partir, de los 300 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Lo que se corrobora con la mayor SV obtenida en los ambientes donde la PPDF fue menor (Cuadro 2). La alta acumulación de biomasa se presentó en días largos con temperaturas frescas (19-21 °C). En el tratamiento a la intemperie se registró la más baja LT y BFT debido al bajo desarrollo, senescencia prematura de las plantas (Cuadro 3) y a los días con temperatura mayor o igual a 36 °C (26 °C es la temperatura máxima de crecimiento para fresa) (Dávalos-González *et al.*, 2011). Silva *et al.* (1994) menciona que el fraccionar la intensidad luminosa es un factor que mejora la eficiencia de la aclimatación mientras que el exceso de luz induce fotoinhibición y desecación (Pospisilová *et al.*, 1999).

Evaluación de plántulas

Supervivencia

Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para la supervivencia (Cuadro 3, Figura 2 C). La más alta SV (91.9%) se obtuvo bajo malla sombra del 75%, seguido del ambiente con sombreo de 50%; sin embargo, bajo sombreo de 75% se obtuvieron las plantas con las mejores características, opuesto a esto en el ambiente a la intemperie 94.4% de las plantas murió. La pobre aclimatación en el testigo fue debido al máximo de temperaturas registradas (> 30 °C), la cual causó desecación en las plantas lo que incremento la mortalidad.

Es conocido que la alta tasa de mortalidad en plantas obtenidas *in vitro* ocurre cuando las plantas están en ambiente controlado y son movidas a un ambiente no controlado (González *et al.*, 2014) y esto particularmente ocurre cuando las plantas son transferidas a condiciones naturales (25.6 ± 2 °C). Rohr *et al.* (2003) indican que el mayor problema de supervivencia (SV) es la carencia de vigor de la planta y la necrosis de la plántula se debe a la excesiva pérdida de humedad por efecto de la temperatura durante la transferencia de plantas micropropagadas en condiciones *in vitro* (alta humedad relativa; HR) a condiciones ambientales con bajos niveles de HR.

Jofre-Garfias *et al.* (2006) reportan una tasa de supervivencia de plántulas de fresa 93% después de una semana de ser transferidas y 90% después de cuatro semanas, tasa de SV similar a la encontrada en nuestro estudio en condiciones similares, pero con manejo diferente en la aclimatación ya que proponemos la aclimatización en dos fases: 1) pre-aclimatación en condiciones controladas; y 2) bajo malla sombra de 75%.

Bajo sombreado de 50 y 75% las hojas mostraron una temperatura de 21-23 °C (Cuadro 3), 4 °C menos que la temperatura máxima de crecimiento reportada para el crecimiento de la fresa. Temperatura que dio mejor resultado ya que las plantas no sufrieron estrés por calor. Mientras que las plántulas bajo cobertura plástica al ser sometidas a temperatura mayor a 26 °C se deshidrataron por estrés de calor ya que las plántulas en estas condiciones no pueden regular la transpiración de las estomas y fácilmente se deshidratan y mueren (Hazarika, 2006; Beyl y Trigiano, 2008).

Conclusiones

En este estudio fueron aplicadas técnicas básicas y nuestros resultados demostraron que la aclimatación *ex vitro* podría ser exitosa sin cultivar las plantas micropropagadas en condiciones de invernadero. Por lo que, estos resultados podrían contribuir a facilitar la producción a gran escala de plantas de fresa generadas en condiciones *in vitro*.

Agradecimientos

Los autores(a) desean agradecer al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el apoyo financiero otorgado y por las facilidades prestadas para la realización de esta investigación mediante el proyecto SIGI 10432134438.

Literatura citada

- Beyl, C. A. and Trigiano, R. N. 2008. Plant propagation. Concepts and laboratory exercises. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 426 p.
- Biswas, M. K.; Islam, R. and Hossain, M. 2008. Micro propagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. J. Agric. Technol. 4(1):167-182.
- Boxus, P. 1999. Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: Hall, R. D. (Eds.) Plant Cell Culture Protocols. Methods in molecular biology™. Humana Press. Totowa NJ. 111. 103-114 pp.
- Calvete, O. E.; Grando, F. M.; Gomide, G. D.; Maran, E. R.; Suzin, M.; Nienow, A. A. e Cecchetti D. 2009. Desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP. 31(4):943-949.
- Contreras, P. C. A.; Silva, R. L.; Gallegos, V.; Ortiz-Castellanos M. L. y Jofre, G. A. E. 2017. Incidencia de infecciones virales mezcladas en un área de producción de fresa en Guanajuato, México. Rev. Mex. Fitopatol. 32(1):12-25.
- Dávalos, G. P. D.; Aguilar, G. R.; Jofre, G. A. E.; Hernández, R. A. E. y Vázquez, S. N. M. 2011. Tecnología para sembrar viveros de fresa. Campo Experimental Bajío, INIFAP. Celaya, Guanajuato, México. Libro técnico núm. 3. 156 p.
- Dávalos-González, P. A.; Jofre-Garfias, A. E.; Díaz-Espino, L. F.; Mariscal-Amaro, L. A. and López-Pérez, M. G. 2017. Advances in strawberry breeding in Mexico: genotypes selection with high productivity, good fruit quality, and tolerance to the local viral complex and *Fusarium oxysporum*. Acta Hort. 1156:159-165. DOI:10.17660/ActaHortic.2017.1156.23.
- Debnath, S. C. 2005. Strawberry Sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 41(5):671-676. DOI: 10.1079/IVP2005688.

