

**ZAMORANO**  
**CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCION AGROPECUARIA**

Uso de L-cisteína y ácido ascórbico para reducir  
la oxidación durante el establecimiento y la  
multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos  
de tres cultivares de plátano (*Musa* spp.)  
incubados bajo luz y oscuridad

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

Por:

**Byron Alejandro Reyes Padilla**

**Honduras: Abril, 2001**

El autor concede a El Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

---

Byron Alejandro Reyes Padilla

El Zamorano, Honduras  
Abril, 2001

**Uso de L-cisteína y ácido ascórbico para reducir la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano (*Musa spp.*) incubados bajo luz y oscuridad**

Presentado por

Byron Alejandro Reyes Padilla

Aprobada:

## **DEDICATORIA**

A mi hijo Alexander, por ser el eje y la alegría de mi vida.

A mis padres Alejandro y Teresa por todo el amor, la confianza y apoyo que me han dado durante mi vida.

A mis hermanos Verónica y Marcos por estar conmigo siempre.

A Diana Vanessa, porque este sacrificio inicialmente fue nuestro.

A la memoria de mi abuela Petita.

A toda mi familia por haberme apoyado a lo largo de mi vida y de mis estudios.

A mi país Ecuador.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme siempre.

A mis padres y tíos por hacer posible mis estudios en El Zamorano.

A Diana Vanessa por su apoyo incondicional y su cariño.

A Elena por estar a mi lado y permitirme ser parte de su vida.

A Dinie de Rueda por ser mi segunda madre y por su ejemplo, apoyo, consejos y guía en mi vida y en este estudio.

A mis demás asesores por haber confiado en mí y ayudarme en la elaboración de este estudio.

A Franco Sangoluisa mi compañero de cuarto por su ejemplo de humildad, apoyo y consejos siempre que los necesité.

A César por haberme aconsejado y por hacerme ver la vida de una manera más sencilla.

A mis amigos Leonidas, Víctor, Karlos, Paúl Peña, Paúl Oquist, Melvin, Fernando, Néstor Núñez, Néstor Meneses, Gabriela, Alvaro, José, Luis, Isidra, Marissa y Bárbara por hacer más llevadera mi estadía en Zamorano.

A Zoila Sandoval y Ericka Salgado por brindarme todo el apoyo que les fue posible y por hacerme más llevadera mi estadía en la escuela, mil gracias.

A Wolfgang Pejuan y Rodolfo Pacheco por ayudarme en el análisis estadístico de este documento.

A mi alma Mater.

## RESUMEN

Reyes Padilla, Byron Alejandro. 2001. Uso de L-cisteína y ácido ascórbico para reducir la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano (*Musa* spp.) incubados bajo luz y oscuridad. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 50 p.

El plátano (*Musa* spp.) es un cultivo muy importante como alimento y como fuente de almidón en países en vías de desarrollo, además tiene usos como vegetal, producción de cerveza de bajo contenido alcohólico y alimento animal. Una alternativa para incrementar la producción de este cultivo es usar técnicas de cultivo de tejidos, pero éstas presentan diversos problemas fisiológicos, entre ellos la oxidación. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto antioxidante del ácido ascórbico y la L-cisteína en la propagación *in vitro* de plátano FHIA 20, FHIA 21 y Cuerno, incubado bajo luz y oscuridad. Con ese propósito se seleccionó material vegetal de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) y se estableció este material en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano. Se empleó un diseño completamente al azar con 15 tratamientos y siete repeticiones. En cada uno de los cultivares se probó L-cisteína a 2.0 y 4.0 mg/L; ácido ascórbico a 100 y 200 mg/L y el testigo en que no se agregó ningún antioxidante al medio de cultivo. En la etapa de establecimiento de los ápices se probó el efecto de incubar los ápices con luz u oscuridad. En la etapa de multiplicación, para los dos subcultivos, sólo se incubaron los ápices en luz. Las variables medidas fueron grado de oxidación, formación de callo, número de brotes, grado de necrosis y contaminación. Para controlar la oxidación en la etapa de establecimiento, se requerirán 4.0 mg/L de L-cisteína al incubar los ápices en luz y 2.0 mg/L en oscuridad. En los subcultivos ningún antioxidante redujo la oxidación. La formación de callo en luz y oscuridad fue mayor de 40% durante el establecimiento de los ápices y fue mínima en los subcultivos. El FHIA 20 tuvo mayor número de brotes y al usar 100 mg/L de ácido ascórbico se estimuló el brotamiento. La necrosis fue menor en FHIA 21 durante los subcultivos y luego se estabilizó. La contaminación fue cada vez menor conforme se avanzaba en los subcultivos.

**Palabras claves:** Antioxidantes, brotes, callo, subcultivos.

## NOTA DE PRENSA

### **Uso de antioxidantes durante el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano (*Musa spp.*) incubados bajo condiciones de luz y oscuridad**

El plátano constituye una de las principales fuentes de carbohidratos en la dieta alimenticia de los seres humanos, puede consumirse como vegetal o fruta, es de gran utilidad en la industria textil y posee propiedades curativas. Sus múltiples usos y beneficios hacen necesaria la búsqueda de alternativas que permitan en incremento de su producción.

La biotecnología y su técnica del cultivo de tejidos ha logrado incrementar el número de plantas que se producen de esta especie, al permitir el cultivo *in vitro* de ápices, suspensiones celulares, cultivo de embriones, entre otras. Sin embargo, durante las primeras etapas del cultivo, esta metodología presenta problemas de oxidación, vitrificación de los tejidos, necrosis y otros.

En un experimento realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación del Zamorano, se evaluó el efecto de dos antioxidantes (L-cisteína y ácido ascórbico) para el control de la oxidación durante las primeras etapas del cultivo del plátano; además, se midió el efecto de incubar ápices en luz y oscuridad.

En el análisis, desarrollado entre marzo y julio de 2000, se aplicaron dos dosis de los antioxidantes bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), luminosidad (36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y fotoperíodo (16 h luz).

Los resultados de la prueba muestran que la L-cisteína controló mejor la oxidación y que se obtuvieron mayores beneficios al incubar los ápices en oscuridad. El informe señala que los antioxidantes en estudio y bajo las condiciones propuestas, sólo son eficientes durante el establecimiento del cultivo ya que en la etapa de multiplicación, los antioxidantes no surtieron efecto.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>PORTADILLA</b> .....	i
	<b>AUTORIA</b> .....	ii
	<b>PÁGINA DE FIRMAS</b> .....	iii
	<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
	<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
	<b>RESUMEN</b> .....	vi
	<b>NOTA DE PRENSA</b> .....	vii
	<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	viii
	<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xi
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiv
	<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	xvii
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	2
1.2	LÍMITES DEL ESTUDIO .....	2
1.3	OBJETIVOS .....	3
1.3.1	Objetivo general .....	3
1.3.2	Objetivos específicos .....	3
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1	PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN DE PLÁTANO .....	5
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
3.1	LOCALIZACIÓN .....	8
3.2	MATERIALES DE LABORATORIO .....	8
3.2.1	Experimento 1 .....	8
3.2.2	Experimento 2 .....	9
3.3	MEDIOS DE CULTIVO .....	9
3.3.1	Elaboración del medio de cultivo para la etapa de establecimiento (E I) .....	11

3.3.1.1	Experimento 1 .....	11
3.3.1.2	Experimento 2 .....	12
3.3.2	Elaboración del medio de cultivo para la etapa de multiplicación (E II) .....	13
3.3.2.1	Experimento 1 .....	13
3.3.2.2	Experimento 2 .....	13
3.4	MATERIAL VEGETAL .....	13
3.4.1	Experimento 1 .....	14
3.4.2	Experimento 2 .....	14
3.5	PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL .....	14
3.5.1	Preparación del material vegetal .....	14
3.5.2	Esterilización superficial del material .....	14
3.6	ESTABLECIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL EN EL MEDIO DE CULTIVO .....	15
3.6.1	Experimento 1 .....	15
3.6.2	Experimento 2 .....	15
3.7	MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL .....	15
3.7.1	Experimento 1 .....	15
3.7.2	Experimento 2 .....	16
3.8	CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA INCUBACIÓN ..	16
3.8.1	Experimento 1 .....	16
3.8.2	Experimento 2 .....	16
3.9	VARIABLES MEDIDAS .....	16
3.10	TOMA DE DATOS .....	17
3.11	EVALUACIÓN ESTADÍSTICA .....	17
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
4.1	Experimento 1: efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico durante el establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de luz .....	18
4.1.1	Etapas de establecimiento (E I) .....	18
4.1.1.1	Oxidación .....	18
4.1.1.2	Formación de callo .....	20
4.1.1.3	Necrosis .....	21
4.1.1.4	Contaminación .....	22
4.1.2	Primer subcultivo (S1) de la etapa de multiplicación (E II) .....	23
4.1.2.1	Oxidación .....	23
4.1.2.2	Formación de callo .....	25
4.1.2.3	Número de brotes .....	26
4.1.2.4	Necrosis .....	27
4.1.2.5	Contaminación .....	29
4.1.3	Segundo subcultivo (S2) de la etapa de multiplicación (E II) .....	30
4.1.3.1	Oxidación .....	30
4.1.3.2	Formación de callo .....	33
4.1.3.3	Número de brotes .....	34
4.1.3.4	Necrosis .....	36

4.1.3.5	Contaminación .....	37
4.2	Experimento 2: efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de oscuridad .....	38
4.2.1	Oxidación .....	38
4.2.2	Formación de callo .....	41
4.2.3	Necrosis .....	42
4.2.4	Contaminación .....	44
4.3	COMPARACIÓN DE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO ENTRE AMBOS EXPERIMENTOS .....	45
4.3.1	Oxidación .....	45
4.3.2	Necrosis .....	46
4.3.3	Formación de callo .....	46
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>51</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		
1.	Medio de cultivo, Murashige y Skoog (MS) modificado utilizado para la propagación <i>in vitro</i> de plátano. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	10
2.	Cantidad de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	11
3.	Cantidad de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	12
4.	Dosis de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en la multiplicación <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras. 2000 .....	13
5.	Grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	18
6.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	19
7.	Formación de callo (%), durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	21
8.	Grado de necrosis durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	21
9.	Porcentaje de contaminación según agente causal durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> (E I) de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	22

10.	Grado de oxidación observado durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	23
11.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	24
12.	Porcentaje de formación de callo durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	26
13.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre la formación de callo durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	26
14.	Grado de necrosis durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	28
15.	Porcentaje de contaminación según su agente causal durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	29
16.	Grado de oxidación observado durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	30
17.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	30
18.	Porcentaje de formación de callo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	34
19.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre la formación de callo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación	

	<i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	34
20.	Grado de necrosis durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	36
21.	Porcentaje de contaminación según su agente causal durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	37
22.	Grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	38
23.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	39
24.	Porcentaje de formación de callo durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	42
25.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre la formación de callo durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	42
26.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de necrosis durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	43
27.	Porcentaje de contaminación según su agente causal durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000 .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1.	Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	19
2.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	20
3.	Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	22
4.	Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000..	24
5.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	25
6.	Porcentaje de brotes por explante durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	27
7.	Porcentaje de brotes por explante según tratamiento durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000..	27
8.	Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el primer subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano	28

incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.

9.	Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	31
10.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	32
11.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico a través del tiempo sobre el grado de oxidación durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	33
12.	Porcentaje de brotes por explante durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	35
13.	Porcentaje de brotes por explante según tratamiento durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	35
14.	Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.....	37
15.	Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.....	40
16.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.....	41

17.	Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.....	44
18.	Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz y oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.....	45
19.	Efecto del ambiente de incubación a través del tiempo sobre el grado de necrosis durante el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de plátano. El Zamorano, Honduras, 2000.....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

- |    |  |    |
|----|--|----|
| 1. | Formato de registro de toma de datos. El Zamorano, Honduras, 2000..... | 52 |
|----|--|----|

## 1. INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa* spp.), originario del sudeste asiático, es un cultivo muy importante como alimento. A pesar que la mayoría de su producción se destina al consumo interno, una buena parte se exporta, generando importantes divisas para los países productores. En los últimos años se ha incrementado la demanda en estos países (Usui *et al.*, 1996).

Según Sharrock (1996), las comunidades primitivas usaron la bellota (flor masculina) y el interior del pseudotallo del género *Musa* como vegetales; también se usó este género, en el centro y este de África, para la producción de cerveza con bajo contenido de alcohol pero corta vida útil. Este mismo autor señala que el género *Musa* también es usado como alimento animal a través de ensilajes y como medicina, ya que el jugo de la bellota sirve como remedio para problemas estomacales. Así mismo, la fruta madura está siendo usada para tratar el asma y la bronquitis. Las especies del género *Musa* también han sido utilizadas como fuente de fibra, la cual es extraída de los peciolo y pseudotallos secos; esta fibra es usada para la manufactura textil o elaboración de papel. Adicionalmente, las hojas son usadas para servir comidas típicas como es el caso de los tamales. Según Price (1995), el 70% de la producción mundial de plátano se encuentra en África. En las regiones más pobres del mundo, este cultivo es la fuente más importante de carbohidratos.

La producción masiva de plantas de plátano se puede realizar por medio de técnicas de cultivo de tejidos y micropropagación tales como: rescate de embriones, formación de callos, suspensiones celulares, cultivo de protoplastos y cultivo de ápices meristemáticos, entre otras técnicas (Vuylsteke y Swennen, 1992).

Según Israelí *et al.* (1995), cuando la demanda de plantas disminuye, el proceso de multiplicación a través de la micropropagación se puede detener, bajando la intensidad lumínica y la temperatura hasta 11-18°C; bajo estas condiciones los ápices meristemáticos se pueden mantener sin multiplicar por más de un año, de esta manera la producción de plantas de plátano puede ser disminuida en caso de que el mercado lo obligue.

Dada la importancia que tiene el plátano y el género *Musa* en general, la micropropagación es una alternativa para incrementar la producción masiva de plantas de plátano, pero ésta puede presentar varios problemas al momento de iniciar el proceso tales como: oxidación, contaminación, necrosis, vitrificación y además puede inducir variaciones somaclonales que son cambios tanto positivos como negativos para cualquier variedad.

La oxidación generalmente se presenta en las primeras etapas de la propagación *in vitro*, afectando el porcentaje de establecimiento de los ápices y además, constituyendo una

disminución del potencial de multiplicación del material. Laboratorios de cultivos de tejidos como la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) y GALILTEC en Honduras y otros en Colombia, han encontrado igualmente problemas de oxidación durante el establecimiento de vitroplantas de algunas variedades de plátano como FHIA 20 y Plátano Enano (Rivas, 2000)<sup>1</sup>. La FHIA ha realizado algunos experimentos utilizando L-cisteína como antioxidante obteniendo buenos resultados (Höhne y Ruiz, 1995).

## 1.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Con el presente estudio, realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano, en colaboración con la FHIA, se determinó, bajo condiciones de luz y oscuridad, el tipo y concentración de antioxidante que controla eficientemente los problemas de oxidación en las primeras etapas de la producción *in vitro* de plátano FHIA 21, FHIA 20 y Cuerno. Se analizó el efecto que tienen estos tratamientos en el desarrollo de los ápices meristemáticos y en el brotamiento. En el presente estudio se realizaron dos experimentos:

**Experimento 1: Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de luz.** Consistió en incubar los ápices meristemáticos de plátano en un cuarto de crecimiento con condiciones lumínicas de  $36 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura promedio de 24°C y fotoperíodo de 16 h luz por día durante tres meses y medio. Se midieron los efectos en la etapa de iniciación o establecimiento del cultivo (E I) y los primeros dos subcultivos (S1 y S2) de la etapa de multiplicación (E II) de plátano FHIA 21, FHIA 20 y Cuerno.

