

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“MICROPROPAGACIÓN DE BANANO (*Musa acuminata* AAA) CV.
‘WILLIAMS’ MEDIANTE BIORREACTORES RITA®: RESPUESTA
A REGULADORES DE CRECIMIENTO”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

DIEGO ALVARO PATIÑO TRONCOS

LIMA - PERÚ

2023

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

MICROPROPAGACIÓN DE BANANO (Musa acuminata AAA) CV. 'WILLIAMS' MEDIANTE BIORREACTORES RITA®: RESPUESTA A REGULADORES DE CRECIMIENTO

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

11%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
3	Mehran Ali, Shahla Karim Baloch, Nighat Seema, Shafqat Yaeen et al. "Influence of Phytohormones on Callus Indication and Micrpropagation on Rose (Rosa indica L.)", Journal of Basic & Applied Sciences, 2018 Publicación	1%
4	cd.dgb.uanl.mx Fuente de Internet	1%
5	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
6	scholarworks.wm.edu Fuente de Internet	1%
7	repositorio.unesum.edu.ec Fuente de Internet	

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“MICROPROPAGACIÓN DE BANANO (*Musa acuminata* AAA) CV.
‘WILLIAMS’ MEDIANTE BIORREACTORES RITA®: RESPUESTA A
REGULADORES DE CRECIMIENTO”**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

DIEGO ALVARO PATIÑO TRONCOS

Sustentado y aprobado por el siguiente jurado:

.....
Dr. Erick Espinoza Núñez
PRESIDENTE

.....
Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa
ASESOR

.....
Dr. Jorge Eduardo Jiménez Dávalos
MIEMBRO

.....
Dr. Gastón Enrique Martín Zolla Benites
MIEMBRO

LIMA - PERÚ

2023

DEDICATORIA

Este documento va dedicado a mi familia.

A mis padres, Ramiro y Elicia, por ser un ejemplo constante de perseverancia y dedicación, por las palabras de aliento cuando las cosas estuvieron complicadas, por los consejos brindados. Sin ellos nada hubiese sido posible ya que han sido el soporte necesario en cada etapa de mi vida.

A mi hermana Sofía, por siempre tener las palabras justas y creer en mí.

A mi abuela materna, con quién fui bastante cercano en sus últimos años, por animarme a cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a mi asesora PhD. María de Lourdes Tapia y Figueroa por permitirme realizar esta investigación en las instalaciones del Instituto de Biotecnología en el área de Cultivo de Tejidos. Gracias por los conocimientos adquiridos, por el apoyo incondicional y la confianza depositada en mí.

A mis compañeros de laboratorio que me hicieron sentir parte del equipo desde el primer día y me motivaron a continuar con mi investigación.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Banano	4
2.1.1. Descripción botánica	4
2.1.2. Origen y distribución geográfica.....	5
2.1.3. Cultivares.....	5
2.1.4. Banano en Perú	8
2.2. Micropropagación <i>in vitro</i>	8
2.2.1. Fundamento	8
2.2.2. Medio de Cultivo	8
2.2.3. Etapas	9
2.2.4. Ventajas	10
2.2.5. Aplicaciones	10
2.3. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en medio de cultivo líquido	10
2.3.1. Bioreactor	10
2.3.2. CIS.....	11
2.3.3. TIS.....	11
2.4. Reguladores de crecimiento (PGR).....	12
2.4.1. Fundamento	12
2.4.2. Clasificación	13
III. METODOLOGÍA	16
3.1. Ubicación del campo experimental	16
3.2. Materiales y equipos.....	16
3.2.1. Material Vegetal.....	16
3.2.2. Condiciones de incubación.....	16

3.2.3. Equipos de laboratorio.....	16
3.2.4. Instrumentos y materiales de laboratorio.....	17
3.2.5. Reactivos e insumos.....	17
3.3. Método.....	18
3.3.1. Experimento 1: Determinación de la respuesta de banano cv ‘Williams’ a distintas densidades de explantes utilizando un medio de cultivo líquido MS suplementado con BAP y AIB.....	19
3.3.2. Experimento 2: Determinación de la respuesta de banano cv. ‘Williams’ a medios de cultivo líquido MS con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BAP, AIA y AIB.....	21
3.3.3. Experimento 3: Determinación de la respuesta de banano cv ‘Williams’ procedente de biorreactores RITA® correspondientes al experimento de reguladores de crecimiento trasladados a un medio de cultivo sólido MS suplementado con BAP y AIB	23
3.4. Variables evaluadas.....	25
3.5. Análisis Estadístico.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	26
4.1. Experimento 1: Determinar la respuesta de banano cv ‘Williams’ a distintas densidades de explantes utilizando un medio de cultivo líquido MS suplementado con BAP y AIB.....	26
4.2. Experimento 2: Determinar la respuesta de banano cv. ‘Williams’ a medios de cultivo líquido MS con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BAP, AIA y AIB.....	32
4.3. Experimento 3: Determinar la respuesta de banano cv ‘Williams’ procedente de biorreactores RITA® correspondientes al experimento de reguladores de crecimiento trasladados a un medio de cultivo sólido MS suplementado con BAP y AIB.....	38
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES.....	46
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	47
VIII. ANEXOS.....	55

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1: Biorreactor RITA®	18
Figura 2: Panel de control del sistema RITA®	19
Figura 3: Resultados del coeficiente de multiplicación para distintas densidades de explantes.....	27
Figura 4: Resultados del número de hojas para distintas densidades de explantes.....	28
Figura 5: Resultados de la altura para distintas densidades de explantes.....	29
Figura 6: Resultados del peso fresco para distintas densidades de explantes.....	30
Figura 7: Resultados del peso seco para distintas densidades de explantes	31
Figura 8: Resultados del coeficiente de multiplicación para distintas combinaciones de PGR.....	33
Figura 9: Resultados del número de hojas para distintas combinaciones de PGR.....	34
Figura 10: Resultados de la altura para distintas combinaciones de PGR.....	35
Figura 11: Resultados del peso fresco para distintas combinaciones de PGR.....	36
Figura 12: Resultados del peso seco para distintas combinaciones de PGR	37
Figura 13: Resultados del coeficiente de multiplicación en medio sólido.....	39
Figura 14: Resultados del número de hojas en medio sólido	40
Figura 15: Resultados de la altura en medio sólido	41
Figura 16: Resultados del peso fresco en medio sólido.....	42
Figura 17: Resultados del peso seco en medio sólido	44

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos a evaluar para experimento de densidad de explantes	20
Tabla 2: Tratamientos a evaluar para experimento de reguladores de crecimiento	22
Tabla 3: Tratamientos a evaluar para experimento de medio sólido.....	24

ÍNDICE GENERAL DE ANEXOS

Anexo 1: Composición de Medio Murashige & Skoog	55
Anexo 2: Agar utilizado (Sigma-Aldrich A9799-500G).....	56
Anexo 3: ANOVA de resultados del coeficiente de multiplicación para distintas densidades de explantes	57
Anexo 4: ANOVA de número de hojas para distintas densidades de explantes.....	57
Anexo 5: ANOVA de resultados de altura de planta para distintas densidades de explantes	57
Anexo 6: ANOVA de resultados de peso fresco para distintas densidades de explantes ...	58
Anexo 7: ANOVA de resultados de peso seco para distintas densidades de explantes	58
Anexo 8: ANOVA de resultados del coeficiente de multiplicación para distintos PGR.....	58
Anexo 9: ANOVA de resultados de número de hojas para distintos PGR.....	59
Anexo 10: ANOVA de resultados de altura de planta para distintos PGR	59
Anexo 11: ANOVA de resultados de peso fresco para distintos PGR.....	59
Anexo 12: ANOVA de resultados de peso seco para distintos PGR.....	60
Anexo 13: ANOVA de resultados del coeficiente de multiplicación en medio sólido.....	60
Anexo 14: ANOVA de resultados de número de hojas en medio sólido	60
Anexo 15: ANOVA de resultados de altura de planta en medio sólido	61
Anexo 16: ANOVA de resultados de peso fresco en medio sólido	61
Anexo 17: ANOVA de resultados de peso seco en medio sólido.....	61

LISTADO DE ABREVIATURAS

TIS: Sistema de Inmersión Temporal

CIS: Sistema de Inmersión continua

SSS: Sistema semisólido

PGR: Regulador del Crecimiento de las Plantas

PTC: Cultivo de Tejidos Vegetales

BAP: Bencilaminopurina

AIA: Ácido indol-3-acético

AIB: Ácido indol-butírico

KIN: Kinetina

ANA: Ácido Naftalenacético

HCl: Ácido clorhídrico

NaOH: Hidróxido de sodio

MS: Medio Murashige & Skoog

RESUMEN

El banano es originario del sudeste de Asia y es uno de los principales commodities en el mundo. Presenta un deficiente sistema de propagación vegetativo donde se reportan importantes pérdidas económicas debido a agentes patógenos. Utilizar métodos de micropropagación mejora notablemente el rendimiento en campo y la calidad del fruto. Se planteó utilizar biorreactores RITA® de Sistemas de Inmersión Temporal (TIS) para obtener un elevado coeficiente de multiplicación de brotes de excelente calidad. El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta del banano cultivar ‘Williams’ a la micropropagación bajo el sistema de biorreactores de inmersión temporal RITA® en la etapa de multiplicación. Se evaluó en tres experimentos, (1) distintas densidades de explantes en medio de cultivo líquido en biorreactores RITA®, (2) distintos medios de cultivo líquidos en biorreactores RITA® y (3) medio de cultivo sólido en recipientes cerrados herméticamente con explantes procedentes del experimento anterior. La investigación se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se utilizaron 75 explantes en el primer experimento, 64 explantes en el segundo experimento y 96 explantes en el tercer experimento. Se utilizaron explantes correspondientes al cuarto subcultivo de la fase de multiplicación, obtenidos a partir de meristemas de hijuelos de banano cv. ‘Williams’, introducidos *in vitro* en el Instituto de Biotecnología. Al analizar los resultados, después de 21 días de cultivo, se logró evidenciar la ventaja de utilizar TIS en lugar de medio de cultivo sólido, presentando diferencias significativas en la multiplicación de banano cv ‘Williams’.

Palabras claves: banano, RITA®, SIT, PGR, densidad de brotes

ABSTRACT

Bananas are native to Southeast Asia and are one of the main commodities in the world. It has a deficient vegetative propagation system where significant economic losses are reported due to pathogenic agents. Using micropropagation methods significantly improves field yield and fruit quality. It was proposed to use RITA® bioreactors from Temporary Immersion Systems (TIS) to obtain a high multiplication coefficient of excellent quality shoots. The objective of this research was to evaluate the response of the banana cultivar 'Williams' to micropropagation under the RITA® temporary immersion bioreactor system in the multiplication stage. It was evaluated in three experiments, (1) different densities of explants in liquid culture medium in RITA® bioreactors, (2) different liquid culture medium in RITA® bioreactors and (3) solid culture medium in hermetically closed containers with explants from the previous experiment. The research was carried out at the Institute of Biotechnology of the National Agrarian University La Molina. 75 explants were used in the first experiment, 64 explants in the second experiment and 96 explants in the third experiment. Explants corresponding to the fourth subculture of the banana *in vitro* introduction from the Institute of Biotechnology were used. When analyzing the results, after 21 days of cultivation, it was possible to demonstrate the advantage of using TIS instead of solid culture medium, presenting significant differences in the multiplication of banana cv 'Williams'.

Keywords: banana, RITA®, TIS, PGR, shoot density

I. INTRODUCCIÓN

El banano se considera un cultivo altamente rentable y disperso en el territorio de América Latina y el Caribe. Presenta alta demanda alrededor de todo el mundo debido a su alta calidad y sus propiedades nutritivas con impacto en la salud del consumidor (FAO, 2020). Por otro lado, los precarios sistemas de producción a los que suelen estar asociados los cultivos agravan los efectos del cambio climático y es necesario realizar prácticas y procedimientos que permitan contrarrestar estos efectos (Engels & Thormann, 2020).

