

**Efecto de tratamientos antioxidantes en dos
medios de cultivo en el establecimiento *in vitro*
de *Fragaria x ananassa* a partir de la siembra
apolar de láminas foliares**

Edgar Leonel Bonilla Muñoz

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Noviembre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto de tratamientos antioxidantes en dos
medios de cultivo en el establecimiento *in vitro*
de *Fragaria x ananassa* a partir de la siembra
apolar de láminas foliares**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Edgar Leonel Bonilla Muñoz

Honduras, Zamorano
Noviembre, 2014

Efecto de tratamientos antioxidantes en dos medios de cultivo en el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa* a partir de la siembra apolar de láminas foliares

Presentado por:

Edgar Leonel Bonilla Muñoz

Aprobado:

Dinie Espinal, M.Sc.
Asesor Principal

Renán Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Raul Espinal, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto de tratamientos antioxidantes en dos medios de cultivo en el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa* a partir de la siembra apolar de láminas foliares

Edgar Leonel Bonilla Muñoz

Resumen. El cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) que se comercializa en el mundo debe su origen gracias a dos especies antepasadas, *F. chiloensis* y *F. virginiana*. En la comercialización este híbrido ha reemplazado a la especie silvestre *Fragaria vesca* por el tamaño superior de sus frutos. La propagación por medio de cultivos de tejidos ha resultado ser una opción para los productores ya que las plantas han resultado con mayor número de estolones, más uniformes y con mayor vigorosidad. Para este proyecto se realizó un experimento de desinfección para establecer un procedimiento de esterilización superficial de los explantes. El experimento principal consistió en evaluar el efecto de tratamientos antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares, utilizando dos medios de cultivo y dos condiciones de incubación. En el experimento de desinfección superficial, al final de la primera semana se observó que el tratamiento de 30% (v/v) de NaClO a 20 minutos, obtuvo la menor contaminación (10%). Se determinó que el mejor tratamiento para reducir la oxidación y para la regeneración de tejido callogénico fue utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), el antioxidante ácido cítrico con ácido ascórbico y bajo la condición de incubación de oscuridad ya que se obtuvo que el 50% de los explantes sobrevivieron y formaron tejido callogénico. Independiente del medio de cultivo utilizado, los tratamientos donde se observó una mayor incidencia de oxidación fueron aquellos donde se utilizó cisteína bajo condiciones de incubación en luz, ya que en estos tratamientos el 100% de los explantes presentó oxidación.

Palabras clave: Callogénesis, contaminación, oxidación, sobrevivencia.

Abstract: The cultivation of strawberry (*Fragaria x ananassa*) that is sold in the world owes its origin thanks to two ancestor's species, *F. chiloensis* and *F. virginiana*. In marketing this hybrid has replaced the wild species *Fragaria vesca* the superior size of fruit. The propagation by tissue culture has been an option for growers because plants have resulted in greater number of stolon, more uniform and more vigor. For this project a disinfection experiment was performed to establish a procedure for surface sterilization of explants. The main experiment was to evaluate the effect of antioxidant treatments in the establishment of leaf blades *in vitro* using two culture media and two incubation conditions. In the experiment for surface disinfection, the end of the first week was observed that treatment of 30% (v/v) NaClO for 20 minutes, had the lowest contamination (10%). It was determined that the best treatment for reducing the oxidation and regeneration of callogénico tissue was using the culture medium Murashige and Skoog (MS), the antioxidant citric acid with ascorbic acid, and under the condition of incubating in darkness as it was found that 50% survived and formed callogénico tissue. Independent of the medium used, the treatments with a higher incidence of oxidation were used those in which cysteine incubation low light conditions, because in such treatments 100% of the explants displayed oxidation was observed.