**Experimento 2: Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de oscuridad.** A diferencia del anterior, consistió en incubar los ápices en oscuridad, manteniendo la temperatura, luminosidad y fotoperíodo externo igual que en el primer experimento por un período de 40 días. La oscuridad se consiguió incubando los contenedores con los ápices meristemáticos en cajas de cartón debidamente cerradas. Se midieron los efectos en la etapa de iniciación o establecimiento del cultivo (E I) de la propagación *in vitro* de plátano FHIA 21, FHIA 20 y Cuerno.

## 1.2 LÍMITES DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el período comprendido entre el 14 de marzo y el 08 de julio de 2000, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano.

---

<sup>1</sup> RIVAS, J. 2000. Comunicación personal.

El número de repeticiones por tratamiento fue bajo ya que el material madre, a pesar de estar disponible, fue difícil transportarlo y manipularlo para su preparación para el estudio.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antioxidante del ácido ascórbico y la L-cisteína en la propagación *in vitro* de plátano FHIA 20, FHIA 21 y Cuerno, bajo condiciones de incubación con luz y oscuridad.

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la respuesta de los ápices expuestos a los dos tipos de antioxidantes.
- Determinar la respuesta de los ápices a las dos dosificaciones de cada antioxidante.
- Comparar los efectos de la incubación bajo condiciones de luz y oscuridad en la reducción de la oxidación y el desarrollo de callo en los ápices meristemáticos en la etapa de establecimiento.
- Evaluar el efecto que tienen los cinco tratamientos en el brotamiento y la formación de callo de los ápices meristemáticos.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

Uno de los mayores problemas biológicos que presenta el cultivo de meristemas de plátano en las primeras etapas es la oxidación. Este problema consiste en el oscurecimiento de los ápices meristemáticos y el medio de cultivo debido a la presencia de radicales libres en el medio y a la liberación de fenoles por parte de los ápices, los cuales se vuelven tóxicos para ellos mismos (Jiménez, 1998).

Según George (1996), Jiménez (1998) y Vuylsteke (s.f.), una manera de contrarrestar el fenómeno de la oxidación es mantener los ápices meristemáticos en soluciones antioxidantes antes de su trasplante o a través de la adición de antioxidantes en el medio de cultivo. Estos autores también señalan que para contrarrestar la oxidación se pueden hacer cambios frecuentes de medio de cultivo. Jiménez (1998) e Israelí *et al.* (1995) señalan que el cultivo bajo condiciones de oscuridad o menor intensidad luminosa, los cambios en el nivel de sacarosa y la regulación de la temperatura son también beneficiosos para el control de la oxidación.

Höhne y Ruiz (1995) encontraron que para disminuir la oxidación se debe reducir la cantidad de cortes y la manipulación excesiva de los ápices. También encontraron que en la etapa de iniciación de plátano FHIA 21 la oxidación fue mayor, por lo que pocos días después del establecimiento tuvieron que pasar los ápices meristemáticos a otros frascos conteniendo medio fresco. Asimismo, señalaron que la oxidación desapareció totalmente en la fase de multiplicación.

Anthony *et al.* (1999) encontraron que en dos variedades de plantas nativas australianas, recalcitrantes a la micropropagación, la oxidación se redujo cuando los ápices fueron sumergidos en una solución conteniendo citrato de potasio (KC por sus siglas en inglés) al 0.1% o adicionando este compuesto al medio de cultivo a razón de 0.01%.

De acuerdo a los trabajos realizados por Samosir *et al.* (1997) en *Cocos nucifera*, al usar vainas cotiledonares para el cultivo de tejidos, la oxidación en las primeras etapas se puede reducir lavando los meristemas con agua deionizada estéril y cultivando los mismos con carbón activado o ácido ascórbico agregado al medio. Estos mismos autores señalan que el carbón activado es indispensable para la supervivencia de los meristemas.

Nomura *et al.* (1998) incluyeron “glutación” (antioxidante natural) en el medio de cultivo para manzanos (*Malus pumila*) para el control de la oxidación y encontraron que no es necesario incluirlo en el medio si los tejidos se sumergen en una solución conteniendo 0.1 mM de “glutación” antes de su establecimiento *in vitro*.

En la micropropagación, la oxidación y la necrosis, son más notorias en plantas leñosas. Mederos-Molina y Trujillo (1999) reportaron que la oxidación en tejidos de pistacho (*Pistacia vera*) puede ser eliminada al enjuagar los tejidos con L-cisteína antes del establecimiento en etapa I, o agregando carbón activado al medio de cultivo. Estos mismos autores observaron que, combinando este último tratamiento con oscuridad o agregando nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) al medio, también se podía reducir la oxidación.

Dado que la oxidación ocurre por la liberación de compuestos fenólicos, Caspersen *et al.* (2000) notaron que en lechuga, uno de los fenoles que se liberaba era el ácido ferúlico; accidentalmente descubrieron que la concentración de este ácido, en el medio de cultivo, se redujo en presencia de microorganismos desconocidos. Realizados estos descubrimientos, montaron un experimento para determinar que tipo de microorganismo(s) controlaba(n) la oxidación encontrando que uno de ellos era probablemente *Pseudomonas* spp. Básicamente, estos microorganismos degradan el ácido ferúlico (promotor de la oxidación) reduciendo así la oxidación.

Standardi y Romani (1991) encontraron que al agregar antioxidantes como PVP o ácido cítrico al medio nutritivo para el cultivo *in vitro* de manzanos (*Malus pumila*), el porcentaje de raíces se ve afectado tanto positiva como negativamente, dependiendo de la etapa de la aplicación. Esto indica que los antioxidantes pueden ser usados con diferentes propósitos.

Un antioxidante se define como un donador de electrones que inhibe la oxidación de substratos. Los antioxidantes remueven el oxígeno de otras moléculas a través de los agentes reductores que contienen o por otros componentes que actúan por mecanismos alternos como atrapando o desactivando los iones libres. Esos agentes disminuyen el potencial de reducción/oxidación (Redox) y son eficientes en evitar el oscurecimiento del tejido y la oxidación de los fenoles libres (George, 1996).

Los antioxidantes más usados son el ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína, cisteína hidrociorada, carbón activado, polyvinylpyrrolidone (PVP) y tiosulfato de sodio, de los cuales los tres primeros son los más usados en plátano. Estos compuestos se pueden usar antes del establecimiento del material o adicionándolos al medio de cultivo (George, 1996; Jiménez, 1998).

De una u otra manera, los investigadores han demostrado que los antioxidantes se hacen necesarios para poder propagar *in vitro* muchos cultivos, no solamente el plátano.

## 2.1 PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN DE PLÁTANO

**De acuerdo al protocolo seguido por la FHIA<sup>2</sup>, el proceso para llevar a cabo la micropropagación del plátano es el siguiente:**

1. Se seleccionan en el campo las plantas madres de las que se van a utilizar los cormos/rizomas. Estas deben tener buenas características físicas ya que así como son las madres, serán las plantas que se produzcan en el laboratorio.
2. Se cortan los cormos y se limpian los residuos de tierra que traigan del campo.
3. Se lavan y luego se enjuagan bien con agua y jabón.
4. Los cormos limpios son reducidos con un machete o cuchillo grande, asperjando cloro comercial (hipoclorito de sodio) sin diluir antes de cada reducción tanto en la herramienta como en el cormo.
5. Una vez reducidos, se llevan al laboratorio y se desinfectan durante 30 min en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 30% (v/v) conteniendo tres gotas de “Tween 80” por cada 100 ml de solución desinfectante.
6. En la cámara de flujo laminar se realizan tres enjuagues con agua bidestilada estéril.
7. Se realizan dos reducciones y dos desinfecciones más, una con hipoclorito de sodio al 10% (v/v) y la otra al 2.5% (v/v) por 10 y 2 min respectivamente. Ambas soluciones desinfectantes llevan “Tween 80” de la misma manera como se especificó en el inciso 5.
8. Después de cada enjuague con hipoclorito de sodio se realizan tres lavados con agua bidestilada estéril antes de proceder a la reducción.
9. Después de la última reducción, los ápices son plantados en el medio de cultivo para su posterior incubación en condiciones controladas de luz y temperatura. Esta es la etapa de iniciación o establecimiento (E I)
10. Los ápices pasan en la etapa de establecimiento aproximadamente 40 días.
11. A los 40 días, los ápices se limpian, se dividen longitudinalmente y se transplantan a otro medio en donde iniciarán la etapa de multiplicación (E II).
12. La etapa de multiplicación consta de ocho subcultivos (S), cada uno con una duración de 21 días aproximadamente.
13. Antes de iniciar cada subcultivo, los ápices se limpian, se reducen en su base y se dividen para incrementar el número de vitroplantas a producir.
14. Los primeros tres subcultivos forman lo que se llama la M1 y se denominan como S1, S2 o S3 dependiendo si es el primer, segundo o tercer subcultivo respectivamente (e.g. M1S2).
15. Del cuarto al sexto subcultivo forman lo que se llama la M2 y se denominan como S4, S5 o S6 dependiendo si es el cuarto, quinto o sexto subcultivo respectivamente.
16. El séptimo y octavo subcultivo forman la M3 y se denominan S7 o S8, dependiendo si es el séptimo u octavo subcultivo respectivamente.
17. Después de los ocho subcultivos, las vitroplantas pasan a la etapa de regeneración (E III) donde forman las raíces necesarias para su aclimatación.

---

<sup>2</sup> RIVAS, J. 1999. Comunicación personal y entrenamiento personal en servicio en el laboratorio de FHIA.

18. Estas vitroplantas pasan en la etapa E III aproximadamente 4 a 5 semanas, hasta tener de 5 a 8 cm de altura o 3 a 4 hojas formadas.
19. Después de esta etapa, las vitroplantas se plantan en bandejas para su aclimatación en el invernadero donde pasan aproximadamente 5 a 6 semanas hasta tener una altura de 10 a 15 cm.
20. Luego de transcurrido este tiempo, cada planta es transplantada a una bolsa plástica negra (8x7") conteniendo un substrato 4:2:1 (tierra: casulla de arroz: arena). En estas bolsas las plantas terminan de crecer por cerca de 6 a 7 semanas hasta ser finalmente vendidas o plantadas en campo abierto.

Con lo expuesto anteriormente, se puede deducir que todo el proceso de micropropagación del plátano tarda aproximadamente 11 meses y medio, si este proceso es llevado a cabo sin ningún contratiempo, ya que puede tardar más si no se realizan las multiplicaciones en el tiempo indicado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano, Honduras, entre el 14 de marzo y el 08 de julio de 2000. Se realizaron dos experimentos para determinar qué tipo y concentración de antioxidante era más efectivo para el control de la oxidación en la micropropagación de plátano. En el primer experimento, los ápices meristemáticos fueron incubados en la luz y en el segundo fueron incubados en total oscuridad. Los materiales que se utilizaron para ambos experimentos y la metodología que se siguió se detallan a continuación.

#### 3.2 MATERIALES DE LABORATORIO

**3.2.1 Experimento 1:** Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de luz.

- La cristalería usada fue: frascos de 4 oz, platos de Petri, vasos de precipitado, balones aforados, frascos de Mason, pipetas y probetas, entre otros.
- La cristalería fue lavada con agua y “Alconox” para eliminar todas las impurezas de la misma y luego de este lavado, se enjuagó con agua bidestilada. Seguidamente, los platos de Petri y los frascos de 4 oz fueron secados en un horno a 360°C por una hora y media; el resto de cristalería fue dejada, boca abajo, sobre un mueble para que seque al ambiente.
- El equipo que se utilizó fue: autoclave, horno de microondas, horno para secar cristalería, balanza de precisión, potenciómetro, refrigeradora, agitadores, jeringas dosificadoras de 30 y 10 ml, bandejas de metal y de plástico y cámara de flujo laminar.
- Las herramientas usadas para la reducción de los cormos fueron: dos machetes, una lima, un recipiente de plástico de 4,000 ml, un aspersor y un cepillo.
- Las herramientas usadas en el proceso de micropropagación fueron: pinzas medianas y grandes, mangos de bisturíes # 4 y dos mecheros
- Como insumos se utilizaron: cloro comercial (5.25% i.a.), detergente común, alcohol al 70% (c/v), alcohol para quemar, fósforos, papel aluminio, papel parafinado, agua bidestilada estéril, “Tween 80” papel traza, cinta adhesiva, marcadores indelebles, hojas de bisturíes # 21, guantes desechables, mascarillas y gorros para el cabello.

**3.2.2 Experimento 2:** Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de oscuridad.

- Los materiales fueron los mismos que se usaron para el Experimento 1, adicionando a los insumos varias cajas de cartón pequeñas (4x9x12”) para poder incubar los ápices en completa oscuridad.

### **3.3. MEDIOS DE CULTIVO**

Se utilizaron modificaciones del medio básico de Murashige y Skoog (MS) para la etapa de establecimiento (E I) y para los primeros dos subcultivos de la primera etapa de multiplicación (E II: M1S1 y M1S2). Estos medios de cultivo fueron los utilizados por el laboratorio de Cultivo de Tejidos de El Zamorano, realizándose las modificaciones respectivas según la recomendación de personal de la FHIA, para la producción *in vitro* de plátano (Cuadro 1).

**Cuadro 1.- Medio de cultivo, Murashige y Skoog (MS) modificado utilizado para la propagación *in vitro* de plátano. El Zamorano, Honduras, 2000.**

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Solución madre 10X (mg/l)</b> Disolver en 1 L de agua destilada	<b>ml de solución madre 10X por litro de medio</b>
KNO <sub>3</sub>	1,900.00	19,000.00	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00	16,500.00	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.00	4,400.00	100
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00	3,700.00	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1,700.00	

<b>Micronutrientes</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Solución madre 1000X (mg/l)</b> Disolver en 1 L de agua destilada	<b>ml de solución madre 1000X por litro de medio</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.900	16,900.00	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600	8,600.00	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	6,200.00	1.0
KI	0.830	830.00	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	25.00	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	250.00	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	25.00	

<b>Solución de hierro</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Solución madre 200X (mg/l)</b> Disolver en 1 L de agua destilada	<b>ml de solución madre 200X por litro de medio</b>
FeNaEDTA	50.00	10,000.00	5.0

<b>VITAMINAS</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Dilución<sup>1</sup></b>	<b>ml de solución madre por litro de medio</b>
Tiamina HCl	0.5	1:1	0.5
Acido nicotínico	0.5	1:1	0.5
Piridoxina HCl	0.5	1:1	0.5
Glicina	2.0	1:1	2.0

<b>Otros</b>	<b>mg/l</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Etapas I (Iniciación)</b>	<b>Etapas II (Multiplicación)</b>
ácido	100	Pesar en balanza y agregar directamente al medio	100 mg/l	100 mg/l
ascórbico <sup>2</sup>	200		200 mg/l	200 mg/l
L-cisteína <sup>2</sup>	2.0	100 mg/100 ml <sup>1</sup>	2.0 ml/l	2.0 ml/l
	4.0	Disolver en agua destilada	4.0 ml/l	4.0 ml/l
Sacarosa			30.0 g/l	30.0 g/l
BAP	4.0	100 mg/ 100 ml <sup>1</sup>		
(M1- 31.00)		Disolver en 1N de KOH y completar con agua destilada	1.0 mg/l (1ppm)	4.0 mg/l (4 ppm)

S1,S2)				
Phytigel <sup>3</sup>	3500	Calentar el medio para disolver	3.5 g/l (medir pH antes)	3.5 g/l (medir pH antes)
Gelrita <sup>3</sup>	2000	No es necesario calentar el medio para disolver	2.0 g/l (medir pH antes)	2.0 g/l (medir pH antes)
pH			5.8	5.8

---

<sup>1</sup> Dilución de 1:1 (1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de producto).

<sup>2</sup> Antioxidantes.

<sup>3</sup> Agentes gelatinizadores (el Phytigel sólo fue usado para el establecimiento del experimento 1; para los demás medios de establecimiento y multiplicación se utilizó Gelrita).

