



**IDENTIFICACIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DEL BANANO GROS MICHEL
(*MUSA ACUMINATA* AAA) DURANTE LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO
DE PROPAGACIÓN IN VITRO EN LA BIOFÁBRICA DE PLANTAS DE LA SEDE DE
DESARROLLO TECNOLÓGICO E INNOVACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE
ANTIOQUIA**

Paula Andrea Esquea Osorio

Informe de práctica industrial para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Asesor(es)

Blanca Mercedes Leguízamo Betancourth, Doctor (PhD) en Genética

Juliana Osorio Echavarría, Ingeniera Química, M.Sc. en Ingeniería

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Bioquímica
Carmen de Viboral - Antioquia

2024

Cita	(Esquea Osorio, 2024)
Referencia	Esquea Osorio, P. (2024). <i>Identificación De Los Requerimientos Del Banano Gros Michel (Musa Acuminata AAA) Durante La Estandarización Del Protocolo De Propagación In vitro En La Biofábrica De Plantas De La Sede De Desarrollo Tecnológico E Innovación De La Universidad De Antioquia</i> [Practica empresarial]. Universidad de Antioquia, Carmen de Viboral.
Estilo APA 7 (2020)	



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda.

Decano: Julio Cesar Saldarriaga.

Jefe departamento: Farlán Taborda Agudelo

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios, quien siempre estuvo conmigo y me dio la fortaleza necesaria para llegar al final de este camino. A mis padres, Beatriz Osorio y Rafael Esquea, cuyo amor y apoyo incondicional me han brindado la fortaleza necesaria para alcanzar mis metas. A Daniel Ortiz quien creyó en mí y mis capacidades, apoyándome incondicionalmente a pesar de lo difícil que parecía el camino. A mis hermanos, pues fueron mi fuente de inspiración para nunca rendirme. Y finalmente, a mí misma, me dedico este título como ejemplo de resiliencia en la lucha por alcanzar mis objetivos (¡Lo lograste!).

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han hecho posible la realización de este proyecto. A la UdeA, por permitir formar profesionales con una educación gratuita y de calidad. A las coordinadoras de prácticas quienes estuvieron conmigo durante todo este proceso. A los profesores por su orientación y valiosas enseñanzas. Al team obrero de FASPLAN, quienes me ayudaron a crecer como persona y profesional en el ejercicio de mis prácticas e hicieron de mis días una alegría constante. A Jhon Amaya, quien me apoyó durante la culminación de mi carrera y estuvo conmigo en momentos difíciles. A mis amigos por ser una fuente de motivación constante creyendo en mí y en especial a Cris, Glori y Clari, quienes siempre me dieron su compañía y palabras de aliento. A mis abuelitos y en general a todos aquellos que, de alguna manera, contribuyeron con sus ideas y críticas constructivas. Este logro no sería posible sin cada uno de ustedes apoyándome en diferentes etapas del camino, ¡Gracias!.

Tabla de Contenido

Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
1 Planteamiento del problema	14
1.1 Antecedentes	15
1.1.1 Desinfección	15
1.1.2 Multiplicación	16
1.1.3 Enraizamiento	17
2 Justificación.....	19
3 Objetivos	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 Marco teórico	21
5 Metodología	25
5.1 Preparación del material vegetal	25
5.2 Desinfección.....	26
5.3 Multiplicación in vitro.....	30
5.4 Enraizamiento.....	32
6 Resultados	35
6.1 Preparación del material vegetal	35
6.2 Desinfección.....	36
6.3 Multiplicación	38
6.4 Enraizamiento.....	43
7 Discusión	50

7.1 Preparación del material vegetal	50
7.2 Desinfección.....	52
7.3 Multiplicación	53
7.4 Enraizamiento.....	56
8 Conclusiones	59
Referencias	60

Lista de tablas

Tabla 1: Pasos de los métodos de desinfección	26
Tabla 2: Variables de respuesta al proceso de desinfección in vitro.....	37
Tabla 3: Prueba U de Mann-Whitney de la variable explantes viables en la etapa de desinfección	38
Tabla 4: Resultados subcultivo tres respecto a los medios M1 y M2	40
Tabla 5: Resultados subcultivo cuatro respecto a los medios M1 y M2	41
Tabla 6: Análisis descriptivo del número de raíces en la etapa de enraizamiento	43
Tabla 7: Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la variable número de raíces	43
Tabla 8: Resultados de las pruebas individuales U de Mann Whitney de la variable número de raíces.....	44
Tabla 9: Análisis descriptivo del número de hojas en la etapa de enraizamiento	45
Tabla 10: Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la variable número de hojas	45
Tabla 11: Resultados de las pruebas individuales U de Mann Whitney de la variable número de hojas	45
Tabla 12: Análisis descriptivo de la proporción largo/diámetro en la etapa de enraizamiento	46
Tabla 13: Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la variable largo/diámetro	47
Tabla 14: Resultados de las pruebas individuales U de Mann Whitney de la variable largo/diámetro	47

Lista de figuras

Figura 1: Preparación del material vegetal, primera parte	25
Figura 2: Preparación del material vegetal, segunda parte	26
Figura 3: Preparación del material vegetal, tercera parte	27
Figura 4: Primera fase de multiplicación	30
Figura 5: Subcultivos de la etapa de multiplicación	31
Figura 6: Etapa de enraizamiento	32
Figura 7: Material de partida escogido	35
Figura 8: Clasificación explantes después de la etapa de desinfección	36
Figura 9: Explantes transferidos a los medios M1 y M2, respectivamente	39
Figura 10: Comparación explantes segundo subcultivo de la etapa de multiplicación	39
Figura 11: Comparación explantes tercer subcultivo de la etapa de multiplicación.....	40
Figura 12: Comparación explantes cuarto subcultivo de la etapa de multiplicación.....	41
Figura 13: Crecimiento de los explantes en el medio M1 durante los subcultivos.....	42
Figura 14: Crecimiento de los explantes en el medio M2 durante los subcultivos.....	42
Figura 15: Diagrama de cajas y bigotes del volumen de los tallos en la etapa de enraizamiento	47
Figura 16: Comparativa entre explantes de los distintos tratamientos	48
Figura 17: Características físicas de los explantes después de la fase de enraizamiento	49
Figura 18: Cormos no seleccionados en la fase de selección del material	51
Figura 19: Cormos ideales para su utilización como material de partida	51

Siglas, acrónimos y abreviaturas

AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	Bencilaminopurina
CM	Coefficiente de multiplicación
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
GA	Ácido giberélico
MS	Murashige y Skoog
RPM	Revoluciones por minuto
UdeA	Universidad de Antioquia

Resumen

El banano es uno de los cultivos alimentarios más importantes a nivel mundial debido a su bajo costo y alto contenido nutricional. Sin embargo, este es afectado por diversas plagas y enfermedades que dificultan su producción a gran escala. En consecuencia, para abordar estos desafíos, han surgido distintos métodos para optimizar el proceso de multiplicación del banano; entre los que destaca la micropropagación. Este proceso consiste en cultivar *in vitro*, bajo condiciones fitosanitarias controladas, clones de una planta élite en medios suplementados con reguladores de crecimiento, los cuales permiten obtener un alto coeficiente de multiplicación y una etapa de enraizamiento más acorde a los requerimientos establecidos. El presente proyecto tuvo como objetivo estandarizar el protocolo para la propagación *in vitro* del banano variedad Gros Michel (*Musa acuminata* AAA) en las instalaciones de la biofábrica; este se llevó a cabo en tres etapas: desinfección, multiplicación y enraizamiento. Durante estas etapas se plantearon dos alternativas por cada método aplicadas a muestras independientes; estas alternativas fueron evaluadas estadísticamente con el fin de determinar en cuál se obtuvieron mejores resultados, esto se realizó a través de pruebas de hipótesis para comparación de medias a través del software estadístico JASP 0.18.30. Para la desinfección no se obtuvo diferencias significativas entre las medias de los métodos, es decir, el uso de hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempos de exposición no genera diferencias considerables entre ambos métodos. Por otra parte, en los medios de multiplicación se obtuvo una diferencia significativa en el medio M2 debido a la adición de reguladores de crecimiento. Por último, en la etapa de enraizamiento se evaluaron dos medios que diferían entre ellos por la presencia de reguladores de crecimiento; se tomaron como variable de respuesta el número y largo de los tallos, hojas y raíces, dando como resultado que, los explantes provenientes de un medio de multiplicación suplementado con reguladores de crecimiento y, que posteriormente durante la etapa de enraizamiento fueron transferidos a un medio sin reguladores, presentaron significativamente una mayor cantidad de raíces.

Palabras clave: propagación *in vitro*, *Musa acuminata* AAA, desinfección, multiplicación, enraizamiento.

Abstract

The banana is one of the most important food crops worldwide due to its low cost and high nutritional content. However, it is affected by various pests and diseases that make large-scale production difficult. Consequently, to address these challenges, various methods have emerged to optimize the banana multiplication process, among which micropropagation stands out. This process consists of *in vitro* cultivation, under controlled phytosanitary conditions, of clones of an elite plant in media supplemented with growth regulators, which allow for a high multiplication coefficient and a rooting stage more in line with the established requirements. The objective of the present project was to standardize the protocol for *in vitro* propagation of the Gros Michel banana variety (*Musa acuminata* AAA) in the facilities of the biofactory; this was carried out in three stages: disinfection, multiplication, and rooting. During these stages, two alternatives were proposed for each method applied to independent samples; these alternatives were statistically evaluated to determine which one obtained better results, this was done through hypothesis tests for comparison of means through the statistical software JASP 0.18.30. For disinfection, no significant differences were obtained between the means of the methods, that is, the use of sodium hypochlorite at different concentrations and exposure times does not generate considerable differences between the two methods. On the other hand, in the multiplication media, a significant difference was obtained in the M2 medium due to the addition of growth regulators. Finally, in the rooting stage, two media were evaluated that differed from each other by the presence of growth regulators; the number and length of stems, leaves, and roots were taken as the response variable, resulting in the explants from a multiplication medium supplemented with growth regulators and subsequently transferred to a medium without regulators during the rooting stage, presenting significantly more roots.

Keywords: *in vitro* propagation, *Musa acuminata* AAA, disinfection, multiplication, rooting.

Introducción

La palabra “biofábrica” es cada vez más frecuente entre agricultores del mundo, esto se debe a la búsqueda de prácticas agrícolas alternas para impulsar dinámicas de productividad sostenibles e innovadoras, que aporten al desarrollo socio-económico del país y a la conservación y cuidado de todas las formas de vida como respuesta a los desafíos globales (Palacio & Herrera, 2022). Una biofábrica es una instalación para la producción a escala comercial de diferentes especies vegetales mediante técnicas basadas en el cultivo *in vitro* que incorporan mejoras tecnológicas y sistemas de propagación semiautomatizados de última generación; en la cual el equipamiento dispuesto, el flujo productivo y las características mismas de la infraestructura, la convierten en una iniciativa versátil, capaz de dar respuesta oportuna a diferentes solicitudes comerciales al mismo tiempo (Restrepo, 2019).

Con base en la importancia y el aporte de esta, la Universidad de Antioquia (UdeA) ha reactivado operaciones en la biofábrica que se encuentra ubicada en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la misma universidad. En esta biofábrica de plantas, opera la empresa FASPLAN S.A.S., la cual es una empresa del oriente antioqueño que contribuye a la propagación *in vitro* de múltiples especies vegetales, a través de la estandarización y desarrollo de procesos biotecnológicos que satisfacen las necesidades del sector (Fasplan, 2021); por ello, debe estar a la vanguardia de las tecnologías emergentes y a su vez, ofrecer un amplio catálogo de productos a sus clientes, entre los cuales se ha identificado el banano de la variedad Gros Michel. Para contar con este catálogo, es necesario realizar la estandarización de los diversos procesos llevados a cabo con cada especie, puesto que permite asegurar no solo la calidad del producto por medio de las etapas validadas, sino también a evitar la variabilidad genética obteniendo siempre clones que generen los productos con las características deseadas.

El banano pertenece a la familia de las musáceas (*Musa spp.*), y representa uno de los cultivos más importantes en el mundo entero (Equenique & Mamani, 2021). En términos de valor bruto de la producción, el banano es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. Este fruto es un alimento básico que contribuye a la seguridad alimentaria de miles de millones de personas en gran parte del mundo en desarrollo, y dada su comercialización en mercados locales, proporciona ingresos y empleo a las poblaciones rurales. Este cultivo se ve seriamente afectado por las grandes pérdidas asociadas a la gran diversidad y

voracidad de plagas y enfermedades que dañan seriamente las producciones de banano; entre ellos los ácaros, insectos, nematodos y microorganismos fitopatógenos de variados orígenes, productores de las peores enfermedades de los cultivos agrícolas como Moko bacteriano, Sigatoka negra y Mal de Panamá, las cuales provocan numerosas pérdidas en todos los países productores de banano y plátano. Como resultado, es conveniente buscar métodos alternativos de multiplicación del banano que permitan reducir de forma considerable las posibilidades de contraer infecciones en la etapa de reproducción y crecimiento (Quispe, 2019).

Aunque existen numerosas investigaciones para el género *Musa*, la mayor parte estas se han enfocado en mejorar la calidad de la fruta, la condición de enanismo y la resistencia del germoplasma a las enfermedades ya mencionadas. Sin embargo, es de gran importancia realizar investigaciones que, además procuren mantener las características de las variedades o clones. La propagación de estas plantas se realiza comúnmente por vía vegetativa; en este tipo de propagación se utilizan las yemas que surgen alrededor de la corona del cormo, brotes jóvenes llamados “puyones” o hijuelos que salen de la base del “tronco” principal. El uso de este tipo de propágulos facilita la diseminación y establecimiento de plagas y enfermedades que reducen significativamente la producción y rentabilidad del cultivo, por lo tanto, la identificación y reproducción de clones resistentes o tolerantes a las enfermedades es de suma importancia para la conservación de la especie (Castañeda, 2023). Dentro de las desventajas de este método se encuentra que, depende en gran medida de la capacidad de la planta para producir hijuelos, lo cual limita la cantidad y tiempo necesario para la producción debido a que su tasa de multiplicación es relativamente baja.

