

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO FACULTAD DE POSGRADO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

Desarrollo de un protocolo para la regeneración de plantas de Banano Williams (*Musa spp.*) vía yemas adventicias mediante el uso de medios de cultivo semisólidos y biorreactores de inmersión temporal.

Autor:

María Inés Tapay Mendoza

Directora:

PhD. Elisa Quiala Mendoza

Milagro, 2026

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, María Inés Tapay Mendoza en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **Manejo de recursos genéticos en la agricultura y ganadería** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su

forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 3 de mayo de 2026

María Inés Tapay Mendoza

0921679932

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Elisa Quiala Mendoza** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Inés Tapay Mendoza** cuyo tema es **Desarrollo de un protocolo para la regeneración de plantas de Banano Williams (Musa spp.) vía yemas adventicias mediante el uso de medios de cultivos semisólido y biorreactores de inmersión temporal**, que aporta a la Línea de Investigación **Manejo de recursos genéticos en la agricultura y ganadería**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 3 de mayo de 2026

PhD. Elisa Quiala Mendoza

1757114861

FACULTAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los treinta días del mes de marzo del dos mil veintiseis, siendo las 11:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING. TAPAY MENDOZA MARIA INES, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS DE BANANO WILLIAMS (MUSA SPP.) VÍA YEMAS ADVENTICIAS MEDIANTE EL USO DE MEDIOS DE CULTIVOS SEMISÓLIDO Y BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL.**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS, Presidente(a), Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO en calidad de Vocal; y, Msc Bio V LAZO SULCA RAFAEL SELEYMAN que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	40.00
PROMEDIO	100.00
EQUIVALENTE	EXCELENTE

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 12:00 horas.



Firmado electrónicamente por:
**GUSTAVO ELIAS
MARTINEZ VALENZUELA**
Validar únicamente con FirmaEC

**MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**JUAN DIEGO
VALENZUELA COBOS**
Validar únicamente con FirmaEC

**Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
VOCAL**



Firmado electrónicamente por:
**RAFAEL SELEYMAN
LAZO SULCA**
Validar únicamente con FirmaEC

**Msc Bio V LAZO SULCA RAFAEL SELEYMAN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**MARIA INES TAPAY
MENDOZA**
Validar únicamente con FirmaEC

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo, fruto del esfuerzo y aprendizaje que he recibido, a Dios, por su infinita misericordia y por haberme brindado la sabiduría, la salud y la fortaleza necesarias para culminar con éxito esta etapa tan importante e inimaginable de mi vida. Su guía y bendición estuvieron presentes en cada paso de este camino.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este proyecto de investigación representa un hito significativo en mi trayectoria académica y profesional, y no habría sido posible sin el invaluable apoyo y la colaboración de numerosas personas e instituciones.

En primer lugar, mi más sincero y profundo agradecimiento a mi tutora y mentora, Dra. Elisa Quiala. Su guía experta, su paciencia inagotable y su constante motivación fueron pilares fundamentales en cada etapa de este proyecto. Su visión crítica y su compromiso con la excelencia científica no solo enriquecieron mi investigación, sino que también forjaron en mí una mejor investigadora.

Hago extensivo mi agradecimiento a la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP y en especial al Fondo de Investigación para la Agrobiodiversidad, Semillas y Fomento de la Agricultura Sustentable los Fondos (FIASA), que a través del proyecto FIASA- EELS-2022-008, contribuyó con el financiamiento necesario para la materialización de los objetivos de esta investigación.

Mi gratitud también a la Universidad Estatal de Milagro (UNEMI) por haberme brindado la valiosa oportunidad de cursar esta maestría en Biotecnología, un pilar fundamental para el desarrollo exitoso de la presente investigación.

A mi amado esposo, Gabriel Quitiaquez, gracias por tu amor incondicional, tu comprensión y tu apoyo constante, tu aliento fue mi refugio en los momentos de mayor desafío. A mi querida hija, Nohelia Quitiaquez, gracias por tu alegría, tu paciencia y por ser mi motivación diaria. Tu presencia hizo este camino aún más significativo.