El procedimiento que se siguió para la elaboración de los medios en cada uno de los experimentos se detalla a continuación:

### 3.3.1 Elaboración del medio de cultivo para la etapa de establecimiento (E I)

#### 3.3.1.1 Experimento 1

1. Para la primera etapa se preparó 2,100 ml de medio básico Murashige y Skoog (MS) más 1.0 mg/l de benzilaminopurina (BAP) (Cuadro 1).
2. Este medio se separó en cinco vasos de precipitado, cada uno conteniendo 420 ml de medio en los que se distribuyeron los tratamientos. A cada vaso de precipitado se le agregó el antioxidante respectivo (Cuadro 2).

**Cuadro 2.- Cantidad de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Tratamiento No.	L-cisteína <sup>1</sup> (mg/l)		ácido ascórbico <sup>2</sup> (mg/l)	
	2.0	4.0	100	200
1 (ml)	0.84 <sup>3</sup>	0.00	0.00	0.00
2 (ml)	0.00	1.68 <sup>3</sup>	0.00	0.00
3 (mg)	0.00	0.00	42.00 <sup>3</sup>	0.00
4 (mg)	0.00	0.00	0.00	84.00 <sup>3</sup>
5 (Testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>1</sup> Se utilizó solución madre con dilución de 1:1 (1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de L-cisteína).

<sup>2</sup> Se pesó en la balanza de precisión y se agregó directamente al medio de cultivo.

<sup>3</sup> Cantidad agregada por alícuota de 420 ml de medio de cultivo.

3. Cada tratamiento se ajustó a un pH de 5.8, lo cual se consiguió adicionando ácido clorhídrico (HCl) 1N para bajarlo o hidróxido de potasio (KOH) 1N para subirlo.
4. A los vasos de precipitado conteniendo el medio nutritivo correspondiente a cada tratamiento se les agregó 1.47 g (3.5 g/l) de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se les mantuvo en agitación.
5. Para poder disolver el agente gelatinizador, cada medio se calentó en un horno de microondas por un periodo aproximado de 2.5 minutos, agitando a intervalos. Luego se hizo la distribución del medio en los frascos.
6. Se utilizaron frascos de 4 oz. en los que el medio se distribuyó, con ayuda de una jeringa dosificadora, a razón de 20 ml por frasco, que fueron debidamente rotulados con marcador indeleble indicando la variedad y el tratamiento.
7. Una vez vertido el medio de cultivo, los frascos se sellaron con papel aluminio.
8. Para su esterilización, los frascos sellados fueron puestos en el autoclave donde se sometieron a 15 PSI de presión y 121°C de temperatura durante 20 minutos.

9. Al sacar los frascos del autoclave, se dejaron enfriar hasta que el medio se solidificó, después de lo cual se mantuvieron en refrigeración hasta que, en los siguientes ocho días, se utilizaron para el experimento.

### 3.3.1.2 Experimento 2

1. Para la primera etapa se preparó 3,200 ml (200 ml más de lo necesario) de medio básico MS más 1.0 mg/l de BAP.
2. Este medio se separó en cinco vasos de precipitado, cada uno conteniendo 640 ml. A cada vaso de precipitado se le agregó el antioxidante respectivo (Cuadro 3).

**Cuadro 3.- Cantidad de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Tratamiento No.	L-cisteína <sup>1</sup> (mg/l)		ácido ascórbico <sup>2</sup> (mg/l)	
	2.0	4.0	100	200
1 (ml)	1.28 <sup>3</sup>	0.00	0.00	0.00
2 (ml)	0.00	2.56 <sup>3</sup>	0.00	0.00
3 (mg)	0.00	0.00	64.00 <sup>3</sup>	0.00
4 (mg)	0.00	0.00	0.00	128.00 <sup>3</sup>
5 (Testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>1</sup> Se utilizó solución madre con dilución de 1:1 (1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de L-cisteína).

<sup>2</sup> Se pesó en la balanza de precisión y se agregó directamente al medio de cultivo.

<sup>3</sup> Cantidad agregada por alícuota de 640ml de medio de cultivo.

3. Cada tratamiento se ajustó a un pH de 5.8, lo que se consiguió adicionando ácido clorhídrico (HCl) 1N para bajarlo o hidróxido de potasio (KOH) 1N para subirlo.
4. A los vasos de precipitado conteniendo el medio nutritivo correspondiente a cada tratamiento se les agregó 1.28 g. (2.0 g/l) de Gelrita (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se les mantuvo en agitación constante para luego distribuir el medio en los frascos.
5. Se utilizaron frascos de 4 oz. en los que se vertió 20 ml de medio. Los frascos fueron debidamente rotulados con marcador indeleble, indicando la variedad y el tratamiento.
6. Una vez vertido el medio de cultivo, los frascos se sellaron con papel aluminio.
7. Para su esterilización, los frascos sellados fueron puestos en el autoclave donde se sometieron a 15 PSI de presión y 121°C de temperatura durante 20 minutos.
8. Al sacar los frascos del autoclave, se dejaron enfriar hasta que el medio se solidificó, después de lo cual se mantuvieron en refrigeración hasta que, en los siguientes siete días, se utilizaron para el experimento.

### 3.3.2 Elaboración del medio de cultivo para la etapa de multiplicación (E II)

**3.3.2.1 Experimento 1.** Para la elaboración del medio de cultivo usado para los dos subcultivos (M1S1 y M1S2) de la etapa de multiplicación (E II), se utilizó el mismo procedimiento para elaborar el medio de la etapa de establecimiento descrito para el primer experimento, con las siguientes variaciones:

La cantidad a preparar se basó en el número de ápices meristemáticos que lograron establecerse sin contaminarse durante la primera etapa. Esta se averiguó multiplicando el número de ápices que se establecieron por dos (ya que estos se dividieron en dos) y por 20 ya que cada frasco contuvo 20 ml de medio de cultivo.

La cantidad de BAP agregada al medio se incrementó de 1.0 mg/l que se había utilizado en la primera etapa, a 4.0 mg/l de medio.

En lugar de utilizar Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como agente gelatinizador, se utilizó Gelrita (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Las cantidades de los antioxidantes variaron según la cantidad de medio que se preparó por cada tratamiento, siempre manteniendo las dosis iniciales usadas (Cuadro 4).

**Cuadro 4.- Dosis de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras. 2000.**

Antioxidante <sup>1</sup>	Tratamiento No.				
	1	2	3	4	5 (Testigo)
L-cisteína <sup>2</sup>	2.0	4.0	0.00	0.00	0.00
ácido ascórbico	0.00	0.00	100	200	0.00

<sup>1</sup> Cantidad de producto utilizada en mg/l.

<sup>2</sup> Se preparó una solución madre 1:1 donde 1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de producto.

Los antioxidantes fueron utilizados igual que en la etapa de establecimiento según el tratamiento del que procedía cada material vegetal.

**3.3.2.2 Experimento 2.** En este experimento no se realizó la multiplicación de los ápices por lo que no se requirió preparar los medios que se necesitan para esta labor.

### 3.4 MATERIAL VEGETAL

Para ambos experimentos se seleccionaron plantas madres que presentaron las mejores características físicas y genéticas para obtener buenos hijos. Las plantas estaban con frutos para observar las características del racimo: número, forma, longitud y calidad de los dedos. Estas plantas se escogieron en las plantaciones de la FHIA en La Lima, Honduras.

### **3.4.1 Experimento 1**

Se utilizaron 35 cormos de cada uno de los plátanos: FHIA 20, FHIA 21 y Cuerno, para un total de 105 cormos.

### **3.4.2 Experimento 2**

Se utilizaron 50 cormos de cada uno de los plátanos: FHIA 20, FHIA 21 y Cuerno, para un total de 150 cormos.

## **3.5 PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL**

### **3.5.1 Preparación del material vegetal**

Para ambos experimentos se realizó el siguiente procedimiento para preparar el material vegetal en el campo y el invernadero antes de su ingreso al laboratorio:

1. A las plantas escogidas en la FHIA, se les cortaron los hijos para su transporte hacia El Zamorano.
2. En El Zamorano, antes del ingreso de los cormos al laboratorio, se lavaron con agua y jabón para eliminar los residuos del campo y luego se realizaron tres reducciones de los mismos, tal como se detalló en el inciso 2.1.
3. Se asperjó cloro comercial sin diluir (5.25% de i.a. NaOCl) sobre el cormo y los machetes antes de cada reducción hasta obtener los ápices meristemáticos de aproximadamente 7.0 cm de largo por 3.0 cm de diámetro.
4. Los ápices se ingresaron al laboratorio en un recipiente con agua bidestilada.

### **3.5.2 Esterilización superficial del material vegetal**

Para ambos experimentos, a nivel del laboratorio, se realizó el siguiente procedimiento para esterilizar superficialmente el material vegetal antes de su utilización:

1. Los ápices fueron pasados, con una pinza grande, a un vaso de precipitado de 4,000 ml conteniendo una solución desinfectante de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 30% (v/v) conteniendo tres gotas de "Tween 80" por cada 100 ml de solución desinfectante.
2. En esta solución, los ápices se mantuvieron en agitación constante por 30 min dentro de la cámara de flujo laminar. Todos los pasos siguientes se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar.
3. Antes de su uso, las herramientas se flamearon sobre un mechero y después se enfriaron sumergiéndolas en un frasco con agua fría destilada previamente esterilizada. Esta agua se cambió constantemente para evitar la contaminación y este procedimiento se repitió durante todo el proceso de la micropropagación ya que siempre se trabajó con las herramientas estériles.

4. Con una pinza grande previamente esterilizada, los ápices meristemáticos se pasaron a tres vasos de precipitado de 2,000 ml cada uno, conteniendo agua bidestilada estéril para el enjuague. Cada enjuague en el proceso duró aproximadamente 2 minutos. Seguidamente, con el bisturí esterilizado, los ápices se redujeron sobre un plato de Petri estéril hasta aproximadamente el 50% de su tamaño original.
5. Después, con una pinza mediana estéril, se movieron los ápices a otro vaso de precipitado de 1,000 ml con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) conteniendo 3 gotas de “Tween 80” por cada 100 ml de solución, en el cual se mantuvieron durante 10 minutos en constante agitación.
6. Luego de esta desinfección, los ápices fueron enjuagados tres veces con agua bidestilada estéril, siguiendo el procedimiento expuesto en el inciso 4 para los enjuagues.
7. Se repitió el procedimiento 5, moviendo los ápices esta vez a un vaso de precipitado de 500 ml conteniendo solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 2.5% (v/v), conteniendo 3 gotas de “Tween 80” por cada 100 ml de solución, durante 2 minutos en constante agitación.
8. Finalmente, los ápices meristemáticos se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril. Para esto, los ápices meristemáticos se pasaron, con la ayuda de una pinza mediana, por tres vasos de precipitado de 500 ml c/u, conteniendo agua bidestilada estéril. Cada enjuague tuvo una duración de 2 minutos.

### **3.6 ESTABLECIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL EN EL MEDIO DE CULTIVO**

#### **3.6.1 Experimento 1**

1. Los ápices meristemáticos, ya preparados y desinfectados, se redujeron (con el bisturí esterilizado y sobre un plato de Petri estéril) a un tamaño aproximado de 2.0 cm de largo por 0.8 cm de diámetro.
2. Luego se flameó el borde del frasco que contenía el medio para los ápices y se colocó un ápice por cada frasco.
3. Estos frascos se sellaron con papel aluminio y los bordes se sellaron con parafinado.
4. Los frascos se rotularon indicando el número de planta y fecha.
5. Los ápices fueron incubados por aproximadamente 40 días.

#### **3.6.2 Experimento 2**

Se siguió el mismo procedimiento usado en el Experimento 1 pero los ápices se incubaron en condiciones de oscuridad.

### **3.7 MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

### **3.7.1 Experimento 1**

Una vez establecidos los ápices, se procedió a la multiplicación de los mismos, etapa en la cual por limitaciones de tiempo para el estudio sólo se realizaron dos subcultivos (M1S1 y M1S2) de los ocho recomendados. El proceso de multiplicación se realizó cada 21 días.

6. Para la multiplicación se extrajo el ápice meristemático sano del frasco que lo contenía y se colocó sobre un plato de Petri.
7. Luego se procedió a limpiar la base del ápice que estaba oxidada, reduciendo un poco la longitud de la base y limpiando la parte aérea, eliminando así las partes necróticas.
8. Luego se dividió longitudinalmente el ápice meristemático en dos partes de manera que cada una de ellas quedó con su parte aérea y base.
9. Seguidamente cada una de esas partes se colocó en el frasco que contenía el medio de cultivo para multiplicación, de modo que se mantuvo siempre un ápice por frasco.
10. Luego se sellaron los frascos con papel aluminio y parafinado para incubarlos nuevamente por 21 días hasta la siguiente multiplicación.

### **3.7.2 Experimento 2**

No se realizaron las etapas de multiplicación.

## **3.8 CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA INCUBACIÓN**

### **3.8.1 Experimento 1**

Los ápices se incubaron en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de  $36 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , una temperatura promedio de  $24^{\circ}\text{C}$  y un fotoperíodo de 16 h luz por día.

### **3.8.2 Experimento 2**

Para la incubación en la oscuridad, los frascos conteniendo los ápices (uno por frasco) se colocaron dentro de varias cajas de cartón pequeñas (4x9x12”), las cuales sólo fueron abiertas para la toma de datos. Estas cajas se mantuvieron en el mismo cuarto de crecimiento descrito para el primer experimento.

## **3.9 VARIABLES MEDIDAS**

Las variables que se midieron fueron:

- Grado de oxidación (Ox), que se midió en la base de los ápices meristemáticos de acuerdo a cinco categorías:

Ox 0: sin oxidación.

**Ox 1: oxidación levemente visible (1-25%) o aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del ápice oxidado.**

**Ox 2: oxidación media (25-50%) o aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del ápice oxidado.**

**Ox 3: oxidación alta (50-75%) o aproximadamente  $\frac{3}{4}$  del ápice oxidado.**

Ox 4: oxidación total (75-100%) o todo el ápice oxidado.

La oxidación fue considerada sólo en las paredes de cada ápice meristemático. La base de la base del ápice no fue considerada porque, por lo general, ésta se mantuvo en contacto con el fondo del frasco.

- Formación de callo.
- Número de brotes por ápice en la etapa de multiplicación.
- Grado de necrosis (N) de los ápices meristemáticos, se clasificó de acuerdo a cinco categorías:

N 0: sin necrosis.

**N 1: necrosis levemente visible (1-25%) o aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del ápice con necrosis.**

**N 2: necrosis media (25-50%) o aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del ápice con necrosis.**

**N 3: necrosis alta (50-75%) o aproximadamente  $\frac{3}{4}$  del ápice con necrosis.**

N 4: necrosis total (75-100%) o todo el ápice con necrosis.

Para la necrosis se tomó en cuenta la parte aérea del ápice mas no los brotes ya que estos no la presentaron.

- Número de plantas contaminadas y su agente causal (hongo o bacteria).

Los brotes fueron considerados como tales al presentar un tamaño aproximado de 2 mm con una coloración blanca verdusca.

### 3.10 TOMA DE DATOS

La toma de datos se realizó cada cinco días, observando individualmente las plantas involucradas en el estudio. Los datos se registraron en formatos diseñados para ese efecto (Anexo 1).

### 3.11 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

En ambos experimentos los tratamientos y las variedades se ordenaron de manera aleatoria. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis System” versión 6.12 (SAS<sup>®</sup>, 1997), por medio de un análisis de varianza, una separación de medias “Student-Newman-Keuls” (SNK) y un análisis Chi-Cuadrado.

Todos los datos obtenidos fueron transformados con el logaritmo en base 10 de “X+1”. Se comparó las variables según los datos transformados y no transformados para ver si la transformación aumentó la significancia y el ajuste del modelo.