Una alternativa más reciente que busca solucionar esta desventaja es una técnica de la biotecnología conocida como micropropagación o propagación in vitro, la cual busca mejorar la calidad del material vegetal de partida garantizando que las características específicas de una planta dada sean perpetuadas en forma idéntica de una generación a otra con una velocidad de crecimiento mayor y con adecuadas condiciones fitosanitarias (Quispe, 2019). Esto debido a que, esta herramienta aprovecha la capacidad que tiene la célula vegetal nucleada de desarrollar un nuevo individuo, dando lugar directamente a órganos o embriones somáticos, permitiendo así, la propagación masiva de muchas especies vegetales, libre de enfermedades (Equenique & Mamani, 2021).

Dentro de las etapas del cultivo *in vitro*, existen muchos factores que determinan el éxito de la propagación, entre ellos el estado fisiológico del material de partida, su genética, el proceso de desinfección, la presencia de reguladores de crecimiento en las diferentes etapas, las condiciones ambientales, la tasa de multiplicación, los estándares de procesos de cultivo de tejidos en cada instalación específica, entre otros. Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo de esta investigación se centró en la identificación de las diferentes condiciones fisicoquímicas que podrían beneficiar el proceso de propagación *in vitro* del banano Gros Michel durante la etapa de introducción, multiplicación y enraizamiento, con el fin de estandarizar el protocolo de propagación *in vitro* en las instalaciones de FASPLAN S.A.S (Sede de desarrollo Tecnológico e Innovación de la UdeA).

1 Planteamiento del problema

Colombia cuenta con una economía rica y diversa, integrada por regiones e industrias que desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo del país. Según el Departamento Administrativo de Estadística (DANE), la economía colombiana creció significativamente y esto es debido a los principales sectores económicos del país que han logrado establecer su presencia en nuevos mercados por medio de las exportaciones, tales como el café, el plátano, el banano y las flores. Para el año 2022, se exportaron 149.800 toneladas netas de banano, por lo cual el suministro de estos productos es de vital importancia para el bienestar y desarrollo del país (ANALDEX, 2022). El continuo crecimiento de la demanda de estos productos obliga a contar con una disponibilidad permanente y para lograrlo, los productores requieren grandes producciones libres de enfermedades y así, disminuir las pérdidas asociadas a las plagas y tiempos de cosecha (Cámara de Comercio de Bogotá, 2023).

Teniendo en cuenta este tipo de inconvenientes existentes en la agricultura colombiana, la empresa FASPLAN tiene entre sus objetivos principales, desarrollar un amplio portafolio de plantas élite libres de enfermedades que sirvan como material vegetal de partida para diversos cultivos agrícolas que cumplan con las condiciones fitosanitarias exigidas para su exportación. En consecuencia, la empresa actualmente ha desarrollado innovaciones biotecnológicas para ofrecer diversos productos como crisantemo, rosas, claveles, piña, papa, entre otros.

Adicionalmente, teniendo en cuenta la demanda de plantas de banano en la zona y en el país, FASPLAN ha identificado la necesidad de estandarizar en sus instalaciones, un protocolo de propagación in vitro que permita obtener plantas de banano de forma masiva y comercial, libres de fitopatógenos manteniendo las características genéticas, fenotípicas y fitosanitarias exigidas por el mercado. Para esto, es necesario establecer que, aunque el cultivo de tejidos vegetales (CTV) ofrece numerosas ventajas, esta tecnología tiene algunas limitaciones asociadas a que, los meristemas pueden depender en gran medida de la proporción de las citoquininas: giberelinas, teniendo influencia en la supervivencia de las plantas durante la aclimatación. Además, existen varios factores que producen variaciones somaclonales durante el cultivo in vitro como lo es el crecimiento meristemático desorganizado, la composición del medio de cultivo, la concentración de los reguladores de crecimiento de las plantas y el tipo de fuentes de los explantes. En consecuencia, la estabilidad genética in vitro depende de las especies y los métodos utilizados, es

por ello que las técnicas a emplear y los protocolos son específicos para cada laboratorio (García R. , Quiroz, Carrasco, & Caligari, 2010). Adicionalmente, obtener un producto de origen biotecnológico requiere personal capacitado que pueda llevar a cabo los pasos definidos durante la estandarización evaluada; de allí que, FASPLAN, invierta recursos en la evaluación e implementación de protocolos que permitan ampliar su portafolio.

1.1 Antecedentes

Las investigaciones en el CTV con banano han avanzado significativamente en las últimas décadas, destacándose como una técnica esencial para la propagación masiva y la conservación de variedades de banano. Estudios previos han explorado diferentes métodos de cultivo in vitro, incluyendo la micropropagación o la regeneración de plantas a partir de explantes como meristemos y hojas. Estos trabajos han demostrado la eficacia del cultivo de tejidos para superar desafíos como las enfermedades y las limitaciones genéticas, permitiendo una producción más eficiente y sostenible. Además, se ha investigado el uso de reguladores de crecimiento y condiciones óptimas de cultivo para mejorar la tasa de éxito en la regeneración y el desarrollo de plantas de banano sanas y vigorosas.

1.1.1 Desinfección

Los métodos para desinfectar explantes de banano varían entre laboratorios, en donde se han empleado diferentes reactivos y frecuencias. Para este proceso, se ha referenciado en diferentes investigaciones que es esencial lavar con agua y jabón, usar agua destilada estéril y desinfectantes. Adicionalmente, se ha observado que el hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes más efectivos, en comparación con el cloruro de mercurio. El surfactante Tween 20 u 80 también se utiliza con frecuencia, ya que mejora el contacto del desinfectante con el explante. Además, se reporta el uso de ácido cítrico para prevenir o reducir la oxidación causada por los fenoles que las musáceas secretan al ser cortadas (Carrión, 2020). Se destaca el trabajo de los autores:

- Martínez et al. (2008) usando banano variedad Maqueño, realizaron una comparación de varios métodos de desinfección cambiando la cantidad de cloro y cloruro de mercurio. Estos

autores obtuvieron un 100% de explantes sanos con una solución de 20% de cloro durante 20 minutos y de 0,1% de cloruro de mercurio durante 10 minutos.

- Medina et al. (2015) utilizaron plátano bocadillo del Chocó o variedad Simmonds realizando una desinfección de 10 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 5,5% y otra desinfección de 20 minutos en solución al 3%.
- López (2016) obtuvo 100% de los explantes AAB variedad Barraganete libres de patógenos con una inmersión de 45 minutos en una solución al 20% de hipoclorito de sodio y 2 lavados con agua y jabón.
- Ubilla Navarro (2016) utilizando variedades Williams y Gros Michel de Banano, realizó un lavado con agua y jabón suave por un minuto, luego los sumergió en una solución de cloro comercial al 0.5% v/v (NaOCl 4.72% de ingrediente activo) durante 15 minutos y agregó dos gotas de Tween 80 por cada 100 mL de solución desinfectante de alcohol sumergiendo los cormos durante otros 15 minutos.
- Por último, Mamani (2022) Comparó los métodos de Medina et al. (2015) y Ubilla Navarro (2016) en banano variedad Grand Naine y concluyó que el método de desinfección de este último autor fue el mejor desinfectante para hongos, mientras que el de Medina funcionó mejor para reducir la contaminación bacteriana y la oxidación fenólica.

Con estas y otras investigaciones ha sido posible tener aproximaciones a las mejores técnicas de desinfección de explantes durante el CTV de banano. Sin embargo, aunque existen numerosas investigaciones sobre la desinfección de explantes en banano, las variaciones en las condiciones ambientales, la aparición de nuevas enfermedades y la necesidad de optimizar la eficiencia del proceso subrayan la importancia de continuar desarrollando investigaciones que pueden contribuir a perfeccionar las técnicas existentes, asegurando una mayor tasa de éxito en la desinfección y el cultivo de explantes de esta especie.

1.1.2 Multiplicación

El estudio de la multiplicación in vitro de *Musa acuminata* empezó en China y Taiwán en los años setenta en cultivos de la familia AAA. Para la década de los ochenta, la disponibilidad de banano en el mercado aumentó considerablemente gracias a esta técnica (Galán, y otros, 2018).

La multiplicación de banano por cultivo de tejidos es una técnica avanzada que permite la producción masiva de plantas sanas y uniformes. Comúnmente, este proceso implica la selección de material vegetal de alta calidad, que se desinfecta y se cultiva en medios nutritivos como el medio Murashige y Skoog (MS), enriquecido con reguladores de crecimiento como la bencilaminopurina (BAP) y la kinetina para la inducción de brotes, y el ácido indolacético (AIA) o el ácido naftalenacético (ANA) para la formación de raíces. Bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, se generan brotes que se desarrollan en plántulas completas, libres de enfermedades y plagas. Entre los estudios que se han realizado acerca de la multiplicación del banano se destacan:

- Krikorian y Cronauer (1983) desarrollaron un medio de cultivo para el mejoramiento aséptico de banano y plátano que se sigue utilizando hasta la fecha y que consiste en el uso de un medio basal de Murashige y Skoog modificado y suplementado con 6- BAP y sacarosa.
- Martínez et al. (2008) utilizaron un medio similar al de Krikorian y Cronauer para la multiplicación, pero con AIA en vez de sacarosa y de la cual obtuvieron un coeficiente de multiplicación (CM) de 2,5 en el banano variedad Maqueño.
- López (2016) realizó varios medios de cultivo obteniendo la mejor producción de biomasa con el medio Murashige y Skoog modificado y suplementado con 6 mg/L de BAP, 13.95 mg/L de ANA y 30 g/L de sacarosa.
- Ubilla Navarro (2016) utilizando el medio de Krikorian y Cronauer (1983) obtuvo un CM de 3,11 en banano variedad Gros Michel.
- Mamani-Sánchez (2021) realizó una comparación de varios métodos de multiplicación, donde el mejor resultado se obtuvo con el medio basal de Murashige y Skoog enriquecido con BAP en donde el plátano variedad gran enano presentó un CM de 8.

1.1.3 Enraizamiento

La etapa de enraizamiento es el proceso de inducción de la formación de raíces con el objetivo de desarrollar una planta completa. Una vez se obtienen los brotes en la fase de multiplicación, es fundamental inducir el enraizamiento (Carrión, 2020). Las plántulas deben permanecer aproximadamente 30 días para lograr una proporción adecuada de raíz y follaje. Se

estima que cada brote puede generar un promedio de siete raíces con una longitud de 10 cm y una abundancia de pelos absorbentes, características que mejorarán la calidad de las plantas al iniciar su adaptación a condiciones ex vitro (García, Reyes , Zayas , & Destrade, 2015). En general, los autores han tomado los mismos medios de multiplicación como medios de enraizamiento y en algunos otros casos se cambian las citoquininas por auxinas, tal como los siguientes trabajos realizados:

- Florio et al. (2010) emplearon el mismo medio MS utilizado en etapas previas, pero sin citocininas y con la adición de auxinas.
- Velasco (2011) obtuvo mejores resultados de longitud y cantidad de raíces en el enraizamiento de plátano macho y banano variedad Gran Enano en un medio de cultivo que contenía 2.5 mg/L de BAP y agua de coco (10-30%) que en medio de cultivo sin agua de coco.
- Medina et al. (2015) realizaron el enraizamiento in vitro de *Musa acuminata* variedad Simmonds en el mismo medio de proliferación (medio basal de Murashige y Skoog con los reguladores BAP y ANA), dando como resultado raíces vigorosas que facilitaron su trasplante a suelo.

2 Justificación

La micropropagación es una técnica de cultivo de tejidos que ofrece numerosas ventajas sobre la propagación convencional. Esta técnica permite una gran y rápida producción de plantas a partir de una pequeña cantidad de material vegetal, como un solo brote o una yema. Esto es útil para la propagación de plantas difíciles de multiplicar por métodos convencionales. Además, por medio de la micropropagación se puede controlar con precisión, la calidad y uniformidad de las plantas. Las condiciones de cultivo son ajustadas meticulosamente, lo que resulta en plantas genéticamente idénticas en términos de características deseables como resistencia a las enfermedades (Beyl & Trigiano, 2017).

Adicionalmente, con la micropropagación es posible obtener un gran número de plantas en un corto período de tiempo, facilitando la rápida expansión de cultivos comerciales o la recuperación de especies en peligro de extinción, libre de fitopatógenos, garantizando la sanidad en los cultivos (Arditti & , 2009). De esta forma, la micropropagación ofrece ventajas significativas en términos de eficiencia, control y calidad, lo que la convierte en la mejor alternativa biotecnológica para responder a la demanda agrícola que actualmente tiene la empresa FASPLAN.

Sumado a ello, aunque ya existen numerosas investigaciones sobre la propagación in vitro de banano, es imperativo realizar nuevas exploraciones que permitan estandarizar los procesos en cada laboratorio. Las condiciones ambientales específicas, como la temperatura, la humedad y la calidad del agua, varían de un lugar a otro y pueden afectar significativamente el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Además, los medios de cultivo y las concentraciones de los reguladores deben ajustarse a las particularidades de cada laboratorio para asegurar la máxima eficiencia y uniformidad en la producción de plantas. Por lo tanto, la investigación continua es esencial para perfeccionar estas técnicas y garantizar su éxito en diversas condiciones.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar los requerimientos del Banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA) durante la estandarización del protocolo de propagación in vitro en la empresa Fasplan S.A.S

3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo de desinfección durante la introducción in vitro del banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA) para evitar la contaminación por microorganismos.
- Evaluar dos medios de cultivo para la etapa de multiplicación in vitro del banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA) basado en el CM.
- Determinar el medio propicio para la etapa de enraizamiento del banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA) que posibilite la formación de raíces.

