

PLANTAS DE FRESA REGENERADAS *IN VITRO* MEDIANTE ORGANOGÉNESIS DIRECTA EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AUXINAS Y CITOCININAS

Jesús Hernández Ruiz¹, Ana E. Rangel Castillo¹, María I. Laguna Estrada¹, Gibran J. Alejandro Rojas², Ana I. Mireles Arriaga¹ y Jorge E. Ruiz Nieto¹

RESUMEN

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es una especie vegetal de gran importancia económica y agroalimentaria, que se cultiva en regiones agroindustriales de México, como el Bajío. El principal insumo de la producción agrícola son las plantas, cuya primera etapa de multiplicación empieza con la formación de clones por cultivo *in vitro* a partir de las plantas madre seleccionadas. Sin embargo, diversas características de las plantas regeneradas pueden presentar variaciones que reducen su valor agronómico y comercial. Dicha variabilidad es debida a múltiples factores, aunque destaca el efecto que tienen las combinaciones de auxinas y citocininas, así como sus concentraciones. El objetivo del presente estudio fue evaluar las características de plantas de fresa regeneradas *in vitro* mediante organogénesis directa ante diferentes concentraciones de auxinas y citocininas. Los explantes se obtuvieron de meristemos apicales en los estolones de plantas madre de la variedad Camino Real. Se utilizaron 21 tratamientos de auxinas (AIB y 2,4-D) y citocininas (BAP y cinetina) para evaluar la organogénesis. El mayor número de vitroplantas se obtuvo con la combinación del AIB y el BAP a 0,4 mg·L⁻¹, con una tasa de regeneración promedio de 68,3 %. En dicho tratamiento se presentaron la vitroplantas con mejor desarrollo y alta respuesta antioxidante. La mayor concentración promedio de prolina de 1,7 µg mL⁻¹, en el tratamiento control sin auxinas ni citocininas.

Palabras clave adicionales: Clonación, cultivo *in vitro*, *Fragaria x ananassa*, vitroplantas

ABSTRACT

Strawberry plants regenerated *in vitro* by direct organogenesis at different concentrations of auxins and cytokinins

The strawberry (*Fragaria x ananassa*) is a plant species of great economic and agri-food importance, which is grown in agro-industrial regions of Mexico such as Bajío. The main input for agricultural production is seedlings, whose first stage of multiplication begins with the formation of clones by *in vitro* culture from selected mother plants. However, several characteristics of the regenerated plants may present variations that reduce their agronomic and commercial value. This variability is due to multiple factors, although the effect of auxin and cytokinin combinations, as well as their concentrations, stands out. The aim of the present study was to regenerate strawberry plants *in vitro* by direct organogenesis at different concentrations of auxins and cytokinins. Explants were obtained from apical meristems on the stolons of mother plants of the Camino Real variety. A total of 21 treatments of auxins (indole-3-butyric acid –IBA and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid –2,4-D) and cytokinins (benzylaminopurine –BAP and kinetin) were used for organogenesis evaluation. The highest number of *in vitro* plants regenerated with the combination of IBA and BAP at 0,4 mg·L⁻¹, with an average regeneration rate of 68,3 %. In this treatment, the *in vitro* plants showed better development and high antioxidant response. The highest average proline concentration of 1,7 µg mL⁻¹, in the control treatment without auxins or cytokinins.

Additional keywords: Cloning, *Fragaria x ananassa*, *in vitro* culture, vitroplants

Editor Asociado: Dra. Marie González

INTRODUCCIÓN

El cultivo y la producción de fresa (*Fragaria x ananassa*) es importante desde el punto de vista económico porque los frutos son altamente demandados por los consumidores. Según

FAOSTAT (2022), México fue el cuarto país productor y un importante exportador de fresa en el mundo, y en el 2023 la producción fue cerca de 650 mil toneladas, con un valor superior a 800 millones de dólares (SIAP, 2024). Los frutos de fresa son ricos en vitaminas, antioxidantes y

Recibido: Agosto 22, 2024

Aceptado: Noviembre 25, 2024

¹Departamento de Agronomía de la Universidad de Guanajuato México.

e-mail: jorge.ruiz@ugto.mx (autor de correspondencia); hernandez.jesus@ugto.mx; ae.rangel@ugto.mx; mi.laguna@ugto.mx; ana.mireles@ugto.mx

²Berrie Gene Innovation. e-mail: comercial@berriegeninnovation.com

fibras, contribuyendo a dietas saludables (Giampieri et al., 2015). Además, la fresa es un cultivo con posibilidad de producción intensiva y tecnificada, lo que permite innovaciones en prácticas de cultivo para sustentar la demanda del mercado (Ibrahim et al., 2022). El sistema productivo de fresa depende de la oferta constante de plantas como principal insumo y en regiones agroindustriales de México como el Bajío, la experiencia de los productores y el avance técnico favorecen la oportunidad de especialización para recuperar el liderazgo por el que se solía caracterizar esta región.

La oferta de plantas se puede generar en viveros de producción a partir de los estolones de las plantas madre; sin embargo, en este sistema la producción de plantas está sujeta a temporadas específicas ya que la formación de estolones es controlada principalmente por señales hormonales y respuestas ambientales, como el fotoperiodo y la temperatura (Al-Madhagi, 2023). Igualmente, como desventaja, la propagación masiva de plantas en los viveros es susceptible a problemas fitosanitarios si no se siguen las prácticas correspondientes (Poothong, 2020), resultando las enfermedades virales las más críticas (Valliath y Mondal, 2023). Para soslayar estas desventajas, las plantas madre son clonadas por cultivo *in vitro* para generar poblaciones con un mayor número de individuos que mantengan la misma identidad y presenten menos fitopatógenos (Mahmoud et al., 2017). Sin embargo, a pesar de las ventajas biotecnológicas de esta técnica, existen retos importantes como las variaciones somaclonales (Palei et al., 2015).