Keywords: Callogenesis, contamination, oxidation, survival.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	ii
Índice de cuadros y figuras.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4 CONCLUSIONES.....	15
5 RECOMENDACIONES	16
6 LITERATURA CITADA.....	17

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros		Página
1.	Modificación del medio básico Murashige y Skoog (MS) (1962) utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Fragaria x ananassa</i> . El Zamorano, Honduras, 2014	4
2.	Modificación del medio básico Knop (1865) utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Fragaria x ananassa</i> . El Zamorano, Honduras, 2014	5
3.	Tratamientos utilizados para el establecimientos <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Fragaria x ananassa</i> . El Zamorano, Honduras, 2014	10
4.	Escala para la denominación de las variables utilizadas en el experimento principal de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fragaria x ananassa</i> . El Zamorano, Honduras 2014	11
5.	Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición en la desinfección de láminas foliares de <i>Fragaria x ananassa</i> . El Zamorano, Honduras 2014	12
6.	Resultados de los tratamientos para la sobrevivencia y ausencia de la oxidación en la siembra <i>in vitro</i> de <i>Fragaria x ananassa</i> con base en la escala utilizada. El Zamorano, Honduras 2014	13
7.	Análisis estadístico de los factores y su interacción utilizados en el experimento principal de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fragaria x ananassa</i> . El Zamorano, Honduras 2014	14
Figuras		Página
1.	Flujo de proceso para la siembra <i>in vitro</i> de <i>Fragaria x ananassa</i> a partir de láminas foliares. El Zamorano, Honduras, 2014	6

1. INTRODUCCIÓN

La planta de fresa (*Fragaria x ananassa*) que se comercializa en el mundo debe su origen gracias a dos especies antepasadas, *F. chiloensis* y *F. virginiana*. La *F. chiloensis* es nativa de la costa oeste de Norte y Sudamérica, mientras que *F. virginiana* es nativa de la costa este de Norteamérica. Estas dos especies fueron llevadas a Europa donde accidentalmente formaron nuevos híbridos en algún momento a mediados del siglo XVIII (Darrow, 1966).

Las variedades cultivadas comercialmente son por lo general híbridos, en especial de *Fragaria x ananassa*, que han reemplazado casi universalmente a la especie silvestre, *F. vesca*, por el tamaño superior de sus frutos. El fruto, que conocemos como fresa, es en realidad un engrosamiento del receptáculo floral, siendo los puntitos que hay sobre ella los auténticos frutos (Santos y Obregón, 2009).

La planta de fresa (*Fragaria x ananassa*) se propaga convencionalmente de forma asexual, por estolones o por corona, por lo que existe gran diseminación de virus, enfermedades, nematodos y hongos. Estos problemas se han agudizado por la dificultad de detectar estos patógenos ya que muchas plantas enfermas son asintomáticas (Boxus, 1977).

Las plantas que se han propagado por medio de cultivos de tejidos han resultado con mayor número de estolones que las plantas propagadas por los métodos tradicionales, además de que son más uniformes y sobreviven más en el campo. Experiencias llevadas a cabo en Venezuela señalan que las plantas micropropagadas poseen un excelente vigor y también una óptima producción de estolones y frutos en el campo (FUSAGRI, 1984).

Los explantes para el cultivo de tejidos de fresa (*Fragaria x ananassa*) pueden provenir de la corona o de los estolones aunque es más fácil la extracción y la desinfección de los explantes a partir de los estolones. La alta pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo inducen una alta contaminación de los explantes, especialmente cuando estos son extraídos de plantas provenientes del campo. Estos contaminantes pueden ocasionar muerte de los tejidos, competir con ellos o modificar el medio (Salaverría, 2004).

Existen diversas técnicas para el control de la contaminación *in vitro*, tales como el uso de fungicidas y antibióticos en la planta madre, el explante y/o el medio de cultivo; sin embargo no se recomienda el uso de antibióticos en el medio para el control de bacterias ya que no son efectivos en la mayoría de los casos. En ocasiones ocurre el ennegrecimiento de los tejidos y posteriormente esto conlleva a una necrosis del explante. Para evitar que los explantes sufran una oxidación se sugiere disminuir la intensidad de la luz y agregar antioxidantes al medio de cultivo (Salaverría, 2004).

Ocasionalmente ocurre el ennegrecimiento del tejido, con posterior necrosis del explante. Para evitarlo se sugiere disminuir la intensidad de la luz, agregar antioxidantes al medio y el explante, subcultivar con frecuencia, incrementar las sales de calcio, reducir el nivel de nitrato en el medio y sumergir el explante en medio líquido por un día (Swartz y Lindstrom, 1986).

El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de cloro comercial (4.75% de hipoclorito de sodio) para la desinfección de explantes foliares de *Fragaria x ananassa* utilizando dos concentraciones de solución desinfectante (10 y 20% v/v), durante dos tiempos de exposición (20 y 30 min), así como la evaluación de dos tratamientos antioxidantes (ácido cítrico con ácido ascórbico y cisteína), la evaluación de dos medios de cultivo (Murashige y Skoog (MS) y Knop) y dos condiciones de incubación (luz y oscuridad).