4 Marco teórico

Dentro de la familia de las Musáceas, el género *Musa* ha adquirido importancia en la alimentación humana a nivel mundial; de él derivan dos tipos específicos: los plátanos de cocción ('cooking bananas') y los bananos que se consumen crudos ('dessert bananas'). Las teorías sobre el origen indomalayo de estos cultivares se remontan a los estudios de Kurt en 1865, y hoy ha sido ampliamente demostrado que todos los bananos y plátanos comestibles se derivan de dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla (*M. cavendishii* Lamb ex. Paxt.) y *Musa balbisiana* Colla. Actualmente, los sistemas de clasificación generalmente aceptados se basan en los trabajos de Simmonds y Shephard quienes desde 1956, establecieron calificaciones para identificar los aportes genómicos provenientes de las especies *M. acuminata* (genoma A) y *M. balbisiana* (genoma B). Los clones triploides, mucho más numerosos que los diploides y tetraploides, se designan con los siguientes códigos: AAA, para bananos con muy bajo contenido de almidones y mayor contenido de azúcares; AAB, para plátanos de cocción del tipo hartón con dominancia 'acuminata'; y ABB, para plátanos con dominancia 'balbisiana', llamados también 'cuatro filos' en algunos países de América tropical, con alto contenido de almidones y bajo contenido de azúcares (Castañeda, 2023). Las harinas y los almidones, son fuentes alimenticias importantes en África y Centro y Suramérica, donde la producción de banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA) se cultiva en áreas extensas lo cual beneficia a las poblaciones por la disponibilidad para el consumo y la generación de ingresos al exportar un banano apetecido por sus características (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004) (Lucas, Montoya, & Quintero, 2014).

El banano tradicionalmente se propaga de forma vegetativa por cormos, estos son separados de la planta principal para la respectiva siembra en campo. Sin embargo, esta técnica es menos efectiva ya que la tasa de multiplicación es muy baja. Adicionalmente, con la propagación vegetativa por cormos se puede presentar un aumento en la incidencia de plagas y enfermedades que pueden propagarse entre plantaciones. Según el DANE, las plantas de banano sufren de diversas enfermedades y plagas que afectan los rendimientos del cultivo, como por ejemplo: el moko o maduraviche causado por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, pudrición acuosa del pseudotallo causado por la bacteria *Dickeya chrysanthemi*, mal de Panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum*, Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, picudo negro o gorgojo del plátano los cuales son unos escarabajos (*Cosmopolites sordidus*) que se alimentan y

desarrollan cepas dentro del cormo formando túneles que debilitan la planta, los nemátodos *Radopholus similis* y *Helicotylenchus multicintus*, los cuales son unos fitoparásitos que se alimentan de las raíces y los cormos del banano y finalmente, la mosca blanca espiral del plátano y el banano (*Aleurodicus floccissimus*) la cual se alimenta de la savia de la planta, perdiendo su capacidad fotosintética y generando la muerte de las hojas (DANE, 2016).

Con base en los diferentes problemas que pueden observarse en los cultivos agrícolas con el uso de métodos convencionales de propagación, los investigadores han diseñado estrategias biotecnológicas como el CTV. Esta técnica, permite el crecimiento y multiplicación de células, tejidos y órganos vegetales en un medio nutritivo bajo condiciones asépticas y controladas. Las técnicas de cultivos de tejidos se han mejorado y perfeccionado durante varias décadas lo que permite la propagación in vitro de especies de una manera más rápida y eficiente (Cancado, y otros, 2013).

El CTV se basa en la totipotencialidad celular, capacidad que tienen las células vegetales para generar un nuevo organismo, idéntico al que le dio origen. Una de las técnicas utilizada en el cultivo de tejidos para la obtención de plantas de calidad a gran escala de forma rápida y eficiente es la micropropagación in vitro; la cual significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial (Castillo, 2004). Esta técnica consiste en el cultivo aséptico de porciones de tejido (explantes) extraídos de una planta. Para esto, se pueden utilizar órganos enteros o porciones (embriones, yemas, hojas, raíces y flores), así como tejidos, callos o incluso protoplastos (células vegetales sin pared celular) (Cancado, y otros, 2013). Las etapas para el desarrollo de la micropropagación pueden variar, pero generalmente abarcan cinco etapas definidas a continuación:

Etapas 0: Selección y preparación de la planta madre

La selección del material de propagación es el primer paso para iniciar la siembra de este cultivo. En el caso del banano, usualmente son utilizados rebrotes provenientes del deshije, se deben utilizar los retornos sanos y de buen tamaño, con características deseables. Para su utilización es necesario ubicar e identificar las yemas presentes en el cormo, lo cual permitirá que el sistema sea altamente eficiente (Alvarado, 2019).

Etapas 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas

Esta etapa es crítica, debido a que, es el material de partida para la propagación. En esta fase, se debe buscar eliminar microorganismos contaminantes que se encuentren en la superficie de los tejidos con agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y el jabón neutro, sin afectar la integridad del explante y su viabilidad. La desinfección se realiza debido a que el material vegetal (cormos) se encuentra enterrado en el suelo y están expuestos a microorganismos patogénicos (Mamani, Nova, & Bosque, 2021). Para la propagación in vitro del banano, se recomienda utilizar meristemas, que son tejidos indiferenciados que pueden originar otros tejidos y órganos (Real Academia Española, 2024), puesto que de esta forma se garantiza un desarrollo uniforme entre las plantas al ser sometidas a condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y nutrientes, a diferencia de lo que ocurre en campo, donde se observa un desarrollo irregular o desigual entre las plantas (Quispe, 2019).

Etapa 2: Introducción in vitro del material seleccionado

Luego de la desinfección, el explante se siembra en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro (Mamani Q. , 2022). En este medio de cultivo estéril, se utilizan reguladores de crecimiento como citoquininas las cuales estimulan la división celular, promoviendo la formación de nuevas plantas (Agroactivocol, 2020).

Etapa 3: Multiplicación de brotes

En esta etapa se realiza la propagación masiva de brotes a partir de los explantes establecidos con el fin de mantener y aumentar el número de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación. En este proceso de organogénesis están involucrados una serie de factores tales como los ingredientes que forman parte del medio de cultivo, reguladores de crecimiento, sustancias propias de la planta y condiciones ambientales (Mamani Q. , 2022). Vega et al., (2016) mencionaron que, uno de los reguladores de crecimiento comúnmente utilizado es el AIA o ácido indol-3-Acético, el cual es un regulador que estimula el crecimiento como respuesta a la luz. En esta fase, la capacidad de multiplicarse se evalúa por medio del CM, el cual nos permite definir el mejor medio para aumentar el número de brotes (Díaz & Castro, 2011). El CM se calcula usando la ecuación 1.

$$CM = \frac{EF}{EI} \quad (1)$$

Donde:

CM: Coeficiente de multiplicación.

EF: Número de explantes final.

EI: Número de explantes inicial.

Etapa 4: Enraizamiento

Esta etapa tiene la finalidad de que las plantas desarrollen su sistema radicular y con ello, prepararlas para su restablecimiento a condiciones ex vitro. Los brotes que tengan un tamaño aproximado de 2cm, son separados individualmente y colocados en un medio de enraizamiento para posibilitar la obtención de plantas completas. Según Mamani (2022), en esta etapa se suprime el BAP en el medio de cultivo ya que la emisión radicular es espontánea, obteniéndose una planta completa en un período de 25 a 30 días.

Etapa 5: Aclimatación

Las plantas producidas por la técnica del CTV se desarrollan en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) poco funcionales frente a descensos de la humedad relativa, por lo que son poco efectivos para evitar la desecación del explante. Adicionalmente, estas plantas tienen una baja capacidad fotosintética o a veces nula, debido a que se les proporciona una gran cantidad de azúcares durante su crecimiento; es por ello por lo que, la etapa de aclimatación ex vitro es esencial para la supervivencia de las plantas en campo. Esta fase permite que las plantas terminen de formar completamente las estomas facilitando el intercambio gaseoso y la capacidad fotosintética para que ellas puedan adaptarse y vivir en condiciones naturales (Castillo, 2004)

5 Metodología

El proyecto fue desarrollado en la empresa FASPLAN S.A.S ubicada en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la UdeA, la cual está localizada en la vereda Quirama, perteneciente al municipio de El Carmen de Viboral.

5.1 Preparación del material vegetal

El material de partida con el que se trabajó fue la variedad de banano Gros Michel perteneciente a un cliente de la empresa, el cual se encargó de seleccionar cormos de plantas élites, que se distinguen por sus características agronómicas y comerciales de interés. Posteriormente, se revisaron los cormos con el objetivo de verificar el estado y la viabilidad de estos, se rotularon las muestras y se removieron las vainas foliares del pseudotallo y los tejidos blancos de la base, hasta obtener un corno de aproximadamente 1 cm de longitud, que contenía el meristemo central y aproximadamente 2 cm de la base (Figura 1).

Figura 1

Preparación del material vegetal, primera parte. (a) Revisión de los cormos, (b) rotulación de las muestras, (c) retiro de hojas y tejidos externos.

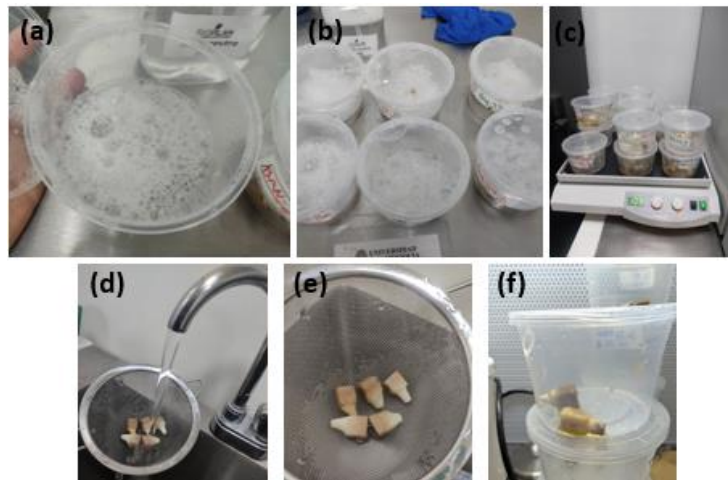


Una vez finalizado el proceso anteriormente descrito, se realizó un lavado superficial al material con una solución de agua corriente y jabón neutro a razón de 5 cm³/L durante 5 min a 100 RPM. Pasados los 5 min, se enjuagó con agua corriente hasta eliminar completamente la espuma. Posteriormente, se realizó un segundo lavado adicionando una solución de agua corriente con yodo

metálico a razón de $1\text{cm}^3/\text{L}$ hasta cubrir los cormos y se agitaron durante 5 min. Pasado este tiempo, se realizó un enjuague con agua corriente para retirar el exceso de yodo (Figura 2).

Figura 2

Preparación del material vegetal, segunda parte. (a) y (b) enjuague con jabón neutro, (c) agitación de los cormos con solución de yodo, (d) y (e) enjuague con agua corriente y (f) almacenamiento de los cormos.



5.2 Desinfección

Una vez finalizado el lavado de los cormos y, con el fin de evaluar cual metodología se debe desarrollar en el proceso de desinfección dentro de la biofábrica, se procedió a realizar en cabina de flujo laminar dos métodos de desinfección superficial de los explantes, los cuales se describen a continuación:

Tabla 1

Pasos de los métodos de desinfección

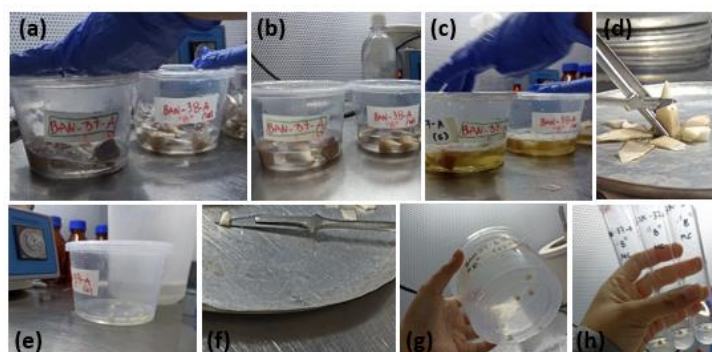
PASOS \ MÉTODO	MÉTODO A	MÉTODO B
Adición de etanol al 70% hasta cubrir los cormos completamente durante 1 min.	Sí	Sí

Enjuague con desionizada estéril hasta cubrir completamente los cormos durante 3 min.	Sí	Sí
Desinfección con hipoclorito de sodio al 1% + Tween 20 durante 5 min a 100 RPM.	Sí	Sí
Se realizan tres enjuagues con agua desionizada estéril para eliminar los residuos de espuma e hipoclorito de sodio.	Sí	Sí
Primer retiro de los tejidos externos o vainas foliares hasta extraer el meristemo con un tamaño distinto para cada método.	1 mm	3mm
Segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 0.5% + Tween 20 durante 1 min a 100 RPM.	No	Sí
Enjuague con agua desionizada estéril hasta eliminar completamente el residuo de hipoclorito.	No	Sí
Segundo retiro de los tejidos externos o vainas foliares hasta extraer el meristemo con un tamaño distinto para cada método	No	1 mm

Finalmente, los explantes fueron sembrados en el medio de introducción previamente estandarizado por los técnicos de la empresa (Figura 3).

Figura 3

Preparación del material vegetal, tercera parte. (a) Enjuague con etanol al 70%, (b) y (g) Enjuague con agua desionizada estéril, (c) y (e) Enjuague con hipoclorito + Tween 20, (d) y (f) Retiro de tejido de las vainas foliares, (h) Siembra de meristemos.



Una vez se ejecutaron los métodos de desinfección anteriormente descritos, los tubos con las respectivas siembras fueron almacenados en condiciones de oscuridad durante 15 días a temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se le realizó seguimiento semanal. Para finalizar esta etapa, los tubos fueron llevados a cámara de crecimiento en donde estuvieron durante 15 días adicionales expuestos a fotoperiodo de aproximadamente 10 horas luz y 14 horas de oscuridad a una temperatura promedio de $27^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$. Luego de esta etapa, se procedieron a sembrar los explantes viables en los medios de multiplicación.