Las principales auxinas utilizadas en la regeneración *in vitro* de fresa son el ácido indolacético, el ácido indol butírico y el ácido naftalenacético. Estas auxinas promueven la formación de raíces y pueden influir tanto en el desarrollo de callos como de órganos, cuando se combinan con citocininas como la benziladenina o Thidiazuron (Cappelletti et al., 2016). Mientras que las principales citocininas utilizadas en la regeneración *in vitro* de fresa, son la benziladenina y el Thidiazuron. Estas hormonas son conocidas por estimular la división celular y la organogénesis; se utilizan especialmente para la formación de brotes (Gupta et al., 2020). La interacción entre las auxinas y las citocininas es esencial para la organogénesis; una alta

proporción de auxinas favorece la formación de raíces, mientras que una mayor proporción de citocininas promueve la producción de brotes. El equilibrio preciso de estas hormonas en el medio de cultivo determina la vía por la cual se lleva a cabo la regeneración *in vitro* y éste puede ajustarse según el objetivo de cada proyecto, ya sea la generación de callos, raíces o la propagación de brotes (Shanthala et al., 2021).

La evaluación de auxinas y citocininas es esencial para cada variedad de una misma especie, ya que las diferencias genéticas dan lugar a respuestas morfológicas también diferentes (Suraya et al., 2021). Katel et al. (2022) indicaron que la variación en las respuestas a los reguladores de crecimiento, entre variedades de fresa, ocurre también a nivel fisiológico. Diferentes concentraciones y combinaciones afectan la regeneración, el crecimiento y la diferenciación de los tejidos. Por ejemplo, para Anuradha et al. (2016) la mayor respuesta en la multiplicación de brotes de la variedad Ofra, se obtuvo en medio MS con cinetina (CIN) a $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido indol acético (IAA) a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Kim et al. (2019) indican que, el tratamiento benciladenina fue el más eficiente en la proliferación *in vitro* de las variedades Goha y Seolhyang; sin embargo, se recomendó su uso en bajas concentraciones para evitar variaciones morfológicas y genéticas. Sukhi et al. (2021) reportaron que los explantes de puntas de meristemas de la línea BARI Strawberry-1 mostraron el mejor desempeño en medio MS suplementado con bencilaminopurina (BAP) a 1.0 mg, ácido giberélico (GA3) a 0,5 mg y CIN a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para la iniciación de brotes; y el medio MS se suplementó con ácido indol-3-butírico (AIB) a 1,0 mg y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para la iniciación de raíces.

Determinar las concentraciones óptimas para cada condición asegura la producción de plantas *in vitro* con las características morfológicas requeridas por cada sector productivo regional (Khromova y Matsneva, 2022). La determinación de aminoácidos como la prolina permite evaluar el nivel de estrés osmótico en los tejidos vegetales en regeneración, lo que facilita la identificación de líneas celulares más tolerantes (Mäkelä et al., 2019). Piwowarczyk et al. (2017) reportaron la acumulación significativa de prolina en los brotes *in vitro* de las variedades Derek y Krab de

Lathyrus sativus, en los cuales se indujo estrés osmótico con polietilenglicol a 11 mM. La prolina también ha demostrado protección contra varias especies reactivas de oxígeno (ROS) en sistemas *in vitro*; Rehman et al. (2021) indican que la prolina posee la capacidad de eliminar el superóxido mediante una transferencia de electrones. Si bien su eficiencia de eliminación es baja a nivel molar, su elevada presencia en células vegetales sometidas a estrés le permite contribuir de manera significativa a la eliminación de ROS, complementando la acción de otros eliminadores no enzimáticos.

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* están expuestos a diversos factores que pueden generar estrés oxidativo como la alta luminosidad, la composición del medio, la manipulación excesiva y la bioacumulación de compuestos tóxicos (Chaki et al., 2020). Los ensayos *in vitro* ofrecen un entorno controlado para estudiar las respuestas al estrés oxidativo. En estos ensayos, el estrés se puede inducir, por ejemplo, suplementando los medios de cultivo con peróxido de hidrógeno o metilviolígeno, los cuales generan la formación de especies reactivas de oxígeno (Claeys et al., 2014). Evaluar la respuesta antioxidante permite optimizar los protocolos *in vitro*, asegurando plantas más sanas y productivas al minimizar el estrés oxidativo y maximizar la regeneración de plantas (Nieto et al., 2020).

Como hipótesis se planteó que las diferencias en la combinación de auxinas y citocininas tendrían efecto en las características expresadas en las plantas de fresa regeneradas *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la variación de las características de plantas de fresa regeneradas *in vitro* mediante organogénesis directa en diferentes concentraciones de auxinas y citocininas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y obtención de explantes

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Genética Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Guanajuato. Se utilizaron plantas madre de la variedad Camino Real por su importancia agroindustrial y económica en el Bajío. Se obtuvieron 252 explantes de meristemas apicales en estolones de 1,5 cm de altura (ElKichaoui, 2014) y se utilizaron 12 explantes

por tratamiento. Como pre-desinfección, los explantes se lavaron con una solución de N-(triclorometilto) ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida a $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ por 20 min en agitación constante; y posteriormente, en etanol 70 % durante 1 min con dos enjuagues finales utilizando agua destilada estéril. Después, se mantuvieron en cloro al 1,5 % v/v durante 3 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, los explantes se lavaron con detergente neutro $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ por 3 min y se enjuagaron 3 veces con agua desmineralizada. Para la desinfección, se lavaron en hipoclorito de sodio al 2,0 % durante 15 min en agitación constante y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se mantuvieron en agua destilada estéril hasta antes de ser transferidos al medio de cultivo.

Establecimiento *in vitro*. Se utilizó el medio de cultivo WPM (sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar bacteriológico $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y carbón activado $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), según la recomendación de la empresa Berrie Gene Innovation para el cultivo *in vitro* de fresa. El pH y la conductividad eléctrica se ajustaron a 5,5 y $0,12 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Los primeros cinco días, los explantes se conservaron en oscuridad y posteriormente se mantuvieron en un fotoperiodo de 10 h luz y 14 h oscuridad, los explantes se mantuvieron a 20 cm de la fuente de luz LED blanca donde recibían 280 lx. La oscuridad durante los primeros días del cultivo *in vitro* ayuda a reducir el estrés, especialmente el oxidativo, que experimentan las plantas durante esta transición. Al evitar el estrés por luz, se previene la deshidratación de los explantes y se favorece la aclimatación de las plantas (Díaz et al., 2021). La incubación se realizó en un cuarto de crecimiento ($12,6 \text{ m}^3$) a $22 \text{ }^\circ\text{C}$.