El objetivo General de este estudio es desarrollar un procedimiento para el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa* a partir de la siembra apolar de láminas foliares. Los objetivos específicos son: (1) desarrollar un procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*, (2) evaluar el efecto de dos tratamientos de antioxidantes, ácido cítrico con ácido ascórbico y cisteína en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*, (3) determinar la mejor formulación nutritiva para la siembra *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa* y evaluar el efecto de la incubación de láminas foliares bajo condiciones de luz y (4) oscuridad en la siembra *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El presente ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano.

Materiales.

- Equipo de laboratorio (balanza analítica Fisher AccuSeries IP-54, cámara de flujo laminar Labconco con filtro HEPA, que retiene polvo, esporas de hongos, bacterias y toda clase de partículas mayores a 0.3 micrómetros (μm)).
- Cuarto de crecimiento que se mantiene a una temperatura de 24°C con 16 horas luz y 8 horas oscuridad.
- Cristalería (beacker, balón aforado, pipetas, platos petri, frascos de vidrio).
- Microondas y Autoclave
- Reactivos, Formulaciones y Soluciones nutritivas:
 - Medio Básico Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1)
 - Medio Básico Knop (1865) (Cuadro 2)
 - Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4,D)
 - Ácido Indolebutírico (AIB)
 - Antioxidantes cisteína, ácido cítrico y ácido ascórbico
 - Solución desinfectante a base de Hipoclorito de Sodio (NaClO) con 4.75% de ingrediente activo del producto comercial Magia Blanca®
 - Alcohol al 70%

El material vegetal (*Fragaria x ananassa*) se recolecto en la comunidad de Magadacilla, municipio de La Esperanza, del Departamento de Intibucá, Honduras. Este material vegetal fue otorgado por el señor Gonzalo Guevara Aguilar, productor comercial de fresa en La Esperanza. Este material ha sido propagado de manera convencional, por división de corona y tiene una edad promedio de 5 meses.

Cuadro 1. Modificación del medio básico Murashige y Skoog (MS) (1962) utilizado para el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*. El Zamorano, Honduras, 2014.

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	Nitrato de amonio - NHNO_3	1,650.000
	Nitrato de potasio - KNO_3	1,900.000
	Fosfato de potasio monobásico - KH_2PO_4	170.000
	Sulfato de magnesio heptahidratado - $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
	Cloruro de calcio dihidratado - $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
Micronutrientes	Yoduro de potasio - KI	0.830
	Ácido trioxobórico - H_3BO_3	6.200
	Sulfato de manganeso monohidratado - $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	16.900
	Sulfato de zinc heptahidratado - $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
	Molibdato de sodio - $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
	Sulfato de cobre pentahidratado - $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Hierro	FeNa EDTA - Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas	Ácido nicotínico	0.500
	Piridoxina	0.500
	Tiamina	0.400
Antioxidante	Ácido ascórbico	150.000
	Ácido cítrico	100.000
	Cisteína	4.000
Fitohormonas	Ácido indolebutírico	0.500
	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4,D)	2.000
	Inositol	100.000
	Sacarosa	30,000.000
	Phytigel	1,800.000
pH		5.8

Fuente: Kyte y Klein. 1996

Cuadro 2. Modificación del medio básico Knop (1865) utilizado para el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*. El Zamorano, Honduras, 2014.

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	Nitrato de potasio – KNO ₃	125.000
	Fosfato de potasio - KH ₂ PO ₄	125.000
	Sulfato de magnesio - MgSO ₄	125.000
	Nitrato de calcio - Ca(NO ₃) ²	500.000
Micronutrientes	Yoduro de potasio - KI	0.830
	Ácido trioxobórico - H ₃ BO ₃	6.200
	Sulfato de manganeso monohidratado - MnSO ₄ H ₂ O	16.900
	Sulfato de zinc heptahidratado - ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.600
	Molibdato de sodio - Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.250
	Sulfato de cobre pentahidratado - CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado - CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Hierro	FeNa EDTA - Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas	Ácido nicotínico	0.500
	Piridoxina	0.500
	Tiamina	0.400
Antioxidante	Ácido ascórbico	150.000
	Ácido cítrico	100.000
	Cisteína	4.000
Fitohormonas	Ácido Indolebutírico	0.500
	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4,D)	2.000
	Inositol	100.000
	Sacarosa	30,000.000
	Phytigel	1,800.000
pH		5.8