Posterior a la fase de introducción, y con el fin de identificar pérdidas por contaminación microbiana, necrosis y viabilidad de los explantes, se revisaron y clasificaron de la siguiente forma:

- Contaminado: aquellos en donde se evidenció la presencia de contaminación microbiana.
- Sobreviviente: aquellos que no se necrosaron y presentaron tejido viable, con contaminación microbiana o no.
- Viable: aquellos que no se necrosaron, con tejido viable y no presentaron contaminación microbiana.

Para el proceso de desinfección fueron analizadas las variables de respuesta: porcentaje de contaminación, porcentaje de supervivencia y porcentaje de explantes viables (Mamani Q. , 2022):

El porcentaje de contaminación dado por la ecuación 2:

$$PC(\%) = \frac{EC}{ET} \cdot 100 \quad (2)$$

Donde:

PC: Porcentaje de contaminación.

EC: explantes contaminados.

ET: explantes totales

El porcentaje de supervivencia o los sobrevivientes cumple la ecuación 3:

$$PS(\%) = \frac{ES}{ET} \cdot 100 \quad (3)$$

Donde:

PS: Porcentaje de supervivencia.

ES: Explantes supervivientes.

ET: Explantes totales

El porcentaje de supervivencia sin contaminación o viables se calcula por la ecuación 4:

$$PSC(\%) = \frac{ESC}{ET} \cdot 100 \quad (4)$$

Donde:

PSC: Porcentaje de supervivencia sin contaminación.

ESC: Explantes supervivientes sin contaminación.

ET: Explantes totales

El análisis estadístico consistió en determinar el porcentaje de supervivencia sin contaminación o viables para cada uno de los métodos usando la ecuación 3. Luego, en el software estadístico JASP 0.18.30, se ingresaron los valores correspondientes a las 30 muestras obtenidas tras la preparación del material vegetal. Se realizó un análisis estadístico para las 15 muestras de cada uno de los métodos, asignando el valor 0 a las muestras contaminadas y el valor 1 a las viables. Esto se realizó debido a que, el principal interés al evaluar los métodos de desinfección fue identificar aquellos explantes que no se contaminaron, garantizando la validez del método y su viabilidad para uso en fases posteriores. De esta forma, se aplicó una prueba no paramétrica U de Mann Whitney para datos ordinales con distribución sin normalidad para la igualdad de medias, formulando las hipótesis nula y alternativa correspondientes.

- H_0 : La cantidad promedio de explantes viables del método A es igual a la cantidad promedio del método B.
- H_a : La cantidad promedio de explantes viables del método A es diferente a la cantidad promedio del método B.

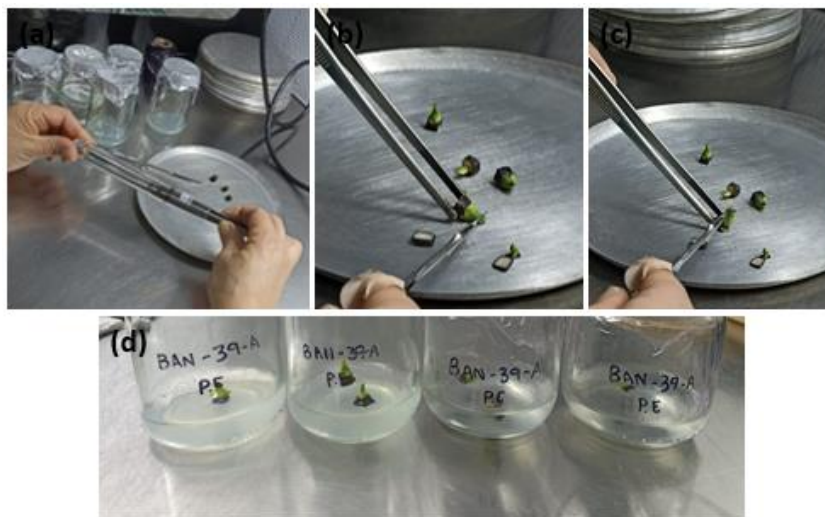
5.3 Multiplicación in vitro

Con el fin de suplementar los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo de las plantas y así, aumentar el CM, se diseñaron dos medios de cultivo diferentes denominados M1 y M2 en los cuales se sembraron los explantes viables que fueron obtenidos durante la introducción in vitro (24 explantes), con un total de 12 explantes sembrados en cada medio de cultivo. Los pasos llevados a cabo durante la primera multiplicación se describen a continuación:

- 1) Dentro de la cabina de flujo laminar, se procedió a retirar los explantes viables que se encontraban en los tubos de ensayo que contenían el medio de introducción in vitro
- 2) Se realizaron cortes superficiales a los explantes para retirar las partes oxidadas o necrosadas.
- 3) Finalmente, fueron sembrados los explantes en el medio de multiplicación correspondiente (Figura 4).

Figura 4

Primera fase de multiplicación. (a) Retiro de los explantes viables de los tubos de ensayo con medio de introducción in vitro, (b) y (c) limpieza de los explantes, (d) Siembra en medios de multiplicación M1 y M2 durante el subcultivo 1 o transferencia de explantes.



Subcultivos

El primer subcultivo también llamado de transferencia de explantes, fue realizado pasados los 15 días posteriores al periodo de luz. Posteriormente, a los 27 días de esto, fue realizado un segundo subcultivo con el fin de mejorar el desarrollo de las plantas durante las condiciones in vitro y aumentar los coeficientes de multiplicación. Los pasos desarrollados durante cada subcultivo se describen a continuación:

- 1) Fueron identificados aquellos explantes viables o con tejidos saludables.
- 2) Luego, se identificó la presencia o no de nuevos brotes, los cuales fueron separados e individualizados.
- 3) Con ayuda de pinzas y bisturí estéril, se procedió a retirar el exceso de tejido vegetal. Posteriormente, se realizó un corte en la base de los explantes.
- 4) Estos explantes fueron transferidos para un nuevo medio de multiplicación (medio M1 o M2, según correspondiera) (Figura 5).

Figura 5

Subcultivos de la etapa de multiplicación. (a) y (d) Análisis de explantes viables medio M1 y M2, (b) y (e) retiro exceso de material, (c) y (f) siembra de los explantes en el medio M1 y M2 durante el subcultivo 2.



Posterior a esto, cada 21 días fue realizado un nuevo subcultivo con el fin de individualizar nuevos brotes y aumentar el número del CM. En total se realizaron cuatro subcultivos siguiendo los pasos descritos anteriormente, variando el número de brotes obtenidos durante cada uno.

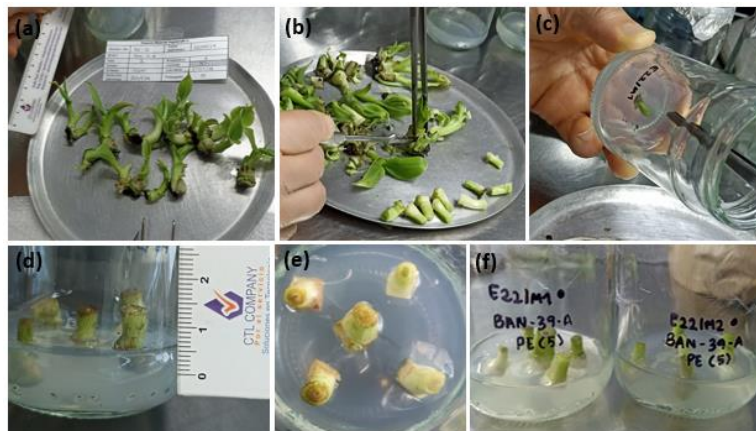
5.4 Enraizamiento

Una vez se finalizó el cuarto subcultivo, se procedió a realizar la fase de enraizamiento. Para esto, se utilizaron los explantes o brotes diferenciados y mejor desarrollados (con presencia de tallo y hojas principalmente) provenientes de los medios M1 y M2. Los explantes que no cumplían con los indicadores de calidad para el enraizamiento, fueron transferidos nuevamente para el medio M2.

Durante la siembra en la fase de enraizamiento, se retiró el exceso de hojas y raíces hasta conseguir explantes de aproximadamente 2 cm. Esto se realizó con el objetivo de obtener tamaños similares y evitar la competencia por nutrientes, garantizando que el desarrollo de los explantes no se viera afectado por este factor. Los explantes provenientes de los medios M1 y M2, fueron divididos en partes iguales para ser sembrados en los medios E22/M1 y E22/M2 respectivamente. En la Figura 6, se observan los pasos desarrollados durante esta etapa.

Figura 6

Etapa de enraizamiento. (a) Revisión de explantes diferenciados del medio M2, (b) retiro exceso de material, (c) siembra de los explantes en el medio E22/M1 y E22/M2 respectivamente, (d) y (e) verificación de tamaño de los explantes, (f) Comparación de tamaños en los medios correspondientes.



Una semana después de realizado el enraizamiento se tomaron los primeros datos de las plantas de banano, dentro de estos datos se tomaron variables como la presencia y el largo de las raíces, hojas y tallo, además, el grosor del tallo. Según la literatura, el tiempo estimado para el enraizamiento de *Musa acuminata* AAA es de 4 a 8 semanas, esto teniendo en cuenta un buen desarrollo del sistema radicular, sin embargo, el enraizamiento dentro de la biofábrica se lleva a cabo en dos semanas con el fin de evitar el crecimiento excesivo de raíces que termina en la pérdida de estas cuando se trasladan a la fase de aclimatación. Por ende, al finalizar las dos semanas, se tomaron nuevamente los datos mencionados anteriormente. Estos datos fueron introducidos en el software estadístico JASP 0.18.30 donde fueron analizados de forma descriptiva e inferencial. Las 4 variables utilizadas y su descripción fueron las siguientes:

- Raíces: Variable tipo ordinal. Número de raíces que tenía el explante. Rango desde 0 a 7.
- Hojas: Variable tipo ordinal. Número de hojas que tenía el tallo. Rango desde 0 a 3.
- Longitud/Diámetro: Variable tipo continua. Proporción entre longitud y diámetro del tallo. Valores mayores a 1.
- Volumen: Variable tipo continua. Volumen aproximado del tallo. Valores menores a 1cm³.

El análisis inferencial consistió en realizar una prueba Kruskal-Wallis para determinar si al menos uno de los 4 tratamientos utilizados durante el enraizamiento, tenía una mediana significativamente diferente del resto de los tratamientos, evaluando presencia de raíces, hojas y la proporción entre largo y diámetro del tallo. Adicionalmente, se realizó una prueba individual U de Mann Whitney por cada par de tratamientos, esto con el fin de comparar directamente la relación uno a uno. Por último, los resultados asociados al volumen aproximado del tallo en los explantes de cada tratamiento, fueron comparados mediante un gráfico de cajas y bigotes, el cual permitió evidenciar la distribución y parámetros descriptivos de cada tratamiento con mayor claridad. La convención utilizada para designar cada uno de los tratamientos fue la siguiente:

- T₁₁: Enraizamiento en medio E1 (sin reguladores de crecimiento) proveniente de multiplicación en medio M1 (sin reguladores de crecimiento).
- T₁₂: Enraizamiento en medio E1 (sin reguladores de crecimiento) proveniente de multiplicación en medio M2 (con r reguladores de crecimiento).

- T₂₁: Enraizamiento en medio E2 (con reguladores de crecimiento) proveniente de multiplicación en medio M1 (sin reguladores de crecimiento).
- T₂₂: Enraizamiento en medio E2 (con reguladores de crecimiento) proveniente de multiplicación en medio M2 (con reguladores de crecimiento).

6 Resultados

6.1 Preparación del material vegetal

Para esta investigación se contó con varias muestras del banano Gros Michel otorgadas por el cliente. Sin embargo, solo se trabajaron con 30 muestras que fueron aptas y cumplieron con los requerimientos para ser utilizadas como material de partida en el proceso de micropropagación, dicho material, no debía presentar síntomas de enfermedades ni pudrición o malos cortes que comprometieran el meristemo. Con base en esto, el material de partida utilizado fue el que se observa en la Figura 7.

Figura 7

Material de partida escogido.



El éxito de cualquier proceso de cultivo de tejidos está determinado por el empleo de un material de partida adecuado. El primer factor por evaluar es la constitución genética de la planta donante, ya que, en la mayoría de los casos, para la propagación in vitro, se selecciona como material inicial una planta élite que ha sido escogida por sus características fenotípicas especiales, las cuales, en este caso, fueron definidas por el propietario del material.

El estado fisiológico de la planta donante también es de gran influencia en la respuesta durante el CTV. Existen varios reportes científicos en donde se mencionan diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferente edad fisiológica. Para llevar a cabo esta técnica, generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo: vigoroso y sano, debido a que, la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos in vitro proviene de la planta madre. Por lo tanto, la selección y el desarrollo de plantas

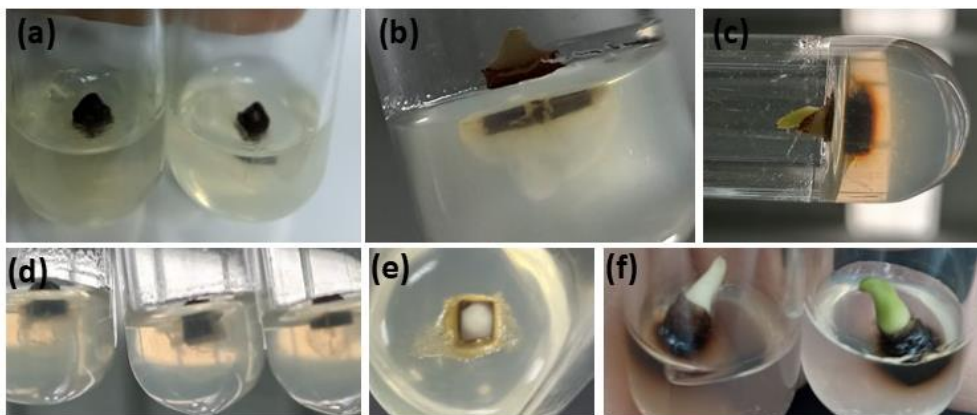
donantes bajo un buen manejo fitosanitario, reduce notablemente la contaminación, principalmente fúngica. Por ello, si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior puede deberse a otro tipo de errores que pueden reducirse con un buen protocolo de desinfección y buenas prácticas de laboratorio (Universidad Nacional de la plata [UNLP], 2017).