A mis padres, Baltazar Tapay por inculcarme la perseverancia y Mariana Mendoza (+), aunque ya no estás físicamente sigues siendo mi fortaleza para seguir adelante, gracias por el amor, sacrificio y por haberme inculcado desde pequeña valores importantes que me han ayudado en este camino, este logro es también suyo. Finalmente, quiero expresar mi cariño y gratitud a mis queridas hermanas, Susana, Ángela, Margarita y Paola (+), y a mi hermano Manuel. Su apoyo y sus palabras de aliento.

Resumen

En el presente documento se describe un protocolo eficiente de regeneración de plantas *in vitro* de banano Williams vía yemas adventicias. Los diferentes ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS), del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en el cantón San Jacinto de Yaguachi, provincia del Guayas. El protocolo se estableció a partir de la evaluación de diferentes concentraciones de Tiazuron (TDZ) en medios de cultivo semisólidos y el efecto de diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la multiplicación de las yemas adventicias y la regeneración de plantas en biorreactores de inmersión temporal. El objetivo final fue desarrollar un protocolo eficiente con la tasa de regeneración de plantas de banano más elevada que las descritas hasta el momento en la literatura internacional, contribuyendo así a incrementar la probabilidad de desagregar quimeras con mayor eficiencia en programas de mejoramiento genético con base en la variación somaclonal o la mutagénesis.

Palabras clave: banano Williams, biorreactores de inmersión temporal, Regeneración *in vitro*, yemas adventicias, Tiazuron (TDZ), 6-Bencilaminopurina (6-BAP).

Abstract

This document describes an efficient protocol for the *in vitro* regeneration of Williams banana plants via adventitious buds. The various trials were conducted at the Biotechnology Laboratory of the Litoral Sur Experimental Station (EELS) of the National Institute of Agricultural Research (INIAP), located in the canton of San Jacinto de Yaguachi, Guayas province. The protocol was established based on the evaluation of different concentrations of thidiazuron (TDZ) in semi-solid culture media and the effect of different concentrations of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) on the multiplication of adventitious buds and the regeneration of plants in temporary immersion bioreactors. The ultimate goal was to develop an efficient protocol with the highest banana plant regeneration rate described so far in the international literature, thus contributing to increasing the likelihood of efficiently separating chimeras in genetic improvement programs based on somaclonal variation or mutagenesis

Keywords: Williams banana, temporary immersion bioreactors, *in vitro* regeneration, adventitious buds, thidiazuron (TDZ), 6-Benzylaminopurine (6-BAP).

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTOS	VI
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
CONTENIDO	X
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Delimitación del Problema:	5
1.3. Delimitación Geográfica:.....	7
Preguntas de Investigación:	7
1.4. Objetivo general.....	8
1.5. Objetivos específicos	8
1.6. Hipótesis	8
Hipótesis general.....	9
Hipótesis específicas	9
1.7. Declaración de las variables	10
1.8. Justificación	10
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	14
2.1 Antecedentes.....	14
2.2 Características botánicas, taxonomía, origen y evolución del cultivo.....	14
2.3 Clasificación taxonómica del banano	15
2.4 Importancia Económica	16
2.5 Cultivo de tejidos.....	17
2.6 Ventajas	17
2.7 Desventajas.....	18
2.8 Fundamentos de la Micropropagación	19
2.9 Inducción de Yemas Adventicias en Banano.....	21
2.10 Medios de Cultivo Semisólidos: Aplicación, Ventajas y Desafíos en Banano.....	24