La separación de medias SNK se realizó para las variables paramétricas (necrosis y oxidación) con una significancia menor o igual a 0.05. Las variables no paramétricas (contaminación, callo y brotes) se analizaron usando la prueba Chi-Cuadrado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano, Honduras, entre el 14 de marzo y el 08 de julio de 2000. Se realizaron dos experimentos para determinar qué tipo y concentración de antioxidante era más efectivo para el control de la oxidación en la micropropagación de plátano. En el primer experimento, los ápices meristemáticos fueron incubados en la luz y en el segundo fueron incubados en total oscuridad. Los materiales que se utilizaron para ambos experimentos y la metodología que se siguió se detallan a continuación.

#### 3.2 MATERIALES DE LABORATORIO

**3.2.1 Experimento 1:** Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de luz.

- La cristalería usada fue: frascos de 4 oz, platos de Petri, vasos de precipitado, balones aforados, frascos de Mason, pipetas y probetas, entre otros.
- La cristalería fue lavada con agua y “Alconox” para eliminar todas las impurezas de la misma y luego de este lavado, se enjuagó con agua bidestilada. Seguidamente, los platos de Petri y los frascos de 4 oz fueron secados en un horno a 360°C por una hora y media; el resto de cristalería fue dejada, boca abajo, sobre un mueble para que seque al ambiente.
- El equipo que se utilizó fue: autoclave, horno de microondas, horno para secar cristalería, balanza de precisión, potenciómetro, refrigeradora, agitadores, jeringas dosificadoras de 30 y 10 ml, bandejas de metal y de plástico y cámara de flujo laminar.
- Las herramientas usadas para la reducción de los cormos fueron: dos machetes, una lima, un recipiente de plástico de 4,000 ml, un aspersor y un cepillo.
- Las herramientas usadas en el proceso de micropropagación fueron: pinzas medianas y grandes, mangos de bisturíes # 4 y dos mecheros
- Como insumos se utilizaron: cloro comercial (5.25% i.a.), detergente común, alcohol al 70% (c/v), alcohol para quemar, fósforos, papel aluminio, papel parafinado, agua bidestilada estéril, “Tween 80” papel traza, cinta adhesiva, marcadores indelebles, hojas de bisturíes # 21, guantes desechables, mascarillas y gorros para el cabello.

**3.2.2 Experimento 2:** Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de oscuridad.

- Los materiales fueron los mismos que se usaron para el Experimento 1, adicionando a los insumos varias cajas de cartón pequeñas (4x9x12”) para poder incubar los ápices en completa oscuridad.

### **3.3. MEDIOS DE CULTIVO**

Se utilizaron modificaciones del medio básico de Murashige y Skoog (MS) para la etapa de establecimiento (E I) y para los primeros dos subcultivos de la primera etapa de multiplicación (E II: M1S1 y M1S2). Estos medios de cultivo fueron los utilizados por el laboratorio de Cultivo de Tejidos de El Zamorano, realizándose las modificaciones respectivas según la recomendación de personal de la FHIA, para la producción *in vitro* de plátano (Cuadro 1).

**Cuadro 1.- Medio de cultivo, Murashige y Skoog (MS) modificado utilizado para la propagación *in vitro* de plátano. El Zamorano, Honduras, 2000.**

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Solución madre 10X (mg/l)</b> Disolver en 1 L de agua destilada	<b>ml de solución madre 10X por litro de medio</b>
KNO <sub>3</sub>	1,900.00	19,000.00	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00	16,500.00	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.00	4,400.00	100
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00	3,700.00	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1,700.00	

<b>Micronutrientes</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Solución madre 1000X (mg/l)</b> Disolver en 1 L de agua destilada	<b>ml de solución madre 1000X por litro de medio</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.900	16,900.00	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600	8,600.00	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	6,200.00	1.0
KI	0.830	830.00	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	25.00	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	250.00	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	25.00	

<b>Solución de hierro</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Solución madre 200X (mg/l)</b> Disolver en 1 L de agua destilada	<b>ml de solución madre 200X por litro de medio</b>
FeNaEDTA	50.00	10,000.00	5.0

<b>VITAMINAS</b>	<b>Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)</b>	<b>Dilución<sup>1</sup></b>	<b>ml de solución madre por litro de medio</b>
Tiamina HCl	0.5	1:1	0.5
Acido nicotínico	0.5	1:1	0.5
Piridoxina HCl	0.5	1:1	0.5
Glicina	2.0	1:1	2.0

<b>Otros</b>	<b>mg/l</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Etapas I (Iniciación)</b>	<b>Etapas II (Multiplicación)</b>
ácido	100	Pesar en balanza y agregar directamente al medio	100 mg/l	100 mg/l
ascórbico <sup>2</sup>	200		200 mg/l	200 mg/l
L-cisteína <sup>2</sup>	2.0	100 mg/100 ml <sup>1</sup>	2.0 ml/l	2.0 ml/l
	4.0	Disolver en agua destilada	4.0 ml/l	4.0 ml/l
Sacarosa			30.0 g/l	30.0 g/l
BAP	4.0	100 mg/ 100 ml <sup>1</sup>		
(M1- 31.00)		Disolver en 1N de KOH y completar con agua destilada	1.0 mg/l (1ppm)	4.0 mg/l (4 ppm)

S1,S2)				
Phytigel <sup>3</sup>	3500	Calentar el medio para disolver	3.5 g/l (medir pH antes)	3.5 g/l (medir pH antes)
Gelrita <sup>3</sup>	2000	No es necesario calentar el medio para disolver	2.0 g/l (medir pH antes)	2.0 g/l (medir pH antes)
pH			5.8	5.8

<sup>1</sup> Dilución de 1:1 (1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de producto).

<sup>2</sup> Antioxidantes.

<sup>3</sup> Agentes gelatinizadores (el Phytigel sólo fue usado para el establecimiento del experimento 1; para los demás medios de establecimiento y multiplicación se utilizó Gelrita).

El procedimiento que se siguió para la elaboración de los medios en cada uno de los experimentos se detalla a continuación:

### 3.3.1 Elaboración del medio de cultivo para la etapa de establecimiento (E I)

#### 3.3.1.1 Experimento 1

10. Para la primera etapa se preparó 2,100 ml de medio básico Murashige y Skoog (MS) más 1.0 mg/l de benzilaminopurina (BAP) (Cuadro 1).
11. Este medio se separó en cinco vasos de precipitado, cada uno conteniendo 420 ml de medio en los que se distribuyeron los tratamientos. A cada vaso de precipitado se le agregó el antioxidante respectivo (Cuadro 2).

**Cuadro 2.- Cantidad de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Tratamiento No.	L-cisteína <sup>1</sup> (mg/l)		ácido ascórbico <sup>2</sup> (mg/l)	
	2.0	4.0	100	200
1 (ml)	0.84 <sup>3</sup>	0.00	0.00	0.00
2 (ml)	0.00	1.68 <sup>3</sup>	0.00	0.00
3 (mg)	0.00	0.00	42.00 <sup>3</sup>	0.00
4 (mg)	0.00	0.00	0.00	84.00 <sup>3</sup>
5 (Testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>1</sup> Se utilizó solución madre con dilución de 1:1 (1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de L-cisteína).

<sup>2</sup> Se pesó en la balanza de precisión y se agregó directamente al medio de cultivo.

<sup>3</sup> Cantidad agregada por alícuota de 420 ml de medio de cultivo.

12. Cada tratamiento se ajustó a un pH de 5.8, lo cual se consiguió adicionando ácido clorhídrico (HCl) 1N para bajarlo o hidróxido de potasio (KOH) 1N para subirlo.
13. A los vasos de precipitado conteniendo el medio nutritivo correspondiente a cada tratamiento se les agregó 1.47 g (3.5 g/l) de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se les mantuvo en agitación.
14. Para poder disolver el agente gelatinizador, cada medio se calentó en un horno de microondas por un periodo aproximado de 2.5 minutos, agitando a intervalos. Luego se hizo la distribución del medio en los frascos.
15. Se utilizaron frascos de 4 oz. en los que el medio se distribuyó, con ayuda de una jeringa dosificadora, a razón de 20 ml por frasco, que fueron debidamente rotulados con marcador indeleble indicando la variedad y el tratamiento.
16. Una vez vertido el medio de cultivo, los frascos se sellaron con papel aluminio.
17. Para su esterilización, los frascos sellados fueron puestos en el autoclave donde se sometieron a 15 PSI de presión y 121°C de temperatura durante 20 minutos.

18. Al sacar los frascos del autoclave, se dejaron enfriar hasta que el medio se solidificó, después de lo cual se mantuvieron en refrigeración hasta que, en los siguientes ocho días, se utilizaron para el experimento.

### 3.3.1.2 Experimento 2

9. Para la primera etapa se preparó 3,200 ml (200 ml más de lo necesario) de medio básico MS más 1.0 mg/l de BAP.
10. Este medio se separó en cinco vasos de precipitado, cada uno conteniendo 640 ml. A cada vaso de precipitado se le agregó el antioxidante respectivo (Cuadro 3).

**Cuadro 3.- Cantidad de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Tratamiento No.	L-cisteína <sup>1</sup> (mg/l)		ácido ascórbico <sup>2</sup> (mg/l)	
	2.0	4.0	100	200
1 (ml)	1.28 <sup>3</sup>	0.00	0.00	0.00
2 (ml)	0.00	2.56 <sup>3</sup>	0.00	0.00
3 (mg)	0.00	0.00	64.00 <sup>3</sup>	0.00
4 (mg)	0.00	0.00	0.00	128.00 <sup>3</sup>
5 (Testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>1</sup> Se utilizó solución madre con dilución de 1:1 (1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de L-cisteína).

<sup>2</sup> Se pesó en la balanza de precisión y se agregó directamente al medio de cultivo.

<sup>3</sup> Cantidad agregada por alícuota de 640ml de medio de cultivo.

11. Cada tratamiento se ajustó a un pH de 5.8, lo que se consiguió adicionando ácido clorhídrico (HCl) 1N para bajarlo o hidróxido de potasio (KOH) 1N para subirlo.
12. A los vasos de precipitado conteniendo el medio nutritivo correspondiente a cada tratamiento se les agregó 1.28 g. (2.0 g/l) de Gelrita (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se les mantuvo en agitación constante para luego distribuir el medio en los frascos.
13. Se utilizaron frascos de 4 oz. en los que se vertió 20 ml de medio. Los frascos fueron debidamente rotulados con marcador indeleble, indicando la variedad y el tratamiento.
14. Una vez vertido el medio de cultivo, los frascos se sellaron con papel aluminio.
15. Para su esterilización, los frascos sellados fueron puestos en el autoclave donde se sometieron a 15 PSI de presión y 121°C de temperatura durante 20 minutos.
16. Al sacar los frascos del autoclave, se dejaron enfriar hasta que el medio se solidificó, después de lo cual se mantuvieron en refrigeración hasta que, en los siguientes siete días, se utilizaron para el experimento.

### 3.3.2 Elaboración del medio de cultivo para la etapa de multiplicación (E II)

**3.3.2.1 Experimento 1.** Para la elaboración del medio de cultivo usado para los dos subcultivos (M1S1 y M1S2) de la etapa de multiplicación (E II), se utilizó el mismo procedimiento para elaborar el medio de la etapa de establecimiento descrito para el primer experimento, con las siguientes variaciones:

La cantidad a preparar se basó en el número de ápices meristemáticos que lograron establecerse sin contaminarse durante la primera etapa. Esta se averiguó multiplicando el número de ápices que se establecieron por dos (ya que estos se dividieron en dos) y por 20 ya que cada frasco contuvo 20 ml de medio de cultivo.

La cantidad de BAP agregada al medio se incrementó de 1.0 mg/l que se había utilizado en la primera etapa, a 4.0 mg/l de medio.

En lugar de utilizar Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como agente gelatinizador, se utilizó Gelrita (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Las cantidades de los antioxidantes variaron según la cantidad de medio que se preparó por cada tratamiento, siempre manteniendo las dosis iniciales usadas (Cuadro 4).

**Cuadro 4.- Dosis de L-cisteína y ácido ascórbico utilizadas como tratamiento antioxidante en la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras. 2000.**

Antioxidante <sup>1</sup>	Tratamiento No.				
	1	2	3	4	5 (Testigo)
L-cisteína <sup>2</sup>	2.0	4.0	0.00	0.00	0.00
ácido ascórbico	0.00	0.00	100	200	0.00

<sup>1</sup> Cantidad de producto utilizada en mg/l.

<sup>2</sup> Se preparó una solución madre 1:1 donde 1.0 ml de solución contenía 1.0 mg de producto.

Los antioxidantes fueron utilizados igual que en la etapa de establecimiento según el tratamiento del que procedía cada material vegetal.

**3.3.2.2 Experimento 2.** En este experimento no se realizó la multiplicación de los ápices por lo que no se requirió preparar los medios que se necesitan para esta labor.

### **3.4 MATERIAL VEGETAL**

Para ambos experimentos se seleccionaron plantas madres que presentaron las mejores características físicas y genéticas para obtener buenos hijos. Las plantas estaban con frutos para observar las características del racimo: número, forma, longitud y calidad de los dedos. Estas plantas se escogieron en las plantaciones de la FHIA en La Lima, Honduras.

### **3.4.1 Experimento 1**

Se utilizaron 35 cormos de cada uno de los plátanos: FHIA 20, FHIA 21 y Cuerno, para un total de 105 cormos.

### **3.4.2 Experimento 2**

Se utilizaron 50 cormos de cada uno de los plátanos: FHIA 20, FHIA 21 y Cuerno, para un total de 150 cormos.

## **3.5 PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL**

### **3.5.1 Preparación del material vegetal**

Para ambos experimentos se realizó el siguiente procedimiento para preparar el material vegetal en el campo y el invernadero antes de su ingreso al laboratorio:

5. A las plantas escogidas en la FHIA, se les cortaron los hijos para su transporte hacia El Zamorano.
6. En El Zamorano, antes del ingreso de los cormos al laboratorio, se lavaron con agua y jabón para eliminar los residuos del campo y luego se realizaron tres reducciones de los mismos, tal como se detalló en el inciso 2.1.
7. Se asperjó cloro comercial sin diluir (5.25% de i.a. NaOCl) sobre el cormo y los machetes antes de cada reducción hasta obtener los ápices meristemáticos de aproximadamente 7.0 cm de largo por 3.0 cm de diámetro.
8. Los ápices se ingresaron al laboratorio en un recipiente con agua bidestilada.

### **3.5.2 Esterilización superficial del material vegetal**

Para ambos experimentos, a nivel del laboratorio, se realizó el siguiente procedimiento para esterilizar superficialmente el material vegetal antes de su utilización:

9. Los ápices fueron pasados, con una pinza grande, a un vaso de precipitado de 4,000 ml conteniendo una solución desinfectante de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 30% (v/v) conteniendo tres gotas de "Tween 80" por cada 100 ml de solución desinfectante.
10. En esta solución, los ápices se mantuvieron en agitación constante por 30 min dentro de la cámara de flujo laminar. Todos los pasos siguientes se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar.
11. Antes de su uso, las herramientas se flamearon sobre un mechero y después se enfriaron sumergiéndolas en un frasco con agua fría destilada previamente esterilizada. Esta agua se cambió constantemente para evitar la contaminación y este procedimiento se repitió durante todo el proceso de la micropropagación ya que siempre se trabajó con las herramientas estériles.

12. Con una pinza grande previamente esterilizada, los ápices meristemáticos se pasaron a tres vasos de precipitado de 2,000 ml cada uno, conteniendo agua bidestilada estéril para el enjuague. Cada enjuague en el proceso duró aproximadamente 2 minutos. Seguidamente, con el bisturí esterilizado, los ápices se redujeron sobre un plato de Petri estéril hasta aproximadamente el 50% de su tamaño original.
13. Después, con una pinza mediana estéril, se movieron los ápices a otro vaso de precipitado de 1,000 ml con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) conteniendo 3 gotas de “Tween 80” por cada 100 ml de solución, en el cual se mantuvieron durante 10 minutos en constante agitación.
14. Luego de esta desinfección, los ápices fueron enjuagados tres veces con agua bidestilada estéril, siguiendo el procedimiento expuesto en el inciso 4 para los enjuagues.
15. Se repitió el procedimiento 5, moviendo los ápices esta vez a un vaso de precipitado de 500 ml conteniendo solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 2.5% (v/v), conteniendo 3 gotas de “Tween 80” por cada 100 ml de solución, durante 2 minutos en constante agitación.
16. Finalmente, los ápices meristemáticos se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril. Para esto, los ápices meristemáticos se pasaron, con la ayuda de una pinza mediana, por tres vasos de precipitado de 500 ml c/u, conteniendo agua bidestilada estéril. Cada enjuague tuvo una duración de 2 minutos.