6.2 Desinfección

Luego del proceso de desinfección y posterior introducción, los explantes fueron analizados y clasificados como contaminado, sobreviviente o viable (Figura 8).

Figura 8

Clasificación explantes después de la etapa de desinfección. (a) y (d) explantes necrosados por bacterias, (b) y (e) explantes sobrevivientes no viables (contaminados), (c) y (f) explantes sobrevivientes viables.



En la Tabla 2, se observan los porcentajes obtenidos para cada clasificación. El porcentaje correspondiente a sobrevivientes, se calculó sobre el 100% de los explantes de partida, mientras que la columna de sobrevivientes no viables (contaminados) y sobrevivientes viables correspondió al 100% de explantes pertenecientes a los sobrevivientes. Estos últimos, correspondieron a aquellos que no presentaron necrosis ni contaminación aparente, es decir, aquellos que cumplían con las características necesarias para usarse como material de partida para la micropropagación.

A su vez, a partir de la columna de los sobrevivientes, se puede observar que del 100% de los explantes iniciales, con la desinfección utilizada en el método A, el 66.7% de los meristemos sobrevivientes se encontraban viables en comparación de aquellos desinfectados con el método B,

en donde se obtuvo un 73.3% de meristemas viables. Esto demuestra que, aunque en el método A había un mayor número de meristemas con el tejido vegetal vivo, estos no eran aptos para su propagación debido a contaminantes, sugiriendo que, el método B es más efectivo en la desinfección de cormos de banano variedad Gros Michel, permitiendo la obtención de un mayor número de explantes viables.

Tabla 2

Variables de respuesta al proceso de desinfección in vitro.

Método de desinfección	Sobrevivientes (%)	Sobrevivientes no viables (contaminados) (%)	Sobrevivientes viables (%)
A	93.3	33.3	66.7
B	80	26.7	73.3

En el software estadístico JASP 0.18.30, se ingresaron los valores correspondientes a las 30 muestras obtenidas tras la preparación del material vegetal. Se realizó un análisis estadístico para las 15 muestras de cada uno de los métodos, asignando el valor 0 a las muestras contaminadas y el valor 1 a las viables. Esto se hizo porque el principal interés al evaluar los métodos de desinfección es identificar aquellos explantes que no se contaminaron, garantizando la validez del método y su viabilidad para uso posterior. Se aplicó una prueba paramétrica t-Student para la igualdad de medias, formulando las hipótesis nula y alternativa correspondientes.

- H_0 : La cantidad promedio de explantes viables del método A es igual a la cantidad promedio del método B.
- H_a : La cantidad promedio de explantes viables del método A es diferente a la cantidad promedio del método B.

El valor-p obtenido en la prueba t-Student fue de 0.702, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluyó que no existe una diferencia significativa entre la cantidad promedio de explantes viables de ambas muestras. Sin embargo, se observa que la prueba de normalidad

presentó un valor-p menor a 0.001, sugiriendo que la distribución de las muestras no es normal, lo que incumple con uno de los supuestos necesarios para la validez de la prueba.

Posteriormente, se realizó una prueba U de Mann Whitney la cual es una prueba no paramétrica para datos ordinales con distribución sin normalidad. De esta forma, utilizando la misma formulación de las hipótesis nula y alternativa, se obtuvo un valor-p similar de 0.715 (Tabla 3), concluyendo igualmente que no existe una diferencia significativa entre la cantidad promedio de explantes viables de ambas muestras.

Tabla 3

Prueba U de Mann-Whitney de la variable explantes viables en la etapa de desinfección.

	Parámetro U	Valor - p
Respuesta	105.000	0.715

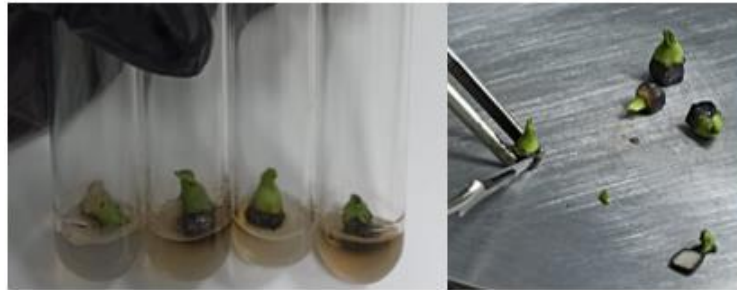
Nota: Prueba desarrollada en el software JASP 0.18.30.

6.3 Multiplicación

Durante el primer subcultivo o transferencia, fue posible la siembra de 24 explantes viables provenientes de ambos métodos, los cuales fueron homogeneizados y divididos en partes iguales y sembrados en los medios M1 y M2 correspondientemente. En este primer subcultivo no se observaron diferencias significativas, esto pudo ser debido a que todos los explantes provenían del mismo medio estándar de introducción. Además, los explantes no tenían suficiente tiempo en las condiciones in vitro, de tal manera que esto permitiese la absorción necesaria de los reguladores de crecimiento dentro de sus tejidos, afectando los coeficientes de multiplicación y el desarrollo de nuevos tejidos (Figura 9).

Figura 9

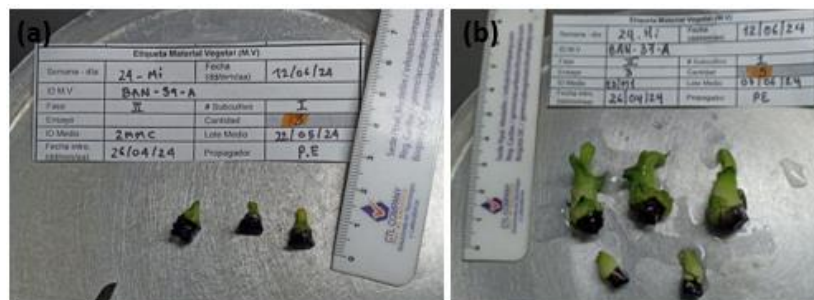
Explantos transferidos a los medios M1 y M2, respectivamente.



El segundo subcultivo se llevó a cabo a los 27 días posteriores a la transferencia. Durante este subcultivo fue identificado un menor desarrollo en el medio M1 en comparación con el medio M2, en donde se evidenció un crecimiento más rápido de los explantes. Hasta este subcultivo, ningún medio propició el crecimiento de brotes, por ende, no se calculó el CM (Figura 10).

Figura 10

Desarrollo de los explantes en el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación. (a) explantes del medio M1, (b) explantes del medio M2.



El tercer subcultivo fue realizado 21 días después del segundo subcultivo, durante este se evidenció una diferencia marcada entre el medio M1 y M2. Aunque los explantes del medio M1 aumentaron el desarrollo de hojas y la elongación del tallo, su desarrollo fue menor en comparación con los explantes del medio M2. Adicionalmente, su coloración era de un verde más oscuro, mientras que en el medio M2, los explantes aumentaron su tamaño notablemente, incrementaron el número de brotes, presentaban un mayor número de hojas y tenían una coloración verde más clara presentando un mayor grado de humedad (

Figura 11).

Figura 11

Desarrollo de los explantes en el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación. (a) y (c)

Explantes del medio M1, (b) y (d) explantes del medio M2.



Como se definió anteriormente, cada medio se evaluó por medio del CM que está dado por la ecuación 1. Los resultados obtenidos para el tercer subcultivo se presentan en la Tabla 4, donde se evidencia que en el medio M1 no se desarrollaron nuevos brotes teniéndose un CM de 1. Sin embargo, durante este subcultivo en el medio M2, fue posible la obtención de nuevos brotes dando como resultado un CM de 2.66 brotes por explante, indicando que se duplicó el número de individuos.

Tabla 4

Coefficientes de multiplicación de banano Gros Michel al tercer subcultivo en los medios M1 y M2.

Medio evaluado	Explantes iniciales	Explantes finales	CM
M1	12	12	1
M2	12	32	2.66

El cuarto y último subcultivo, se realizó a los 21 días del tercer subcultivo. Durante este, se evidenció una diferencia en los explantes de ambos medios. En el caso del medio M1, los explantes no desarrollaron brotes, sin embargo, presentaron crecimiento de raíces, hojas y elongación tallo alcanzando un tamaño aproximado de 4 cm. En el medio M2, no se evidenció presencia de raíces, sin embargo, el número de brotes aumentó en comparación con el de los subcultivos anteriores, el

crecimiento de las hojas y de los explantes fue mayor al de los anteriores subcultivos. La coloración en ambos casos fue la misma observada en el subcultivo número 3 (Figura 12).

Figura 12

Desarrollo de los explantes en el cuarto subcultivo de la etapa de multiplicación. (a) y (c) Explantes del medio M1, (b) y (d) explantes del medio M2, (e) Comparativo de raíces en los medios M1 y M2.



Durante el cuarto subcultivo la coloración entre los explantes de cada medio fue la misma que se observó en el subcultivo número 3 (Figura 12). Además, para este cuarto subcultivo también se calculó el CM. Para el caso del medio M1 se obtuvo un CM de 1, mientras que en el medio M2, se obtuvo un coeficiente de 3.125 brotes por cada explante Tabla 5.

Tabla 5

Coefficientes de multiplicación banano Gros Michel al cuarto subcultivo en los medios M1 y M2.

Medio evaluado	Explantes iniciales	Explantes finales	CM
M1	12	12	1
M2	32	100	3.125

Durante cada subcultivo se evidenció una diferencia en el estado de los explantes, las primeras hojas en el caso del medio M1, se desarrollaron a los 12 días del segundo subcultivo, mientras que en el medio M2 se desarrollaron a los 15 días del primer subcultivo. Además, también hubo una diferencia en el tiempo requerido para la correcta diferenciación de explantes en cada medio de cultivo. En el caso del M1, fue en el tercer subcultivo que se observaron las primeras

plantas con parte aérea y radicular bien definidas, mientras que para el medio M2, desde el segundo subcultivo se obtuvieron explantes bien diferenciados. Esto se observa en las Figura 13 y Figura 14.

Figura 13

Desarrollo progresivo de los explantes en el medio M1 durante los cuatro subcultivos



En el caso del medio M1, se evidencia que, durante el desarrollo de los explantes en la Figura 13 no hubo crecimiento de brotes solo de hojas y raíces. Mientras que, para el medio M2, en la última imagen de la Figura 14, se evidencian brotes diferenciados.

Figura 14

Desarrollo progresivo de explantes en el medio M2 durante los cuatro subcultivos



6.4 Enraizamiento

Después de las dos semanas requeridas para la fase del enraizamiento, se tomaron los datos correspondientes al largo y diámetro de los tallos, el número de hojas y raíces de todos los explantes. Luego de tabularlos e ingresarlos al software JASP 0.18.30, se obtuvo el análisis descriptivo de la Tabla 6 para la variable correspondiente al número de raíces.

Tabla 6

Análisis descriptivo del número de raíces en la etapa de enraizamiento.

Tratamiento	N	Media	SD	SE	Coeficiente de variación
T11	5	2.600	1.140	0.510	0.439
T12	7	1.429	0.976	0.369	0.683
T21	57	3.158	1.424	0.189	0.451
T22	56	0.929	1.291	0.173	1.391

En la Tabla 7, se observa el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para los cuatro tratamientos de la variable número de raíces.

Tabla 7

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la variable número de raíces.

Factor	Estadístico	df	Valor - p
Tratamiento	53.437	3	< .001

Debido a que el valor-p de la prueba es menor al nivel de significancia de 0.05, se concluye que existe al menos un tratamiento que presenta una diferencia significativa de su distribución frente al resto de tratamientos. Por lo tanto, se realizó una prueba individual U de Mann-Whitney por cada par de tratamientos con el fin de verificar cuales de ellos presentaban diferencias significativas. En la Tabla 8, es posible apreciar el resumen de estas comparaciones. Los valores –

p de las comparaciones que son menores a 0.05, indican que existen diferencias significativas entre las medias de ambos métodos.

Tabla 8

Resultados de las pruebas individuales U de Mann Whitney de la variable número de raíces.

Comparación	z	W _i	W _j	r _{rb}	Valor - p
T11 - T12	1.237	77.200	51.500	0.571	0.216
T11 - T21	-0.587	77.200	86.921	0.260	0.557
T11 - T22	2.317	77.200	38.821	0.700	0.020
T12 - T21	-2.492	51.500	86.921	0.682	0.013
T12 - T22	0.891	51.500	38.821	0.334	0.373
T21 - T22	7.204	86.921	38.821	0.746	< .001

Asimismo, en la Tabla 8, se puede evidenciar que el tratamiento T21 fue significativamente diferente a los tratamientos T12 y T22. A su vez, de la Tabla 6, se puede observar que las medias del tratamiento T21 es mayor a las medias de los tratamientos T12 y T22, por lo tanto, el tratamiento T21 obtuvo significativamente una mayor cantidad de raíces frente a estos dos tratamientos, los cuales en su composición tenían presencia de reguladores de crecimiento. Además, el tratamiento T11 es significativamente diferente al tratamiento T22, demostrando que este tratamiento presenta significativamente más raíces frente al método T22. Adicionalmente, se puede evidenciar que no se presentaron diferencias significativas en el número de raíces entre los métodos con igual medio de enraizamiento (T11-T21 y T12-T22), es decir que el medio de multiplicación no influye en la formación de raíces, mientras que el medio de enraizamiento si influye.

En la Tabla 9, se resume el análisis estadístico descriptivo de los cuatro tratamientos para el número de hojas.

Tabla 9

Análisis descriptivo del número de hojas en la etapa de enraizamiento.

Tratamiento	N	Media	SD	SE	Coefficiente de variación
T11	5	1.600	0.548	0.245	0.342
T12	7	0.000	0.000	0.000	No aplica
T21	57	1.404	0.863	0.114	0.615
T22	56	0.161	0.371	0.050	2.306

Aplicando la prueba de Kruskal-Wallis se obtienen los resultados de la Tabla 10, donde se presenta el estadístico de prueba y el valor-p.

Tabla 10

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la variable número de hojas.