Organogénesis directa. Después de 75 días del establecimiento *in vitro* se indujo la organogénesis directa, subcultivando los explantes en medios conteniendo las combinaciones de auxinas y citocininas presentadas en el Cuadro 1. Estas concentraciones se diseñaron con base en estudios de Dutta (2022), Rukh et al. (2023) y Gonzales et al. (2023).

Variables evaluadas. A los 30 días después de la inducción de la organogénesis directa, se evaluaron las características morfológicas de las vitroplantas. Se contabilizó el número plantas regeneradas (NPR) y la tasa de regeneración de vitroplantas (TRVP, %), el número de raíces

(NRC) y tallos (NTA). Se midió la longitud de la raíz más larga (LRL, cm) y del tallo más largo (LTL, cm). Para evaluar el desarrollo, se determinó la biomasa de las vitroplantas, también de forma separada en raíces y tallos (BVP, BRZ, BTS, g). Para lo cual se calentaron las muestras a 70 °C por 72 h, posteriormente se registró el peso seco (Al-Khateeb et al., 2014). Se determinó la concentración de prolina (PRO; $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por la reacción del aminoácido con el 2,2-dihydroxiIndeno-1,3-diona; la medición se realizó por espectrofotometría a 517 nm (Bates et al.,

1973). Respecto a la respuesta antioxidante, se determinó la concentración de compuestos fenólicos (CF; $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico) con base en la formación del complejo fosfotúngstico-fosfomolibdeno y la medición se realizó por espectrofotometría a 750 nm (Martínez y Paredes, 2014). La actividad antioxidante se analizó mediante el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y su absorbancia por espectrometría a 515 nm, los resultados se reportaron como porcentaje de radical remanente (Brand et al., 1995).

Cuadro 1. Tratamientos de combinaciones de auxinas y citocininas evaluados.

Tratamiento	Auxina	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Citocinina	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
T1	AIB	0,2	BAP	0,2
T2	AIB	0,2	BAP	0,4
T3	AIB	0,2	CIN	0,2
T4	AIB	0,2	CIN	0,4
T5	AIB	0,2	Sin citocinina	0,0
T6	AIB	0,4	BAP	0,2
T7	AIB	0,4	BAP	0,4
T8	AIB	0,4	CIN	0,2
T9	AIB	0,4	CIN	0,4
T10	AIB	0,4	Sin citocinina	0,0
T11	2,4-D	0,2	BAP	0,2
T12	2,4-D	0,2	BAP	0,4
T13	2,4-D	0,2	CIN	0,2
T14	2,4-D	0,2	CIN	0,4
T15	2,4-D	0,2	Sin citocinina	0,0
T16	2,4-D	0,4	BAP	0,2
T17	2,4-D	0,4	BAP	0,4
T18	2,4-D	0,4	CIN	0,2
T19	2,4-D	0,4	CIN	0,4
T20	2,4-D	0,4	Sin citocinina	0,0
T21	Sin auxina	0,0	Sin citocinina	0,0

AIB: Ácido indol-3-butírico; 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: bencilaminopurina; CIN: cinetina

Análisis estadístico. Los datos obtenidos en los 21 tratamientos de las diferentes variables se analizaron a través de un diseño completamente al azar con 10 repeticiones, mediante el análisis de la varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey. Para reducir la complejidad de las relaciones multidimensionales entre los datos de las variables, se realizó un análisis de componentes principales y los tratamientos se agruparon mediante el algoritmo k-means. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Minitab 16.2.3 (Pennsylvania State University).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) en el NPR, donde el mayor número de brotes se obtuvo agregando la auxina AIB y la citocinina BAP, en ambos casos a 0,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figuras 1 y 2). Según Gomes et al. (2021), cuando la concentración de AIB es superior a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se induce la multiplicación de las vitroplantas por organogénesis indirecta; AIB es una auxina similar en estructura y función a la hormona vegetal original, por lo cual se promueve el enraizamiento mediante el

alargamiento y la división celular. Por su parte, el 2,4-D es un agente plaguicida con efectos herbicidas en altas concentraciones, pero que en cultivo de tejidos vegetales promueve una respuesta en el crecimiento (de Castro, 2017). La BAP contiene un grupo bencilo unido a la base de adenina, mientras que la CIN posee un grupo furfurilo. Esta variación en su estructura química afecta la estabilidad y forma en que las vitroplantas metabolizan estas citocininas (Plihalova et al., 2016). Para el cultivo de tejidos vegetales la BAP puede inducir efectos más pronunciados en concentraciones más bajas. Sin embargo, la elección de la citocinina depende de la especie, el tejido para los explantes y la etapa de desarrollo, entre otros factores específicos propios de cada investigación (Rodríguez et al., 2022). En los resultados reportados por Rahman et

al. (2015), el mayor número de brotes fue de 15,0 por disco de hoja en medio MS, con BAP a $3,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido giberélico a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; con una longitud de 2,0 cm. En el caso de los resultados de Dutta (2022), el medio MS con CIN fue menos efectivo para el desarrollo de brotes en comparación con el medio suplementado con diferentes concentraciones de BAP. Sin embargo, Naing et al. (2019) indicó que las vitroplantas regeneradas de callos cultivados en medios con CIN $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mostraron mejores parámetros de crecimiento en comparación con las que se obtuvieron sin CIN. Lo cual resulta similar a los resultados del presente estudio, cuando se comparan los tratamientos de control T5, T10, T15, T20 y T21 donde no se utilizó la combinación auxinas y citocininas.