El país posee 160 mil hectáreas de producción de banano y plátano, donde las extensiones de cultivo más representativas se ubican en la selva. Así mismo, el crecimiento de las áreas sembradas es sostenible (INIA, 2020). En los años noventa se realiza un cambio en la producción en el país: de convencional a orgánico. Se afirma que el 5% de la producción exportada se realiza por 7 mil pequeños agricultores aproximadamente. La producción de banano orgánico se encuentra concentrada en Piura con un valor mayor a 80% debido a que la región cuenta con factores favorables para el desarrollo del cultivo (FAO, 2017).

Esta especie tiene un proceso bastante lento de propagación y la tasa de multiplicación de los retoños por los métodos convencionales suele manifestar impactos negativos, donde se incluye la baja producción, campos no uniformes y degradación del material genético original (Hussein, 2012). Se sabe que el uso de técnicas de cultivo *in vitro* posibilita la manipulación y clonación de los individuos bajo determinadas condiciones controladas (Ramírez Mosqueda et al., 2020).

La biotecnología permite producir plantas bajo condiciones controladas particulares, como biorreactores, entre otros, con determinadas características para beneficio de la ciencia. Dentro de sus aplicaciones resalta la utilidad de las técnicas en cultivos *in vitro* (Efferth,

2019). Se menciona la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales, donde se empieza el proceso con un explante con el propósito de cultivarlo y obtener una nueva planta *in vitro*, superando limitaciones fisiológicas y ambientales (Nielsen et al., 2019).

Los reguladores de crecimiento de plantas (PGR); auxinas, citoquininas, entre otros, constituyen un instrumento necesario en la agricultura que puede influir en las distintas etapas de un cultivo (Katel et al., 2022).

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* se extiende a una extensa lista de plantas. Resulta necesario un recipiente cerrado y estéril, donde se suministra nutrientes a la planta en fase líquida o sólida. Destaca el uso de biorreactores con Sistema de Inmersión Temporal (TIS) (Melviana et al., 2021). El biorreactor con TIS consta de un sistema con medio de cultivo líquido donde la inmersión del explante es periódica. El tiempo de inmersión influye notablemente en la absorción de nutrientes (Vidal & Sanchez, 2019). La utilización de TIS resultan ser una opción para producir individuos de alta calidad, es decir, homogéneos y libres de plagas y enfermedades. La micropropagación llevada a cabo en laboratorios tiene un inmenso potencial con múltiples aplicaciones (Bello Bello et al., 2021).

Con todo lo expuesto, se realizará un trabajo de determinación de la respuesta a reguladores de crecimiento en la micropropagación de banano cv. ‘Williams’ mediante sistema de biorreactores RITA®. Se espera optimizar la producción de plántulas en una menor cantidad de tiempo y con características deseadas.

Por lo indicado se planteó los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general:

Evaluar la respuesta del banano cv. ‘Williams’ a la micropropagación bajo el sistema de biorreactores de inmersión temporal RITA® en la etapa de multiplicación.

1.2. Objetivos específicos:

Determinar la respuesta de banano cv 'Williams' a distintas densidades de explantes utilizando un medio de cultivo líquido MS suplementado con BAP y AIB

Determinar la respuesta de banano cv. 'Williams' a medios de cultivo líquido MS con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BAP, AIA y AIB.

Determinar la respuesta de banano cv 'Williams' proveniente de biorreactores RITA® correspondientes al experimento de reguladores de crecimiento trasladados a un medio de cultivo sólido MS suplementado con BAP y AIB.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Banano

El cultivo de banano resulta importante en el mercado internacional, debido a que presenta un fruto con elevado consumo en el mundo (Martínez Solórzano & Rey Brina, 2021). Se registró un incremento constante en los últimos 10 años de consumo per cápita global, pasando de 4.85 kg en el año 2010 a 5.85 kg en el año 2020 (FAO, 2021).

2.1.1. Descripción botánica

El banano crece en la zona de trópicos húmedos y es una hierba perenne. El crecimiento empieza por un pseudotallo formado en la base de las hojas. El ápice del brote se encuentra a nivel del suelo de donde emerge una inflorescencia de gran tamaño en la parte superior. La inflorescencia guía la producción de fruto y posterior muerte del brote. En esta planta, ocurre la formación de nuevos hijuelos sobre la superficie de los cormos. Resulta esencial propagar de manera vegetativa la planta debido a que no ocurre formación de semillas (Morton, 1987).

La clasificación taxonómica propuesta por Cronquist (1988), es la más aceptada:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Subclase: Zingiberidae
Orden: Zingiberales
Familia: Musaceae
Género: Musa
Especie: *Musa Acuminata*

2.1.2. Origen y distribución geográfica

El término banano comprende a las especies o híbridos correspondiente al género *Musa* perteneciente a la familia Musaceae. Dos especies diploides, *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, originarias de la región del sudeste de Asia dieron origen a los cultivares de frutos comestibles de banano. Existen híbridos diploides y poliploides que componen el género *Musa* (Robinson, 1996; Stover & Simmonds, 1987). Respecto a la genética del banano, ambas especies diploides *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* aportan respectivamente los genomas A y B, originando múltiples genomas producto de la hibridación (Ortiz & Swennen 2014).

Las plantaciones del género *Musa* son cultivadas en países de zonas tropicales y subtropicales alrededor del mundo debido a sus frutos comestibles sin semillas (Sharrock & Frison, 1999). El cultivo de banano se encuentra distribuido en Sudamérica, Centroamérica, Asia y África. Destacando Ecuador, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Filipinas como principales países productores (FAO, 2021).

2.1.3. Cultivares

Según Robinson & Galán-Sauco (2010), en el género *Musa* se presentan distintos cultivares asociados a grupos genómicos. Los grupos genómicos más comerciales en banano son los siguientes: Grupo AA, Grupo AAA, Grupo AAAA. Estos grupos se dividen en subgrupos y tipos; donde se comprenden los cultivares.

Grupo AA

Sucrier, también conocido como Pisang Mas en Indonesia y Malasia y bocadillo en América del Sur. Diploide resistente al Mal de Panamá. Presenta frutos de tamaño pequeño y presenta menor rendimiento en relación a los triploides (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Grupo AAA

Subgrupo Red y Green Red

No poseen relevancia a nivel comercial, sin embargo, se encuentran bastante diseminados en el mundo, siendo destinados al consumo doméstico. El clon Red se caracteriza por un fruto de color rojo y por mutación se produjo Green Red de color verde (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Subgrupo Cavendish

Se cataloga de importancia a nivel mundial y genera un gran impacto en el comercio internacional, en trópicos y subtropicos. Presenta frutos dulces al madurar con pulpa color crema y cáscara amarilla. La variación de altura dependerá de los cultivares y varía entre 1.80 a 2.00 metros y 4.00 a 5.00 metros de altura (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Tipo Dwarf Cavendish

El cultivar más destacado es Dwarf Cavendish, también conocido como Pequeño Enano, Dwarf Chinese o Enano en América del Sur y el Caribe. Se distribuye ampliamente en el planeta y se trata de la variedad de menor altura. Tiene como características resaltantes un alto rendimiento y una fácil adaptación. Sin embargo, es susceptible a la obstrucción floral y ha sido sustituido gradualmente por cultivares con mayor altura (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Tipo Giant Cavendish

Los cultivares más destacados son Williams y Gran Enano. La altura en comparación a los Cavendish Enano no es abismal, pero sirve para diferenciar los cultivares. El cultivar Gran Enano es líder en exportación a nivel internacional, pero es bastante susceptible a *Fusarium oxysporum* raza 4, razón por la cual viene siendo reemplazado por Williams en América del Sur y el Caribe (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Tipo Lacatán

Es un cultivar con gran altura y su importancia comercial no es representativa. Se le conoce como Monte Cristo en Puerto Rico, Filipino en Ecuador y Lacatán en América del Sur y el Caribe (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Tipo Robusta

Los cultivares más destacados son Poyo en Antillas y Valery en América del Sur y el Caribe. Presentan mayor altura respecto a los de tipo Giant Cavendish. Valery presenta mayor adaptabilidad a climas húmedos y ha sido un cultivar importante para el comercio a nivel internacional. Actualmente, debido a la susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* raza 4 y a la altura viene siendo reemplazada por Williams en América del Sur y el Caribe (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Subgrupo Gros Michel

El cultivar Gros Michel presenta dos mutantes: Highgate y Cocos. Se trata de un cultivar de alto tamaño y vigor con racimos en forma cilíndrica y frutos grandes. Solía ser el principal cultivar comercializado en el mundo hasta la década de los 50, siendo diezmado por *Fusarium oxysporum cubense* y reemplazado por otros cultivares resistentes a esta enfermedad (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Otros cultivares AAA

Es necesario mencionar que existen otros cultivares triploides AAA como el subgrupo Lujugira y cultivares como Caipira e Ibota (Robinson & Galán Sauco, 2010).

Grupo AAAA

Obtenidos por el cruzamiento de plantas madres triploides AAA y donantes de polen diploides AA, destacan los cultivares tetraploides AAAA I.C.2, Bodies Altafort y FHIA SH 3436 (Robinson & Galán Sauco, 2010).

2.1.4. Banano en Perú

La producción de banano en el país se ubica en las zonas tropicales, específicamente en regiones de la selva como Ucayali, Loreto, Madre de Dios, San Martín, comprendiendo también parcialmente Junín, Huánuco, Amazonas, entre otras; produciendo 708 mil toneladas. En la costa se cultiva en Piura, destaca como productora de banano orgánico, La Libertad, Lambayeque, Lima, entre otras regiones; produciendo 311 mil toneladas (MINAGRI, 2014).

2.2. Micropropagación *in vitro*

2.2.1. Fundamento

La micropropagación consiste en producir plantas nuevas en condiciones controladas de temperatura y humedad a partir de un determinado material vegetal. Se aplica para superar condiciones limitantes como una baja producción de semillas o plantas que presenten problemas con la reproducción vegetativa (Bhowmik & Rahman, 2020). Dependiendo del explante, añadir hormonas logra la inducción de plantas a una rápida producción de brotes. Durante el proceso de producción de las nuevas plántulas se puede trabajar continuamente con los nuevos brotes obtenidos. Se puede trabajar con protocolos, llevar a campo la planta y obtener nuevamente una planta madre (Cardoso et al., 2020). Estos procedimientos incurren en un alto costo del material vegetal y equipo específico, por consiguiente, deberían optimizarse de manera iterativa (Teixeira et al., 2019).

Totipotencia

La totipotencia es una capacidad que poseen las plantas, logrando crear un nuevo organismo a partir de células vegetales (Su et al., 2021). La capacidad de la planta de regenerarse totalmente incluye múltiples mecanismos y formas de llevarlo a cabo. El Cultivo de Tejidos Vegetales puede ocurrir mediante brotes, raíces y embriogénesis somática (Mathew & Prasad 2021; Su et al., 2020).

2.2.2. Medio de Cultivo

El medio de cultivo influye notablemente en el Cultivo de Tejidos Vegetales, abarcando el desarrollo del explante. Las distintas formulaciones de los medios de cultivo obedecen a la

posibilidad de generar distintas respuestas a partir de un mismo explante. Un medio de cultivo presenta dentro de su composición: reguladores de crecimiento, vitaminas, sales inorgánicas, agente gelificante y fuente de carbono. En determinados casos, se puede agregar antibióticos, aminoácidos, entre otros (Álvarez et al., 2019).

2.2.3. Etapas

Se reconocen cuatro etapas en la micropropagación, las cuales se nombran a continuación: 1) Establecimiento 2) Multiplicación 3) Enraizamiento 4) Aclimatación. Se considera también la etapa 0, que consiste en seleccionar la planta madre y realizar los preparativos para el establecimiento del explante (Suarez, 2020).

Etapa 0, se selecciona la planta madre que debe cumplir con un aislamiento y estar libre de patógenos que puedan afectar la producción masiva (Suarez, 2020).