Factor	Estadístico	df	Valor - p
Tratamiento	63.375	3	< .001

Dado que se obtiene un valor-p menor a 0.001 en la Tabla 10, se concluye que al menos un tratamiento de enraizamiento tuvo diferencias significativas en la distribución de la variable número de hojas frente a los otros tratamientos. Por lo tanto, se realiza una prueba individual U de Mann-Whitney para determinar que tratamientos presentaron diferencias en la cantidad de hojas. Los resultados de esta prueba se visualizan en la Tabla 11.

Tabla 11

Resultados de las pruebas individuales U de Mann Whitney de la variable número de hojas.

Comparación	z	W _i	W _j	r _{rb}	p
T11 - T12	3.194	95.100	33.500	1.000	0.001

Comparación	z	W _i	W _j	r _{rb}	p
T11 - T21	0.608	95.100	85.763	0.084	0.543
T11 - T22	3.542	95.100	40.652	0.936	< .001
T12 - T21	-3.962	33.500	85.763	0.789	< .001
T12 - T22	-0.542	33.500	40.652	0.161	0.588
T21 - T22	7.280	85.763	40.652	0.722	< .001

Es posible visualizar que, para las comparaciones T11-T12, T11-T22, T12-T21 y T21-T22, los valores-p son menores a 0.05, es decir, que existen diferencias significativas cuando los medios de enraizamiento son diferentes, mientras que, en las comparaciones entre tratamientos con igual medio de enraizamiento (T11-T21 y T12-T22) se obtuvieron valores-p mayores a 0.05; lo cual sugiere que, los tratamientos con igual medio de enraizamiento no presentaron diferencias significativas en el tamaño de las hojas. Concluyendo que, el medio de enraizamiento influye en la cantidad de hojas que presentan los explantes.

Por último, para realizar la comparación de los tratamientos en la proporción largo/diámetro, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que permitió determinar si los tratamientos tenían una distribución significativamente diferente entre sí. En primer lugar, la Tabla 12, presenta el análisis descriptivo de los tratamientos respecto a la proporción largo/diámetro.

Tabla 12

Análisis descriptivo de la proporción largo/diámetro en la etapa de enraizamiento

Tratamiento	N	Media	SD	SE	Coefficiente de variación
T11	5	6.438	1.270	0.568	0.197
T12	7	6.571	1.962	0.741	0.299
T21	57	5.640	1.653	0.219	0.293
T22	56	7.234	2.452	0.328	0.339

En la Tabla 13, se observa el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para los cuatro tratamientos de la variable proporción largo/diámetro de los tallos.

Tabla 13

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la variable largo/diámetro.

Factor	Estadístico	df	p
Tratamiento	10.581	3	0.014

Debido a que el valor-p de la prueba es menor al nivel de significancia de 0.05, se concluye que existe al menos un tratamiento que presenta una diferencia significativa en la distribución frente al resto de tratamientos. Por lo tanto, se realizó una prueba individual U de Mann-Whitney por cada par de tratamientos con el fin de verificar cuales presentaban diferencias significativas. En la Tabla 14, es posible apreciar el resumen de estas comparaciones. Los valores – p de las comparaciones que son menores a 0.05, indican que existen diferencias significativas entre las medias de ambos métodos.

Tabla 14

Resultados de las pruebas individuales U de Mann Whitney de la variable largo/diámetro.

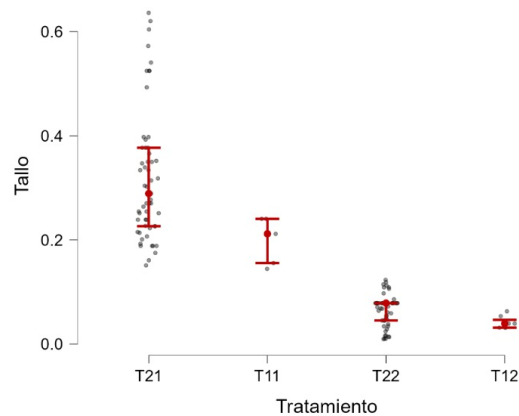
Comparación	z	W _i	W _j	r _{tb}	p
T11 - T12	-0.011	66.200	66.429	0.143	0.991
T11 - T21	0.857	66.200	51.719	0.270	0.391
T11 - T22	-0.448	66.200	73.768	0.179	0.654
T12 - T21	1.014	66.429	51.719	0.218	0.311
T12 - T22	-0.505	66.429	73.768	0.087	0.613
T21 - T22	-3.235	51.719	73.768	0.352	0.001

De la Tabla 14, se puede evidenciar que el tratamiento T21 es significativamente diferente al tratamiento T22, mientras que para los otros tratamientos no es posible tener conclusiones desde el punto de vista estadístico. Asimismo, en la Tabla 12, la media de la muestra con tratamiento T21

es menor a la media de la muestra con tratamiento T22, por lo tanto, el tratamiento T21 produce significativamente una menor relación largo/diámetro frente al tratamiento T22.

Figura 15

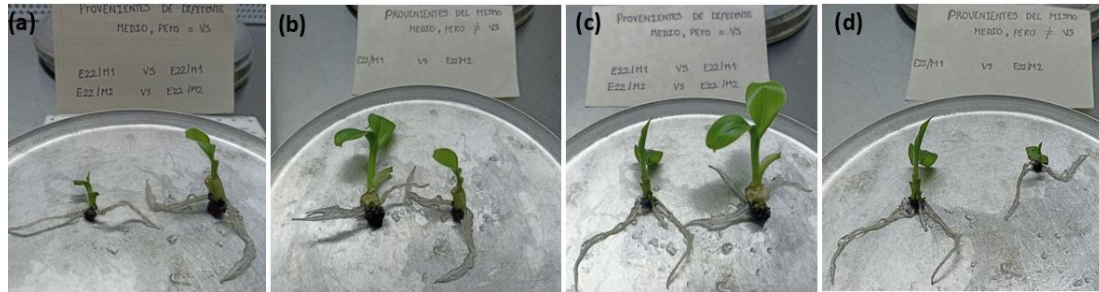
Diagrama de cajas y bigotes del volumen aproximado de los tallos en la etapa de enraizamiento.



De la Figura 15 se puede observar que, los tratamientos T11 y T21 tienen un volumen de tallo mayor que el de los tratamientos T12 y T22. A su vez, a pesar de existir una pequeña diferencia entre las medias de los tratamientos T11 y T21, no es posible definir si existe una diferencia significativa entre las medias de los volúmenes de los tallos de estos tratamientos, debido a la poca cantidad de datos del tratamiento T11. Sin embargo, desde un enfoque cualitativo, fue posible observar diferencias en el tamaño de los explantes, así como en la cantidad y longitud de las raíces y hojas (Figura 16).

Figura 16

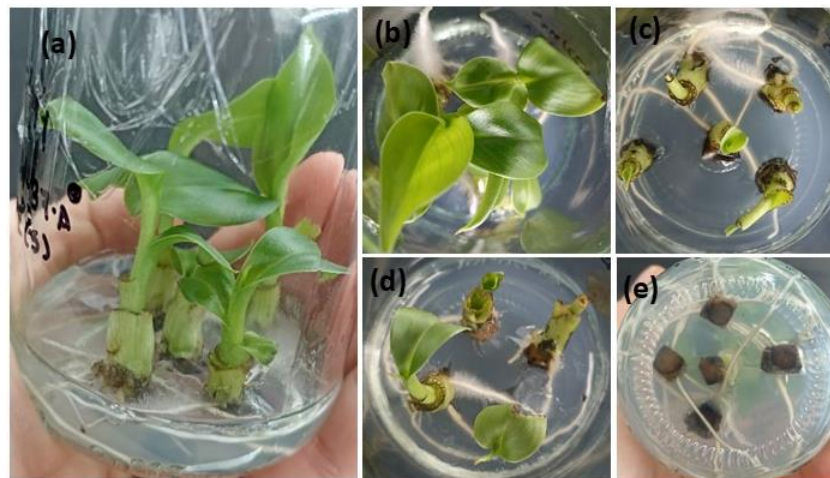
Desarrollo de los explantes en los diferentes tratamientos. (a) y (c) comparativo entre explantes provenientes de diferentes medios, pero transferidos al mismo medio E22/M2 y E22/M1 respectivamente, (b) y (d) comparativo entre explantes provenientes del mismo medio, pero transferidos a diferentes medios E22/M1 y E22/M2 respectivamente.



Finalmente, en la Figura 17, se puede observar la coloración, tamaño y desarrollo de los explantes obtenidos al finalizar las dos semanas de la fase de enraizamiento.

Figura 17

Desarrollo de los explantes al finalizar la fase de enraizamiento. (a) Explantes en medio E22/M1 provenientes del medio M2, (b) explantes en medio E22/M1 provenientes del medio M1, (c) explantes en medio E22/M2 provenientes del medio M1, (d) Explantes en medio E22/M2 provenientes del medio M2 y (e) raíces de los explantes en (b).



7 Discusión

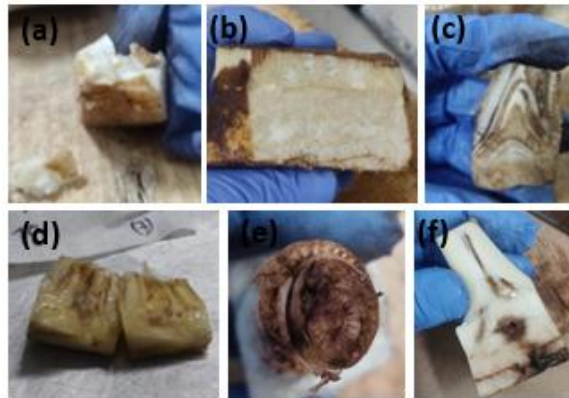
7.1 Preparación del material vegetal

Como se mencionó anteriormente, las plantas de banano sufren ataques de diferentes plagas y enfermedades, las cuales, afectan el desarrollo de las plantas y por ende a los cultivos agrícolas. Es por ello que la selección de material vegetal inicial es crucial para realizar una correcta propagación de banano por métodos biotecnológicos como el CTV, en donde se debe insistir en el uso de materiales con las características genéticas, fisiológicas y fitosanitarias ideales, ya que éstas serán las mismas características que tendrán las plantas obtenidas durante la micropropagación.

Con base en los resultados obtenidos durante la preparación del material vegetal de banano var. Gros Michel, se identificaron muestras que no cumplían con las características, puesto que se encontraban afectados por diversas razones como cortes inapropiados del meristemo, debido a una incorrecta extracción desde la planta madre; estos afectan la integridad y funcionalidad de las células meristemáticas, interrumpiendo su habilidad para generar nuevas células y tejidos. Además, como se indicó anteriormente, un mal corte ocasiona vulnerabilidad al exponer los tejidos a patógenos como hongos y bacterias. Incluso, un mal corte puede afectar los patrones de crecimiento y desarrollo de los explantes al verse afectada la formación de tejidos, debido a que los meristemas están involucrados en la regulación de hormonas vegetales como las auxinas que son esenciales para el crecimiento y la respuesta a estímulos ambientales (Gordon & Meyerowitz, 2016) (Zhao & Christensen, 2009). Por otra parte, también se evidenció durante la selección del material, la presencia de pudrición de la base del cormo; lo cual pudo ser ocasionado por distintos patógenos que atacan a esta especie, por ende, se descartó este material por no cumplir con los estándares de calidad fitosanitaria (Figura 18).

Figura 18

Síntomas de enfermedad y mal corte en cormos durante la selección del material vegetal de partida. (a), (b) y (c) Cormos con mal corte donde se compromete el meristemo, (d), (e) y (f) cormos con síntomas de enfermedades.



Es fundamental que los cormos destinados a los procesos en FASPLAN no presenten rastros de pudrición ni daños mecánicos en los meristemos debido a cortes inapropiados durante su extracción de la planta madre tal como se muestran en la Figura 19. Esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y repetible, ya que, tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Universidad Nacional de la plata [UNLP], 2017).

Figura 19

Aspecto superficial de cormos con estándares de calidad para su utilización como material de partida durante el CTV.



7.2 Desinfección

Una vez seleccionado el material de partida que cumplía con las condiciones necesarias para la micropropagación, se realizaron dos desinfecciones basadas en los antecedentes bibliográficos. Para evaluar cuál de los dos métodos presentó la mejor desinfección para los explantes, se utilizaron dos pruebas de hipótesis, una paramétrica y otra no paramétrica. Inicialmente se realizó la t-Student, una prueba paramétrica que permite evaluar variables cuantitativas con un tamaño de muestra menor o igual a 30 individuos, sin embargo, aunque los resultados cumplían con estas condiciones y se pudo obtener que no existían diferencias significativas para las medias de los métodos, esta prueba no tuvo validez al incumplir con el supuesto de distribución normal. Por ello, se realizó una segunda prueba no paramétrica, la prueba U de Mann Whitney, la cual permite analizar muestras independientes con variables cuantitativas sin distribución normal; esta permitió corroborar los resultados de la prueba t-Student, es decir, que al no existir diferencias significativas entre las medias de los métodos, no existe diferencia desde el punto de vista estadístico entre el método A y el método B, por lo tanto, se definieron otros criterios para la selección del mejor método de desinfección.

En ambos métodos se utilizó el hipoclorito de sodio (NaClO) como agente desinfectante; debido a que, ha sido ampliamente utilizado por los investigadores en el establecimiento in vitro de tejidos vegetales gracias a su amplia y rápida actividad antimicrobiana, relativa estabilidad, fácil uso y bajo costo (Bogado, Sansberro, & Luna, 2014). Dentro de los patógenos sobre los cuales tiene eficacia el hipoclorito, se encuentran *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Curvularia*, bacterias gram negativas como *Azospirillum* y *Xanthomonas*, contaminantes frecuentes en el cultivo in vitro de banano (Díaz, Pereira, Brítez, Mongelós, & Mussi, 2023). De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 4, el método B presenta un mayor porcentaje de explantes viables asociados a su doble desinfección, permitiendo una desinfección superficial más eficaz. Sin embargo, esta doble desinfección generó un porcentaje de sobrevivientes menor frente al método A, esto asociado al uso del hipoclorito de sodio, el cual, a pesar de ser un agente desinfectante puede causar daño a las membranas celulares provocando pérdida de funcionalidad de los tejidos e inhibe el crecimiento de las células meristemáticas afectando el crecimiento de las mismas e incluso, causar necrosis en los tejidos, provocando manchas marrones y muerte celular, como la evidenciada en la Figura 8 (Santos & Ribeiro, 2021).