Figura 1. Vitroplantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Camino Real regeneradas por organogénesis directa en medio de cultivo suplementado con la auxina ácido indol-3-butírico y la citocinina bencilaminopurina, ambas a $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para la variable NRC, se identificaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) con el mayor número de raíces de 9,5 presente en el T7. Una proporción más alta de auxinas:citocininas, generalmente, favorece el desarrollo de las raíces, mientras que una proporción más alta de citocininas:auxinas estimula la proliferación de los brotes (Salvador et al., 2014); sin embargo, los resultados del tratamiento T7 corresponden a una proporción de AIB y BAP de 1:1. Regular el equilibrio hormonal en el medio de cultivo es esencial para una regeneración y crecimiento exitoso (Kurepa y

Smalle, 2022). En cuanto al enraizamiento, Danial et al. (2016) reportaron que en el medio MS suplementado con $0,75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indolacético se presentó el mayor número de raíces por vitroplanta de fresa de 6,265 cm y una longitud de 4,393 cm. Por su parte, Saridas et al. (2021) indicaron que las vitroplantas de fresa de la variedad 291 en un medio de MS $4,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y agar $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sin reguladores de crecimiento, presentaron 30 raíces en promedio y en la variedad Kaska ocurrió la mayor longitud de raíz de 5,0 cm, promedio, también en el mismo medio. Al garantizar un sistema de raíces sano y

extenso, las plantas propagadas *in vitro* pueden alcanzar un crecimiento de brotes y tallos más vigoroso, lo cual promueve la producción y

distribución de hormonas vegetales como las citoquininas (Espinosa et al., 2018).

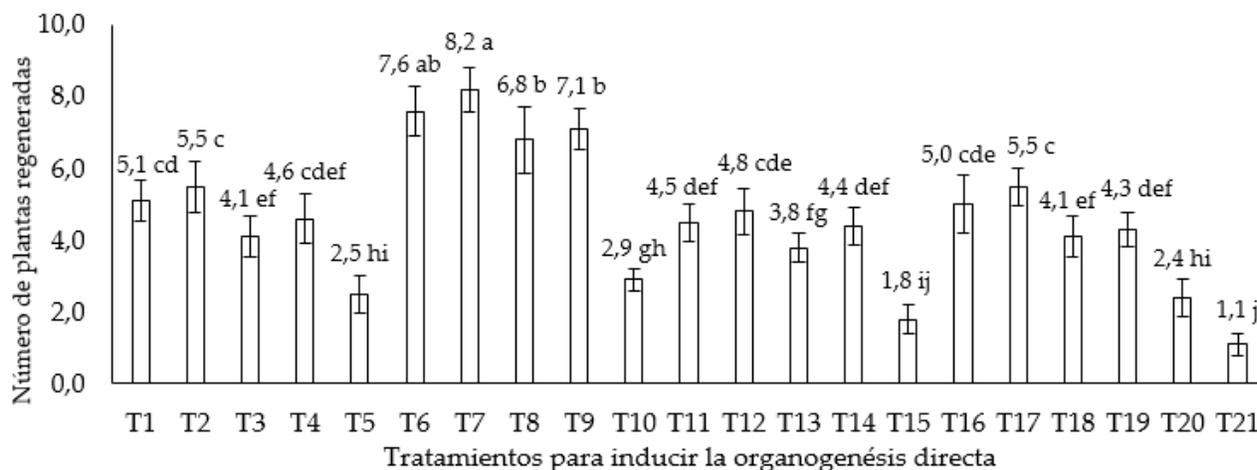


Figura 2. Número de plantas regeneradas promedio por tratamiento a partir de 12 explantes iniciales obtenidos de meristemos apicales de estolones de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Camino Real, en medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de bencilaminopurina y cinetina a los 105 días. Tratamientos T1 a T21 descritos en la Tabla 1.

En el caso del NTA, se identificaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) con el mayor número tallos de 4,0, también en el T7. Igualmente, se identificó una correlación de 0,91 ($p \leq 0,01$) identificada entre las variables NRC y NTA. El desarrollo de raíces y tallos *in vitro* se ve influenciado por el equilibrio hormonal, principalmente auxinas y citoquininas. Las condiciones de cultivo podrían haber favorecido la organogénesis en aquellos tratamientos donde se logró dicho equilibrio (Lapiz et al., 2020). Un sistema radicular más desarrollado facilita una mayor absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo, lo que a su vez puede promover el desarrollo de un mayor número de tallos (Gao et al., 2023).

Las mayores longitudes en la raíz y el tallo se presentaron en la combinación de AIB a $0,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con BAP a $0,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, con 4,4 y 3,5 cm, correspondientemente; igualmente, se identificó una correlación de 0,97 ($p \leq 0,01$) entre las variables LRL y LTL. La longitud de las raíces de las plantas *in vitro* está influenciada por diversos factores hormonales, como el tipo y la concentración de auxinas, la interacción con las citoquininas y la duración de la exposición a las hormonas (Danial et al., 2016). La integridad y

composición del medio basal de cultivo, incluido su contenido hormonal, influyen altamente en la longitud de la raíz (Fragoso et al., 2018).

Se identificaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre los tratamientos en la BVP, así como su segmentación en raíces y tallos. En el T7 se determinó la mayor cantidad de biomasa con 2,52 g por vitroplanta, principalmente debido a que el desarrollo de raíces permitió la mayor relación de biomasa en los tallos; las proporciones fueron de 38,1 y 61,9 % en las raíces y los tallos, respectivamente (Cuadro 2). Contrariamente, el menor desarrollo de 1,90 g se presentó en el T21 (control absoluto) donde no se utilizaron reguladores de crecimiento; las proporciones de biomasa de raíces y tallos fueron de 75,8 y 24,2 %, según correspondió. Complementar el sistema radicular con auxinas durante la regeneración de plantas *in vitro* conduce a una mayor capacidad de desarrollo y crecimiento de los brotes (Sahoo et al., 2021). Mientras que en comparación con los resultados de Al-Khateeb et al. (2014) que utilizaron el medio MS y la variedad Chandler de fresa, el tratamiento con ácido naftalenacético presentó mayor peso seco, del cual los tallos y las raíces representaron el 57,6 y 42,4 %, respectivamente.

Cuadro 2. Análisis estadístico entre los tratamientos por cada variable evaluada y relacionada con el crecimiento de cada vitroplanta de fresa.