Etapa 1, se trata de un proceso complejo donde se realiza la selección de un explante apropiado, reguladores de crecimiento y medio de cultivo. Se debe mantener la asepsia para que prospere la micropropagación (Arteaga, 2019)

Etapa 2, se debe cambiar el medio de cultivo para el crecimiento del explante y se procede a subdividir para multiplicar el material vegetal. El proceso consiste en desarrollar el explante y subdividirlo en sucesivas oportunidades (Suarez, 2020).

Etapa 3, se espera un crecimiento de los brotes y un desarrollo del sistema radicular lo suficientemente apto para colocarse en sustrato y posibilitar un posterior traslado a invernadero (Bello Bello & Spinoso Castillo, 2022).

Etapa 4, las plantas obtenidas en condiciones controladas son trasladadas a lugares con condiciones similares a las tenidas durante el cultivo *in vitro* y cambiadas gradualmente durante determinado período, debido a que el estrés ocasionado puede afectar el normal desarrollo y ocasionar la muerte del material vegetal (Suárez, 2020).

2.2.4. Ventajas

Se mencionan las importantes ventajas de la micropropagación *in vitro* (Valliath & Mondal, 2023).

- Utilizando un solo individuo resulta posible producir una alta cantidad de plantas en periodos cortos de tiempo y libre de enfermedades.
- Se puede emplear en genotipos que presenten dificultad en su propagación *in vivo*.
- Se puede trabajar durante todo el año.
- Se puede programar su almacenamiento ante la demanda.

2.2.5. Aplicaciones

Se mencionan las diversas aplicaciones posibles para la micropropagación *in vitro* (Singh et al., 2023).

- Se logra acortar el tiempo de producción de nuevas plantas.
- Se logra una producción a gran escala.
- Se puede mejorar las características de la planta mediante el Cultivo de Tejidos Vegetales.
- Se facilita el intercambio de material vegetal internacional con distintos fines.

2.3. Sistemas de cultivo *in vitro* en medio de cultivo líquido

2.3.1. Biorreactor

El biorreactor es un sistema cerrado y estéril, un equipo que consta de un recipiente de cultivo, entrada y salida de aire, sistema de control semiautomático o automático. Se utiliza medio de cultivo líquido sin importar el tipo de biorreactor (Mamun, 2015; Krol et al., 2021). Se ha utilizado el medio de cultivo líquido en la micropropagación *in vitro* de distintas especies de importancia (Carvalho et al., 2019).

Frecuencia y tiempo de inmersión

Es importante el contacto del medio de cultivo líquido con el explante debido a una mayor disponibilidad de nutrientes para el explante. La frecuencia y el tiempo que dure la inmersión varían según la especie (Castillo et al., 2020).

2.3.2. CIS

Los biorreactores en un sistema de inmersión continua funcionan de manera óptima en algunas especies, se trata de un sistema eficiente. El material vegetal está en constante contacto con el medio de cultivo (Vidal & Sánchez 2019).

2.3.3. TIS

Los biorreactores en un sistema de inmersión temporal se originan a partir del método de sumergir de manera periódica el tejido vegetal en el medio de cultivo y un posterior drenaje con la finalidad de dejar aire disponible (Afreen, 2007). Una manera bastante práctica de dividir este tipo de sistema consiste en biorreactores con un único contenedor y de dos contenedores. Los TIS permiten ser controlados por un sistema automatizado de manera parcial y total (De Carlo et al., 2021).

En los últimos años se han creado nuevos modelos de TIS como biorreactor de inmersión por burbujas, termo-foto biorreactor, RITA®, SETIS, entre otros (Georgiev et al., 2014). Utilizar este tipo de sistemas ha logrado un alto grado de efectividad en distintas especies (Georgiev et al. 2014; Uma et al., 2021; Vidal & Sánchez 2019).

Ventajas

Se reportan numerosos beneficios para TIS: regula el crecimiento del tejido vegetal, proporciona mayor uniformidad al contacto entre el medio de cultivo y el tejido vegetal respecto a métodos convencionales, produce plantas más sanas en comparación con CIS; y reduce el estrés, presencia de gases y contaminación (Afreen, 2007; De Carlo et al., 2021)

TIS RITA®

En el diseño del TIS se alternan determinados periodos en los que el tejido vegetal permanece sumergido en el medio de cultivo líquido con periodos secos en los que el tejido está expuesto al aire. La frecuencia y duración de estos períodos debe determinarse para cada especie específica. Los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) están disponibles en varios diseños, siendo el más eficiente y con mejores resultados Récipient à Immersion Temporaire Automatique (RITA®) (Teisson et al., 1996).

El biorreactor RITA® consta de un contenedor en dos partes, la parte superior que contiene las plántulas y la parte inferior que contiene el medio de cultivo. La presión aplicada en el espacio inferior mediante la inyección de aire comprimido estéril empuja el medio de cultivo hacia el espacio superior, donde se contacta con el tejido vegetal y lo sumerge mientras se aplica la presión. Durante la inmersión, el aire burbujea, agita el tejido y restablece la atmósfera en el espacio superior, y la sobrepresión escapa mediante un tubo de salida protegido por un filtro estéril en la parte superior del artefacto. Al terminar la presión ejercida por el aire, el medio desciende por gravedad al compartimiento inferior, permitiendo al tejido vegetal secar (Teisson et al., 1996).

2.4. Reguladores de crecimiento (PGR)

2.4.1. Fundamento

Los reguladores de crecimiento vegetal (PGR) son compuestos orgánicos producidos por las plantas de una manera natural. Controlan el crecimiento y distintas funciones correspondientes a la fisiología. Se encuentran activos en cantidades mínimas (Kumari et al., 2018).

Estos compuestos influyen durante condiciones de estrés abiótico (Takahashi et al., 2019) y funciones relacionadas al metabolismo (Sharma et al., 2020).

2.4.2. Clasificación

La clasificación de estos compuestos orgánicos sintetizados se encuentra dividida según la actividad, efectos estimulantes o inhibitorios, estructura moléculas, entre otros. A nivel fenotípico se pueden evaluar determinadas funciones (Bish et al., 2018).

Auxinas

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal estimula la formación de raíces adventicias, tallo y favorece la dominancia apical. A nivel celular facilita la diferenciación celular, promueve la división celular y disminuye la presión en la pared de las células. Tiene como precursor orgánico a l-triptofano. Se encuentran variedades como 2,4-D, AIB, AIA y ANA (Alcántara et al., 2019).

Giberelinas

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, promueve la formación de hojas jóvenes y floración, facilita el desarrollo de tejidos e induce a germinar a las semillas. A nivel celular, facilita el crecimiento embrionario y promueve la elongación celular. Tiene como precursor orgánico al ent-kaureno. Se encuentran variedades como GA1, GA2 y GA3 (Alcántara et al., 2019).

Citoquininas

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, promueve brotes axilares, activa la senescencia en hojas y estimula la iniciación de raíces. A nivel celular, da comienzo a la proliferación de tejidos y produce una elevada proliferación celular. Tiene como precursor orgánico a la adenina. Se encuentran variedades como 4-hidroxifenietil alcohol, kinetina, beciladenina y zeatina (Alcántara et al., 2019).

Ácido abscísico

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, regula la transpiración celular y mantiene el proceso de dormancia en las semillas. A nivel celular,

promueve la producción de los tejidos zigotos y posee acceso a la membrana celular vegetal. Tiene como precursor orgánico al isopentil pirofosfato y a los carotenoides. No presenta variedades (Alcántara et al., 2019).

Etileno

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, se encuentra presente en la maduración de hojas y frutos, regula los procesos de maduración y senescencia vegetal y mejora las características en maduración de los frutos. A nivel celular, puede ser producido indistintamente del órgano vegetal, potencia acción de auxinas y citoquininas, degrada las proteínas y lípidos. Tiene como precursor orgánico a metionina. No presenta variedades (Alcántara et al., 2019).

Ácido salicílico

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, incrementa el periodo de longevidad floral, controla procesos de estrés y eleva la resistencia a ambientes de sequía y salinidad. A nivel celular, controla la actividad fotosintética y posee un papel en la inhibición de la síntesis de etileno. Tiene como precursor orgánico a la fenilalanina. No presenta variedades (Alcántara et al., 2019).

Poliaminas

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, estimula el desarrollo del sistema radicular y la disminución del regulador podría disminuir la elongación radicular. A nivel celular, se involucran en la señalización en el proceso de transducción y está asociada a proliferación de células vegetales. Tiene como precursor orgánico a la arginina. Se encuentran variedades como agmatina, cadaverina, espermina y espermidina (Alcántara et al., 2019).

Ácido jasmónico y derivados

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, se encuentra involucrado en adaptación al estrés y fototropismos, regula el desarrollo de órganos embrionarios. A nivel celular, representa importancia en la inmunidad vegetal, promueve el

desarrollo celular e inhibe el proceso de formación de callos. Tiene como precursor orgánico a ácidos grasos poliinsaturados y OPD. Se encuentra ácido jasmónico (Alcántara et al., 2019).

Brasinoesteroides

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, participa en el proceso de regulación de fotomorfogénesis, controla los factores de estrés y promueve la diferenciación entre estomas. A nivel celular, controla la división celular, estimula la producción de etileno y participa en la señalización celular. Tiene como precursor orgánico a campesterol. Se encuentran variedades como 25HB, brassinolida, catasterona y ponasterona (Alcántara et al., 2019).

Estrigolactonas

Los efectos de este regulador de crecimiento son diversos. A nivel vegetal, se relaciona a las respuestas adaptativas en caso de deficiencia de nitrógeno y fósforo, potencia el desarrollo radicular. A nivel celular, inhibe la acción de citoquininas y regula el proceso de transporte de fitohormonas. Tiene como precursor orgánico a los carotenoides. Se encuentran variedades como estrigol y GR24 (Alcántara et al., 2019).

III. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del campo experimental

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Área de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología (IBT), ubicado en la Universidad Nacional Agraria La Molina (Av. La Molina s/n). Tiene como ubicación geográfica: Latitud: 12°04'46" S, Longitud: 76°56'46" W y altitud de 243 m.s.n.m.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Material Vegetal

Para el presente estudio se utilizó explantes obtenidos a partir de brotes de banano (*Musa acuminata* AAA) cv. 'Williams', introducidos y conservados en condiciones para ser cultivados.

3.2.2. Condiciones de incubación:

Temperatura: 21± 2°C

Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 horas oscuridad

Luminosidad: 3180 lux

3.2.3. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar horizontal
- Campana de flujo laminar
- Estufa

- Agitador magnético
- Potenciómetro
- Biorreactores tipo RITA®
- Balanza analítica
- Refrigeradora
- Horno microondas

3.2.4. Instrumentos y materiales de laboratorio

- Frascos autoclavables
- Pipetas
- Bagueta
- Matraz de Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Mechero de alcohol
- Jarras volumétricas
- Papel aluminio
- Frascos ámbar
- Papel filtro
- Etiquetas
- Guantes quirúrgicos
- Pinza larga
- Pinza curva
- Mango de bisturí
- Hojas de bisturí N°10
- Mechero
- Placas petri

3.2.5. Reactivos e insumos

- Sales inorgánicas (Murashige & Sock, 1962)
- BAP
- AIA

- AIB
- Vitaminas MS
- Sacarosa
- Alcohol 96%
- Agua destilada
- HCl
- NaOH

3.3. Método

La presente investigación se desarrolló mediante tres experimentos de manera consecutiva con distintos objetivos respectivamente. Se detalla el procedimiento llevado a cabo.

En la Figura 1 se observa las partes de un biorreactor RITA®, previo a ser autoclavado, donde se distingue la parte superior destinada para los explantes y la parte inferior destinada para el medio de cultivo. En la Figura 2 se aprecia el panel de control del sistema de inmersión temporal (TIS) RITA®, controlando el tiempo de inmersión y la frecuencia de inmersión.