2.11	Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).....	25
2.12	Variación Somaclonal en Cultivo de Tejidos de Banano.....	31
2.13	Principales enfermedades que amenazan el cultivo de banano.....	33
2.14	Material vegetal.....	36
2.15	Preparación de Medios de Cultivo para Inducción y Multiplicación.....	37
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		40
3.1	Establecimiento de plantas in vitro de banano Williams a partir de material adaptado en invernadero.....	40
3.2	Inducción de yemas adventicias in vitro.....	41
3.2.1	Ensayo 1: Efecto de diferentes dosis de TDZ en la inducción de yemas adventicias en medio de cultivo semisólido.....	42
	Inducción de Yemas Adventicias.....	42
3.2.2	Ensayo 2. Efecto de la concentración de TDZ en la inducción de yemas adventicias sobre la regeneración in vitro de banano cv. Williams en los BIT.....	44
3.2.3	Ensayo 3. Efecto de diferentes dosis de 6-BAP en la regeneración de yemas adventicias de banano Williams cultivadas en los BIT.....	45
3.3	Aclimatación de plantas en invernadero.....	47
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		48
4.1	Establecimiento de plantas in vitro de banano Williams a partir de material adaptado en invernadero.....	48
4.1.1	Establecimiento de plantas en invernadero.....	48
4.2	Inducción de yemas adventicias <i>in vitro</i>	50
4.2.1	inducción de yemas adventicias en medio de cultivo semisólido.....	50
4.2.2	Ensayo 2. Efecto de la concentración de TDZ en la inducción de yemas adventicias sobre la regeneración in vitro de banano cv. Williams en los BIT.....	54
4.3	Ensayo 3. Efecto de diferentes dosis de 6-BAP en la regeneración de yemas adventicias de banano Williams cultivadas en los BIT.....	56
4.4	Aclimatación de plantas en invernadero.....	59
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		61
5.1	Discusión.....	61
5.2	Conclusiones.....	63
5.3	Recomendaciones.....	64
	Referencias Bibliográficas.....	65
	Anexos.....	69

Introducción

El banano constituye el principal rubro de exportación de Ecuador. El país es el primer exportador mundial de esta fruta fresca y cuenta con aproximadamente 1.38 millones de hectáreas destinadas a este cultivo (INEC, 2024). En 2024, la producción nacional de banano alcanzó 7.5 millones de toneladas métricas, con la provincia de Los Ríos aportando el 39.8% del total. Las exportaciones crecieron un 1.42% en volumen, alcanzando 364.16 millones de cajas. El sector bananero genera empleo para más de un millón de familias, lo que representa alrededor de 2.5 millones de personas, equivalentes al 17% de la población ecuatoriana, que dependen directa o indirectamente de esta industria. Las exportaciones de banano generaron aproximadamente 3.600 millones de dólares en ingresos para Ecuador en 2024. Los principales mercados de exportación del banano ecuatoriano son: Unión Europea (29.03%), Rusia (18.42%), Medio Oriente (13.61%), Estados Unidos (11.83%), Cono Sur (6.93%) y Asia Oriental (6.31%). Estos datos reflejan la importancia del banano en la economía ecuatoriana y su impacto en el comercio internacional.

Sin embargo, la industria bananera enfrenta serios desafíos. La industria del banano en Ecuador enfrenta varios desafíos en este 2025, dentro de ellos los factores climáticos adversos y la amenaza de enfermedades devastadoras como el Fusarium R4T, presente en tres países vecinos. Ante este escenario el uso de prácticas agrícolas sostenibles y el mejoramiento genético, asistidos por biotecnologías constituyen herramientas poderosas para enfrentar estos desafíos.

No obstante, el mejoramiento genético del banano también ha enfrenta desafíos significativos debido a su reproducción vegetativa y la limitada variabilidad genética de los cultivares comerciales. Dentro de las estrategias, la inducción de yemas adventicias constituye uno de los métodos clave para la regeneración eficiente de plantas y la generación de variabilidad genética, facilitando la selección de individuos con características agronómicas mejoradas (Huang, et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que la aplicación de reguladores de crecimiento, como el N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ilurea conocido como Tidiazuron (TDZ) y la 6-Bencilaminopurina (6-BAP), en medios de cultivo optimizados puede incrementar la tasa de multiplicación de yemas adventicias, permitiendo una producción masiva de plantas con potencial para programas de mejoramiento genético. Además, la combinación de esta técnica con biorreactores de inmersión temporal puede mejorar la eficiencia de regeneración y la calidad de las plantas obtenidas (Sipen et al., 2011).