### **3.6 ESTABLECIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL EN EL MEDIO DE CULTIVO**

#### **3.6.1 Experimento 1**

11. Los ápices meristemáticos, ya preparados y desinfectados, se redujeron (con el bisturí esterilizado y sobre un plato de Petri estéril) a un tamaño aproximado de 2.0 cm de largo por 0.8 cm de diámetro.
12. Luego se flameó el borde del frasco que contenía el medio para los ápices y se colocó un ápice por cada frasco.
13. Estos frascos se sellaron con papel aluminio y los bordes se sellaron con parafinado.
14. Los frascos se rotularon indicando el número de planta y fecha.
15. Los ápices fueron incubados por aproximadamente 40 días.

#### **3.6.2 Experimento 2**

Se siguió el mismo procedimiento usado en el Experimento 1 pero los ápices se incubaron en condiciones de oscuridad.

### **3.7 MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

### **3.7.1 Experimento 1**

Una vez establecidos los ápices, se procedió a la multiplicación de los mismos, etapa en la cual por limitaciones de tiempo para el estudio sólo se realizaron dos subcultivos (M1S1 y M1S2) de los ocho recomendados. El proceso de multiplicación se realizó cada 21 días.

16. Para la multiplicación se extrajo el ápice meristemático sano del frasco que lo contenía y se colocó sobre un plato de Petri.
17. Luego se procedió a limpiar la base del ápice que estaba oxidada, reduciendo un poco la longitud de la base y limpiando la parte aérea, eliminando así las partes necróticas.
18. Luego se dividió longitudinalmente el ápice meristemático en dos partes de manera que cada una de ellas quedó con su parte aérea y base.
19. Seguidamente cada una de esas partes se colocó en el frasco que contenía el medio de cultivo para multiplicación, de modo que se mantuvo siempre un ápice por frasco.
20. Luego se sellaron los frascos con papel aluminio y parafinado para incubarlos nuevamente por 21 días hasta la siguiente multiplicación.

### **3.7.2 Experimento 2**

No se realizaron las etapas de multiplicación.

## **3.8 CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA INCUBACIÓN**

### **3.8.1 Experimento 1**

Los ápices se incubaron en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de  $36 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , una temperatura promedio de  $24^{\circ}\text{C}$  y un fotoperíodo de 16 h luz por día.

### **3.8.2 Experimento 2**

Para la incubación en la oscuridad, los frascos conteniendo los ápices (uno por frasco) se colocaron dentro de varias cajas de cartón pequeñas (4x9x12”), las cuales sólo fueron abiertas para la toma de datos. Estas cajas se mantuvieron en el mismo cuarto de crecimiento descrito para el primer experimento.

## **3.9 VARIABLES MEDIDAS**

Las variables que se midieron fueron:

- Grado de oxidación (Ox), que se midió en la base de los ápices meristemáticos de acuerdo a cinco categorías:

Ox 0: sin oxidación.

**Ox 1: oxidación levemente visible (1-25%) o aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del ápice oxidado.**

**Ox 2: oxidación media (25-50%) o aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del ápice oxidado.**

**Ox 3: oxidación alta (50-75%) o aproximadamente  $\frac{3}{4}$  del ápice oxidado.**

Ox 4: oxidación total (75-100%) o todo el ápice oxidado.

La oxidación fue considerada sólo en las paredes de cada ápice meristemático. La base de la base del ápice no fue considerada porque, por lo general, ésta se mantuvo en contacto con el fondo del frasco.

- Formación de callo.
- Número de brotes por ápice en la etapa de multiplicación.
- Grado de necrosis (N) de los ápices meristemáticos, se clasificó de acuerdo a cinco categorías:

N 0: sin necrosis.

**N 1: necrosis levemente visible (1-25%) o aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del ápice con necrosis.**

**N 2: necrosis media (25-50%) o aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del ápice con necrosis.**

**N 3: necrosis alta (50-75%) o aproximadamente  $\frac{3}{4}$  del ápice con necrosis.**

N 4: necrosis total (75-100%) o todo el ápice con necrosis.

Para la necrosis se tomó en cuenta la parte aérea del ápice mas no los brotes ya que estos no la presentaron.

- Número de plantas contaminadas y su agente causal (hongo o bacteria).

Los brotes fueron considerados como tales al presentar un tamaño aproximado de 2 mm con una coloración blanca verdusca.

### 3.10 TOMA DE DATOS

La toma de datos se realizó cada cinco días, observando individualmente las plantas involucradas en el estudio. Los datos se registraron en formatos diseñados para ese efecto (Anexo 1).

### **3.11 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA**

En ambos experimentos los tratamientos y las variedades se ordenaron de manera aleatoria. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis System” versión 6.12 (SAS<sup>®</sup>, 1997), por medio de un análisis de varianza, una separación de medias “Student-Newman-Keuls” (SNK) y un análisis Chi-Cuadrado.

Todos los datos obtenidos fueron transformados con el logaritmo en base 10 de “X+1”. Se comparó las variables según los datos transformados y no transformados para ver si la transformación aumentó la significancia y el ajuste del modelo.

La separación de medias SNK se realizó para las variables paramétricas (necrosis y oxidación) con una significancia menor o igual a 0.05. Las variables no paramétricas (contaminación, callo y brotes) se analizaron usando la prueba Chi-Cuadrado.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Experimento 1: Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de luz

#### 4.1.1 Etapa de establecimiento (E I)

**4.1.1.1 Oxidación.** Para esta variable, el modelo explica el 61% de la variación de los datos, los cuales tienen un coeficiente de variación bajo (40.69%). Se encontraron diferencias altamente significativas entre cultivares, tratamientos, tiempo y la interacción entre cultivares y tratamientos.

Como se ve en el Cuadro 5, el FHIA 20 fue el cultivar que presentó el menor grado de oxidación (1.95), seguido del FHIA 21 y el Cuerno que presentaron 2.49 y 3.14 respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre estas variaciones.

**Cuadro 5. Grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar	Grado de oxidación <sup>1</sup>
FHIA 21	2.49 <sup>b</sup>
Cuerno	3.14 <sup>c</sup>
FHIA 20	1.95 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

Independientemente del cultivar utilizado y como se puede observar en el Cuadro 6, la oxidación de los ápices meristemáticos incubados bajo condiciones de luz durante su establecimiento *in vitro*, se controló mejor al utilizar L-cisteína a razón de 4.0 mg/l; encontrándose que las diferencias entre éste y los demás tratamientos antioxidantes fueron significativas. El uso del ácido ascórbico como antioxidante no fue efectivo bajo estas condiciones.

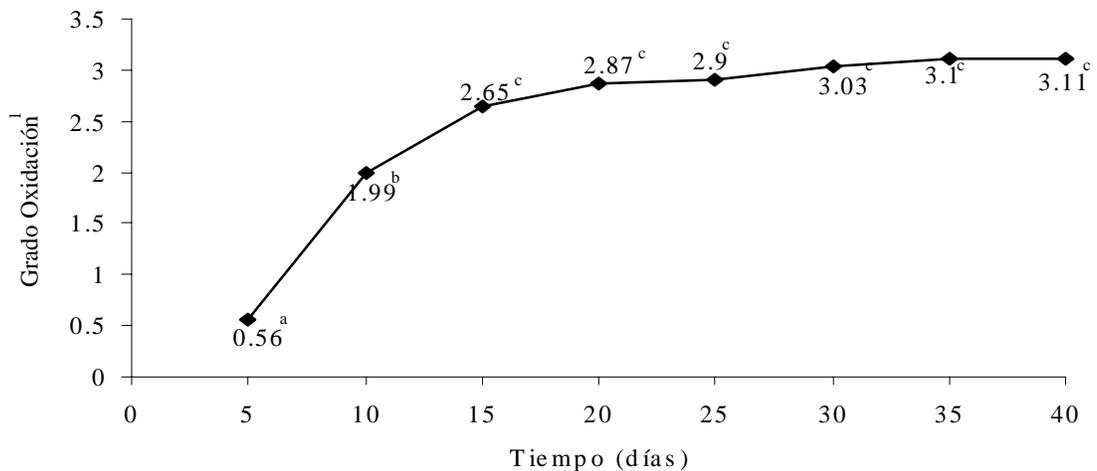
**Cuadro 6. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Tratamientos	Grado de oxidación <sup>1</sup>
4.0 mg/l L-cisteína	1.60 <sup>a</sup>
<b>2.0 mg/l L-cisteína</b>	2.22 <sup>b</sup>
<b>Testigo</b>	2.24 <sup>b</sup>
100 mg/l ácido ascórbico	2.95 <sup>c</sup>
200 mg/l ácido ascórbico	3.03 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

La Figura 1 muestra que en los primeros 15 días hubo un incremento significativo en el grado de oxidación. A partir del quinceavo día, las variaciones en oxidación no fueron mayores y las diferencias no fueron significativas.

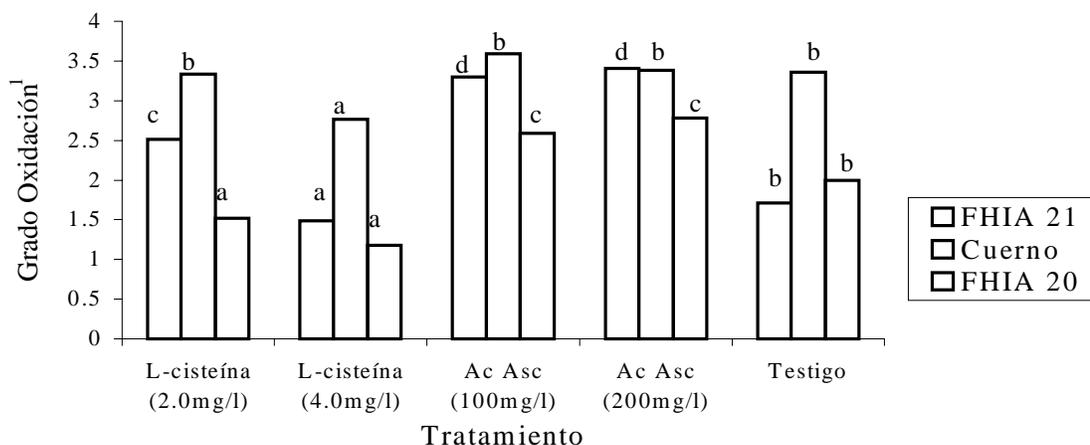


<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P< 0.05)

**Figura 1. Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Comparando la interacción entre los cultivares y los tratamientos, también se encontraron diferencias significativas (Figura 2). Para FHIA 21, el mejor control de la oxidación se observó al utilizar L-cisteína a razón de 4.0 mg/l y a pesar de que el testigo también presentó una baja oxidación, las diferencias fueron significativas entre estos dos tratamientos. Para Cuerno, el mejor control de la oxidación también se obtuvo utilizando L-cisteína a razón de 4.0 mg/l hallándose diferencias significativas con los demás tratamientos. En FHIA 20, igualmente se controló mejor la oxidación al agregar 4.0 mg/l de L-cisteína pero no hubo diferencias significativas entre este tratamiento y el de 2.0 mg/l; sin embargo sí hubo diferencias significativas entre cualquiera de estos dos tratamientos y el testigo, en el cual también se observó un bajo grado de oxidación.



<sup>1</sup> Medida en escala de 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

a,b Medias con igual letra en cada cultivar no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**Figura 2. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Comparando los mejores tratamientos en la etapa de establecimiento bajo condiciones de luz para cada cultivar, al agregar 4.0 mg/l de L-cisteína al medio de cultivo, la oxidación fue menor en los FHIA (sin encontrarse diferencias significativas entre estos) y mayor en el Cuerno, siendo significativa esta diferencia en el grado de oxidación entre los FHIA y el Cuerno con respecto a este tratamiento.

**4.1.1.2 Formación de callo.** De los tres cultivares utilizados en este estudio, el Cuerno presentó aproximadamente 11% de callosidad y los FHIA 21 y FHIA 20 presentaron 9% y 24% de formación de callo respectivamente (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Formación de callo (%), durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar <sup>+</sup>	FORMACIÓN DE CALLO (%)*	
	No	Sí
FHIA 21	19.60	8.71
Cuerno	16.88	10.71
FHIA 20	20.51	23.59
<b>Total (%)</b>	56.99	43.01

\* Porcentaje con respecto al total de ápices utilizados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado (P<0.05).

No se encontró relación entre los antioxidantes utilizados y la formación de callo ya que las diferencias halladas entre tratamientos no fueron significativas según la prueba Chi-cuadrado.

**4.1.1.3 Necrosis.** Las diferencias en necrosis fueron altamente significativas (Cuadro 8), siendo la variabilidad de los datos explicada en un 40% por el modelo y con un coeficiente de variación medio de 64.78%.

Las diferencias significativas fueron analizadas en cuanto a cultivar, tratamiento y a través del tiempo. FHIA 20 y FHIA 21 fueron los cultivares que presentaron el menor grado de necrosis (1.04 y 1.13 respectivamente) y no se encontraron diferencias significativas entre estos dos cultivares a pesar de que el primero presentó un menor grado de necrosis. El

Cuerno presentó el mayor grado de necrosis (1.24) pero no fue estadísticamente diferente del FHIA 21 mas sí del FHIA 20.

**Cuadro 8. Grado de necrosis durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

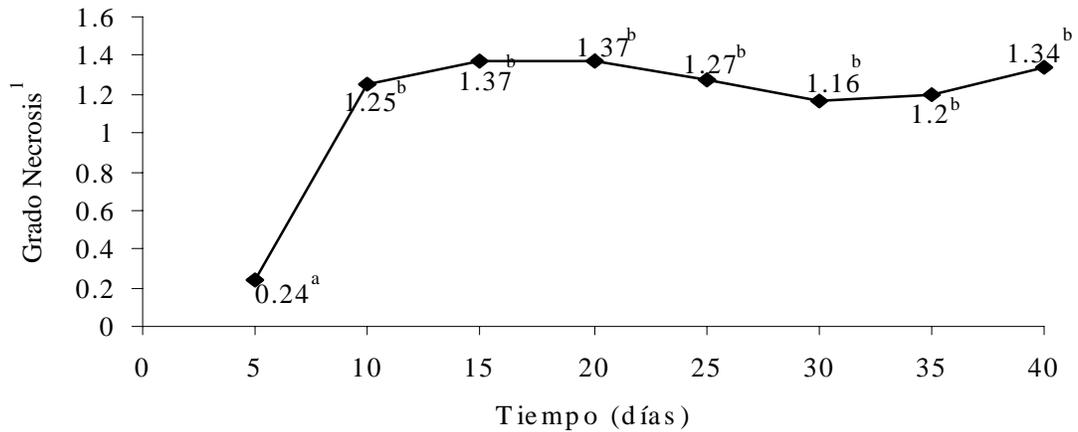
<b>Cultivar</b>	<b>Grado de necrosis<sup>1</sup></b>
FHIA 21	1.13 <sup>ab</sup>
Cuerno	1.24 <sup>b</sup>
FHIA 20	1.04 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de necrosis.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

En cuanto a los tratamientos, al usar 2 mg/l de L-cisteína la necrosis fue mínima pero las diferencias entre esta dosis y el testigo no fueron significativas.