Trat.	NRC**	NTA**	LRL**	LTL**	BVP**	BRZ**	BTS**	PRO**	CF**	DPPH**
T1	7,1 de	3,3 a:d	3,6 b:d	3,0 a:d	2,35 b:e	1,25 de	1,10 d:f	2,78 c:e	1,08 de	70,4 c:f
T2	7,6 c:e	3,5 a:c	3,6 b:d	3,1 a:c	2,40 a:d	1,22 de	1,18 d	2,73 e	1,10 cd	71,2 b:e
T3	6,4 ef	3,2 b:d	3,3 cd	2,9 b:f	2,28 d:f	1,30 b:d	0,98 f:h	2,87 b:d	1,02 d:g	68,4 e:g
T4	6,8 ef	3,2 b:d	3,4 cd	3,0 a:d	2,32 c:e	1,25 de	1,07 d:f	2,80 c:e	1,06 d:f	69,7 d:f
T5	4,9 gh	1,6 fg	2,5 gh	2,5 d:h	1,97 i:k	1,40 a:c	0,57 kl	1,87 hi	0,61 ij	49,5 lm
T6	9,2 ab	3,7 ab	4,1 ab	3,2 a:c	2,49 ab	1,02 fg	1,47 ab	2,44 fg	1,27 ab	76,2 ab
T7	9,5 a	4,0 a	4,4 a	3,5 a	2,52 a	0,96 g	1,56 a	2,42 g	1,32 a	78,0 a
T8	8,2 b:d	3,3 a:d	3,8 a:c	3,0 a:d	2,45 a:c	1,13 de	1,32 c	2,55 f	1,21 bc	73,9 a:d
T9	8,7 a:c	3,5 a:c	4,0 ab	3,2 a:c	2,47 a:c	1,06 fg	1,41 bc	2,51 fg	1,24 ab	75,3 a:c
T10	5,1 gh	1,9 ef	2,8 e:g	2,5 d:h	2,00 hi	1,40 ab	0,60 k	1,92 h	0,68 i	52,8 kl
T11	6,5 ef	3,0 b:d	3,3 cd	2,9 b:f	2,09 g:j	1,23 de	0,86 h:j	3,15 a	0,94 g	63,0 hi
T12	6,8 ef	3,1 b:d	3,4 cd	2,9 b:f	2,12 f:i	1,21 de	0,91 g:i	2,94 b	0,97 fg	64,1 g:i
T13	5,6 fg	2,6 de	3,1 d:f	2,7 c:h	2,03 i:k	1,27 cd	0,75 j	3,20 a	0,81 h	56,8 jk
T14	6,5 ef	2,9 cd	3,2 d:f	2,8 b:g	2,08 h:j	1,25 de	0,83 ij	3,13 a	0,93 g	61,0 ij
T15	4,4 gh	1,3 fg	2,2 gh	2,3 h	1,94 jk	1,44 a	0,50 kl	1,75 ij	0,58 ij	47,2 m
T16	6,9 e	3,2 b:d	3,6 b:d	3,0 a:d	2,33 b:e	1,23 de	1,10 d:f	2,79 c:e	1,06 d:f	69,4 d:g
T17	7,5 c:e	3,4 a:c	3,5 b:d	3,0 a:d	2,38 a:d	1,26 de	1,12 de	2,74 de	1,09 d	70,6 c:f
T18	6,5 ef	2,9 cd	3,2 d:f	2,8 b:g	2,20 e:h	1,21 de	0,99 e:h	2,88 bc	0,98 e:g	65,3 f:i
T19	6,7 ef	3,0 b:d	3,3 cd	2,9 b:f	2,25 d:g	1,22 de	1,04 e:g	2,84 b:e	1,01 d:g	67,8 e:h
T20	5,0 gh	1,9 ef	2,6 f:h	2,5 d:h	1,96 jk	1,39 a:c	0,57 kl	1,72 j	0,63 ij	50,3 lm
T21	4,0 h	1,1 g	2,1 h	2,3 gh	1,90 k	1,44 a	0,46 l	1,65 j	0,53 j	45,0 m

Trat.: tratamientos, NRC: número de raíces, NTA: número de tallos, LRL: longitud de la raíz más larga (cm), LTL: longitud del tallo más largo (cm), BVP, BRZ, BTS: biomasa de las vitro plantas y separada tanto por raíz como tallos ($\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$), PRO: concentración de prolina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), CF: concentración de compuesto fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico), DPPH: actividad antioxidante (%). **: Diferencias altamente significativas ($p\leq 0,01$) en las variables. Los valores con el mismo rango de letras dentro de las filas de cada columna indica que los valores medios son estáticamente iguales según la prueba de Tukey ($p\leq 0,05$).

En el caso de la PRO, se identificaron diferencias altamente significativas ($p\leq 0,01$). La mayor concentración de prolina de $3,20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se determinó en el T13, el cual contenía 2,4-D y CIN a $0,2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, es relevante señalar que el T13 presentó la menor cantidad de BVP (2,03 g). Varios factores pueden provocar un aumento de la concentración de prolina en los tejidos en regeneración, lo cual se relaciona con la respuesta al estrés y la adaptación. Estos factores incluyen estrés osmótico e hídrico, desequilibrio de nutrientes, condiciones culturales, equilibrio hormonal y daño físico. La prolina funciona como un osmoprotector y molécula de señalización en respuestas al estrés, al estabilizar proteínas y membranas mientras elimina los radicales libres

para proteger las células vegetales (Kavi et al., 2015). Hussein et al. (2016) reportaron el incremento del contenido de prolina de $0,53$ a $3,95 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y de $3,31$ a $7,81 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en *in vitro* plantas de las variedades Fortuna y Festival de fresa, en medio MS con NaCl $1,0 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Mozafari et al. (2018) indicaron un aumento en la concentración de prolina de $0,50$ a $1,12 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, en vitroplantas de fresa en medio MS con benciladenina $2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido indol-3-butirico $0,01 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con polietilenglicol de $0,0$ a $5,0 \%$. El incremento intracelular de los niveles de prolina libre se consideran un distintivo de las reacciones adaptativas en las plantas (Forlani y Funck, 2020); por lo cual, la importancia de su determinación en estudios de regeneración de plantas *in vitro*. En el

caso de la respuesta antioxidante, se identificaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre los tratamientos para la variable CF. La mayor CF y actividad antioxidante se determinaron en el T7 con $1,32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico. Se determinó una correlación altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre la CF y la BVP de 0,95. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes, protegiendo a los tejidos vegetales del daño causado por especies reactivas de oxígeno. Según Selim et al. (2021) las antocianinas, un tipo de fenólico, aumentan en respuesta al estrés, lo que sugiere que estos compuestos pueden reducir el daño oxidativo y favorecer un mayor crecimiento y acumulación de biomasa. Vilkickytė y Raudonė (2021) indican que los compuestos fenólicos varían según la etapa de desarrollo y el nivel de estrés de las plantas, lo que implica una función protectora de estos metabolitos.