La implementación de protocolos de inducción de yemas adventicias no solo contribuye a la propagación rápida de genotipos superiores, también incrementa la probabilidad de desagregar quimeras con mayor eficiencia, lo que es fundamental en programas de mejoramiento que tienen como base la variación somaclonal o la mutagénesis. En este contexto, el desarrollo de metodologías optimizadas para la regeneración *in vitro* de banano representa un avance significativo en la biotecnología aplicada a la agricultura, con impacto directo en la productividad y sostenibilidad del cultivo. La justificación de esta investigación

radica en la imperante necesidad de optimizar los programas de mejoramiento genético asistido por biotecnología, para lo cual es indispensable contar con un sistema de regeneración de plantas altamente eficiente, que permita a las células ya sean mutantes o genéticamente modificadas, desarrollarse y dar origen a plantas completas que expresen de forma estable los atributos deseados (FAO, 2022).

El objetivo principal de la presente tesis es establecer un protocolo optimizado para la regeneración de plantas de banano de la variedad 'Williams' a partir de yemas adventicias. Para alcanzar este propósito, se investigarán diferentes concentraciones de fitohormonas y condiciones de cultivo, incluyendo la experimentación con biorreactores de inmersión temporal. Se anticipa que los hallazgos de esta investigación facilitarán la creación de un protocolo mejorado que impulse la producción masiva de plantas de banano 'Williams', lo que generará un impacto positivo en los programas de mejoramiento genético para la obtención de nuevos cultivares con características mejoradas que contribuyan a mejorar la economía y el desarrollo sostenible del sector bananero.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La industria bananera en Ecuador enfrenta varios desafíos en 2025, dentro de ellos los factores climáticos adversos y la amenaza de enfermedades devastadoras como el Fusarium R4T, presente ya en tres países vecinos. Ante este escenario el uso de prácticas agrícolas sostenibles y el mejoramiento genético, asistidos por biotecnologías constituyen herramientas poderosas para enfrentar estos desafíos.

No obstante, el mejoramiento genético del banano también enfrenta desafíos significativos debido a su reproducción vegetativa y la limitada variabilidad genética de los cultivares comerciales. Dentro de las estrategias, la inducción de yemas adventicias constituye uno de los métodos clave para la regeneración eficiente de plantas con baja probabilidad de quimerismo y la generación de variabilidad genética, facilitando la selección de individuos con características agronómicas mejoradas.

Diversos estudios han demostrado que la aplicación de reguladores de crecimiento, como el Tiazuron (TDZ) y la 6-Bencilaminopurina (6-BAP), en medios de cultivo optimizados puede incrementar la tasa de multiplicación de yemas adventicias, permitiendo una producción masiva de plantas con potencial para programas de mejoramiento genético. Además, la combinación de esta técnica con biorreactores de inmersión temporal puede mejorar la eficiencia de regeneración y la calidad de las plantas obtenidas.

La implementación de protocolos de inducción de yemas adventicias no solo contribuye a la propagación rápida de genotipos superiores, también incrementa la probabilidad de desagregar quimeras con mayor eficiencia, lo que es fundamental en programas de mejoramiento que tienen como base la variación somaclonal o la mutagénesis. En este contexto, el desarrollo de metodologías optimizadas para la regeneración *in vitro* de banano representa un avance significativo en la biotecnología aplicada a la agricultura, con impacto directo en la productividad y sostenibilidad del cultivo.

Tabla 1:

Comparación de Métodos de Propagación de Plantas

Método	Velocidad de Propagación	Riesgo de Transmisión de Enfermedades	Uniformidad Genética	Escalabilidad	Costo
Propagación por Semillas	Baja	Alta	Baja	Alta	Bajo
Esqueje/Injerto	Media	Media	Media	Media	Medio
Cultivo <i>In vitro</i>	Alta	Baja	Alta	Alta	Alto (inicial)

Fuente: Comparación de Métodos de propagación de plantas, por el autor, (2025).

1.2. Delimitación del Problema:

La propagación convencional del banano (*Musa spp.*), que se basa en el uso de rizomas, enfrenta desafíos considerables que impactan directamente la producción nacional. Este método se caracteriza por una baja tasa de multiplicación y una marcada susceptibilidad a la diseminación de patógenos (como bacterias, hongos, virus y nematodos). Esta vulnerabilidad se agrava

debido a prácticas decampo que a menudo omiten medidas sanitarias esenciales, como el traslado directo de material vegetal sin desinfección adecuada y la insuficiente cultura de limpieza de las herramientas agrícolas.