Figura 1: Biorreactor RITA®



Figura 2: Panel de control del sistema RITA®

3.3.1. Experimento 1: Determinación de la respuesta de banano cv ‘Williams’ a distintas densidades de explantes utilizando un medio de cultivo líquido MS suplementado con BAP y AIB

Medio de cultivo

Se utilizó un único medio de cultivo líquido, que consistió en medio MS suplementado con 5.0 mgL⁻¹ BAP, 5.0 mgL⁻¹ AIB y 30 g sacarosa.

El medio de cultivo utilizado se preparó con pH de 5.8 regulado con HCl y NaOH. Una vez concluida la preparación del medio de cultivo, se colocó dentro de los biorreactores y se autoclavaron a 121 °C, con 1.5 bar de presión por 20 minutos para una correcta esterilización antes de conectarlos a las mangueras del sistema.

El tiempo estimado desde la preparación hasta la utilización del medio de cultivo es de 21 días, tiempo estimado para descartar contaminación.

Tratamientos

Este experimento comparó la densidad de explantes en un Sistema de Inmersión Temporal (TIS) de biorreactores RITA®. Los explantes a partir de distintas cantidades de explantes fueron colocados en la superficie habilitada dentro del biorreactor, en la parte inferior se colocó el medio de cultivo.

Los tratamientos a partir de tres medios de cultivo fueron colocados en el biorreactor y comparados con un tratamiento testigo.

El listado de los tratamientos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1: Tratamientos a evaluar para experimento de densidad de explantes

Clave	Densidad de explantes
T0	1.0
T1	2.0
T2	4.0
T3	8.0

Diseño Experimental

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), el cual consistió en 4 tratamientos y 5 repeticiones. Al desarrollarse en biorreactores RITA® y producto del DCA planteado, se trabajó con 20 biorreactores.

En este experimento, la unidad experimental considerada ha sido un biorreactor RITA®.

Conducción del Experimento

Los explantes provenientes del cuarto subcultivo *in vitro* sobre medio de cultivo sólido, fueron colocados en la superficie interna del biorreactor. Se emplearon biorreactores RITA® de capacidad de 0.9 L y se colocaron 200 ml de medio de cultivo líquido en cada uno de ellos.

Los explantes de banano cv ‘Williams’ de los tratamientos evaluados fueron colocados dentro de los biorreactores cuidando la asepsia a fin de evitar contaminación en el experimento. Se utilizaron instrumentos esterilizados y la siembra se realizó dentro de una

cámara de flujo laminar. El tiempo de inmersión en el medio de cultivo fue de 3 minutos con una frecuencia de cada 3 horas (8 inmersiones por día).

Después de 26 días se realizó la evaluación en las plántulas con los equipos necesarios.

3.3.2. Experimento 2: Determinación de la respuesta de banano cv. 'Williams' a medios de cultivo líquido MS con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BAP, AIA y AIB.

Medios de cultivo

Se utilizaron cuatro distintos medios de cultivo líquidos a partir de una solución MS.

Los medios de cultivo utilizados se prepararon con pH de 5.8 regulado con HCl y NaOH. Una vez concluida la preparación de los medios de cultivo, se colocaron dentro de los biorreactores y se autoclavaron a 121 °C, con 1.5 bar de presión por 20 minutos para una correcta esterilización antes de conectarlos a las mangueras del sistema.

El tiempo estimado desde la preparación hasta la utilización del medio de cultivo es de 21 días, tiempo estimado para descartar contaminación.

Tratamientos

Este experimento consistió en la elección del medio de cultivo. Se probaron medios de cultivo con la finalidad de obtener la mayor cantidad de brotes posibles y se trabajó con la densidad de explantes por biorreactor RITA® determinada en el experimento anterior.

Los tratamientos a partir de tres medios de cultivo fueron colocados en el biorreactor y comparados con un tratamiento testigo.

El listado de los tratamientos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2: Tratamientos a evaluar para experimento de reguladores de crecimiento

Clave	Medio de cultivo
T0	MS
T1	MS +5.0 mgL ⁻¹ BAP +5.0 mgL ⁻¹ AIB + 30 gL ⁻¹ sacarosa
T2	MS +6.0 mgL ⁻¹ BAP +2.0 mgL ⁻¹ AIA + 30 gL ⁻¹ sacarosa
T3	MS +6.0 mgL ⁻¹ BAP +2.0 mgL ⁻¹ AIB + 30 gL ⁻¹ sacarosa

Diseño Experimental

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), el cual consistió en 4 tratamientos y 4 repeticiones. Al desarrollarse en biorreactores RITA® y producto del DCA planteado, se trabajó con 16 biorreactores.

En este experimento, la unidad experimental ha sido un biorreactor RITA®.

Conducción del Experimento

Los explantes provenientes del cuarto subcultivo *in vitro* sobre medio de cultivo sólido, fueron colocados en la superficie interna del biorreactor. Se emplearon biorreactores RITA® de capacidad de 0.9 L y se colocaron 200 ml de medio de cultivo líquido en cada uno de ellos. Se emplearon 4 explantes por cada biorreactor RITA®.

Los explantes de banano cv ‘Williams’ de los tratamientos evaluados fueron colocados dentro de los biorreactores cuidando la asepsia a fin de evitar contaminación en el experimento. Se utilizaron instrumentos esterilizados y la siembra se realizó dentro de una cámara de flujo laminar. El tiempo de inmersión en el medio de cultivo fue de 3 minutos con una frecuencia de cada 3 horas (8 inmersiones por día).

Después de 21 días se realizó la evaluación en las plántulas con los equipos necesarios.

3.3.3. Experimento 3: Determinación de la respuesta de banano cv ‘Williams’ procedente de biorreactores RITA® correspondientes al experimento de reguladores de crecimiento trasladados a un medio de cultivo sólido MS suplementado con BAP y AIB.

Se utilizaron explantes provenientes de biorreactores correspondientes al experimento anterior. Se obtuvieron explantes a partir de 4 distintos medios de cultivo líquido en biorreactores RITA®. En esta ocasión se transfirieron a un recipiente con un único medio de cultivo sólido.

Medios de cultivo

Posterior al tiempo en biorreactores, se utilizó un medio de cultivo sólido que consistió en medio MS suplementado con 5.0 mgL⁻¹ BAP, 5.0 mgL⁻¹ AIB, 1 mgL⁻¹ de tiamina, 40 gL⁻¹ sacarosa y 6 gL⁻¹ agar.

El medio de cultivo utilizado se preparó con pH de 5.8 regulado con HCl y NaOH. Una vez concluida la preparación de los medios de cultivo, se colocaron dentro de los recipientes y se autoclavaron a 121 °C, con 1.5 bar de presión por 20 minutos para una correcta esterilización.

El tiempo estimado desde la preparación hasta la utilización del medio de cultivo es de 21 días, tiempo estimado para descartar contaminación.

Tratamientos

Este experimento consistió en colocar los explantes procedentes de distintos tratamientos correspondiente al experimento anterior en un medio de cultivo sólido con la finalidad de obtener la mayor cantidad de brotes posibles en recipientes previamente esterilizados.

El listado de los tratamientos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3: Tratamientos a evaluar para experimento de medio sólido

Clave	Procedencia
T0	RITA® Experimento 2 T0
T1	RITA® Experimento 2 T1
T2	RITA® Experimento 2 T2
T3	RITA® Experimento 2 T3

Diseño Experimental

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), el cual consistió en 4 tratamientos y 6 repeticiones respectivamente. Al desarrollarse en recipientes de y producto del DCA planteado, se trabajó con 24 recipientes.

En este experimento, la unidad experimental es un recipiente.

Conducción del Experimento

Los explantes provenientes del sistema de biorreactores RITA® fueron colocados en recipientes con una capacidad de 0.25 L y se colocaron 50 ml de medio de cultivo. Se colocaron 4 explantes por frasco. Se emplearon 4 explantes por biorreactor RITA®.

El medio de cultivo sólido fue colocado en los recipientes. La preparación del medio de cultivo sólido consistió en suplementar un medio MS y añadir agar.

Después de 21 días se realizó la evaluación en las plántulas con los equipos necesarios.

3.4. Variables evaluadas

- **Coefficiente de multiplicación de brotes**, expresado en unidades por explante, se calculó por el número de brotes finales con respecto al número de brotes iniciales.
- **Número de hojas por plántula**, expresado en unidades por plántula, se calculó contabilizando la totalidad de hojas verdaderas presentes en la plántula.
- **Altura de plántula**, expresado en centímetros, se calculó desde la base de la plántula.
- **Peso fresco de plántula**, expresado en gramos, se calculó tomando las plántulas provenientes del biorreactor RITA®. Para el pesado se utilizó una balanza analítica.
- **Peso seco de plántula**, expresado en gramos, el material vegetal fresco provenientes del biorreactor RITA® se colocó en la estufa para el secado a 70°C por 3 días. Para el pesado se utilizó una balanza analítica.

3.5. Análisis Estadístico

Se trabajó con DCA para los 3 experimentos y se realizaron los respectivos análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó la prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 para el coeficiente de multiplicación de brotes, número de hojas por plántula, altura de plántula, peso fresco de plántula y peso seco de plántula.

Para el análisis y procesamiento de los datos obtenidos, se utilizó el programa R de uso libre.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Experimento 1: Determinar la respuesta de banano cv 'Williams' a distintas densidades de explantes utilizando un medio de cultivo líquido MS suplementado con BAP y AIB

Las respuestas estadísticas obtenidas cumplen con homogeneidad y normalidad.

Coefficiente de multiplicación de brotes

En la Figura 3 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta coeficiente de multiplicación de brotes. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 (1 explante), tratamiento T1 (2 explantes), tratamiento T2 (4 explantes) y tratamiento T3 (8 explantes); presentaron valores de 5.60, 4.90, 8.95 y 6.55 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 3, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

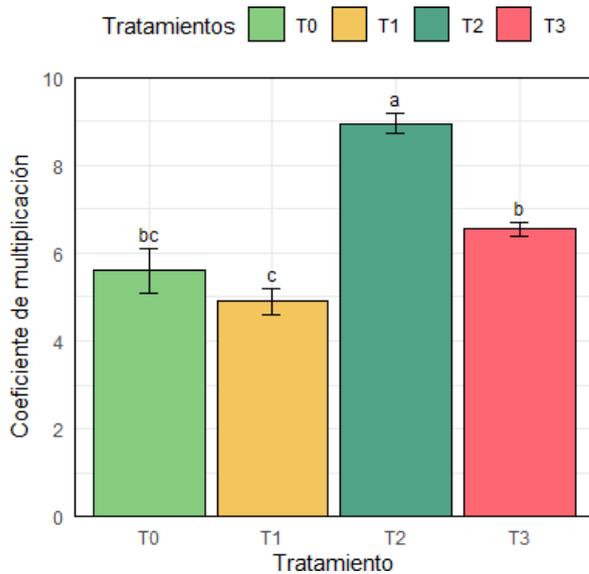


Figura 3: Resultados del coeficiente de multiplicación para distintas densidades de explantes

Vidal & Sánchez (2019) mencionaron la importancia de los biorreactores y la aplicación que pueden tener en el estudio del funcionamiento de las plantas y la reducción del costo para una propagación a gran escala. Kunakhonnuruk et al. (2019) reportaron resultados favorables para TIS en comparación a CIS y SSS en *Epipactis flava*. Según Uma et al., (2021) los biorreactores correspondientes a TIS mejoran la multiplicación de los brotes respecto a SSS en banano; además, existe una importante relación entre la densidad de explantes y la formación de brotes, donde se alcanzó la mayor cantidad de brotes con una densidad de 6.00 explantes iniciales en TIS.

Por tal razón, el tratamiento T2 (4 explantes) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 8.95 brotes por explantes finales. Representó un 182.00% del menor valor obtenido. Se ha demostrado también la importancia de la densidad de explantes en otras especies como *Hylocereus undatus* (Bello Bello et al., 2021) para la multiplicación de brotes.