Por esto, se estableció un criterio de selección basado en el costo beneficio y en la disminución del riesgo asociado a la contaminación microbiana sin afectar los tejidos meristemáticos, lo cual se traduce en un aumento de los explantes sobrevivientes sin contaminar. Como resultado, se definió que el mejor método de desinfección de los explantes es el método B con algunos ajustes. Para ello, se sugiere realizar una doble desinfección a diferentes concentraciones hasta encontrar aquella que garantice la desinfección total incrementando el número de explantes viables disminuyendo el tiempo de inmersión en la solución, lo cual se verá reflejado en la optimización de costos. Adicionalmente, se recomienda realizar nuevas pruebas con un tamaño mayor de muestras y hacer replicaciones con el fin de verificar diferencias significativas en el método. Cabe mencionar que, un análisis variando la concentración vs tiempo de exposición sería útil para determinar la variante adecuada que permita el éxito de la desinfección.

7.3 Multiplicación

Durante los experimentos realizados en esta etapa, se pudo identificar varios factores que influyen en el desarrollo de los explantes y se logró la selección del medio adecuado que cumplía con las condiciones necesarias para la multiplicación del banano Gros Michel. En el primer subcultivo o transferencia no hubo diferencia entre los explantes, puesto que todos provenían del mismo medio introductorio, sin embargo, en los subcultivos posteriores se evidenció una diferencia significativa entre ambos medios. En el segundo subcultivo, se logró ver una diferencia en el tamaño de los explantes y un cambio en su coloración, siendo la del medio M2 más clara con aspecto humedecido y crecimiento no diferenciado de hojas. A partir del tercer subcultivo, se obtuvo coeficientes de multiplicación para el medio M2; este presentaba brotes diferenciados, hojas y tallo definidos, mientras que el medio M1 únicamente presentó crecimiento de raíz y hojas. Finalmente, en el cuarto subcultivo se obtuvo plantas completamente desarrolladas para ambos medios, variando en la coloración, el tamaño y el número de hojas de las mismas, sin embargo, en el medio M1 los explantes no desarrollaron brotes durante los subcultivos, solo un sistema radicular completo, mientras que los explantes en el medio M2 desarrollaron brotes diferenciados sin sistema radicular. Esto concuerda con los resultados obtenidos para los coeficientes de multiplicación de las tablas 2 y 3, donde el valor de 2.66 y de 3.125 respectivamente, muestran que el medio M2 permitió obtener más de dos explantes por cada explante propagado.

Con base en la información anterior, fue posible determinar que el mejor medio para la multiplicación del banano var. Gros Michel es el medio M2, puesto que, en el medio M1 no se logró generar brotes y aumentar el CM. Este resultado se obtuvo por la composición de cada medio, la cual difería entre ellos debido a que el medio M2 fue suplementado con reguladores de crecimiento; los reguladores utilizados comúnmente son las auxinas y las citoquininas, las cuales dispuestas en un balance adecuado permiten obtener una buena respuesta (Píco & Gisbert, 2015). La presencia de los reguladores de crecimiento como el ácido indol-3-acético (AIA), la 6-bencilaminopurina (6-BAP) y el ácido ascórbico desempeñan un papel importante en el desarrollo de los tejidos vegetales del banano. Según la literatura, el AIA controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y división celular, la diferenciación de tejidos, fototropismo, gravitropismo y tiene un importante rol en la formación de la xilema y la raíz (Vega, Canchignia, Gonzáles, & Seeger, 2016). En el caso del banano, una adecuada regulación del AIA puede ayudar a prolongar la vida útil de las hojas y otros tejidos, contribuyendo a una mayor eficiencia fotosintética y un crecimiento más vigoroso (Gepstein & Glick, 1994). Gracias al alargamiento celular promovido por el ácido indolacético, se genera un crecimiento más rápido y uniforme de las células dando lugar a coloraciones más claras gracias a la producción de tejidos jóvenes. A su vez, la presencia de este regulador facilita la absorción de agua, lo que aumenta la turgencia en las células haciéndolas ver más húmedas y firmes como lo observado en la Figura 10 (Zhang, y otros, 2022).

Por otra parte, el ácido ascórbico actúa como un potente antioxidante que protege a las células de daños provocados durante el cultivo, promueve la división celular y el crecimiento de los tejidos mejorando el desarrollo de las plantas y a su vez, participa de la biosíntesis y acción de las hormonas que regulan el crecimiento como las auxinas y citoquininas (Akram, Shafiq, & Ashraf, 2017). Adicionalmente, la 6-bencilaminopurina (6-BAP) es una citoquinina que se utiliza para promover la brotación lateral en numerosas especies, debido a que induce la división celular, incrementando el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos, aumenta la actividad fotosintética, participa en la pérdida de dominancia apical y retrasa la senescencia (Cárdenas, Álvarez, Barragán, & Rivera, 2010). Este regulador aumenta la actividad metabólica generando una mayor retención de agua en los nuevos tejidos, además, influye en la apertura y cierre de los estomas que afectan directamente la transpiración. Lo cual confirma que, la presencia

de 6-BAP en el medio M2, pudo favorecer la formación de brotes laterales durante el proceso de multiplicación in vitro de Gros Michel.

Aunque las hormonas de crecimiento se producen de forma natural en las plantas, en cultivos in vitro es necesario añadirlas al medio de cultivo en forma de hormonas o sus homólogos, conocidos como reguladores de crecimiento. Esto se debe a que los explantes, al ser cultivados en estas condiciones artificiales, no son capaces de sintetizar dichas hormonas por sí mismos. Por lo tanto, los medios de cultivo están diseñados para proporcionar tanto los nutrientes como los reguladores de crecimiento necesarios para su desarrollo adecuado; por ello, es posible que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio M1 ocasionara el bajo desarrollo y la coloración presente en los explantes, debido a que, la ausencia de estos ocasiona que las células tengan una menor turgencia, lo que se traduce en un aspecto más seco y menos vibrante.

Cuando en el medio no existe una apropiada relación entre los reguladores de crecimiento, se puede dar un inadecuado crecimiento celular, lo que con lleva a la acumulación de clorofila dando lugar a una coloración verde oscura en lugar de un verde brillante (Cackett, Luginbuehl, Schreier, Lopez-Juez, & Hibberd, 2022).

Finalmente, se realizaron cuatro subcultivos con el fin de mejorar el estado de los explantes en el tiempo. Las principales razones por las cuales se llevó a cabo cada subcultivo, fueron las siguientes:

- 1) A medida que las plantas van creciendo los nutrientes que se encuentran en el medio pueden agotarse, por lo que el subcultivo garantiza la disponibilidad de los mismos para el desarrollo adecuado de cada planta (George, Hall, & De Klerk, 2008). De esta manera, se tomó la decisión de transferir los explantes cada 4 semanas aproximadamente con el fin de que estos tuvieran disponibilidad de nutrientes.
- 2) A medida que se desarrollan nuevos brotes, las plantas aumentan en número y pasan a competir entre ellas. De esta forma, cuando se separan los nuevos brotes y se distribuyen equitativamente en nuevos medios de cultivo, se proporciona más espacio permitiendo el crecimiento de los explantes al verse reducida la competencia por recursos (Zimmerman & Cline, 1997)
- 3) Se conoce que, la calidad del material vegetal que se obtiene en un subcultivo siempre será mejor que el anterior (Murashige & Skoog, 1962). Al realizar varios subcultivos, fue

posible llevar a cabo la selección de los mejores explantes eliminando explantes débiles o con tejidos necrosados, asegurando que solo aquellos que pudieran formar plantas sanas y más robustas continuaran creciendo.

- 4) Al realizarse varios subcultivos, se facilita la manipulación y el trasplante de las plantas a etapas más avanzadas de crecimiento, como el enraizamiento y aclimatación (Dobrąnszki & Molnár, 2011).

Los subcultivos ayudan a mantener la uniformidad en el tamaño y el desarrollo de las plantas. Esto es importante debido a que, evita la ventaja que puedan tener las plantas que se encuentran mayor desarrolladas y también para aplicaciones comerciales (George, Hall, & De Klerk, 2008). En resumen, los subcultivos fueron fundamentales para asegurar el crecimiento óptimo y la calidad del material vegetal con el que se trabajó. La mejora tras cada subcultivo se puede evidenciar en las figuras Figura 10, Figura 11 y Figura 12 que muestran los subcultivos realizados.

7.4 Enraizamiento

De acuerdo con los resultados obtenidos durante esta etapa, se pudo determinar cuál es el mejor tratamiento para un óptimo enraizamiento. Desde la parte estadística, para la formación de raíces se tiene que, al no existir diferencias significativas entre la media de los tratamientos T11-T21 y T12-T22, el medio de multiplicación no influye en la formación de raíces, sin embargo, el medio de enraizamiento afecta directamente la formación de las raíces.

Debido a la necesidad de obtener plantas viables para el proceso de aclimatación ex vitro, es necesario que estas estén completamente desarrolladas y con presencia de raíces de un tamaño adecuado que facilite el proceso operativo durante las siembras y la aclimatación. Para el proceso, sería favorable que las raíces sean de un tamaño intermedio, de tal forma que, no sea necesario el corte de las mismas para facilitar la siembra, esto debido a que, es conocido que los patógenos pueden entrar a los tejidos internos a través de las heridas ocasionadas por esto. Además, los cortes inducen un estrés que debilita la inmunidad de las mismas frente a enfermedades.

Como se mencionó en los resultados, los tratamientos con mejor respuesta radicular fueron el T21 y el T12; siendo que en este último se observó un menor desarrollo radicular. Estos explantes

del medio T12 provienen del medio de multiplicación sin reguladores de crecimiento y fueron transferidos al medio M2 que contenía ácido giberélico, el cual regula la arquitectura radicular promoviendo un crecimiento más eficiente de las mismas, lo cual concuerda con lo observado en la Figura 16, sin embargo, es necesario evaluar los otros parámetros para definir cuál es el mejor medio de enraizamiento (Santos R. R., 2016). En el caso del tratamiento T21, aunque los explantes fueron transferidos a un medio sin reguladores de crecimiento, provenían de un medio con citoquininas y auxinas las cuales influyeron en la formación de raíces, favoreciendo el proceso natural que tienen las vitroplantas de banano, las cuales, de acuerdo a la literatura, desarrollan raíces de manera espontánea, es por esto que en este tratamiento también se evidenció un mayor crecimiento de raíces frente a los otros tratamientos.

Para el caso de las hojas, de acuerdo con los datos obtenidos durante los análisis estadísticos, se obtuvo que no hubo diferencia significativa en la media de los tratamientos en donde se utilizó el mismo medio de enraizamiento. Mientras que, al variar los medios de enraizamiento los resultados diferían, concluyendo que el medio de enraizamiento si afecta la formación de hojas. Para determinar cuál es el mejor medio de enraizamiento se debe tener en cuenta que, para el proceso de aclimatación posterior se requieren plantas con un número adecuado de hojas, las cuales serán necesarias para que la planta pueda ser capaz de captar la luz solar y realizar procesos como la fotosíntesis, la transpiración, intercambio gaseoso y el almacenamiento de nutrientes. Además, para la correcta aclimatación y adaptación *ex vitro* de las plantas obtenidas por CTV, es necesario que las plantas mantengan una buena relación raíz-hojas; por ello, se consideró que el tratamiento más adecuado a utilizar en el proceso *in vitro* es el tratamiento T21, debido a que, el tratamiento T12 contenía ácido giberélico (GA) el cual afectó el desarrollo de las hojas, mientras que en el tratamiento T21 se presentó un desarrollo más proporcional entre raíces y hojas. Además, existen investigaciones en donde se ha identificado que el uso de GA, puede mejorar el crecimiento de raíces y disminuir el desarrollo de las hojas, siendo beneficioso para el establecimiento inicial, pero limitante para el desarrollo foliar (Hussain & Ali, 2018), lo cual reafirma los resultados obtenidos en el tratamiento T12.

Finalmente, de la Tabla 14 es posible observar que solo existen diferencias significativas para la relación largo/diámetro de los tallos entre tratamientos provenientes del medio de multiplicación con hormona (T21-T22), evidenciando que la adición previa de reguladores de crecimiento afecta la relación (l/d) durante la fase de enraizamiento. Asimismo, en la Tabla 12, la media del

tratamiento T21 es menor a la del tratamiento T22; indicando que el tratamiento T21 produce significativamente una menor relación largo/diámetro frente al otro tratamiento. De lo anterior se puede decir que, el tratamiento T21 permite que el largo y el grosor del tallo sean más proporcionales, dando como resultado plantas idóneas para la etapa de aclimatación, debido a que, una relación en la que el tallo es largo y delgado produce deficiencias durante el desarrollo en la fase de aclimatación. Además, en la Figura 15, se pudo observar que la mejor media para el volumen de los tallos, se obtuvo en el tratamiento T21. Para contar con un buen sistema aéreo es necesario que el volumen de los tallos sea mayor, favoreciendo el establecimiento de las plantas durante la etapa de aclimatación. Con base en los resultados obtenidos directamente de las tablas, se determina que el mejor medio para el proceso de enraizamiento es el tratamiento T21, esto debido a que, permite el desarrollo de hojas, tallos de gran tamaño y a su vez, un sistema radicular completo. Sin embargo, de acuerdo a los requerimientos de la biofabrica es necesario evaluar los días necesario para la obtención de un sistema radicular y aéreo en proporciones adecuadas, ya que al finalizar las dos semanas, en este tratamiento el largo y la cantidad de raíces, fue superior a lo requerido.