De acuerdo a la Figura 3, en los primeros cinco días la necrosis fue baja y aumentó drástica y significativamente hasta el décimo día y luego se mantuvo relativamente constante. Las diferencias encontradas en los últimos días no fueron significativas.



<sup>1</sup> Medida en escala de 0-4, siendo 0 ausencia de necrosis

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ )

**Figura 3. Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

**4.1.1.4 Contaminación.** Como se ve en el Cuadro 9, en esta etapa se presentó un 7.24% de contaminación que se debió mayormente a bacterias. De los tres cultivares utilizados, el FHIA 21 presentó el mayor porcentaje de contaminación (3.03%); dicho porcentaje se debió en su totalidad a bacterias. El FHIA 20 presentó el menor porcentaje de contaminación (1.18%) y el Cuerno fue el único que presentó además contaminación causada por hongo, lo que pudo deberse a errores en la manipulación de dicho material vegetal.

**Cuadro 9. Porcentaje de contaminación según agente causal durante la etapa de establecimiento *in vitro* (E I) de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar <sup>+</sup>	Contaminación (%)*		Total (%)
	Bacteria	Hongo	
<b>FHIA 21</b>	3.03	0.00	3.03
Cuerno	2.19	0.84	3.03
FHIA 20	1.18	0.00	1.18
<b>Total (%)</b>	6.40	0.84	7.24

\* Porcentaje con respecto al total de ápices utilizados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado ( $P < 0.05$ ).

## 4.2 Experimento 2: Efecto antioxidante de la L-cisteína y el ácido ascórbico durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano bajo condiciones de oscuridad

### 4.2.1 Oxidación

El modelo estadístico explica casi el 60% de la variación de los datos, esto es mucho más de lo que el modelo explica en las otras variables estudiadas; el coeficiente de variación de los datos fue bajo (32.67%).

En cuanto a las diferencias encontradas entre los cultivares (Cuadro 22), el FHIA 20 presentó un menor grado de oxidación (2.20), sin embargo las diferencias entre éste y el FHIA 21 (2.28) no fueron significativas. El Cuerno presentó el mayor grado de oxidación (2.92) al incubar los ápices en completa oscuridad y este grado fue significativamente mayor al observado en FHIA 20 y FHIA 21.

**Cuadro 22. Grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar	Grado de oxidación <sup>1</sup>
FHIA 21	2.28 <sup>a</sup>
Cuerno	2.92 <sup>b</sup>
FHIA 20	2.20 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

Con respecto a los tratamientos antioxidantes aplicados e independientemente del cultivar utilizado, se puede apreciar en el Cuadro 23 que al agregar 2.0 o 4.0 mg/l de L-cisteína como antioxidante se logró controlar mejor la oxidación, pero las diferencias encontradas entre ambos tratamientos no fueron significativas. Por el contrario, el ácido ascórbico agregado al medio de cultivo, no tuvo un buen control de la oxidación y se observó que mientras más alta la dosis, menor control sobre la oxidación se obtuvo. Esto se debió probablemente a que el ácido ascórbico es termolábil, ya que éste fue agregado al medio de cultivo y luego pasado por el autoclave, pudiéndose afectar su estructura y su eficiencia para controlar este problema (George, 1996).

**Cuadro 23. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

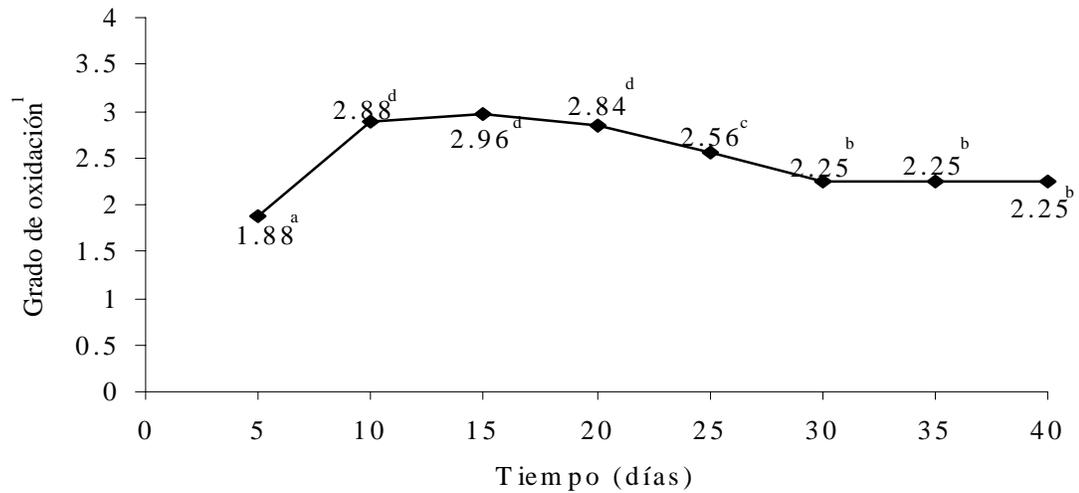
Tratamientos	Grado de oxidación <sup>1</sup>
2.0 mg/l L-cisteína	1.63 <sup>a</sup>
<b>4.0 mg/l L-cisteína</b>	1.73 <sup>a</sup>
Testigo	2.54 <sup>b</sup>
100 mg/l ácido ascórbico	3.12 <sup>c</sup>
200 mg/l ácido ascórbico	3.46 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

El Cuadro 23 sugiere que, con respecto al testigo, los tratamientos con L-cisteína, independientemente de la dosis utilizada, tuvieron buen control de la oxidación y los tratamientos con ácido ascórbico, independientemente de la dosis utilizada, no tuvieron buen control de la oxidación.

En cuanto al desarrollo de la oxidación a través del tiempo, también se hallaron diferencias significativas como se observa en la Figura 15, donde se observa que la oxidación se incrementó a partir del décimo día y es crítica entre éste y el vigésimo día ya que es donde se observó mayor oxidación. Después del décimoquinto día, la oxidación empezó a disminuir para luego mantenerse estable a partir del día 30.



<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

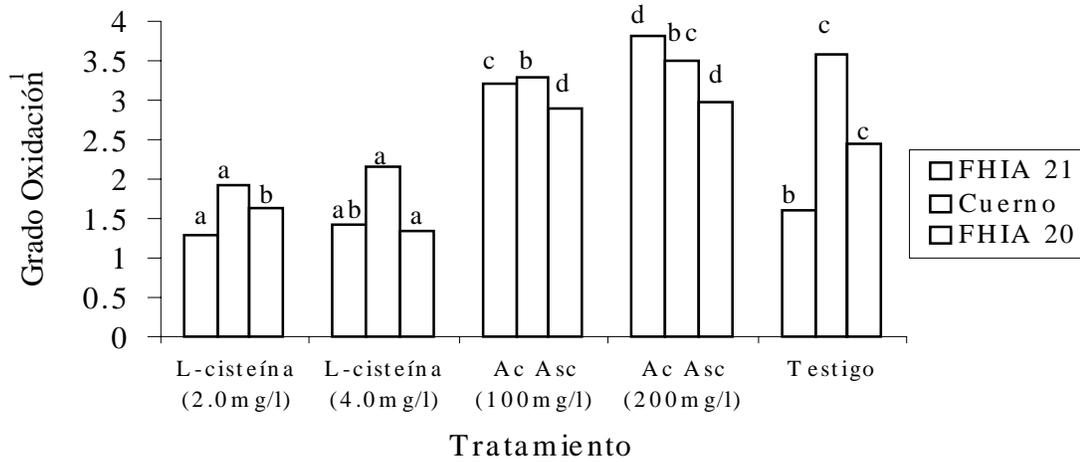
<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ )

**Figura 15. Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

En cuanto a los cultivares en interacción con los tratamientos (Figura 16), también se encontraron diferencias significativas. Como se puede apreciar, para FHIA 21 hubo diferencias significativas entre el Testigo y usar L-cisteína como antioxidante, siendo más eficiente para controlar la oxidación la L-cisteína. No hubo diferencias significativas entre usar 2.0 o 4.0 mg/l de L-cisteína. En cuanto al Cuerno, la oxidación se controló al usar L-cisteína como antioxidante y no hubo diferencias significativas entre una y otra dosis, por lo que es económico y efectivo agregar simplemente 2.0 mg/l de L-cisteína al medio de cultivo para controlar la oxidación. Contrario a lo observado en FHIA 21, el no agregar antioxidante bajo estas condiciones favoreció mucho más la oxidación de los ápices.

Para FHIA 20, el mejor tratamiento para el control de la oxidación fue agregar 4.0 mg/l de L-cisteína al medio de cultivo, encontrándose diferencias significativas entre este y los demás tratamientos. En cualquiera de los tres cultivares, los tratamientos con ácido ascórbico no fueron efectivos para el control de la oxidación.

Bajo condiciones de oscuridad, estadísticamente se obtendría igual control de la oxidación utilizando 2.0 mg/l de L-cisteína en FHIA 21 y 4.0 mg/l de L-cisteína en FHIA 20 lo cual indica que en FHIA 21 se controla mejor la oxidación con menor cantidad de L-cisteína. Si se utiliza 2.0 mg/l de L-cisteína como antioxidante en FHIA 21 y en Cuerno, bajo estas



<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra en cada cultivar no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

condiciones, se observaría menor grado de oxidación en FHIA 21 lo cual indica que éste responde mejor a dicho tratamiento antioxidante comparado con Cuerno.

**Figura 16. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

#### 4.2.2 Formación de callo

Bajo condiciones de oscuridad se observó (Cuadro 24), que el porcentaje total de callo fue ligeramente mayor (44.03) que en el experimento en que los ápices fueron incubados bajo luz (43.01); además, la formación de callo fue más uniforme al incubar los ápices en oscuridad.



**Cuadro 24. Porcentaje de formación de callo durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar <sup>+</sup>	FORMACIÓN DE CALLO (%) <sup>*</sup>	
	No	Sí
FHIA 21	17.81	13.94
Cuerno	19.69	16.48
FHIA 20	18.47	13.61
<b>Total (%)</b>	<b>55.97</b>	<b>44.03</b>

\* Porcentaje con respecto al total de ápices utilizados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado (P<0.05).

Con respecto a los tratamientos antioxidantes, se puede observar en el Cuadro 25 que al usar 2.0 mg/l de L-cisteína, la formación de callo fue mayor (9.96) que en los otros tratamientos y al usar 200 mg/l de ácido ascórbico el desarrollo del callo fue menor (6.53).

**Cuadro 25. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre la formación de callo durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

TRATAMIENTOS <sup>+</sup>	FORMACIÓN DE CALLO (%) <sup>*</sup>	
	No	Sí
2.0 mg/l L-cisteína	9.85	9.96
4.0 mg/l L-cisteína	10.73	9.85
100 mg/l ácido ascórbico	12.06	8.63
200 mg/l ácido ascórbico	12.28	6.53
Testigo	11.06	9.07
<b>Total (%)</b>	<b>55.97</b>	<b>44.03</b>

\* Porcentaje con respecto al total de ápices usados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado (P<0.05).

#### 4.2.3 Necrosis

Para esta variable, el modelo no fue tan efectivo para explicar la variación de los datos ya que solo explica cerca del 30% de esa variación. Al hacer el análisis, no se encontraron diferencias significativas entre FHIA 21 y FHIA 20 en cuanto al grado de necrosis. En cuanto a los tratamientos, independientemente del cultivar utilizado y como se muestra en el Cuadro 26, al utilizar 4.0 mg/l de L-cisteína hubo menor incidencia de necrosis pero las diferencias entre ésta dosis y la dosis menor (2.0 mg/l de L-cisteína) no fueron

significativas. En los ápices tratados con ácido ascórbico se observó una mayor necrosis, siendo esta mayor al agregar mayor cantidad del mismo.

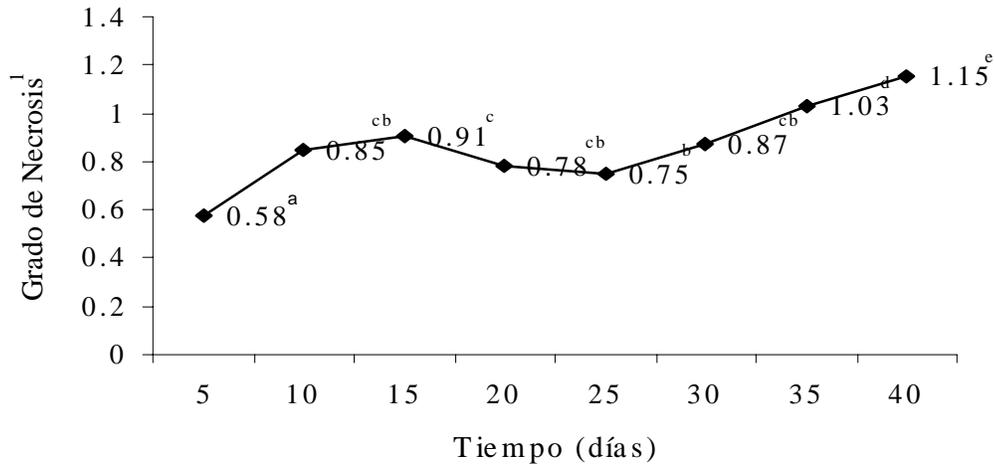
**Cuadro 26. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de necrosis durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

<b>Tratamientos</b>	<b>Grado de necrosis<sup>1</sup></b>
4.0 mg/l L-cisteína	0.68 <sup>a</sup>
<b>2.0 mg/l L-cisteína</b>	0.70 <sup>a</sup>
Testigo	0.84 <sup>b</sup>
100 mg/l ácido ascórbico	1.0 <sup>c</sup>
200 mg/l ácido ascórbico	1.07 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

Como se observa en la Figura 17, la necrosis fue muy variable en el tiempo y, comparada con la misma etapa del experimento con ápices incubados en luz, el promedio de necrosis fue menor; esto se debió posiblemente a la ausencia de luz. Se encontraron diferencias significativas entre los primeros días del subcultivo y los últimos, en los cuales se vio un incremento en la necrosis; en los días intermedios casi no se notaron diferencias estadísticas.



<sup>1</sup> Medida en escala de 0-4, siendo 0 ausencia de necrosis

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ )

**Figura 17. Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

#### 4.2.4 Contaminación

En esta etapa se presentó un 4.64% de contaminación, siendo las bacterias las mayores causantes de esta. De los tres cultivares utilizados, el FHIA 21 presentó el mayor porcentaje de contaminación (1.79) que fue causada en su totalidad por bacterias. Al igual que en el primer experimento, el Cuerno fue el único que mostró contaminación por hongos (Cuadro 27).

**Cuadro 27. Porcentaje de contaminación según su agente causal durante la etapa de establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

CULTIVAR <sup>+</sup>	Contaminación (%)*		Total (%)
	Bacteria	Hongo	
<b>FHIA 21</b>	1.79	0.00	1.79
Cuerno	0.95	0.21	1.16
FHIA 20	1.69	0.00	1.69
<b>Total (%)</b>	4.43	0.21	4.64

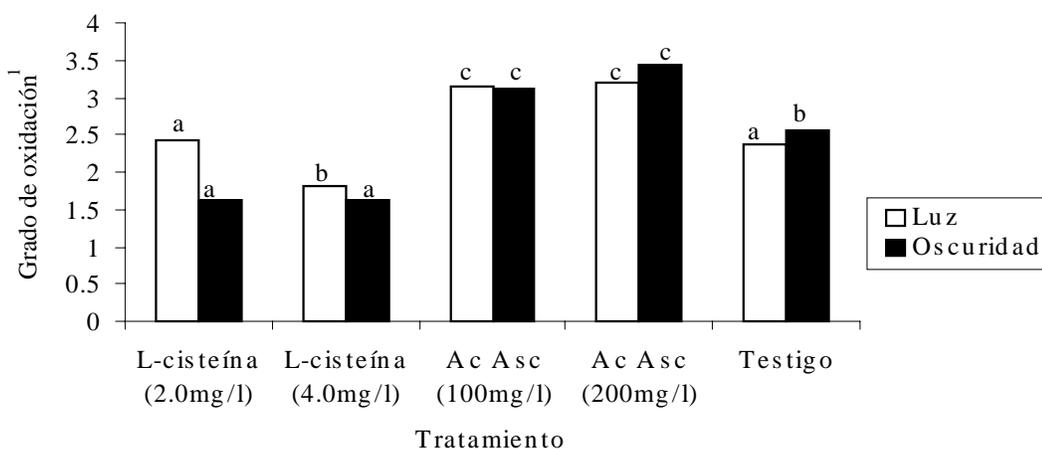
\* Porcentaje con respecto al total de ápices utilizados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado ( $P < 0.05$ ).