Fuente: Kyte y Klein. 1996

Procedimiento para el establecimiento *in vitro* de *fragaria x ananassa* a partir de la siembra apolar de láminas foliares. Para la siembra *in vitro* de *Fragaria x ananassa* es necesario seguir un conjunto de procedimientos ya establecidos en el laboratorio que aseguran un buen manejo del material vegetativo que se utilizara para propagar. Con estos procedimientos se está evitando cualquier tipo de contaminación o factor que pueda incidir negativamente en la siembra del explante y por lo se asegura una respuesta favorable del material. El siguiente flujo (Figura 1), demuestra las actividades que se deben realizar para la siembra *in vitro*:



Figura 1. Flujo de proceso para la siembra *in vitro* de *Fragaria x ananassa* a partir de láminas foliares. El Zamorano, Honduras, 2014.

Cuarentena de la plantación madre. Una semana antes de la siembra, el material vegetal madre fue sometido a aplicaciones de una solución fungicida – bactericida de Benlate (Benzimidazol benomil) 2g/L y Agrimicin (Estreptomycina-oxitetraciclina) 2g/L. Estas aplicaciones se llevaron a cabo simultáneamente.

Preparación del medio de cultivo. El medio de cultivo se elaboró en beacker de 2000 ml con agua destilada estéril que se mantuvo en agitación constante con la ayuda de una barra magnética. Se agregó las soluciones madres de macronutrientes, micronutrientes y hierro, luego se añadieron las concentraciones de fitohormonas de acuerdo al tratamiento, vitaminas y finalmente los antioxidantes con sus respectivas cantidades recomendadas. El pH se ajustó a 5.8 utilizando soluciones de hidróxido de potasio (KOH) para subir el pH o ácido clorhídrico (HCl) para bajar el pH. Ya teniendo el medio con el pH adecuado se le colocó el agente gelificante (Phytigel), a razón de 1.8 g/L y se sometió a calor con agitación constante para homogenizar el medio con el gelificante.

Ya teniendo el medio preparado y el gelificante disuelto homogéneamente, se dispensó en frascos debidamente identificados, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente los frascos fueron esterilizados en la autoclave durante 20 minutos a 120°C y 15 PSI de presión.

Desinfección del material vegetal. Ya teniendo el material vegetal en el laboratorio, se prosiguió a hacerles un lavado con abundante agua y jabón con el objetivo de remover los residuos de tierra que podría llevar el material vegetal. Luego se realizó un enjuague con alcohol al 70% por 10 segundos y finalmente se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio. A esta solución desinfectante se le agregó 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante.

Preparación del material vegetal. Para la preparación del material vegetal, este se trasladó a la cámara de flujo laminar para así asegurar un mejor manejo. Se realizaron cinco enjuagues de 10 segundos cada uno con agua destilada estéril para remover el exceso de solución desinfectante que pueda dañar los tejidos. Luego con la ayuda de pinzas y un bisturí, el material vegetal se cortó en explantes de un tamaño aproximadamente 1 cm².

Siembra y establecimiento *in vitro* del cultivo. Una vez preparados los explantes, se sembró uno por cada frasco y se rotulo cada frasco con la siguiente información: nombre del medio, número de frasco, fecha de siembra, presencia o ausencia de luz y tipo de antioxidante. Una vez que se terminó de sembrar los explantes en cada frasco, estos fueron sellados con parafilm como barrera para evitar la entrada de patógenos.

Condición de Incubación. Una vez sellados los frascos con parafilm estos fueron trasladados al cuarto de crecimiento a una temperatura de 23-25°C, con 16 horas luz. Estas condiciones se mantuvieron durante las cuatro semanas en que se llevó a cabo la investigación. Para los tratamientos con oscuridad, los frascos estuvieron cubiertos con mantas oscuras durante cuatro semanas.

Experimento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio con dos tiempos de exposición en la desinfección de láminas foliares de fragaria x ananassa. Se realizó una prueba preliminar con dos concentraciones de solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición, estas concentraciones fueron en una relación volumen/volumen (v/v). Las concentraciones que se evaluaron fueron de 20% y 30% y los tiempos de exposición en que se evaluaron estas concentraciones fueron de 10 y 20 minutos.