8 Conclusiones

Durante la estandarización del protocolo de propagación in vitro del banano Gros Michel, se obtuvo que los métodos de desinfección planteados no tuvieron diferencias significativas para determinar cuál de los dos era el adecuado. Sin embargo, se propuso realizar una alternativa evaluando diferentes concentraciones vs tiempo de exposición para escoger el método que mejor se ajuste a los requerimientos de viabilidad.

En la etapa de multiplicación, se evaluaron dos medios M1 y M2, este último suplementado con reguladores de crecimiento que favorecieron significativamente los resultados obtenidos, dando un coeficiente de multiplicación de 3.125 en el último subcultivo, mientras que M1 obtuvo un CM de 1. Con base en estos resultados, se definió que el medio indicado para la multiplicación de los explantes de banano var. Gros Michel en la biofábrica fue el medio M2.

Finalmente, durante la etapa de enraizamiento, de acuerdo a los resultados estadísticos y las variables cualitativas evaluadas, se estableció que la mejor combinación para obtener plantas viables que se adapten con facilidad en la etapa posterior de aclimatación fue el T21; esto teniendo en cuenta que el medio de enraizamiento en este tratamiento fue un medio sin reguladores de crecimiento, corroborando la información encontrada en la literatura, que el enraizamiento se da de forma espontáneamente en el banano.

Los resultados de la experimentación permitieron desarrollar una primera versión del protocolo de propagación in vitro del banano var. Gros Michel en las instalaciones de la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la U de A - Fasplan S.A.S. Por último, se recomienda realizar ajustes en el tamaño de la muestra y los tiempos de experimentación, para posteriores estandarizaciones, de tal forma que permita tener un panorama más amplio de la influencia de los factores.

Referencias

- Agroactivocol. (1 de Septiembre de 2020). *icha técnica 6-BAP 98%*. Obtenido de agroactivocol: <https://agroactivocol.com/wp-content/uploads/2020/09/01.-Ficha-Tecnica-M.P.-6-BAP-1.pdf>
- Akram, N., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. 8. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>
- Alvarado, F. (2019). *Evaluación de dos métodos de propagación asexual en dos clones de banano (Musa paradisiaca) con mayor eficacia en el valle del Chira - Piura*. Repositorio universidad San Pedro. Obtenido de https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/USPE_3457f6fcb272224c82b410ae7dcfbadd/Details
- ANALDEX. (Abril de 2022). *analdex*. Obtenido de Informe de las exportaciones colombianas de frutas: <https://www.analdex.org/wp-content/uploads/2023/04/Informe-de-Exportaciones-de-Fruta-2022.pdf>
- Arditti, J., & . (2009). *Micropropagation of orchids*. California: Wiley. Obtenido de <https://books.google.com.co/books?id=zZ34w2WPqoUC>
- Beyl, C., & Trigiano, R. (2017). *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises, Second Edition*. Florida: CRC Press.
- Bogado, F., Sansberro, P., & Luna, C. (2014). *Evaluación del establecimiento in vitro de clones de Grevillea robusta*. Bogotá: RIUNNE.
- Cackett, L., Luginbuehl, L., Schreier, T., Lopez-Juez, E., & Hibberd, J. (2022). Chloroplast development in green plant tissues: the interplay between light, hormone, and transcriptional regulation. *New Phytol*, 2000-2016.
- Cámara de Comercio de Bogotá. (21 de Febrero de 2023). *Colombia, un país de regiones e industrias que impulsan la economía nacional*. Obtenido de <https://www.ccb.org.co/blog/colombia-un-pais-de-regiones-e-industrias-que-impulsan-la-economia-nacional>
- Cancado, G., Braga, F., Souza, R., Nunes, C., Ribeiro, A., & Fontes, B. (2013). Cultivo in vitro da oliveira e suas aplicações.

-
- Cárdenas, J., Álvarez, J., Barragán, E., & Rivera, C. (2010). Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agronomía Colombiana*, 28(1), 19-27. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652010000100003&lng=en&tlng=es
- Cárdenas, J., Álvarez, J., Barragán, E., & Rivera, C. (2024). Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agronomía Colombiana*, 28(1), 19-27. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652010000100003&lng=en&tlng=es
- Cárdenas-Hernández, J., Álvarez-Herrera, J., Barragán, E., & Rivera, C. (2010). Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agronomía Colombiana*, 28(1), 19-27.
- Carrión, J. (2020). *Multiplicación in vitro de plátano: Revisión de literatura*. Zamorano. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/items/ea45ff35-fce1-4834-98dd-5f0b75d8d207/full>
- Casanova, R., Mateo, E., & Ljung, K. (2021). Auxin Metabolism in Plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 13(3). doi:<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039867>
- Castañeda, A. (2023). *Impactos del Establecimiento de un Protocolo de Macro-Propagación de Plátano Hartón Caqueteño (Musa AAB) en Cámara Térmica*. Bogotá: studocu.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Uruguay: INIA. Obtenido de <https://www.inia.uy/publicaciones/documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- DANE. (2016). *Enfermedades y plagas del plátano (Musa paradisiaca) y el banano (Musa acuminata; M sapientum) en Colombia*. Obtenido de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_sep_2016.pdf
- Díaz, J., & Castro, D. (2011). Propagación clonal in vitro de plantas de banano (*Musa AAA*) clon Giant cavendish en biorreactores de inmersión temporal. *Revista Universidad Católica de Oriente*, 31, 31-41.

- Díaz, M., Flor, B., Enciso, C., & González, L. (2016). I carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 140-146. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
- Díaz, M., Pereira, K., Brítez, J., Mongelós, J., & Mussi, C. (2023). Efecto de la concentración del hipoclorito de sodio sobre la contaminación y oxidación de meristemas en la micropropagación de banano. *Reportes científicos de la FACEN*, 14(2), 156-164. doi:<https://doi.org/10.18004/rcfacen.2023.14.2.156>
- Dobrąnszki, J., & Molnár. (2011). Micropropagation of ornamental plants. En *Plant Tissue Culture: Theory and Practice* (págs. 213-240). Springer.
- Equenique, M., & Mamani, M. (2021). Determinación del medio de cultivo para el establecimiento in vitro de banano (*Musa acuminata*) en la Estación Experimental Sapecho – Alto Beni. *Apthapi*, 7(3), 2247-2254. Obtenido de <https://apthapi.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/112>
- Fasplan. (26 de Octubre de 2021). *Inicio*. Obtenido de fasplan: <https://fasplan.com.co>
- Florio , S., De Real, L., & Mogollón, N. (2010). Regeneración in vitro del plátano CV. 'Hartón gigante' (*Musa AAB*). *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 44(4), 425-440.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). *La Economía Mundial Del Banano 1985-2002 (Estudios Fao: Productos Basicos)* (Vol. 50). (P. Arias, C. Dankers, P. Liu, & P. Pilkauskas, Edits.) Food & Agriculture Org. Obtenido de <https://books.google.co.ve/books?id=vaNJC7-F5WIC>
- Galán, V., Rangel, A., Lopez, J., Perez, J., Sandoval, J., & Souza, H. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Revista brasileira de fruticultura*, 40(4). doi:<https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>
- García, M. B., Reyes , D. M., Zayas , J., & Destrade, R. (2015). Efecto de Pectimorf® en el enraizamiento in vitro de plantas de 'FHIA-18' (*Musa AAAB*). *Biotecnología vegetal*, 15(4), 227-232. Obtenido de <https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnologiavegetal/2015/vol15/no4/4.pdf>
- García, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Cultivo de tejidos de plantas: estado actual, oportunidades y desafíos. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-30. Obtenido de

- https://www.researchgate.net/publication/262613141_Cultivo_de_tejidos_de_plantas_estado_actual_oportunidades_y_desafios
- García, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-30. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The Basic Concepts*. Springer.
- Gepstein, S., & Glick, R. (1994). The role of auxins in leaf senescence. *Plant Physiology*, 104(4), 1449-1453.
- Gordon, S., & Meyerowitz, E. (2016). The role of meristems in plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 29(1), 9-15.
- Hernández, Y., & González, M. (2010). efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&tlng=pt
- Hussain, A., & Ali, M. (2018). Role of gibberellins in plant growth and development: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 131-145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.016>
- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. (2012). Cytokinins as central regulators of plant growth and development. *The Plant Cell*, 24(12), 3651-3672.
- Kasahara, H. (2015). Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 1-9. doi:10.1080/09168451.2015.1086259
- Krikorian, A., & Cronauer, S. (1983). Técnicas del cultivo Aséptico para mejoramiento de banano y del plátano. *Informe mensual Unión de países exportadores de banano*, 7(55), 42-47.
- López, P. (2016). *Estandarización de un protocolo de cultivo in vitro para el incremento de biomasa de los callos de plátano (musa spp. Aab) variedad barraganete*. Quito: Universidad de las Americas.
- Lucas, J., Montoya, J., & Quintero, V. (2014). Caracterización de harina y almidón de frutos de banano Gros Michel (*Musa acuminata* AAA). *Acta Agronómica*, 64(1), 11-21. doi:10.15446/acag.v64n1.38814

- Mamani, B., Nova, M., & Bosque, H. (2021). Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio y multiplicación con bencilaminopurina en *Musa* spp. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(1), 37-44. doi:<https://doi.org/10.53287/piku9019rc77e>
- Mamani, Q. (2022). *Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivo en las Etapas de introducción y establecimiento In vitro del cultivo de banano (Musa sp. AAA), variedad gran naine en la Estación Experimental Sapecho*. Repositorio UMSA. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/29077/T3016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martinez, F., Sigcha, E., Toaquiza, P., Ramos, L., & Saucedo, S. (2008). Alternativas para la Propagación in vitro de Plátano de variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Ciencia y Tecnología*, 43-48. Obtenido de <https://revistas.uteq.edu.ec/index.php/cyt/article/view/62>
- Medina, M., Medina, C., & Medina, L. (2015). Propagación in vitro de *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo del Choco, Colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales. *Biodiversidad Neotropical*, 5(1), 47-53. Obtenido de <https://revistas.utch.edu.co/ojs5/index.php/Bioneotropical/article/view/206>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nath, J., Kumari, A., Joshi, S., Gusain, S., Kumari, K., Patial Meghna, . . . Joshi, R. (2024). Micropropagation Technology for Improvement of Ornamental Plants. *Ornamental Horticulture: Latest Cultivation Practices and Breeding Technologies, 2024*, 121-149. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-97-4028-4_7
- Palacio, P., & Herrera, M. (2 de Diciembre de 2022). *Biofábrica: riqueza para el agricultor, el suelo, las plantas y la vida*. Obtenido de ime: <https://ime.edu.co/biofabrica-riqueza-para-el-agricultor-el-suelo-las-plantas-y-la-vida/>
- Píco, M., & Gisbert, C. (2015). *Micropropagación*. Repositorio RIUNET de UPV. Obtenido de https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/51895/Gisbert%20and%20Pico_2015%20micropropagaci%C3%B3n.pdf

- Plíhalová, L., Vylíčilová, H., Doležal, K., & Zahajská, L. (2016). Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology*, 33(5), 614-624. doi:doi:10.1016/j.nbt.2015.11.009
- Quispe, A. (2019). *Propagación del banano Gross Michel con diferentes técnicas de multiplicación en vivero en Belemata distrito de Echarati – La Convención- Cusco*. Cusco: Repositorio universidad nacional de san antonio abad del cusco.
- Real Academia Española. (2024). *Diccionario de la lengua española*. Obtenido de dle.rae: <https://dle.rae.es>
- Restrepo, L. (8 de Agosto de 2019). *Alianza para producción a escala de biofábrica*. Obtenido de udea: <https://www.udea.edu.co>
- Santos, D., & Ribeiro, L. (2021). Effects of sodium hypochlorite on plant tissues: A review. *Journal of Plant Physiology*, 258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153394>
- Santos, R. R. (2016). Influence of gibberellic acid on the in vitro rooting of banana cultivars. *Scientia Agricola*, 73(6), 556-562. doi:<https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0152>
- Ubilla, E. (2016). *Propagación in vitro de Banano. (Musa acuminata) -variedades Gros Michel y Williams- a partir de meristema*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5935/1/CPA-2016-T092.pdf>
- Universidad de Antioquia [UdeA]. (2019). *Ingeniería Bioquímica: Presentación*. Obtenido de udea: <https://www.udea.edu.co/wps/wcm/connect/udea/7f0b6922-3556-492f-9a21-038086dfd510/ingenieria-bioquimica.pdf?MOD=AJPERES>
- Universidad Nacional de la plata [UNLP]. (24 de Marzo de 2017). *Elección, preparación y establecimiento de los explantos para iniciar un*. Obtenido de aula virtual unlp: https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/41271/mod_resource/content/1/2_TP_Elecci_n_del_explanto_y_desinfecci_n.pdf
- Universidad Nacional de la plata [UNLP]. (24 de Marzo de 2017). *Elección, preparación y establecimiento de los explantos para iniciar un cultivo bajo condiciones de asepsia*. Obtenido de aula virtual UNLP: https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/41271/mod_resource/content/1/2_TP_Elecci_n_del_explanto_y_desinfecci_n.pdf
- Vega, P., Canchignia, H., Gonzáles, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 33-39.

- Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005&lng=es&tlng=es
- Vega, P., Martínez, H., Vergara, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos tropicales*, 37(5), 33-39. Obtenido de <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1186>
- Velasco, E. (2011). *Efecto del agua de coco en la micropropagación del plátano (musa aab) y banano (musa aaa) en medios de cultivo sólido y líquido*. San Andrés: Repositorio institucional Universidad Mayor de San Andrés. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/7713>
- Zhang, Y., Yu, J., Xu, X., Wang, R., Liu, Y., Huang, S., . . . Wei, Z. (2022). Molecular Mechanisms of Diverse Auxin Responses during Plant Growth and Development. *International journal of molecular sciences*, 23(20). doi:<https://doi.org/10.3390/ijms232012495>
- Zhao, Y., & Christensen, S. (2009). Plant hormone signaling and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 408-418.
- Zimmerman, R., & Cline, S. (1997). Tissue culture propagation of fruit trees and other woody plants. En *Plant Propagation by Tissue Culture* (págs. 173-195). Springer.