- Diel, M. I.; Marques, P. M. V.; Cocco, C.; Thiesen, L. A.; Bruna Stringari, A. B.; Fontana, D. C.; Caron, B. O.; Testa, V. e Schmidt, D. 2017. Artificial vernalization in strawberry plants: phyllochron, production and quality. *Austr. J. Crop Sci.* 11(10):1315-1319. Doi: 10.21475/ajcs.17.11.10.pne603.
- González-Pérez, E.; Juárez-Muñoz, J.; Ayala-Garay, O. J. and Yáñez-Morales, M. J. 2014. *Ex vitro* acclimatization of gladiolus plantlets. *Propagation of Ornamental Plants.* 14(3):125-132.
- Hanhineva, K.; Kokko, H. and Kärenlampi, S. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 41(6):826-831. doi:10.1079/IVP2005714.
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Hort.* 108(2):105-120.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station Circular No. 347. University of California, Berkeley, USA. 1-32.
- Jan, A.; Bhat, K. M.; Mir, M. A.; Bhat, S. J. A. and Hassan, S. 2013. Callus culture and organogenesis in strawberry cv. Senga Sengada. *J. Cell and Tissue Res.* 13(1):3581-3584.
- Jofre-Garfias, A. E.; Vázquez-Sánchez, M. N.; Hernández-Razo, A. R. and Dávalos-González, P. A. 2006. Production and acclimatization of *in vitro* produced strawberry plants. *Acta Hort.* 727:67-72.
- Kozai, T. 1991. Acclimatization of micropropagated plants. *In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. High-Tech and Micropropagation I.* Springer-Verlag, Berlin. 35(17):313-343.
- Laforge, F.; Lussier, C.; Desjardins, Y. and Gosselin, A. 1991. Effect of light intensity and CO₂ enrichment during *in vitro* rooting on subsequent growth of plantlets of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. *Sci. Hort.* 47(3):259-269.
- Ling, A. C. K. and Wetten, A. 2017. *In vitro* regeneration of *Fragaria vesca* L. (Pertumbuhan semula *in vitro* *Fragaria vesca* L.). *J. Trop. Agric. Food Sci.* 45(1):77-88.
- Mariscal-Amaro, L. A.; Rivera-Yerena, A.; Dávalos-González, P. A. y Ávila-Martínez, D. 2017. Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia.* 51(6):673-681.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15:473-497.
- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadlecěk, P.; Haisel, D. and Plzáková, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum.* 42(4):481-497.
- Preece, J. E. and Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In: Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (Eds.). Micropropagation,* Kluwer Academic Publishers. 71-93.
- Rekha, R.; Mandave, P. and Meti, N. 2013. Micropropagation of strawberry cultivar Sweet Charlie through axillary shoot proliferation. *J. Appl. Hort.* 15(1):71-73.
- Roberts, A. V.; Smith, E. F. and Mottley, J. 1990. The Preparation of micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization. *In: Pollard, J. W. and Walker, J. M. (Eds.). Methods in Molecular Biology.* The Humana Press. 6(2):227-236.
- Rohr, R.; Iliev, I.; Sca, I. A. and Tsouloha, P. 2003. Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Hort.* 616:59-69.
- SAGARPA. 2017. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. Fresa mexicana. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Subsecretaría de Agricultura, SAGARPA, Ciudad de México, México. 13 p.

- SAS. 2009. User's Guide of SAS (Statistical Analysis System) Version 9. Ninth Edition. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA. 550 p.
- Schiappacasse, C. F.; Carrasco, G. and Carrasco, S. F. 2006. Effect of four shading levels on flower stem and bulb quality of two Lilies (*Lilium* spp.) cultivars. Technical Agric. 66(4):352-359.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agrícola y Pecuaria. Anuario estadístico de la producción agropecuaria 2017. SAGARPA, México. <http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola.siap-gobmx/AvanceNacionalCultivo.do>.
- Silva, A. T.; Pasqual, M.; Antunes, L. E. C. and Carva, I. G. R. C. 1994. Influence of species, defoliation and environment in the acclimatization of seedlings produced 'in vitro'. Sci. Prac. 18(2):280-285.