Se identificaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) en la actividad antioxidante determinada por el radical DPPH. La mayor actividad se determinó en el T7 con 78 %, lo cual confirma que en dicho tratamiento una mayor respuesta antioxidante favoreció el crecimiento de las *in vitro* plantas. También se explicaría la correlación entre la actividad antioxidante y BVP de 0,96 ($p \leq 0,01$). Diversas condiciones del cultivo *in vitro* de tejidos pueden dar lugar a la generación

de especies reactivas del oxígeno, cuyos efectos acumulativos eventualmente conducen a la inhibición de la embriogénesis, organogénesis o la muerte de los explantes, lo que hace crucial que las plantas *in vitro* sean capaces de iniciar una potente respuesta antioxidante metabólica y enzimática (Sachdev et al., 2021).

En el análisis de componentes principales, los CP1 y CP2 explicaron acumulativamente el 99 % de la variación. Para el CP1 la mayor correlación se determinó con la variable CF con 0,31 y para el CP2 con la variable PRO con 0,90. En el análisis de conglomerados para los tratamientos, se formaron 4 grupos que explicaron el 94 % de la variación (Figura 3). El grupo 1 sólo incluyó el T21, por lo que fue equivalente al centro de grupo. El grupo 2 se formó con centro en el CP1 de 0,218 y CP2 0,039, incluyendo los T1, T2, T4, T11, T12, T13, T14, T16, T17, T18 y T19. El centro del grupo 3 tuvo el CP1 0,217 y CP2 0,296, abarcando los T6, T7, T8 y T9; este grupo incluyó los tratamientos que presentaron la expresión de las características morfológicas evaluadas en las vitroplantas relacionadas con un mejor desarrollo. El grupo 4 presentó su centro en el CP1 0,218 y CP2 -0,277, formado por los T3, T10, T15 y T20. Las vitroplantas de los grupos identificados comparten las características señaladas en el Cuadro 3.

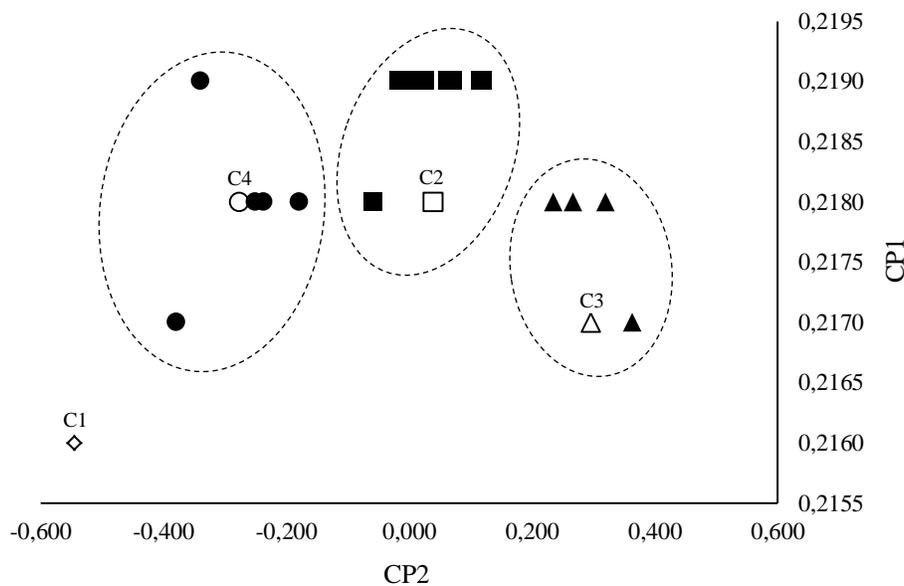


Figura 3. Agrupaciones formadas por el análisis de conglomerados para los tratamientos con base en los componentes principales. Centros de grupos (C1◇, C2□, C3△ y C4○), tratamientos del grupo 1 ◆, 2■, 3▲ y 4●. Componentes principales (CP1 y CP2).

Cuadro 3. Características compartidas por las vitroplantas de los grupos formados por el análisis de conglomerados.

Grupo	Características compartidas
1	Menor número de raíces y tallos, menor longitud la raíz y el tallo principal, mayor biomasa de las raíces, menor biomasa de los tallos, menor concentración de prolina, menor concentración de compuestos fenólicos, menor actividad antioxidante.
2	Alto número de tallos, mayores concentraciones de prolina
3	Mayor número de raíces y tallos, mayor longitud de la raíz y el tallo principal, mayor biomasa de las vitroplantas, mayor biomasa de los tallos, bajas concentraciones de prolina, mayor concentración de compuestos fenólicos, mayor actividad antioxidante.
4	Bajo número de raíces, Bajo número de tallos, mayor biomasa de las raíces, baja concentración de compuestos fenólicos, baja actividad antioxidante

CONCLUSIONES

Las características morfológicas de las vitroplantas variaron en función de la combinación de auxinas y citocininas utilizadas para su regeneración. En el tratamiento 7 constituido por la combinación de ácido indol-3-butírico y la citocinina bencilaminopurina, en ambos casos a $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se presentaron los siguientes valores promedio: el mayor número de vitroplantas con 8,2; la mayor tasa de regeneración con 68,3 %; el mayor número de raíces con 9,5; el mayor número de tallos con 4,0; la raíz más larga con 4,4 cm; el tallo más largo con 3,5 cm; la mayor biomasa como vitroplanta completa con 2,52 g; la mayor biomasa de los tallos con 1,56 g; la mayor concentración de compuestos fenólicos con $1,32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico y la mayor actividad antioxidante con 78,0 %. Es decir, el tratamiento 7 exhibió el mayor desarrollo y concentraciones de antioxidantes. En el tratamiento 15 con ácido 2,4-D a $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sin combinación con citocinina, y el tratamiento 21 sin auxina ni citocinina (control absoluto) se identificó la mayor cantidad de biomasa en las raíces con 1,44 g por vitroplanta, lo cual indica que es posible la regeneración de raíces con bajas concentraciones de auxina o incluso sin su presencia. En el tratamiento 21, se presentó la mayor concentración de prolina con $1,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, explicando en parte la deficiencia en la formación de tallos y un mejor desarrollo.