El material vegetal que se utilizó para preparar los explantes fueron hojas jóvenes de la plantación madre que se trasladaron del invernadero hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio, las hojas fueron lavadas con agua y jabón para remover las partículas de tierra. Luego de que las hojas fueron lavadas, estas se sumergieron en alcohol al 70% por diez segundos.

Seguidamente las hojas se sumergieron con el tiempo respectivo en las diferentes concentraciones de solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio. Posterior a esto el material vegetal fue trasladado a la cámara de flujo laminar, donde se hizo cinco enjuagues con agua destilada estéril de 10 segundos cada enjuague. Finalmente el material vegetal fue cortado en explantes de un tamaño de 1 cm² aproximadamente, mismos que se sembraron en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1) suplementado con ácido indolebutírico y BAP a razón de 0.5 y 1 mg/L respectivamente. Una vez que se concluyó con la siembra se sellaron los tubos de ensayo con parafilm y se rotularon para propósitos de identificación.

Finalmente los tubos de ensayo ya sembrados y sellados fueron trasladados al cuarto de crecimiento en donde fueron expuestos a 16 horas luz. Este experimento duro solo cinco días ya que al segundo y tercer día se comenzaron a observar los resultados esperados. Para este experimento se utilizaron cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones y cada repetición consto de diez tubos de ensayo.

Experimento principal: Evaluación de tratamientos antioxidantes en dos medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de *fragaria x ananassa* a partir de la siembra apolar de láminas foliares. Este experimento se realizó utilizando dos tratamientos antioxidantes (ácido ascórbico con ácido cítrico y cisteína), dos medios de cultivo (Murashige y Skoog (MS) y Knop) y dos condiciones de incubación (luz y oscuridad). Las hojas que se utilizaron para extraer los explantes fueron las hojas más jóvenes de las plantas madre que se mantenían en el invernadero. Estas hojas fueron transportadas desde el invernadero hasta al laboratorio donde se prosiguió a hacerle el proceso de desinfección. Primeramente las hojas fueron lavadas cuidadosamente con agua y jabón para remover los residuos de tierra.

Posterior a esto, los explantes se introdujeron en alcohol al 70% durante diez segundos. Seguidamente se cortaron las hojas en porciones de 1 cm² que serán los explantes utilizados para la siembra. Estos explantes fueron introducidos en la solución de desinfección de hipoclorito de sodio y el tiempo recomendado que mejor resultó en el experimento de desinfección. Luego que los explantes fueron introducidos en la solución desinfectante de hipoclorito de sodio, este se movilizó hacia la cámara de flujo laminar en donde se esperó que terminara el tiempo en la solución desinfectante para realizarle posteriormente cinco enjuagues con agua destilada estéril de 10 segundos cada uno.

Finalmente se procedió a la siembra de los explantes en los dos medios de cultivo (Murashige y Skoog (MS) y Knop) con sus tratamientos antioxidantes (150mg/L de ácido ascórbico con 100mg/L de ácido cítrico y 4mg/L de cisteína). En lugar de BAP se agregó 2mg/L de la fitohormona de crecimiento 2-4,D ya que ayuda al explante a un rápido crecimiento del tejido. También se agregó 0.5mg/L de la auxina ácido indolebutírico (AIB).

Una vez concluida la siembra se prosiguió a sellar los frascos cubriéndolos primero con papel aluminio y luego se sellaron con parafilm; el objetivo de utilizar el parafilm es como barrera protectora, ya que esto no permite que partículas del exterior ingresen al frasco y alteren el medio de nutritivo o contaminen el explante. Cada frasco se identificó y se trasladaron hacia el cuarto de crecimiento en donde la mitad de los frascos fue cubierta con mantas oscuras para asemejar la condición de incubación en oscuridad y la otra mitad fue puesta en las estanterías donde fueron expuestas a un total de 16 horas luz al día, durante cuatro semanas de duración del experimento.