Número de hojas por plántula

En la Figura 4 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta número de hojas por plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 (1 explante), tratamiento T1 (2 explantes), tratamiento T2 (4 explantes) y tratamiento T3 (8 explantes); presentaron valores de 2.40, 2.50, 2.50 y 2.72 número de hojas respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 4, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

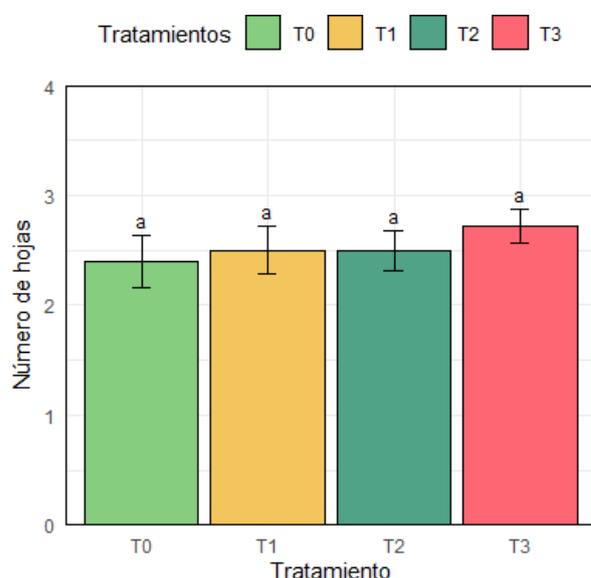


Figura 4: Resultados del número de hojas para distintas densidades de explantes

En banano no se presentaron diferencias significativas, pero sí se reporta en otras especies. Melviana et al. (2021) informaron respecto a los tiempos de inmersión para el crecimiento de *Stevia rebaudiana*, donde se determinó que 30 minutos favorecieron el crecimiento del explante, hojas, entre otros.

Altura de plántula

En la Figura 5 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta altura de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 (1 explante), tratamiento T1 (2 explantes), tratamiento T2 (4 explantes) y tratamiento T3 (8 explantes); presentaron valores de 4.19, 4.57, 4.29 y 4.53 centímetros respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 5, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

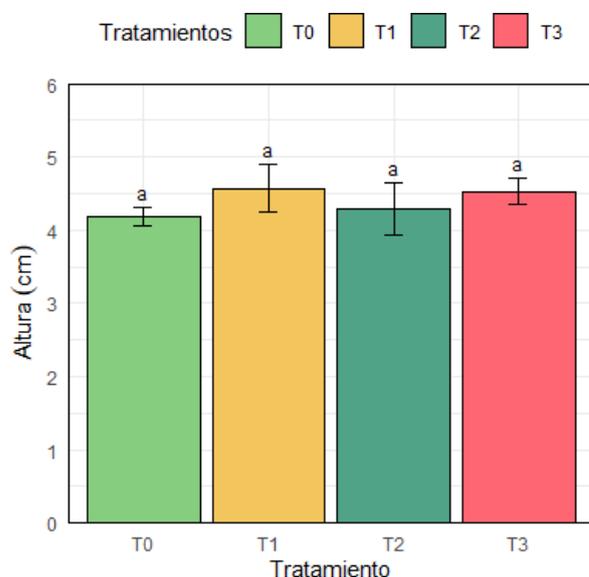


Figura 5: Resultados de la altura para distintas densidades de explantes

En banano no se presentaron diferencias significativas, pero sí se reporta en otras especies. Según Uma et al., (2021) el tiempo de inmersión, la frecuencia y el volumen del medio influyen directamente sobre la altura en banano. Kunakhonnuruk et al. (2019) reportaron resultados favorables para TIS respecto a otros sistemas en *Epipactis flava* trabajando con el brote más largo de cada explante.

Peso fresco de plántula

En la Figura 6 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta peso fresco de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 (1 explante), tratamiento T1 (2 explantes), tratamiento T2 (4 explantes) y tratamiento T3 (8 explantes); presentaron valores de 1.9, 3.12, 2.86 y 3.63 gramos respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 6, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

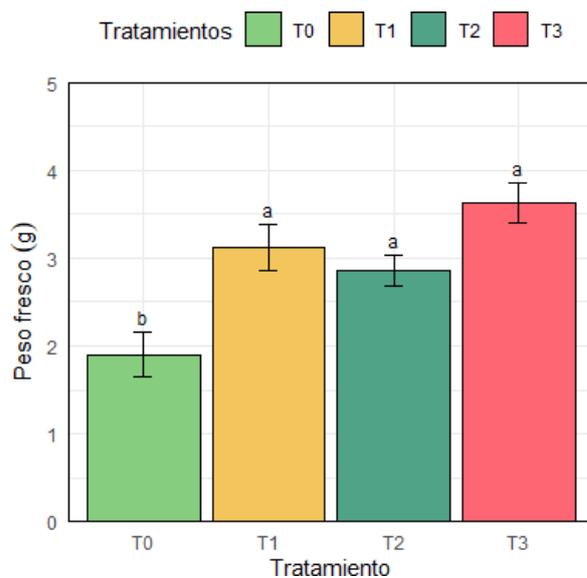


Figura 6: Resultados del peso fresco para distintas densidades de explantes

Carvalho et al., (2019) reportaron que la aparición de los TIS solucionó los problemas de hiperhidricidad y asfixia de los CIS y SSS. De Carlo et al. (2021) indicaron que de esta manera se logró obtener una mayor cantidad posible de biomasa en algunas especies.

Por consiguiente, el tratamiento T3 (8 explantes) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 3.63 gramos. Representó un 191.05% del menor valor obtenido

Peso seco de plántula

En la Figura 7 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta peso seco de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 (1 explante), tratamiento T1 (2 explantes), tratamiento T2 (4 explantes) y tratamiento T3 (8 explantes); presentaron valores de 0.16, 0.23, 0.22 y 0.26 gramos respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 7, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

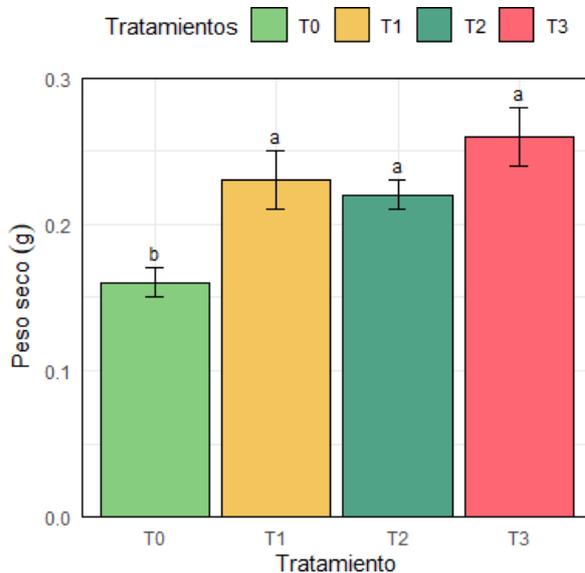


Figura 7: Resultados del peso seco para distintas densidades de explantes

Según De Carlo et al. (2021) en ocasiones la tasa de multiplicación se encontró relacionada con hojas, bulbos, peso, entre otras. Bayraktar (2019) analizó la biomasa en hojas, tallos y raíces para *Stevia rebaudiana* considerando el tiempo de inmersión, frecuencia y volumen del medio de cultivo obteniendo resultados bastante prometedores.

Por ende, el tratamiento T3 (8 explantes) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 0.26 gramos. Representó un 162.50% del menor valor obtenido

4.2. Experimento 2: Determinar la respuesta de banano cv. 'Williams' a medios de cultivo líquido MS con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BAP, AIA y AIB.

Las respuestas estadísticas obtenidas cumplen con homogeneidad y normalidad.

Coefficiente de multiplicación de brotes

En la Figura 8 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta coeficiente de multiplicación de brotes. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIB); presentaron valores de 4.19, 7.38, 8.62 y 6.19 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 8, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

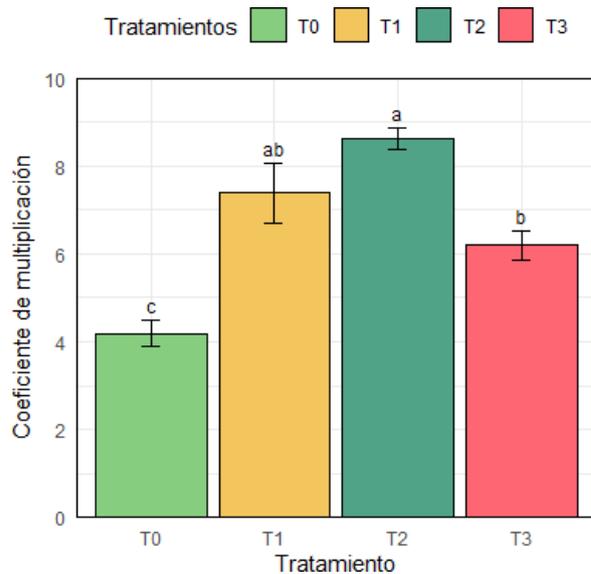


Figura 8: Resultados del coeficiente de multiplicación para distintas combinaciones de PGR

Rico et al. (2022) resaltaron la importancia de la densidad de explantes, medios de cultivo, frecuencia de inmersión, tiempo de cultivo para obtener resultados promisorios en *Cannabis sativa* en genotipos Beatriz, Mati y Moniek. Uma et al. (2023) reportaron características superiores en bioreactores TIS respecto a SSS en los cultivares de banano Grand Naine, Nendran, Red Banana y Ney Poovan; de manera adicional, los explantes obtenidos presentaron mayor supervivencia *ex vitro*. Uma et al. (2021) mencionaron que el tiempo indicado para permanecer los explantes en los biorreactores TIS es de 21 días en banano.

Por ende, el tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 8.62 brotes por explante final. Representó un 205.72% del menor valor obtenido.

Número de hojas por plántula

En la Figura 9 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta número de hojas por plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento

testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL-1 BAP+ 5.00 mgL-1 AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIB); presentaron valores de 2.12, 2.31, 2.69 y 2.62 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 9, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

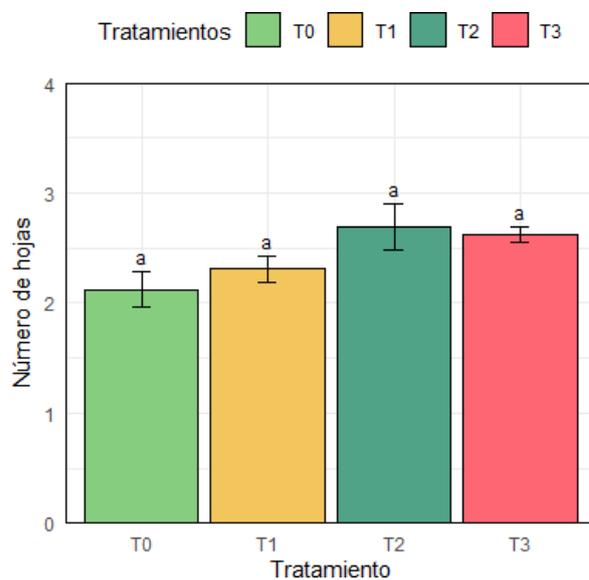


Figura 9: Resultados del número de hojas para distintas combinaciones de PGR

En banano no se presentaron diferencias significativas, pero sí se reporta en otras especies. Monja-Mio et al. (2021) determinaron el importante efecto de la densidad de explantes y tiempo de cultivo, 20 plantas por recipiente y 60 días respectivamente, además, la superioridad de utilizar RITA® respecto a métodos tradicionales en *Agave angustifolia*. Se utilizó la altura y número de hojas para determinar el crecimiento.