LITERATURA CITADA

- Al-Khateeb, A.A., M.E. Solliman, H.A.A. Mohasseb y W.F. Shehata. 2014. The role of hormones auxins in the in-vitro root formation of chandler strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). International Journal of Academic Research 6: 225230.
- Al-Madhagi, I. 2023. The habit of strawberry flowering is the key for runner propagation, where the photoperiod is the main environmental factor-A review. Advances in Horticultural Science 37(4): 433-449.
- Anuradha, S.K., K.P. Anil, K. Subhash y B. Sandhya. 2016. Production of strawberry plant by *in vitro* propagation. Research on Crops 17(3): 545-549.
- Bates, L.S., R.P. Waldren y I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39:205-207.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Science and Technology 28(1): 25-30.
- Cappelletti, R., S. Sabbadini y B. Mezzetti. 2016. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. Scientia Horticulturae 207: 117-124.
- Chaki, M., J.C. Begara-Morales y J.B. Barroso. 2020. Oxidative stress in plants. Antioxidants 9(6): 481.
- Claeys, H., S. Van Landeghem, M. Dubois, K. Maleux y D. Inzé. 2014. What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. Plant physiology 165(2): 519-527.

9. Danial, G.H., D.A. Ibrahim y M.S. Omer. 2016. Response of running shoot tips of strawberry (*Fragaria x ananasa*) for *in vitro* Propagation in Kurdistan region of Iraq. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology 1(2): 164-169.
10. de Castro-Marcato, A.C., C.P. de Souza y C.S. Fontanetti. 2017. Herbicide 2,4-D: a review of toxicity on non-target organisms. Water, Air, & Soil Pollution 228: 1-12.
11. Díaz-Rueda, P., M. Cantos-Barragán y J.M. Colmenero-Flores. 2021. Growth quality and development of olive plants cultured *in-vitro* under different illumination regimes. Plants 10(10): 2214.
12. Dutta, C. 2022. Effect of different plant growth regulators on *in-vitro* regeneration in varieties of strawberry. International Journal of Environment and Climate Change 12(11): 1178-1187.
13. ElKichaoui, A.Y. 2014. *In vitro* propagation of strawberry (*Fragaria x annanasa* Duch.) through organogenesis via runner tips. Ann Plant Sci 3(3): 619-627.
14. Espinosa-Leal, C.A., C.A. Puente-Garza y S. García-Lara. 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta 248: 1-18.
15. FAOSTAT. 2022. Crop and livestock products. Food and agricultura organization. Consultado el 14 de noviembre del 2024.
16. Forlani, G. y D. Funck. 2020. A specific and sensitive enzymatic assay for the quantitation of L-proline. Frontiers in Plant Science 11: 582026.
17. Fragozo-Monfort, L.E., S.K. Vilela-Bertolucci, A. Fabri-Lima, A. Alvares-de Carvalho, A. Mohammed, A.F. Blank y J.E.B. Pereira-Pinto. 2018. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. Industrial Crops and Products 116: 231-239.
18. Gao, C., T.H. Yosida, y D. Li. 2023. Root architecture and visualization model of cotton group with different planting spacing under local irrigation. In: C., Gao, T.H., Yosida and D. Li, Frontiers in Plant Science. Frontiers Media 14.
19. Giampieri, F., T.Y. Forbes-Hernandez, M. Gasparrini, J.M. Alvarez-Suarez, S. Afrin, S. Bompadre et al. 2015. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. Food & Function 6(5): 1386-1398.
20. Gomes, G.L.B. y K.C. Scortecci. 2021. Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. Plant Biology 23(6): 894-904.
21. Gonzales-Arteaga, J.J., J. Rodríguez-Layza, L.C. Romero-Rivas, A. Párraga-Quintanilla y J.A. Olivera-Soto. 2023. Role of BA and IAA on regeneration and shoot proliferation *in vitro* of three strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) varieties. Agroindustrial Science 13(2): 93-102.
22. Gupta, R., L. Pizarro, M. Leibman-Markus, I. Marash y M. Bar. 2020. Cytokinin response induces immunity and fungal pathogen resistance, and modulates trafficking of the PRR LeEIX2 in tomato. Molecular Plant Pathology 21(10): 1287-1306.
23. Hussein, A.E., A.Y. El-Kerdany y K.M Afifi. 2016. Effect of drought and salinity stresses on two strawberry cultivars during their regeneration *in vitro*. International Journal of Innovative Science Engineering and Technology 4(8): 83-93.
24. Ibrahim, M.H., R. Nulit y S.Z. Sakimin. 2022. Influence of drought stress on growth, biochemical changes and leaf gas exchange of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in Indonesia. AIMS Agriculture and Food 7(1): 37-60.
25. Katel, S., H.R. Mandal, S. Kattel, S.P.S. Yadav y B.S. Lamshal. 2022. Impacts of plant growth regulators in strawberry plant: A review. Heliyon 8(12).