Diseño Experimental. Se estableció un arreglo factorial ($2 \times 2 \times 2$) en un diseño de bloques completos al azar (BCA) con medidas repetidas en tiempo, teniendo como Factor A dos tratamientos antioxidantes (ácido cítrico con ácido ascórbico y cisteína), como Factor B dos tipos de formulaciones nutritivas (Murashige y Skoog (MS) y Knop) y como Factor C dos condiciones de incubación (luz y oscuridad). La descripción de los tratamientos (8 en total) se puede observar en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para el establecimientos *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*. El Zamorano, Honduras, 2014.

Medio de Cultivo	Tratamiento Antioxidante	Condición de Incubación
Murashige & Skoog	Ácido cítrico con ácido ascórbico	Luz
Murashige & Skoog	Ácido cítrico con ácido ascórbico	Oscuridad
Murashige & Skoog	Cisteína	Luz
Murashige & Skoog	Cisteína	Oscuridad
Knop	Ácido cítrico con ácido ascórbico	Luz
Knop	Ácido cítrico con ácido ascórbico	Oscuridad
Knop	Cisteína	Luz
Knop	Cisteína	Oscuridad

El ensayo tuvo una duración de cuatro semanas donde cada semana se hacía un monitoreo para verificar su rendimiento. Los datos se analizaron con el programa Statistical Analysis System (SAS®, 2009), a través de un Análisis de Varianza (ANDEVA) usando el modelo lineal general (GLM) y una separación de medias ajustadas LSmeans con un nivel de significancia de ($P < 0.05$) y la separación de medias de los tratamientos se analizó a través de la prueba Duncan.

Variables A Medir. Las variables que se tomarón en cuenta para este proyecto fueron la oxidación, la sobrevivencia y la formación de tejido callogénico.

Oxidación. La oxidación se evaluó una vez por semana durante las cuatro semanas de duración del experimento. Para esta variable se determinó la presencia o ausencia de oxidación en los explantes, en cada repetición, para cada medio de cultivo, para cada tratamiento antioxidante y para cada condición de incubación.



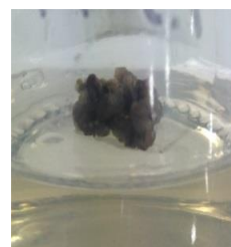
Sobrevivencia sin regeneración de tejido callogénico (STC)

Para esta variable se tomó como base la ausencia total de oxidación y la ausencia total de tejido callogénico. Se evaluaron los explantes cada semana durante las cuatro semanas de duración del experimento, para cada repetición, para cada medio de cultivo, para cada tratamiento antioxidante y para cada condición de incubación. Esta variable se denominó como sobrevivencia sin regeneración de tejido callogénico (STC).



Sobrevivencia con regeneración de tejido callogénico (CTC)

Igualmente para esta variable se tomó como base la ausencia total de oxidación y fue evaluada una vez por semana durante las cuatro semanas de duración del experimento. En esta variable se determinó la presencia o ausencia de tejido callogénico en el explantes, para cada repetición, para cada medio de cultivo, para cada tratamiento antioxidante y para cada condición de incubación. Esta variable se denominó como sobrevivencia con regeneración de tejido callogénico (CTC).



Cuadro 4. Escala para la denominación de las variables utilizadas en el experimento principal de establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa*. El Zamorano, Honduras 2014.

Escala	Denominación de la Variable
1	100% oxidación
2	50% oxidación y 50% STC [£]
3	100% STC [£]
4	50% STC [£] y 50% CTC [¶]
5	100% CTC [¶]

£=Sobrevivencia sin formación de tejido callogénico

¶=sobrevivencia con formación de tejido callogénico

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento de desinfección: Evaluación de dos concentraciones de hipoclorito de sodio con dos tiempos de exposición en la desinfección de láminas foliares de *fragaria x ananassa*. Se realizó este experimento de desinfección para determinar que concentración de hipoclorito de sodio y que tiempo de exposición resultó mejor para establecer un procedimiento de desinfección.

Concentración de hipoclorito de sodio. Los resultados de contaminación se empezaron a observar al segundo y tercer día después de la siembra en los explantes. La contaminación que se observó fue por hongos y por bacterias.

Con base en los resultados obtenidos, se determinó que la mejor concentración de hipoclorito de sodio para establecer el proceso de desinfección de los explantes fue el de 30% (v/v) ya que se obtuvo un total del 10% de contaminación del total de los explantes (Cuadro 5).

Tiempo de exposición. Con base en los resultados obtenidos se determinó que el mejor tiempo de exposición a la solución desinfectante de hipoclorito de sodio es de 20 minutos (Cuadr5).