## 4.3 COMPARACIÓN DE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO ENTRE AMBOS EXPERIMENTOS

### 4.3.1 Oxidación

Para esta variable, el modelo sí se ajusta ya que explica casi el 60% de la variación de los datos, además tiene un CV de 35.63. Analizando el efecto de los tratamientos en cada ambiente, como en las anteriores etapas también se encontraron diferencias significativas como se muestra en la Figura 18.



<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra en cada ambiente no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ )

**Figura 18. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados bajo condiciones de luz y oscuridad. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Al incubar los ápices con luz, agregar 4.0 mg/l de L-cisteína al medio de cultivo resultó más efectivo que agregar 2.0 mg o no agregar antioxidante para el control de la oxidación. Por el contrario, agregar ácido ascórbico al medio de cultivo resultó ineficiente para el control de la oxidación.

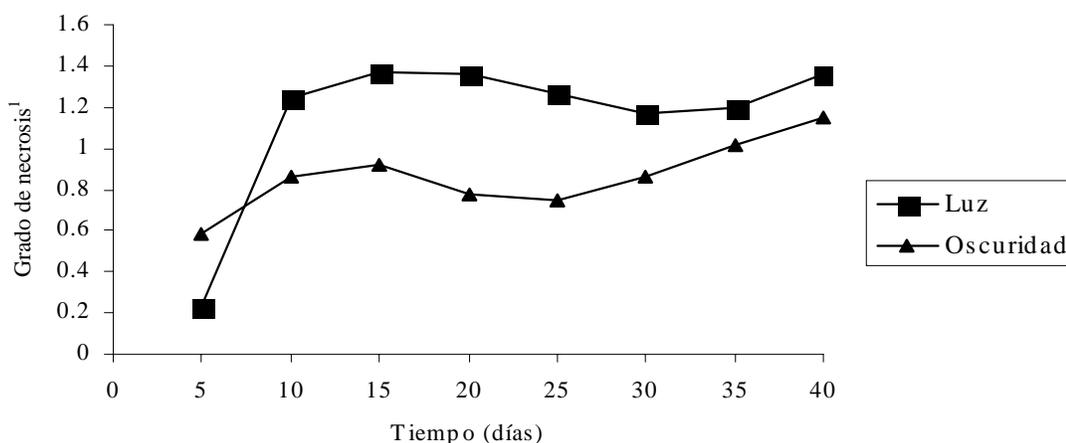
Cuando los ápices fueron incubados en oscuridad, se obtuvo buen control de oxidación agregando 2.0 o 4.0 mg/l de L-cisteína, encontrándose que estadísticamente no hubo diferencias entre una u otra dosis. Bajo condiciones de oscuridad, si no se agregaba antioxidante, la oxidación se incrementó un poco, pero usando ácido ascórbico ésta se incrementó mucho más, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Comparando los mejores tratamientos en cada ambiente, no hubo diferencias significativas entre estos; es decir, se obtendrían los mismos resultados al agregar 4.0 mg/l de L-cisteína en cualquiera de los dos ambientes de incubación. En cambio, si se agregase 2.0 mg/l de L-cisteína, se obtendrían mejores resultados incubando los ápices en oscuridad.

Los resultados observados sugieren que, al incubar los ápices en luz y agregar 4.0 mg/l de L-cisteína se obtendrían los mismos resultados que incubando los ápices en oscuridad con 2.0 mg/l de L-cisteína. Esto posiblemente se deba a que el efecto de la oscuridad es reducir la intensidad de la oxidación.

#### 4.3.2 Necrosis

Para la variable necrosis (Figura 19), el modelo no explica mucho la variabilidad de los datos (32.6% solamente) y el coeficiente de variación fue un poco elevado (57.91%). Para esta variable, se determinó que los ápices presentan menor necrosis al ser incubados en oscuridad. A pesar de que en oscuridad se disminuyó la necrosis, ésta siempre tuvo la tendencia a aumentar, independientemente del ambiente en que se incubaron los ápices.



<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de necrosis

**Figura 19. Efecto del ambiente de incubación a través del tiempo sobre el grado de necrosis durante el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano. El Zamorano, Honduras, 2000.**

#### 4.3.3 Formación de Callo

Para esta variable, a pesar de que los ápices formaron más callo al ser incubados en oscuridad, no se encontraron diferencias significativas entre ambientes.

### 4.1.3 Segundo subcultivo (S2) de la etapa de multiplicación (E II)

**4.1.3.1 Oxidación.** Para esta variable, el modelo explica aproximadamente el 50% de dicha variación; el experimento fue bien manejado porque tuvo un coeficiente de variación bajo (14.55%).

Independientemente del tipo y dosificación de antioxidante utilizado, el Cuadro 16 muestra que el FHIA 21 presentó menor oxidación (3.03) en esta etapa del experimento, seguido por FHIA 20 el cual presentó un poco más de oxidación (3.37) y por Cuerno que fue en el que mayor oxidación se observó (3.39). Las diferencias halladas entre FHIA 21 y los otros cultivares fueron significativas, esto nos indica que FHIA 21 respondió mejor a los tratamientos antioxidantes utilizados.

**Cuadro 16. Grado de oxidación observado durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar	Grado de oxidación <sup>1</sup>
FHIA 21	3.03 <sup>a</sup>
Cuerno	3.39 <sup>b</sup>
FHIA 20	3.37 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

Independientemente del cultivar utilizado y como se observa en el Cuadro 17, el testigo tuvo menor grado de oxidación (2.90), encontrándose diferencias significativas entre éste y los demás tratamientos. Entre los tratamientos que llevaron antioxidante, las vitroplantas tratadas con L-cisteína presentaron menor oxidación, pero no se encontraron diferencias significativas entre ambas dosis de L-cisteína.

**Cuadro 17. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Tratamientos	Grado de oxidación <sup>1</sup>
Testigo	2.90 <sup>a</sup>
4.0 mg/l L-cisteína	3.18 <sup>b</sup>
2.0 mg/l L-cisteína	3.23 <sup>b</sup>

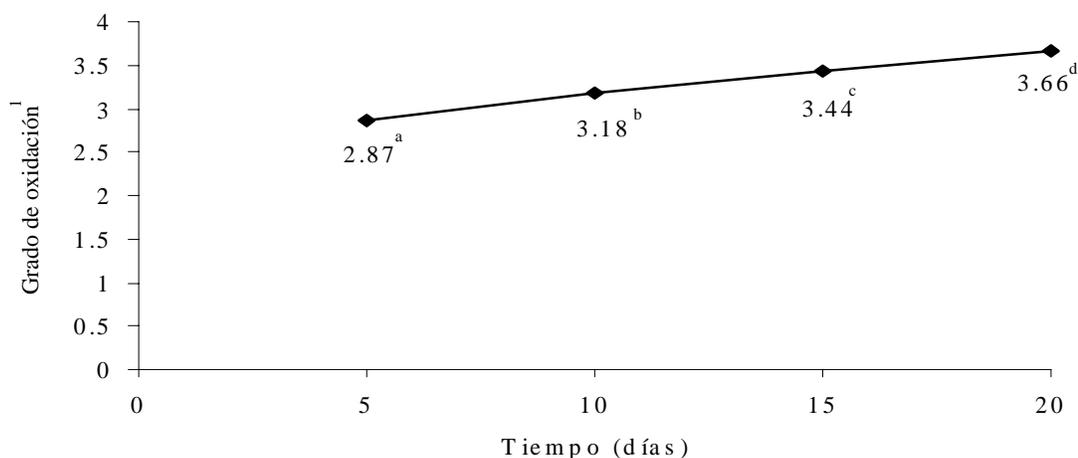
100 mg/l ácido ascórbico	3.44 <sup>c</sup>
200 mg/l ácido ascórbico	3.54 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

Al contrario que lo reportado por Höhne y Ruiz (1995), la oxidación en este subcultivo no desapareció totalmente, inclusive, se notó un mayor grado de oxidación que en el subcultivo anterior. Se observó además que en este segundo subcultivo de la etapa de multiplicación, la oxidación no se controla eficientemente con antioxidantes, por esto en esta etapa tampoco es económico utilizar los antioxidantes probados en este experimento para contrarrestar este problema; se puede entonces probar otros antioxidantes para determinar si se puede controlar eficiente y económicamente la oxidación en las etapas de multiplicación. Asimismo, la oxidación se vio incrementada al agregar como antioxidante ácido ascórbico y mientras más alta la dosis, mayor grado de oxidación.

Como se puede apreciar en la Figura 9, la oxidación fue menor al inicio de esta etapa lo cual se debió a que los ápices, al pasar de una etapa a otra, se limpian para remover el tejido oxidado. La oxidación se incrementó conforme transcurrió el tiempo, encontrándose diferencias estadísticas después de los primeros días de multiplicados los



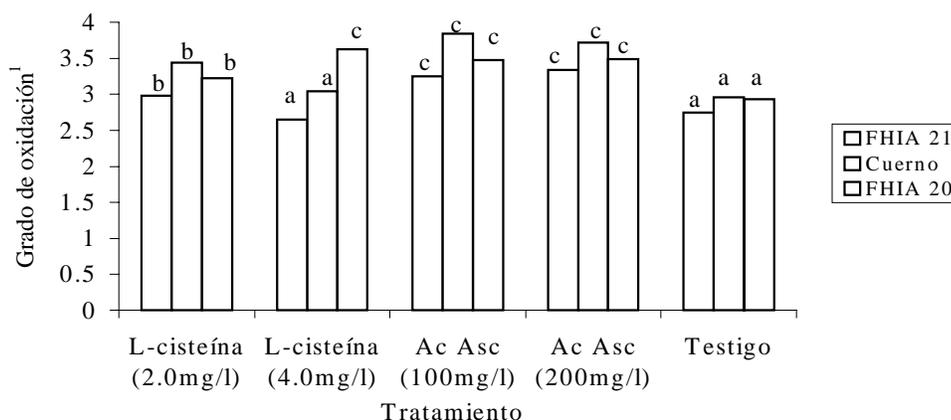
<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P< 0.05)

ápices. Se notó una tendencia creciente significativa en el grado de oxidación.

**Figura 9. Desarrollo del grado de oxidación a través del tiempo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

La interacción de los cultivares con los tratamientos antioxidantes tuvo efectos parecidos a los hallados en el subcultivo anterior ya que en este subcultivo tampoco resultó efectivo el uso de los antioxidantes probados tal como lo muestra la Figura 10.



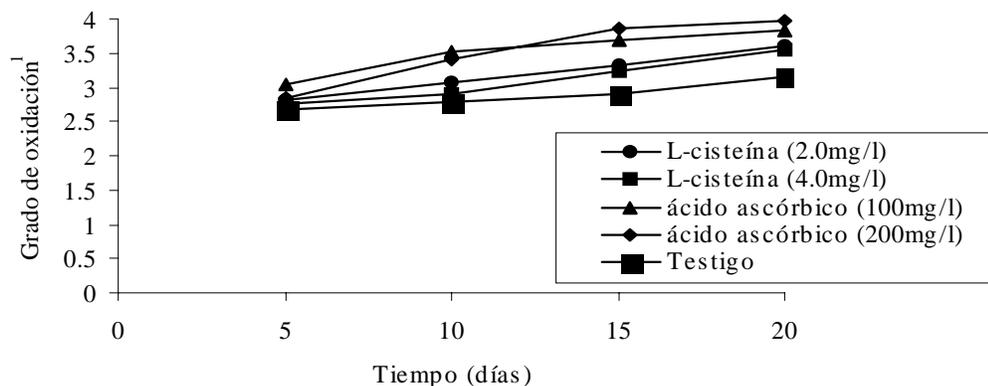
<sup>1</sup> Medida en escala de 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra en cada cultivar no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**Figura 10. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre el grado de oxidación durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

El efecto de agregar 4.0 mg/l de L-cisteína como agente antioxidante en FHIA 21 fue bueno para el control de la oxidación pero, bajo estas condiciones, no hubo diferencias entre esta interacción y la interacción de FHIA 21 con el testigo. En Cuerno igualmente se observó menor grado de oxidación al utilizar 4.0 mg/l L-cisteína o al no utilizar antioxidantes, siendo las diferencias estadísticas entre ambas interacciones no significativas, por lo que resulta más económico no agregar antioxidante. En FHIA 20 se observó un bajo grado de oxidación al agregar 2.0 mg/l de L-cisteína o no agregar antioxidante encontrándose que las diferencias tampoco fueron significativas. Bajo estas condiciones, sin antioxidante se observó menor grado de oxidación en los FHIA que en el Cuerno, siendo estas diferencias significativas; las diferencias entre los FHIA no lo fueron.

Con el transcurrir del tiempo y como se puede apreciar en la Figura 11, los tratamientos antioxidantes tendieron a disminuir su efectividad en el control de la oxidación.



<sup>1</sup> Medida en escala de 0-4, siendo 0 ausencia de oxidación

**Figura 11. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico a través del tiempo sobre el grado de oxidación durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Al iniciar este subcultivo, durante los primeros cinco días se encontró diferencias significativas entre el tratamiento con 100 mg/l ácido ascórbico y los demás tratamientos, en que el ácido ascórbico presentó mayor grado de oxidación. A los 10 días, hubo diferencias significativas entre el testigo, 4.0 mg/l de L-cisteína y los demás tratamientos. El no usar antioxidante o usar 4.0 mg/l de L-cisteína fueron los más efectivos para el control de la oxidación. A partir del quinceavo día, el mejor control de oxidación se observó sin antioxidante, ya que con los demás tratamientos la oxidación se incrementó, encontrándose que las diferencias entre el testigo y los demás tratamientos fueron significativas.

En el transcurso de este subcultivo, se observó menor oxidación en los ápices que no fueron tratados con antioxidantes lo cual pudo deberse a que los antioxidantes usados no resultaron ser efectivos para el control de la oxidación en la etapa de multiplicación (Figura 11).

**4.1.3.2 Formación de callo.** Al igual que lo observado en el primer subcultivo, en el segundo subcultivo (Cuadro 18), el FHIA 20 fue el cultivar que más callo desarrolló (6.17) en comparación con los otros cultivares. El Cuerno fue el cultivar que presentó menor formación de callo (0.95). Las diferencias halladas entre estos cultivares fueron significativas.

En este subcultivo se obtuvo un total de 8.42% de formación de callo, menor cantidad si se compara con el subcultivo anterior; esto se debió a que con el transcurrir del tiempo la formación de callo disminuye pero la producción de brotes se incrementa.

**Cuadro 18. Porcentaje de formación de callo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

Cultivar <sup>+</sup>	FORMACIÓN DE CALLO (%)*	
	No	Sí
FHIA 21	26.22	1.30
Cuerno	29.30	0.95
FHIA 20	36.06	6.17
<b>Total (%)</b>	91.58	8.42

\* Porcentaje con respecto al total de ápices usados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado (P<0.05).

En este subcultivo (Cuadro 19), parece que no hubo relación entre agregar antioxidantes al medio y la formación de callo, ya que se notó que hubo mayor formación en los ápices que no fueron tratados con antioxidante y las diferencias halladas entre uno u otro tratamiento antioxidante no fueron significativas.