Ante estas limitaciones que comprometen la estabilidad del sector bananero, se evidencia una apremiante necesidad de adoptar metodologías de propagación más eficaces y seguras. En este contexto, el cultivo *in vitro*, particularmente la inducción y el desarrollo de yemas adventicias, emerge como una alternativa prometedora. Esta técnica permite la producción masiva de plantas genéticamente uniformes y libres de patógenos en un tiempo reducido y con un uso optimizado de recursos.

Considerando estos parámetros, la presente investigación se orienta hacia la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* dentro de los programas de mejoramiento genético, con el fin de promover el uso de materiales de siembra sanos y certificados.

Delimitación Temática:

- La investigación se circunscribe a las siguientes áreas fundamentales.
- Biotecnología Vegetal: Enfoque en la aplicación de herramientas biotecnológicas para la mejora y propagación de plantas.
- Cultivo *In vitro*: Específicamente, se abordarán la micropropagación y la organogénesis adventicia como estrategias para la obtención de material vegetal para la inducción de mutaciones y de variación somaclonal.
- Producción y Propagación de Banano: Concentración en los aspectos

técnicos relacionados con el incremento y la fusión de este cultivo.

- Fitopatología: Se considerará la relación con la obtención de plantas libres de enfermedades, enfatizando la sanidad del material de propagación.

1.3. Delimitación Geográfica:

Mundial: Se menciona la importancia del banano a nivel mundial y del país.

Preguntas de Investigación:

- ¿Cómo influye la dosis de citoquininas como el TDZ y el 6 BAP en la inducción y proliferación de yemas en medio de cultivo semisólido y sistemas de inmersión temporal?
- ¿En qué medida los biorreactores de inmersión temporal mejoran la eficiencia en la obtención de plantas de banano en un protocolo de regeneración vía yemas adventicias?

Para la propagación *in vitro* de banano, las yemas se desarrollan a partir de explantes seleccionados, son secciones del microcormo o bases foliares. Estos explantes requieren tratamientos preparatorios antes de ser introducidos al cultivo *in vitro*, donde se inducirá la formación de nuevas plántulas de esta manera se asegura la obtención de materiales sanos y libres de patógenos que puedan causar problemas desde el punto de vista económico y productivo.

1.4. Objetivo general

Desarrollar un protocolo eficiente para la regeneración de plantas de banano Williams vía yemas adventicias mediante el uso de medios de cultivo semisólido (vía convencional) y biorreactores de inmersión temporal.

1.5. Objetivos específicos

- Estandarizar el establecimiento in vitro de ápices meristemáticos de banano cv Williams, a partir de un proceso de cuarentena previa en condiciones de invernadero.
- Evaluar la respuesta morfogénica de los explantes en medios de cultivo semisólidos bajo distintas concentraciones de Tidiazuron (TDZ), cuantificando la frecuencia de formación y el número de multiyemas formadas por explante.
- Analizar la influencia de las dosis de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y el efecto residual del TDZ sobre la tasa de multiplicación y la eficiencia de regeneración de brotes en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) de yemas adventicias de banano en biorreactores de inmersión temporal.

1.6. Hipótesis

La presente investigación se desarrolla bajo un enfoque cuantitativo y un diseño experimental, cuyo propósito es evaluar el efecto de diferentes concentraciones de citoquininas (TDZ y 6-BAP) ejercen un efecto significativo sobre la inducción, multiplicación y regeneración de multiyemas de banano Williams.

Hipótesis general

La aplicación de diferentes concentraciones de citoquininas (TDZ y 6-BAP) influye significativamente en la inducción, multiplicación y regeneración de yemas adventicias de banano Williams, de modo que las dosis más elevadas de TDZ en medio semisólido y las dosis intermedias de 6-BAP en biorreactores de inmersión temporal incrementan la formación de multiyemas y el número de brotes verdes regenerados respectivamente.

Hipótesis específicas

H_{1.1}: Las concentraciones crecientes de TDZ en medio semisólido incrementan significativamente el número de multiyemas inducidas respecto a los tratamientos control.

H_{1.2}: Los explantes inducidos con las concentraciones más altas de TDZ generan un mayor número de plantas regeneradas en los biorreactores de inmersión temporal.