Cuadro 5. Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de exposición en la desinfección de láminas foliares de *Fragaria x ananassa*. El Zamorano, Honduras 2014.

Concentración de Hipoclorito de sodio	Tiempo de Exposición	Contaminadas %
Hipoclorito de Sodio al 30% (v/v)	20 minutos	10% ^a ¥
Hipoclorito de Sodio al 20% (v/v)	20 minutos	22% ^b
Hipoclorito de Sodio al 30% (v/v)	10 minutos	27% ^c
Hipoclorito de Sodio al 20% (v/v)	10 minutos	41% ^d

¥=Valores con letra diferente difieren estadísticamente entre sí de acuerdo a la prueba Duncan (Diferencia Significativa P<0.05)

Experimento principal: Evaluación de dos tratamientos de antioxidantes en dos medios de cultivo y evaluar estos con o sin luz para el establecimiento de láminas foliares *in vitro* de *fragaria x ananassa*. Considerando que la incidencia de oxidación en el experimento de desinfección fue muy alta, se realizó este experimento para evaluar tratamientos antioxidantes. Se utilizaron dos tratamientos de antioxidantes (ácido cítrico con ácido ascórbico y cisteína), en dos medios de cultivo (Murashige y Skoog (MS) y Knop) bajo dos condiciones de incubación (luz y oscuridad).

Con base en los resultados obtenidos, se encontró interacciones significativas y diferencia significativa entre los tratamientos. En el Cuadro 6 se observa que el tratamiento con 0% de oxidación y una sobrevivencia con el 50% de los explantes formando tejido callogénico, fue en el que se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con la interacción del factor antioxidante ácido cítrico con ácido ascórbico, bajo la condición de incubación de oscuridad, lo que hace a este tratamiento el mejor de los ocho que se evaluaron.

También se observa en el Cuadro 6, que independiente del medio de cultivo utilizado, los tratamientos en los que se utilizó la interacción entre cisteína como antioxidante y bajo la condición de incubación de luz, presentaron el 100% de oxidación de los explantes haciéndolos los tratamientos menos favorables para controlar la oxidación *in vitro* de las láminas foliares de *Fragaria x ananassa*.

Cuadro 6. Resultados de los tratamientos para la sobrevivencia y ausencia de la oxidación en la siembra *in vitro* de *Fragaria x ananassa* con base en la escala utilizada. El Zamorano, Honduras 2014.

Numero de Tratamiento	Medio de Cultivo	Antioxidante	Condición	Media
1	Murashige y Skoog	AC+AA ^Ø	Oscuridad	4.0 ^{a¥}
2	Murashige y Skoog	AC+AA ^Ø	Luz	3.0 ^b
3	Murashige y Skoog	Cisteína	Oscuridad	3.0 ^b
4	Knop	Cisteína	Oscuridad	3.0 ^b
5	Knop	AC+AA ^Ø	Oscuridad	3.0 ^b
6	Knop	AC+AA ^Ø	Luz	2.6 ^c
7	Knop	Cisteína	Luz	1.0 ^d
8	Murashige y Skoog	Cisteína	Luz	1.0 ^d

Ø=Ácido Cítrico con Ácido Ascórbico

¥=Valores con letra diferente difieren estadísticamente entre sí de acuerdo a la prueba LSmeans (Diferencia Significativa P<0.05)

Además en el Cuadro 6 se observa que los factores si afectan en los resultados. En el segundo tratamiento al compararlo con el primero en los cuales se utilizó el mismo medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), el mismo antioxidante ácido cítrico con ácido ascórbico, pero si se observa que la condición de incubación varia. En el primer tratamiento está bajo la condición de oscuridad mientras que en el segundo tratamiento está bajo la condición de luz. Los resultados indican un cambio del 50% de los explantes formando tejido callogénico bajo condición de incubación de oscuridad, a un 100% que sobrevivieron pero no formando tejido callogénico bajo condiciones de incubación de luz.

De igual manera observamos el tercer tratamiento con comparación en el primer tratamiento del Cuadro 6, en esta ocasión se observa que se utilizó el mismo medio de cultivo Murashige y Skoog y la misma condición de incubación que fue oscuridad, pero el antioxidante cambia. En el primer tratamiento se utilizó ácido cítrico con ácido ascórbico mientras que en el tercer tratamiento se utilizó el antioxidante cisteína. De igual manera los resultados variaron significativamente, de tener un 50% de los explantes formando tejido callogénico en el primer tratamiento, a tener un 100% de los explantes sin formar tejido callogénico en el tercer tratamiento.