Altura de plántula

En la Figura 10 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta altura de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL-1 BAP+ 5.00 mgL-1 AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIB); presentaron valores de 2.92, 3.06, 3.56 y 3.36 centímetros respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 10, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

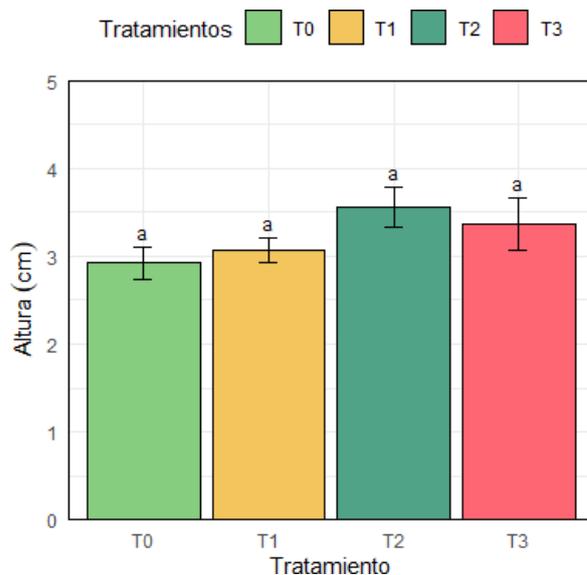


Figura 10: Resultados de la altura para distintas combinaciones de PGR

En banano no se presentaron diferencias significativas, pero sí se reporta en otras especies. Nasri et al. (2019) determinaron que la multiplicación y formación de brotes de *Myrobolan* respondía mejor al tratamiento de 1 mg L⁻¹ BAP y 1 mg L⁻¹ AIB considerando número de hojas, peso fresco, entre otras variables. San José et al. (2020) contemplaron utilizar distintas densidades y propusieron un protocolo empleando RITA® para superar la muerte e hiperhidricidad en explantes en *Alnus glutinosa*.

Peso fresco de plántula

En la Figura 11 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta peso fresco de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL-1 BAP+ 5.00 mgL-1 AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIB); presentaron valores de 1.46, 2.64, 2.51 y 2.55 gramos respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 11, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

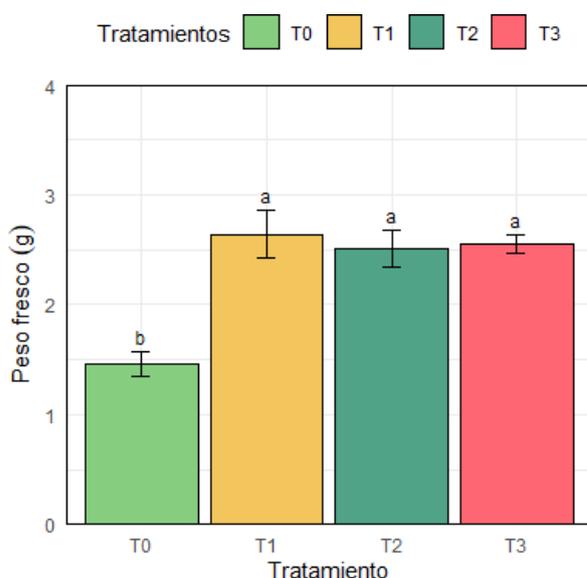


Figura 11: Resultados del peso fresco para distintas combinaciones de PGR

Hwang et al (2022) reportaron respecto a TIS ser un sistema eficiente para una propagación en comparación a sistemas *in vitro* tradicionales, CIS y SSS evaluando variables como número de hojas, peso fresco y peso seco en *Chrysanthemum morifolium*, destacaron la aireación forzada de los biorreactores TIS.

Por ende, el tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 2.64 gramos. Representó un 180.82% del menor valor obtenido.

Peso seco de plántula

En la Figura 12 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta peso seco de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIB); presentaron valores de 0.12, 0.20, 0.18 y 0.19 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 12, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

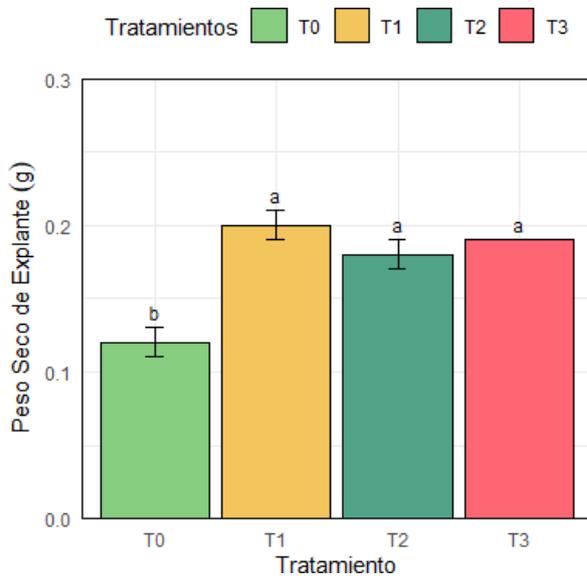


Figura 12: Resultados del peso seco para distintas combinaciones de PGR

Gago et al. (2022) resaltaron el uso de RITA® en la obtención de nuevos brotes, siendo el mejor tratamiento 0.5 mg L⁻¹ BAP y 0.5 mg L⁻¹ AIB con 3% de sacarosa para *Prunus domestica* L. Gago et al. (2021) reportaron mejores resultados en RITA® en comparación a SSS para la propagación de *Salix viminalis* L.

Por ende, el tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 0.20 gramos. Representó un 166.66% del menor valor obtenido

4.3. Experimento 3: Determinar la respuesta de banano cv ‘Williams’ procedente de biorreactores RITA® correspondientes al experimento de reguladores de crecimiento trasladados a un medio de cultivo sólido MS suplementado con BAP y AIB.

Las respuestas estadísticas obtenidas cumplen con homogeneidad y normalidad.

Coefficiente de multiplicación de brotes

En la Figura 13 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta coeficiente de multiplicación de brotes. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIB); presentaron valores de 2.88, 3.67, 4.46 y 3.17 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 13, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

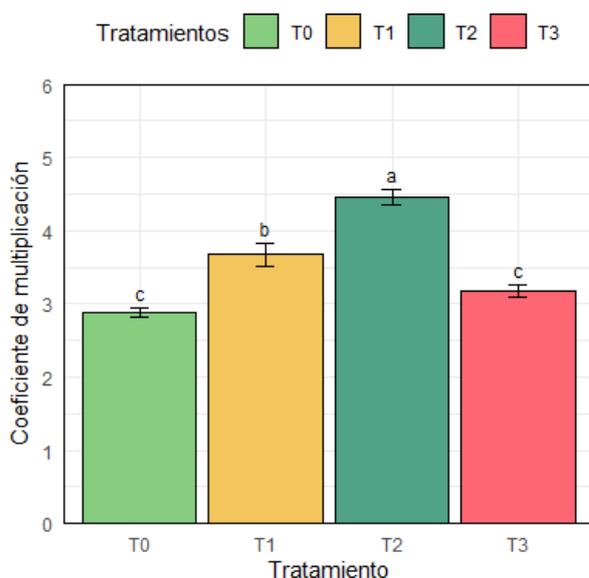


Figura 13: Resultados del coeficiente de multiplicación en medio sólido

Según Mekonen et al. (2021) el medio de cultivo óptimo para la etapa de multiplicación de brotes varía dependiendo del cultivar de banano. Las auxinas (AIA y AIB) en combinación con citoquininas (BAP) manifiestan efecto sinérgico para la formación de brotes. Su et al. (2020) resaltaron la capacidad de totipotencia de las plantas debido a la embriogénesis somática y sugiere una relación con las auxinas.

Por tal motivo, el tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 4.46 brotes por explantes finales. Representó un 154.86% del menor valor obtenido.

Número de hojas por plántula

En la Figura 14 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta número de hojas por plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) y tratamiento

T3 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIB); presentaron valores de 2.42, 2.38, 2.46 y 2.04 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 14, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

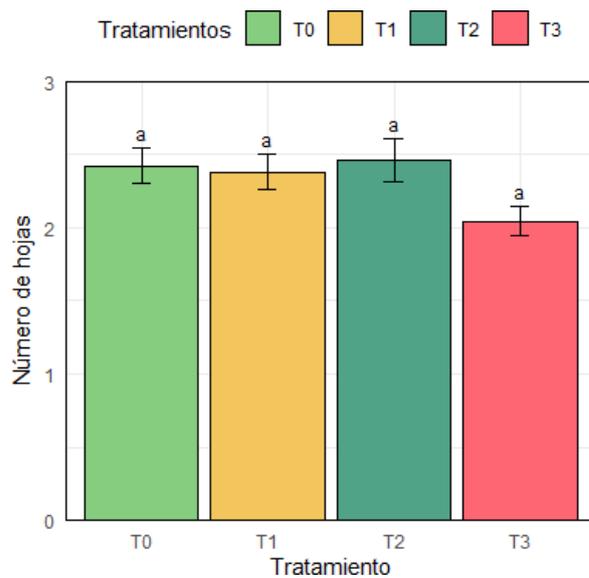


Figura 14: Resultados del número de hojas en medio sólido

Deo et al. (2019) mencionaron que los compuestos ANA y AIA son importantes para la multiplicación de brotes para banano variedad Patakpura. Sugiyono et al. (2021) reportaron en el cultivar Gebyar menor cantidad de hojas respecto Kepok Kuning posterior al tratamiento con 2.5 μ M de AIA.

Por tal razón, el tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIA) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 2.46 gramos sin embargo no se presentó diferencia significativa.

Altura de plántula

En la Figura 15 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta altura de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL-1 BAP+ 5.00 mgL-1 AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIB); presentaron valores de 2.59, 2.86, 2.76 y 2.82 centímetros respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 15, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

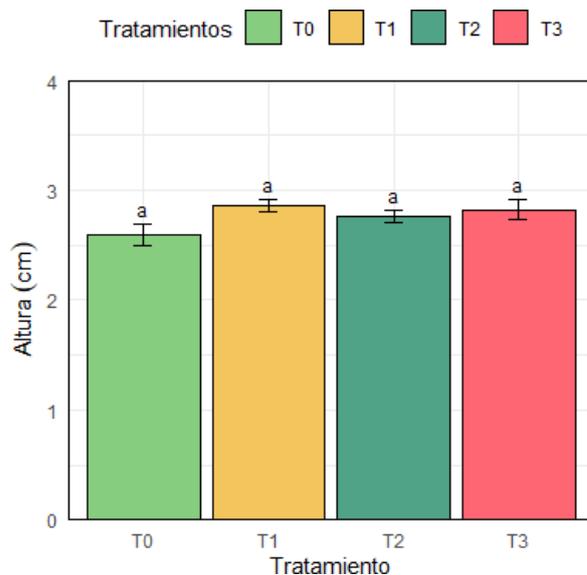


Figura 15: Resultados de la altura en medio sólido

Selvakumar, & Parasurama (2020) determinaron mediante experimentos que al manipular los PGR se puede obtener valores altos para brotes, altura y número de hojas de explante en SSS, donde el mejor tratamiento resultó ser 2 mg L⁻¹ 6-BAP y 1 mg L⁻¹ ANA en los cultivares Grand Naine y Elakki. Deo et al. (2019) para banano variedad Patakpura reportaron una mejor respuesta a BAP en comparación a KIN durante la multiplicación.

Por ende, el tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL-1 BAP+ 5.00 mgL-1 AIB) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 2.85 centímetros sin embargo no se presentó diferencia significativa.

Peso fresco de plántula

En la Figura 16 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta peso fresco de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL-1 BAP+ 5.00 mgL-1 AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL-1 BAP+ 2.00 mgL-1 AIB); presentaron valores de 1.28, 1.82, 1.83 y 1.97 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 16, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

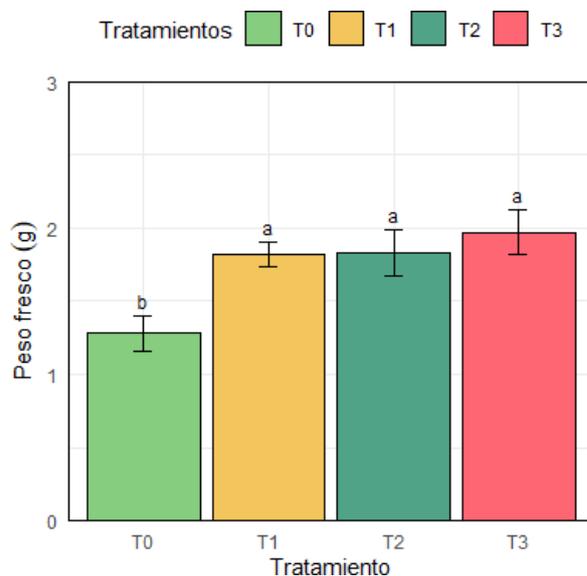


Figura 16: Resultados del peso fresco en medio sólido

Khan et al. (2021) obtuvieron los mejores resultados para número de brotes, número de hojas y peso fresco al utilizar 1 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIA para las variedades Pisang, híbrido William-8818 y Brazilian. Mekonen et al. (2021) indicaron que el medio MS no estimula la formación de brotes.