**Cuadro 19. Efecto de la L-cisteína y el ácido ascórbico sobre la formación de callo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

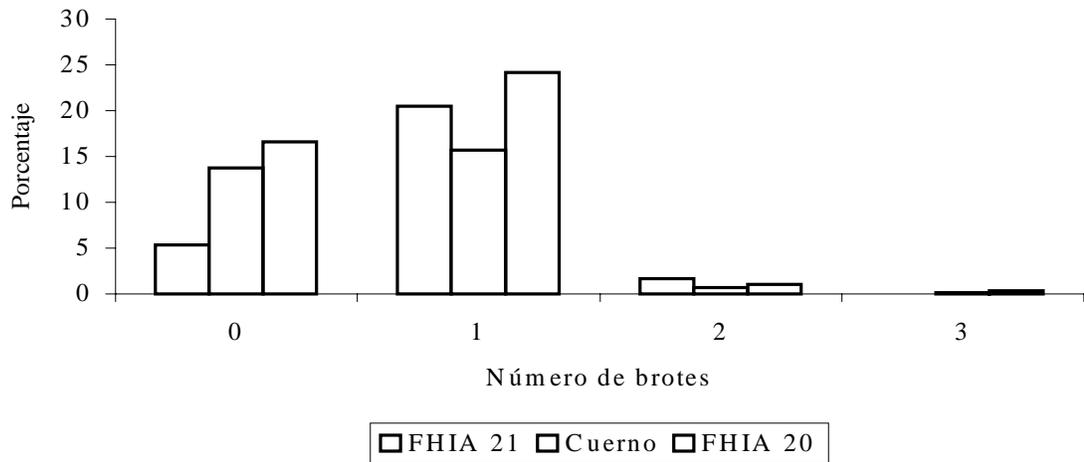
TRATAMIENTOS <sup>+</sup>	FORMACIÓN DE CALLO (%)*	
	No	Sí
2.0 mg/l L-cisteína	19.69	1.07
4.0 mg/l L-cisteína	16.25	1.30
100 mg/l ácido ascórbico	20.76	2.02
200 mg/l ácido ascórbico	20.88	1.90
Testigo	14.00	2.14
<b>Total (%)</b>	91.58	8.42

\* Porcentaje con respecto al total de ápices usados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado (P<0.05).

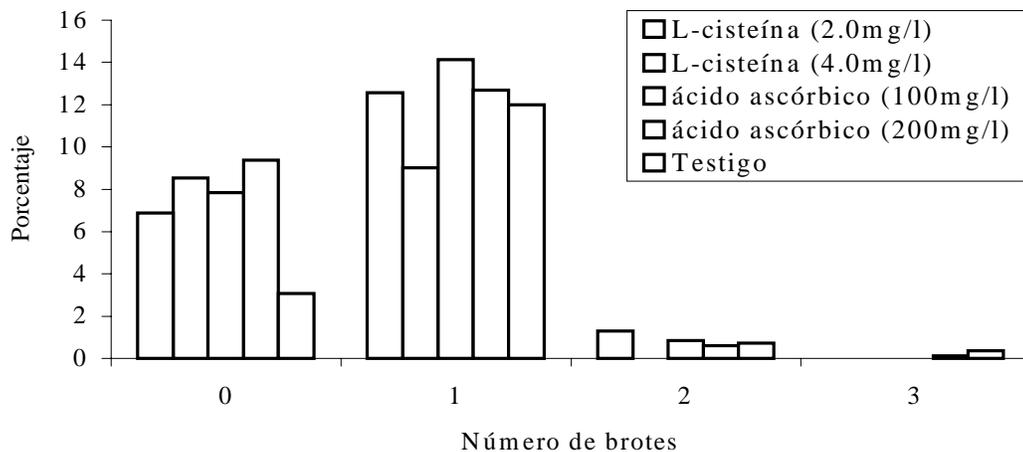
**4.1.3.3 Número de brotes.** Para el segundo subcultivo (Figura 12), al igual que en el subcultivo anterior, el máximo número de brotes observado fue 3. Los tres cultivares

presentaron con mayor frecuencia entre 0 y 1 brotes. El FHIA 20 presentó una mayor cantidad de brotes pudiéndose concluir que éste es mejor que los demás en cuanto a producción de brotes se refiere ya que estas diferencias fueron significativas.



**Figura 12. Porcentaje de brotes por explante durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

En la Figura 13 se observa que al igual que en el subcultivo anterior, al agregar 100 mg/l de ácido ascórbico al medio de cultivo se observó una mayor cantidad de ápices con un brote, pero en comparación con el primer subcultivo, la frecuencia de ápices con un brote aumentó y la cantidad de ápices sin brotes disminuyó. Estas diferencias fueron



significativas y se pudieron deber a que conforme pasó el tiempo, los ápices produjeron mayor número de brotes.

**Figura 13. Porcentaje de brotes por explante según tratamiento durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

**4.1.3.4 Necrosis.** El modelo no explicó muy bien la variabilidad de los datos (24.64%) pero el coeficiente de variación fue bajo (31.3%) por lo que, a pesar de que el modelo no se ajustó muy bien a los datos de necrosis, este bajo CV sugiere que el experimento fue bien manejado. De acuerdo al Cuadro 20, el FHIA 21 presentó el menor grado de necrosis (2.73), encontrándose que las diferencias entre éste y los demás cultivares fueron altamente significativas. Por el contrario, la variación en necrosis entre el FHIA 20 (3.26) y el Cuerno (3.13) no fue significativa.

**Cuadro 20. Grado de necrosis durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

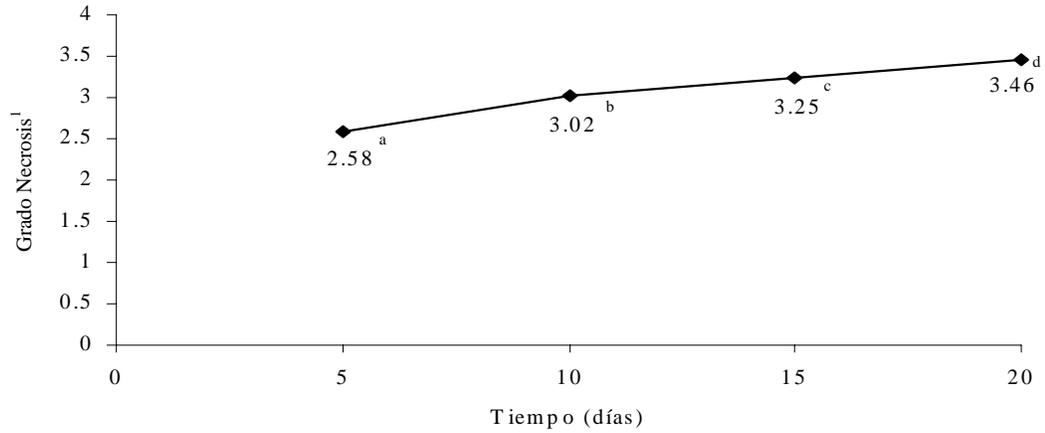
Cultivar	Grado de necrosis <sup>1</sup>
FHIA 21	2.73 <sup>a</sup>
Cuerno	3.13 <sup>b</sup>
FHIA 20	3.26 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de necrosis.

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente (Prueba SNK, P<0.05)

No se notó efecto de los tratamientos, independientemente del cultivar utilizado, en el control de la necrosis, lo cual se debe a que los antioxidantes no tienen efecto para el control de necrosis.

Con el transcurrir del tiempo (Figura 14), la necrosis se incrementó, encontrándose diferencias significativas entre cada toma de datos (cada 5 días). Del quinto día en adelante, la necrosis se incrementó, mostrando una tendencia a seguir incrementando, por esto se deben realizar los subcultivos o multiplicaciones cada 21 días para limpiar el tejido necrótico.



<sup>1</sup> Medida en escala 0-4, siendo 0 ausencia de necrosis

<sup>a,b</sup> Medias con igual letra no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ )

**Figura 14. Desarrollo del grado de necrosis a través del tiempo durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de plátano incubado bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

**4.1.3.5 Contaminación.** En el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación (Cuadro 21), se presentó en promedio 0.71% de contaminación. El FHIA 20 presentó el mayor porcentaje de contaminación (0.59%) el cual fue causado mayormente por bacterias. El FHIA 21 no presentó contaminación pero las diferencias entre cultivares no fueron significativas.

**Cuadro 21. Porcentaje de contaminación según su agente causal durante el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátano incubados bajo condiciones de luz. El Zamorano, Honduras, 2000.**

CULTIVAR <sup>+</sup>	Contaminación (%) <sup>*</sup>		Total (%)
	Bacteria	Hongo	
<b>FHIA 21</b>	0.00	0.00	0.00
Cuerno	0.12	0.00	0.12
FHIA 20	0.35	0.24	0.59
<b>Total (%)</b>	0.47	0.24	0.71

\* Porcentaje con respecto al total de ápices usados en el experimento.

<sup>+</sup> Prueba Chi-cuadrado ( $P < 0.05$ ).

**Se observó que la contaminación fue cada vez menor conforme se iba entrando en las etapas de multiplicación del cultivo; esto se debe a que la etapa crítica para**

**contaminación es la de establecimiento del cultivo, ya que aquí el material vegetal viene del campo y si la desinfección de dicho material no es efectiva el porcentaje de contaminación se eleva.**

## 5. CONCLUSIONES

- Para ambos experimentos, en la etapa de establecimiento de los ápices meristemáticos, la L-cisteína tuvo un efecto positivo en el control de la oxidación. A partir del primer subcultivo de la etapa de multiplicación, ni la L-cisteína ni el ácido ascórbico fueron efectivos para controlar la oxidación.
- En el establecimiento de los ápices meristemáticos bajo condiciones de luz, se determinó que al agregar 4.0 mg/l de L-cisteína se controló mejor la oxidación.
- En el establecimiento de los ápices meristemáticos bajo condiciones de oscuridad, se determinó que la L-cisteína fue más efectiva para el control de la oxidación. Al comparar las dosis de 2.0 mg/l y 4.0 mg/l de este antioxidante, no se encontraron diferencias significativas entre ellas.
- Comparando ambientes de incubación con luz y oscuridad, se obtendrían los mismos resultados al agregar 4.0 mg/l de L-cisteína en cualquiera de los dos ambientes de incubación, pero si sólo se agregasen 2.0 mg/l de L-cisteína, se obtendrían mejores resultados incubando los ápices en oscuridad.
- En la etapa de establecimiento se observó mayor formación de callo en los ápices tratados con 2.0 mg/l de L-cisteína incubados en oscuridad; al incubar los ápices en luz no hubo efecto significativo de los tratamientos en la formación de callo.
- En el primer subcultivo, el agregar 2.0 mg/l de L-cisteína al medio de cultivo tuvo efecto en la formación de callo, pero a partir de ese subcultivo, no hubo efecto de los tratamientos en la formación del mismo.
- Al comparar la formación de callo entre ambos ambientes, independientemente del tratamiento y el cultivar utilizado, no se encontró diferencias significativas.
- En el primer y segundo subcultivo, el agregar 100 mg/l de ácido ascórbico al medio de cultivo aumentó la cantidad de ápices con un brote.
- Hubo diferencia estadísticamente significativa en el grado de necrosis al incubar los ápices en oscuridad o en luz, siendo menor la necrosis en oscuridad.
- El FHIA 20 presentó menor oxidación en el establecimiento y el FHIA 21 presentó menor oxidación en los subcultivos.

## 6. RECOMENDACIONES

- Utilizar 4.0 mg/l de L-cisteína para el control de la oxidación en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de plátano incubados en luz, mientras que para ápices incubados en oscuridad, se recomienda utilizar solo 2.0 mg/l de L-cisteína.
- No utilizar, en el primer y segundo subcultivo de la etapa de multiplicación de ápices meristemáticos de plátano incubados en luz, los antioxidantes probados en este experimento para el control de la oxidación, ya que ninguno de ellos fue efectivo para este propósito.
- Probar ácido ascórbico esterilizado por filtración y no por autoclave ya que éste es termolábil y seguramente disminuye su eficacia al ser esterilizado con temperatura.
- Probar otro tipo de antioxidantes como el ácido cítrico, el carbón activado o el polyvinylpyrrolidone (PVP) para el control de la oxidación en los primeros subcultivos de la etapa de multiplicación.
- Evaluar en estudios posteriores el efecto del ácido ascórbico en la inducción de brotes.
- Durante el establecimiento de los ápices en luz, para FHIA 21 y Cuerno utilizar 4.0 mg/l y para FHIA 20 utilizar 2.0 mg/l de L-cisteína para el control de la oxidación.
- Durante el establecimiento de los ápices en oscuridad, para FHIA 21 y Cuerno utilizar 2.0 mg/l y para FHIA 20 utilizar 4.0 mg/l de L-cisteína para el control de la oxidación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ANTHONY, J.M.; COLABORADORES DE LA UNIVERSIDAD DEL OESTE DE AUSTRALIA. 1999. Control of *in vitro* browning of recalcitrant australian native plants. *Agricell Report*. 32(6):44-45.
- CASPERSEN, S.; SWEDISH UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES; SCOTTISH AGRICULTURAL COLLEGE; ICELANDIC HORTICULTURAL COLLEGE. 2000. Can microorganisms control browning of *in vitro* cultured explants?. *Agricell Report*. 34(2):1,10.
- GEORGE, E.F. 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture In Practice*. 2 ed. England. s.n.t. p. 639- 649.
- HÖHNE, C.M.; RUIZ, D.A. 1995. DESARROLLAR EL MÉTODO ÓPTIMO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE FHIA-21. PROGRAMA DE BANANO Y PLÁTANO: INFORME TÉCNICO. LA LIMA, CORTÉS, HONDURAS. FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA. P. 91-95.
- ISRAELI, Y.; LAHAV, E.; REUVENI, O. 1995. *In vitro* culture of bananas. *In Bananas and plantains*. Ed. por S. Gowen, London, Inglaterra. Chapman & Hall. p. 147-178.
- JIMÉNEZ, E.A. 1998. Cultivo de ápices y meristemos: medios de cultivo y hormonas de crecimiento. *In Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Ed. por Pérez Ponce, J.N. s.n.t. p. 53-55.
- MEDEROS-MOLINA, S.; TRUJILLO, M.I. 1999. Control of browning exudate from Pistacio explants. *Agricell Report*. 33(6):45.
- NOMURA, K. y COLABORADORES. 1998. Control of browning during establishment of Apple explants. *Agricell Report*. 31(2):1,10.
- PRICE, N.S. 1995 The origin and development of banana and plantain cultivation. *In Bananas and plantains*. Ed. por Gowen, S. London, Inglaterra. Chapman & Hall. p. 1-3.

- SAMOSIR, Y.M.S.; UNIVERSIDAD DE QUEENSLAND; INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ACEITE DE PALMA INDONESIA. 1997. Control of tissue browning. *Agricell Report*. 28(6):44.
- SAS Institute Inc., SAS/STAT<sup>®</sup> Software: Changes and Enhancements through Release 6.12, Cary, N.C: SAS Institute Inc., 1997. 1167 p.
- SHARROCK, S. 1996. Uses of *Musa*. Annual Report. INIBAP. p. 42-44.
- STANDARDI, A.; ROMANI, F. 1991. Antioxidants stimulate *in vitro* rooting. *Agricell Report*. 16(2):11.
- USUI, K.; OKABE, K.; VICTORES, R.; RAMIREZ, A.E. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, Guatemala. s.n.t. 166 p.
- VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R. 1992. Biotechnological approaches to plantain and banana improvement at IITA. *In* Biotechnology: enhancing research in tropical crops in Africa. Ed. por Thottappilly, G.; Monti, L.M.; Mohan, D.R.; Moore, A.W. United Kingdom. s.n.t. 364 p.
- VUYLSTEKE, D.R. s.f. Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and distribution of *Musa* germplasm. s.n.t. 73 p.

## **8. ANEXOS**