Análisis Estadístico. Con base en los resultados del análisis de varianza que se muestra en el Cuadro 7, se observó que independiente a los otros dos factores si existe diferencia significativa en el factor antioxidante. También se determinó que para el factor medio de cultivo independiente de los otros dos factores si existe diferencia significativa igualmente se observó que independiente de los otros dos factores para el factor condición de incubación si existe diferencia significativa. En este análisis estadístico también se observa los tres factores en interacción y se determinó que con base en los resultados del análisis de varianza, si existe diferencia significativa en la interacción. Esto representa que los resultados de sobrevivencia y ausencia de oxidación si son afectados si se cambia un factor de la interacción.

Cuadro 7. Análisis estadístico de los factores y su interacción utilizados en el experimento principal de establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa*. El Zamorano, Honduras 2014.

Factor	Pr>F[‡]
Antioxidante	P<.0001
Medio de Cultivo	P<.0001
Condición de Incubación	P<.0001
Antioxidante × Medio × Condición de Incubación	P<.0001

‡=Existe diferencia significativa si P<0.05

4. CONCLUSIONES

- Se determinó que el mejor procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa* se hace utilizando primero un enjuague en alcohol al 70% por 10 segundos, luego sumergir las láminas foliares en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) durante 20 minutos. Esta solución debe de contener 3 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante. Finalmente realizar cinco enjuagues de 10 segundos con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar.
- Para el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Fragaria x ananassa* se determinó que el mejor tratamiento antioxidante es el de ácido cítrico con ácido ascórbico, ya que se pudo observar que fue el que presentó menor oxidación en las láminas foliares.
- Se pudo determinar que la mejor formulación nutritiva para la inducción de tejido callogénico fue Murashige y Skoog (MS) con interacción del factor antioxidante de ácido cítrico con ácido ascórbico bajo condiciones de incubación de oscuridad. La inducción de tejido callogénico se pudo observar en la tercera semana después de la siembra.
- Se determinó que para la incubación de láminas foliares en el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa*, la mejor condición de incubación es bajo oscuridad. Bajo esta condición de incubación se observó mayor sobrevivencia e inducción de tejido callogénico en las láminas foliares.

5. RECOMENDACIONES

- Al transferir las láminas foliares de *Fragaria x ananassa* bajo condiciones de oscuridad a condiciones de luz, reducir las 16 horas luz o bajar la intensidad de luz ya que los explantes pueden presentar necrosis.
- Realizar el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa* utilizando el tratamiento con el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con interacción del factor antioxidante ácido cítrico con ácido ascórbico bajo la condición de incubación de oscuridad, ya que fue el que presento 0% de oxidación en los explantes y un 50% de los mismos presentaron formación de tejido callogénico.
- Realizar pruebas con otros tipos de antioxidantes como el carbón activado.
- Realizar pruebas de enjuagues de los explantes antes de la siembra utilizando soluciones de ácido cítrico con ácido ascórbico.
- Analizar económicamente el costo de producir una vitroplanta de *Fragaria x ananassa* versus el costo de producirla convencionalmente.
- Continuar con la etapa II del procedimiento para establecer un protocolo completo para el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa*.

6. LITERATURA CITADA

Boxus, P. (1977). Large Scale Propagation of Strawberry Plants from Tissue Culture. New York: Springer-Verlag.

Darrow, G. M. (1966). The Strawberry: History, Breeding and Physiology. The New England Institute for Medical Research, 314-385.

FUSAGRI. (1984). Prouccion de plantas de fresa por cultivo de tejidos. Noticiasagrícolas, Vol X, 94-96.

Obregón, B. y Santos, M. (2009). Practicas Culturales para la Produccion Comercial de Fresas en Florida. IFAS Extension UNIVERSITY of FLORIDA, 1-12.

Salaverría, M. C. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) . UDO Agrícola , 21-26.

Segundo. (2011). Ficha Técnica para el Cultivo de la Fresa. 1-9.

Swartz, H. y Lindstrom, J. (1986). Tissue Culture as a plant produccion system for horticultural crops. Dordrecht, 201-220.