En consecuencia, el tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIB) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 1.97 gramos. Representó un 153.90% del menor valor obtenido.

Peso seco de plántula

En la Figura 17 se precisa los datos obtenidos para la variable respuesta peso seco de plántula. La prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo T0 sin reguladores de crecimiento (MS), tratamiento T1 (MS+ 5.00 mgL⁻¹ BAP+ 5.00 mgL⁻¹ AIB), tratamiento T2 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIA) y tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIB); presentaron valores de 0.11, 0.15, 0.14 y 0.16 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza se indican en el Anexo 17, denota que al menos existe un tratamiento diferente a los demás.

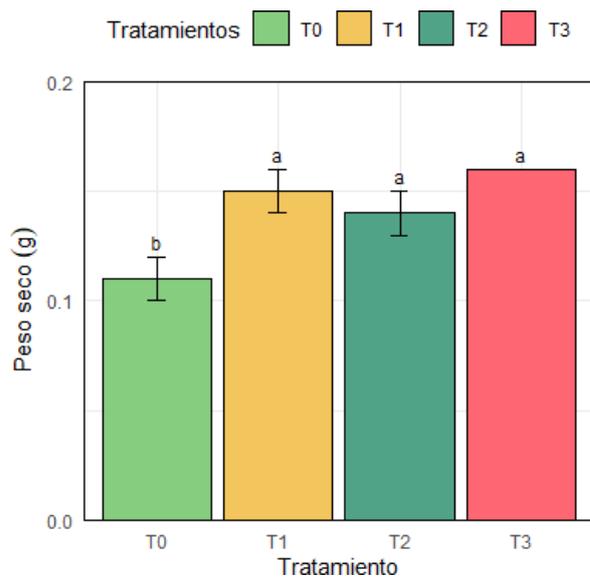


Figura 17: Resultados del peso seco en medio sólido

Agbadje et al. (2021) informaron sobre la dependencia de las auxinas y citoquinina con el genotipo; además, mencionaron la influencia de la combinación de ambas en la proliferación.

Por consiguiente, el tratamiento T3 (MS+ 6.00 mgL⁻¹ BAP+ 2.00 mgL⁻¹ AIB) resultó ser la mejor opción respecto al resto de tratamientos con una media de 0.16 gramos. Representó un 145.45% del menor valor obtenido.

V. CONCLUSIONES

El uso de sistemas de inmersión temporal, RITA® en este caso, proporciona mejores resultados en casi todas las variables establecidas. El coeficiente de multiplicación de brotes presenta diferencia significativa entre TIS en comparación a medio de cultivo sólido logrando resultados prometedores para el banano cv. 'Williams'.

Al determinar una densidad de explantes por biorreactor para un mayor coeficiente de multiplicación de brotes después del tiempo de cultivo de 26 días, se recomienda utilizar el tratamiento T2 con 4 explantes en biorreactores RITA®.

Al determinar un medio de cultivo suplementado con auxinas y citoquininas para un mayor coeficiente de multiplicación de brotes después del tiempo de cultivo de 21 días, se recomienda utilizar el tratamiento T2 constituido por un medio MS +6.0 mgL⁻¹ BAP +2.0 mgL⁻¹ AIA +30 gL⁻¹ sacarosa en biorreactores RITA®.

Al determinar la influencia de distintos pre-tratamientos a los explantes en un medio sólido para un mayor coeficiente de multiplicación de brotes después del tiempo de cultivo de 21 días, se recomienda el tratamiento T2 correspondiente a un pre tratamiento con MS +6.0 mgL⁻¹ BAP +2.0 mgL⁻¹ AIA +30 gL⁻¹ sacarosa en biorreactores RITA®.

VI. RECOMENDACIONES

Contar con una mayor cantidad de biorreactores RITA® con la finalidad de añadir más repeticiones a la investigación; e incluso poder realizar más investigaciones en paralelo, en banano u otros cultivos.

Realizar estudios de Serología para evaluar la contaminación y estudios sobre la influencia de distintos tipos de luces LED sobre los explantes en la etapa de multiplicación.

Realizar estudios sobre hiperhidricidad y fenolización en explantes de banano en los distintos sistemas de cultivo (TIS, CIS, SSS y Sistema Sólido) y evaluar el efecto que tiene sobre los explantes en las siguientes etapas de la micropropagación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Afreen, F. (2007). Temporary Immersion Bioreactor. En: S. D. Gupta & Y. Ibaraki. (Eds), *Plant Tissue Culture Engineering*. Dordrecht, Países Bajos: Springer (pp. 187–201). doi: 10.1007/978-1-4020-3694-1_11
- Agbadje, E. T., Agbidinokoun, A., Zandjanakou-Tachin, M., Cacaï, G. T., & Ahanhanzo, C. (2021). Mass Production of Bananas and Plantains (*Musa* spp.) Plantlets through *in vitro* Tissue Culture Partway: A Review. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 2(4), 1–8. doi: 10.24018/ejbio.2021.2.4.229
- Alcántara, J.S., Acero, J., Alcántara, J. D., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. doi: 10.25058/24629448.3639
- Álvarez, S. P., Tapia, M. A. M., Vega, M. E. G., Ardisana, E. F. H., Medina, J. A. C., Zamora, G. L. F., & Bustamante, D. V. (2019). Nanotechnology and Plant Tissue Culture. En R. Prasad. (Ed.), *Plant Nanobionics* (pp. 333–370). Cham, Suiza: Springer. doi: 10.1007/978-3-030-12496-0_12
- Arteaga Rios, L. D. (2019). *Caracterización molecular y cultivo in vitro de Yolojóchitl (Magnolia mexicana DC.)*. (Tesis de maestría y doctorado en ciencias agropecuarias y recursos naturales). Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
- Bayraktar, M. (2019). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni Using RITA® Bioreactor. *HortScience horts*, 54(4), 725-731. doi: 10.21273/HORTSCI13846-18
- Bello Bello, J. J., Schettino Salomón, S., Ortega Espinoza, J., & Spinoso Castillo, J. L. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, 11(10), 437. doi: 10.1007/s13205-021-02984-5

- Bello Bello, J., & Spinoso Castillo, J. (2022). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 16(30), 1e-14e. doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692
- Bhowmik, T. K., & Rahman, M. M. (2020). Micropropagation of commercially important orchid *Dendrobium palpebrae* Lindl. through *in vitro* developed pseudobulb culture. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 3(3), 225–232. doi: 10.5455/jabet.2020.d128
- Bisht, T., Rawat, L., Chakraborty, B., & Yadav, V. (2018). A Recent Advances in Use of Plant Growth Regulators (PGRs) in Fruit Crops-A Review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 7(5), 1307–1336. doi: 10.20546/ijcmas.2018.705.159
- Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 985. doi: 10.3390/ijms21030985
- Carvalho, L. S. O., Ozudogru, E. A., Lambardi, M., & Paiva, L. V. (2019). Temporary immersion system for micropropagation of tree species: a bibliographic and systematic review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 269-277. doi: 10.15835/nbha47111305
- Castillo, A., Moreno A. y García, M. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173- 182.
- Cronquist, A. (1988) *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Nueva York, Estados Unidos: New York Botanical Garden.
- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., & Benelli, C. (2021). Temporary immersion system for production of biomass and bioactive compounds from medicinal plants. *Agronomy* 11(12), 2414. doi: 10.3390/agronomy11122414
- Deo, B., Keshari, B., & Pradhan, B. (2019). *In vitro* propagation of popular banana cultivar (Musa spp. Cv. Patakpura). *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 44(4), 641-648. doi: 10.3329/bjar.v44i4.45699

- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1): 50–59. doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006
- Engels, J. M. M., & Thormann, I. (2020). Main challenges and actions needed to improve conservation and sustainable use of our crop wild relatives. *Plants*, 9(8), 968. doi: 10.3390/plants9080968
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). *Producción de banano orgánico en Perú*. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/i6870s/i6870s.pdf>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). *Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019*. <http://www.fao.org/3/ca7567es/ca7567es.pdf>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *Banana Statistical Compendium 2020*. Roma. <https://www.fao.org/3/cb6637en/cb6637en.pdf>
- Gago, D., Sánchez, C., Aldrey, A., Christie, C. B., Bernal, M. Á., & Vidal, N. (2022). Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.) in bioreactors using photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Horticulturae*, 8(4), 286. doi: 10.3390/horticulturae8040286
- Gago, D., Vilavert, S., Bernal, M. Á., Sánchez, C., Aldrey, A., & Vidal, N. (2021). The effect of sucrose supplementation on the micropropagation of *Salix viminalis* L. shoots in semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Forests*, 12(10), 1408. doi: 10.3390/f12101408
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6), 607-621. doi: 10.1002/elsc.201300166
- Hussein, N. (2012). Effects of nutrient media constituents on growth and development of banana (*Musa* spp.) shoot tips cultured *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 11(37), 9001-9006. doi: 10.5897/AJB11.4173

- Hwang, H. D., Kwon, S. H., Murthy, H. N., Yun, S. W., Pyo, S. S., & Park, S. Y. (2022). Temporary immersion bioreactor system as an efficient method for mass production of *in vitro* plants in horticulture and medicinal plants. *Agronomy*, 12(2), 346. doi: 10.3390/agronomy12020346
- INIA. Instituto Nacional de Innovación Agraria (2020). *Ministerio desarrollará tecnología que proteja al banano orgánico de letal hongo Fusarium oxysporum*. Recuperado de Plataforma digital única del Instituto Nacional de Innovación Agraria: <https://www.inia.gob.pe/2020-nota-040/>
- Katel, S., Yadav, S. P. S., & Sharma, B. (2022). Impacts of plant growth regulators in strawberry plant: A review. *Heliyon* 8 (12), e11959. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11959
- Khan, A., Bashir, A., Erum, S., Khatak, J. Z. K., & Muhammad, A. (2021). Effects of 6-Benzylaminopurine and Indole-3-acetic acid on growth and root development of banana explants in micropropagation. *Sarhad Journal of Agriculture*, 37(1): 9-13. doi: 10.17582/journal.sja/2021/37.1.9.13
- Krol, A., Kokotkiewicz, A., Szopa, A., Ekiert, H.M., & Luczkiewicz, M. (2021). Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production. En K. G. Ramawat, H. M. Ekiert, S. Goyal (Eds.), *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites* (pp. 187–247). Cham, Suiza: Springer.
- Kumari, S., Bakshi, P., Sharma, A., Wali, V. K., Jasrotia, A., & Kour, S. (2018). Use of plant growth regulators for improving fruit production in sub tropical crops. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(3), 659-668. doi: 10.20546/ijcmas.2018.703.077
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., Kongbangkerd, A. (2019). *In vitro* propagation of Rheophytic Orchid, *Epipactis flava* Seidenf. - A Comparison of Semi-solid, Continuous Immersion and Temporary Immersion Systems. *Biology*, 8(4), 72. doi: 10.3390/biology8040072
- Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U., & Aidun, C.K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Front. Biol.*, 10(2), 177–193. doi: 10.1007/s11515-015-1355-1