26. Kavi-Kishor, P.B., P. Hima-Kumari, M.S.L. Sunita y N. Sreenivasulu. 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front in Plant Science* 6: 148328.
27. Khromova, T.M. y O.V. Matsneva. 2022. Optimization of berry crop genotype regeneration systems at the *in vitro* crop initiation stage. *EDP Science* 47: 04004.
28. Kim, H.J., J.N. Lee, M.J. Choi y J.T. Suh. 2019. Comparison of *in vitro* propagation and occurrence of morphological and genetic variation in strawberry tissue culture with various plant hormone treatments. *Journal of Plant Biotechnology* 46(2): 106-113.
29. Kurepa, J. y J.A. Smalle. 2022. Auxin/cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. *International Journal of Molecular Science* 23(4): 1933.
30. Lapiz-Culqui, Y.K., E.H. Huamán, J.C.N. Chávez y M. Oliva. 2020. Efecto de reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* de (*Vasconcellea sp.*), a partir de meristemos apicales en Chachapoyas, Amazonas. *In: Y.K., Lapiz-Culqui, E.H., Huamán, J.C.N., Chávez y M. Oliva. Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable* 4(1): 43-49.
31. Mahmoud, K.B., A. Najjar, E. Jedid, N. Jemai y A. Jemmali. 2017. Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of New Science* 47(2): 2564-2576.
32. Mäkelä, P.S., K. Jokinen y K. Himanen. 2019. Roles of endogenous glycinebetaine in plant abiotic stress responses. *In: Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*. Springer. pp. 153-173.
33. Martínez-Cruz, O. y O. Paredes-López. 2014. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1346: 43-48.
34. Mozafari, A.A., F. Havas y N. Ghaderi. 2018. Application of iron nanoparticles and salicylic acid in *in vitro* culture of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) to cope with drought stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132: 511-523.
35. Naing, A.H., S.H. Kim, M.Y. Chung, S.K. Park y C.K. Kim. 2019. *In vitro* propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars. *Plant methods* 15: 1-10.
36. Nieto, J.A., S. Santoyo, M. Prodanov, G. Reglero y L. Jaime. 2020. Valorisation of grape stems as a source of phenolic antioxidants by using a sustainable extraction methodology. *Foods* 9(5): 604.
37. Palei, S., A.K. Das y G.R. Rout. 2015. *In vitro* studies of strawberry - an important fruit crop: a review. *The Journal of Plant Science Research* 31(2): 115.
38. Piwowarczyk, B., K. Tokarz, W. Makowski y A. Łukasiewicz. 2017. Different acclimatization mechanisms of two grass pea cultivars to osmotic stress in *in vitro* culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(4): 96.
39. Plihalova, L., H. Vylčílová, K. Doležal, L. Zahajska, M. Zatloukal y M. Strnad. 2016. Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New biotechnology* 33(5): 614-624.
40. Poothong, S. 2020. Optimization of minerals and plant growth regulators for micropropagation of strawberry 'Pharachatan 80'. *Health Science and Technology Reviews* 13(2): 5-17.
41. Rahman, W., S. Zohora, A.I. Talukder y O. Kayess. 2015. Effect of different hormone combinations on callus induction and plant regeneration of strawberry. *International Journal of Advanced Research* 3(6): 1244-1250.
42. Rehman, A.U., F. Bashir, F. Ayaydin, Z. Kóta, T. Páli y I. Vass. 2021. Proline is a

- quencher of singlet oxygen and superoxide both in *in vitro* systems and isolated thylakoids. *Physiologia plantarum* 172(1): 7-18.
43. Rodrigues-Martins, J.P., M. Krysztow-Wawrzyniak, J.M. Ley-López, E. Marzena-Kalemba, M. Merlo-Mendes y P. Chmielarz. 2022. 6-Benzylaminopurine and kinetin modulations during *in vitro* propagation of *Quercus robur* (L.): an assessment of anatomical, biochemical, and physiological profiling of shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 151(1): 149-164.
44. Rukh, S., A. Kazmi, G. Nabi, M. Irshad, A. Ali, S. Muhammad et al. 2023. Improvement of *in vitro* regeneration frequency, polyphenolic and antioxidant profile of Strawberry (*Fragaria ananassa* Cv. Chandler) via indirect organogenesis. *Journal of Pure and applied Agriculture* 8(1).
45. Sachdev, S., S.A. Ansari, M.I. Ansari, M. Fujita y M. Hasanuzzaman. 2021. Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants* 10(2): 277.
46. Sahoo, G., S.L. Swamy, A.K. Singh y A. Mishra. 2021. Propagation of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre: Effect of auxins, age, season and C/N ratio on rooting of stem cuttings. *Trees, Forest and People* 5: 100091.
47. Salvador, T.D.L., T.D.L. Salvador, E.E.P.D. Lemos, P.G. Barros y R.D.S Campos. 2014. Enraizamento de estacas de pinheira (*Annona squamosa* L.) com ácido indolbutírico. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36: 310-314.
48. Saridas, M.A., G. Baktemur, H. Taşkın y S.P. Kargi. 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.
49. Shanthala, A.A., A. Dilkalal y T.G. Umesh. 2021. An efficient *in vitro* approach for direct and callus mediated regeneration of *Curcuma karnatakensis* – an endemic plant of Karnataka. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 27(3): 229-241.
50. Sehrawat, S.K., A.K. Poonia, S. Kajla y S. Bhat. 2016. Production of strawberry plant by *in vitro* propagation. *Research on Crops* 17(3): 545-549.
51. Selim, S., M. Abuelsoud, M.M. Al-Sanea y H. AbdElgawad. 2021. Elevated CO₂ differently suppresses the arsenic oxide nanoparticles-induced stress in C3 (*Hordeum vulgare*) and C4 (*Zea maize*) plants via altered homeostasis in metabolites specifically proline and anthocyanin metabolism. In: S., Selim, W., Abuelsoud, M.M., Al-Sanea and H., AbdElgawad. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier BV 166: 235-245.
52. SIAP. 2024. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Producción agrícola, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Consultado el 30 de octubre del 2024.
53. Suraya, A.A., A. Misran y M. Hakiman. 2021. The efficient and easy micropropagation protocol of *Phyllanthus niruri*. *Plants* 10(10): 2141.
54. Valliath, A.S. y R. Mondal. 2023. Micropropagation of Strawberry Crop (*Fragaria ananassa*): A Review. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika* 38(1): 41-44.
55. Vilkickytė, G. y L. Raudonė. 2021. Phenological and Geographical Effects on Phenolic and Triterpenoid Content in *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves. In: G., Vilkickytė and L., Raudonė, *Plants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute* 10(10): 1986.