- Martínez Solórzano, G. E., & Rey Brina, J. C. (2021). Bananas (Musa AAA): Importance, production and trade in Covid-19 times. *Agronomy Mesoamerican*, 32(3), 1034–1046. doi: 10.15517/AM.V32I3.43610
- Mathew, M. M., & Prasad, K. (2021). Model systems for regeneration: Arabidopsis. *Development*, 148(6), dev195347. doi: 10.1242/dev.195347
- Mekonen, G., Egigu, M. C., & Muthsuwamy, M. (2021). *In vitro* propagation of banana (*Musa paradisiaca* L.) plant using shoot tip explant. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(12), 2339-2346. doi: 10.24925/turjaf.v9i12.2339-2346.2883
- Melviana, A. C., Esyanti, R. R., Mel, M., & Setyobudi, R. H. (2021). Biomass enhancement of *Stevia rebaudiana* Bertoni Shoot culture in temporary immersion system (TIS) RITA® bioreactor optimized in two different immersion periods. *EDP Sciences* 226(7), 1-9. doi: 10.1051/e3sconf/202122600007
- Melviana, A. C., Esyanti, R. R., Setyobudi, R. H., Mel, M., Adinurani, P. G., & Burlakovs, J. (2021). Gene Expression Related to Steviol Glycoside Synthesis Produced in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Shoot Culture Induced with High Far-Red LED Light in TIS RITA® Bioreactor System. *Sarhad Journal of Agriculture*, 37(1). doi: 10.17582/journal.sja/2021/37.1.1.8
- MINAGRI. Ministerio de Agricultura (2014). *El Banano Peruano: Producto Estrella de Exportación. Tendencias de la producción y el comercio del banano en el mercado internacional y nacional*. Recuperado de <https://repositorio.midagri.gob.pe/retrieve/0e3939fe-5e70-44b3-9c34-840ec25e0b77/Boletin-Banano.pdf.jpg>
- Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M. Á., Sánchez-Teyer, F. L., & Robert, M. L. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. ‘Bacanora’. *3 Biotech*, 11, 77. doi: 10.1007/s13205-020-02604-8
- Morton, J. (1987). *Fruits of warm climates*. Miami, Estados Unidos: CAB International.

- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nasri, A., Baklouti, E., Ben Romdhane, A., Maalej, M., Schumacher, H. M., Drira, N., & Fki, L. (2019). Large-scale propagation of Myrobolan (*Prunus cerasifera*) in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity. *Scientia Horticulturae*, 245, 144–153. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.016
- Nielsen, E., Temporiti, M. E. E. & Cella, R. (2019). Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering. *Plant Cell Reports*, 38(10): 1199–1215. doi: 10.1007/s00299-019-02415-z
- Ortiz, R., & Swennen, R. (2014). From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. *Biotechnology Advances*, 32(1), 158-169. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.010
- Ramírez Mosqueda, M. A., Sánchez Segura, L., Hernández Valladolid, S. L. et al. (2020). Influence of silver nanoparticles on a common contaminant isolated during the establishment of *Stevia rebaudiana* Bertoni culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 143(3): 609-618. doi: 10.1007/s11240-020-01945-9
- Rico, S., Garrido, J., Sánchez, C., Ferreiro-Vera, C., Codesido, V., & Vidal, N. (2022). A temporary immersion system to improve *Cannabis sativa* micropropagation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 895971. doi: 10.3389/fpls.2022.895971
- Robinson, J. C. (1996). Distribution and importance; taxonomic classification, cultivars and breeding. En J. C. Robinson (Ed.), *Banana and plantains* (pp. 1–33). Wallingford, Inglaterra: CAB International.
- Robinson, J. C., & Galán-Saúco, V. (2010). *Bananas and plantains*. Wallingford, Inglaterra: CAB International.
- San José, M. C., Blázquez, N., Cernadas, M. J., Janeiro, L. V., Cuenca, B., Sánchez, C., & Vidal, N. (2020). Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143, 265-275. doi: 10.1007/s11240-020-01937-9

- Selvakumar, S., & Parasurama, D. S. (2020). Maximization of micropropagule production in banana cultivars Grand naine (AAA) and Elakki (AB). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56, 515–525. doi: 10.1007/s11627-020-10060-5
- Sharma, L., Priya, M., Kaushal, N., Bhandhari, K., Chaudhary, S., Dhankher, O. P., et al. (2020). Plant growth-regulating molecules as thermoprotectants: functional relevance and prospects for improving heat tolerance in food crops. *Journal of Experimental Botany*, 71(2), 569–594. doi: 10.1093/jxb/erz333
- Sharrock, S., & Frison, E. (1999). Musa production around the world – trends, varieties and regional importance. En INIBAP (Ed.), *International Networking for the Improvement of Banana and Plantain: Annual Report 1998* (pp. 42- 47) Montpellier, Francia: INIBAP
- Singh, V., Deen, B., & Singh, S. (2023). Micropropagation of minor fruit crops of India: A review. *Agricultural Reviews*, 44(2), 259-263. doi: 10.18805/ag.R-2569
- Stover, R. H., & Simmonds, N. W. (1987). Classification of banana cultivars. En R. H. Stover, & N. W. Simmonds (Eds.), *Bananas* (pp. 97–103). Nueva York, Estados Unidos: Wiley.
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63, 228-240. doi: 10.1111/jipb.12972
- Suárez Padrón, I. E. (2020). Cultivo de Tejidos Vegetales. Montería, Colombia: Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Sugiyono, S., Dewi, P. S., & Prasetyo, R. (2021). Banana Cultivars Microshoot Induction and Plantlet Formation Using Cytokinin and Auxin. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*, 36(2), 249-258. doi: 10.20961/carakatani.v36i2.50425
- Takahashi, F., Hanada, K., Kondo, T., & Shinozaki, K. (2019). Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 51, 88–95. doi: 10.1016/j.pbi.2019.05.011

- Teisson, C., Alvard, D., Berthouly, B., Cote, F., Escalant, J., Etienne, H., & Lartaud, M. (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Horticulturae*, 440, 521-526. doi: 10.17660/ActaHortic.1996.440.91
- Teixeira da Silva, J. A.; Gulyás, A.; Magyar-Tábori, K.; Min-Rui, W.; Qiao-Chun, W. and Dobránszki, J. (2019). *In vitro* culture of apple and other Malus species: recent advances and applications. *Planta*, 249, 975-1006. doi: 10.1007/s00425-019-03100-x.
- Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., & Backiyarani, S. (2023). Evaluation of temporary immersion bioreactors for *in vitro* micropropagation of banana (*Musa* spp.) and genetic fidelity assessment using flow cytometry and simple-sequence repeat markers. *South African Journal of Botany*, 157, 553-565. doi: 10.1016/j.sajb.2023.04.006
- Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Backiyarani, S., & Saraswathi, M. S. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Scientific Reports*, 11(1), 20371. doi: 10.1038/s41598-021-99923-4
- Valliath, A.S., & Mondal, R. (2023). Micropropagation of Strawberry Crop (*Fragaria ananassa*): A Review. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika* 38(1): 41-44. doi: 10.18805/BKAP529
- Vidal, N., & Sánchez, C. (2019). Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 896-915. doi: 10.1002/elsc.201900041

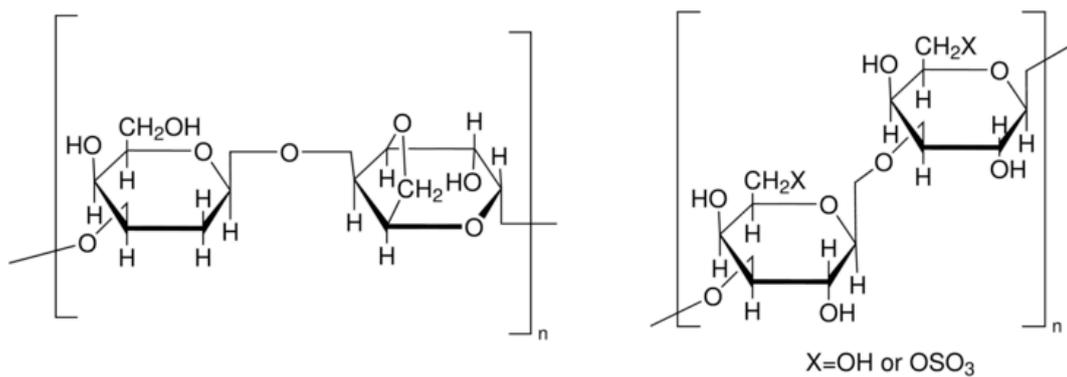
VIII. ANEXOS

Anexo 1: Composición de Medio Murashige & Skoog

Compuesto	Fórmula	Concentración (mg/L)
Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
Fosfato de potasio mono básico	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes		
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Sulfato de cobre dihidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na Fe-EDTA		
EDTA de Sodio Férrico	Na Fe-EDTA	43

Fuente: Murashige & Skoog, 1962

Anexo 2: Agar utilizado (Sigma-Aldrich A9799-500G)



Fuente: www.sigmaaldrich.com

Anexo 3: ANOVA de resultados del coeficiente de multiplicación para distintas densidades de explantes

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	46.875	15.625	29.962	8.441e-07
Error	16	8.344	0.5215		
Total	19	55.219			

Cv: 11.11

Anexo 4: ANOVA de número de hojas para distintas densidades de explantes

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.2836	0.094531	0.4575	0.7158
Error	16	3.3062	0.206641		
Total	19	3.5898			

Cv: 17.96

Anexo 5: ANOVA de resultados de altura de planta para distintas densidades de explantes

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.5119	0.17064	0.4737	0.7049
Error	16	5.7638	0.36024		
Total	19	6.2757			

Cv: 13.66

Anexo 6: ANOVA de resultados de peso fresco para distintas densidades de explantes

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	7.9433	2.64777	9.8414	0.0006443
Error	16	4.3047	0.26904		
Total	19	12.248			

Cv: 18.03

Anexo 7: ANOVA de resultados de peso seco para distintas densidades de explantes

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.028187	0.0093956	8.0132	0.001742
Error	16	0.018760	0.0011725		
Total	19	0.046947			

Cv: 15.68

Anexo 8: ANOVA de resultados del coeficiente de multiplicación para distintos PGR

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	42.766	14.2552	20.199	5.541e-05
Error	12	8.469	0.7057		
Total	15	51.2350			

Cv: 12.74

Anexo 9: ANOVA de resultados de número de hojas para distintos PGR

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.84375	0.281250	3.0857	0.06804
Error	12	1.09375	0.091146		
Total	15	1.9375			

Cv: 12.39

Anexo 10: ANOVA de resultados de altura de planta para distintos PGR

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	1.0286	0.34288	1.6963	0.2207
Error	12	2.4256	0.20214		
Total	15	3.4542			

Cv: 13.95

Anexo 11: ANOVA de resultados de peso fresco para distintos PGR

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	3.7419	1.24730	12.865	0.0004659
Error	12	1.1635	0.09695		
Total	15	4.9054			

Cv: 13.58

Anexo 12: ANOVA de resultados de peso seco para distintos PGR

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.0161412	0.0053804	22.359	3.34e-05
Error	12	0.0028876	0.0002406		
Total	15	0.0190			

Cv: 8.98

Anexo 13: ANOVA de resultados del coeficiente de multiplicación en medio sólido

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	8.6458	2.88194	43.915	5.491e-09
Error	20	1.3125	0.06562		
Total	23	9.9583			

Cv: 7.23

Anexo 14: ANOVA de resultados de número de hojas en medio sólido

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.65365	0.217882	2.286	0.1098
Error	20	1.90625	0.095312		
Total	23	2.55990			

Cv: 13.29

Anexo 15: ANOVA de resultados de altura de planta en medio sólido

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.25152	0.083841	2.1144	0.1304
Error	20	0.79305	0.039653		
Total	23	1.0446			

Cv: 7.22

Anexo 16: ANOVA de resultados de peso fresco en medio sólido

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	1.6618	0.55393	5.3776	0.007033
Error	20	2.0601	10301		
Total	23	3.7219			

Cv: 18.6

Anexo 17: ANOVA de resultados de peso seco en medio sólido

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
Tratamiento	3	0.0074411	0.00248038	9.466	0.0004244
Error	20	0.0052406	0.00026203		
Total	23	0.0127			

Cv: 11.39