H_{1.3}: Las dosis intermedias de 6-BAP (22.5 mg/L) en BIT favorecen significativamente la formación de multiyemas y la regeneración de brotes verdes, respecto a las dosis bajas, altas y el control.

hipótesis nula (H₀)

Las diferentes concentraciones de TDZ y 6-BAP no producen efectos significativos en la inducción, multiplicación ni regeneración de multiyemas de banano Williams, por lo que no existen diferencias con los tratamientos control.

1.7. Declaración de las variables

En la presente investigación se establecen dos variables principales que permiten evaluar el efecto de las citoquininas sobre la respuesta morfogénica del banano Williams bajo condiciones de cultivo *in vitro*. La variable independiente corresponde a las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento aplicadas en los medios de cultivo, mientras que la variable dependiente se relaciona con la respuesta biológica observada en los explantes en términos de inducción, multiplicación y regeneración de estructuras con multiyemas.

A continuación, se describen de manera forma

Tabla 2.

Matriz de Operacionalización de Variables

variable	definición operacional	indicadores	técnicas	instrumentos
concentraciones de citoquininas (tdz y 6-bap)	dosis de tdz (1–4 mg/l) en semisólido y 6-bap (11.25–33.75 mg/l) en bit.	mg/l de tdz; mg/l de 6-bap	preparación de medios hormonados; inoculación en frascos/bit.	fichas de formulación; frascos; biorreactores.
respuesta morfogénica y regeneración	respuesta de explantes bajo tratamientos hormonales.	% de multiyemas; nº de multiyemas; nº de brotes; longitud de brotes.	observación directa; conteo morfológico; registro fotográfico.	estereoscopio; regla milimetrada; fichas de evaluación.

Elaboración propia (2025)

1.8. Justificación

La optimización de protocolos de propagación *in vitro* de plantas de banano Williams presenta una relevancia significativa en el contexto actual de la

agricultura y la biotecnología.

En vista de la creciente demanda global de alimentos y los retos que imponen el cambio climático, junto con la aparición de nuevas enfermedades la generación de nuevos cultivares resistentes mediante técnicas de biotecnológicas se ha convertido en una estrategia prioritaria e ineludible para el mejoramiento genético del banano.

La inducción de mutaciones ya sea mediante agentes físicos o químicos, ofrece la posibilidad de generar diversidad genética en una especie. El banano, carece de una amplia variación natural debido a su propagación vegetativa, esta diversidad es fundamental para la selección de rasgos deseables, como la resistencia a enfermedades o la tolerancia a condiciones ambientales adversas como la sequía, salinidad. Al introducir mutaciones de manera controlada, se acelera el proceso de obtención de plantas con características mejoradas que de otra forma tomaría mucho tiempo.

Según (Ortega et al., 2010) una de las estrategias más prometedoras es el desarrollo de variedades novedosas con resistencia a la Sigatoka negra, lo cual se puede lograr mediante técnicas biotecnológicas modernas como la mutagénesis y avanzadas como la edición, permitiendo así potenciar rasgos existentes o incorporar características agronómicas superiores.

Por consiguiente, la generación de yemas adventicias en banano se erige como un aspecto central de esta investigación. Su relevancia radica en la capacidad de contribuir a la mejora del rendimiento y la calidad del cultivo, así como a la aceleración de su multiplicación, lo cual se logra mediante el avance y

la adaptación de tecnologías. (Colmenares & Giménez, 2003).

La propagación *in vitro* mediante yemas adventicias constituye una técnica de regeneración vegetal que posibilita la obtención de múltiples yemas a partir de un único meristemo. Este proceso se facilita por el empleo de concentraciones elevadas de citoquininas en el medio de cultivo. El origen unicelular o paucicelular de estas multiyemas, combinado con la acción de las altas dosis de citoquininas, genera una fuente de variación somaclonal de gran valor en programas de mejoramiento genético para cultivos de propagación agámica, como es el caso del banano. No obstante, los protocolos convencionales documentados en la literatura internacional, basados en el uso de medios de cultivo semisólidos, si bien logran inducir un número considerable de explantes con multiyemas, presentan una tasa de regeneración de plantas relativamente baja, a menudo inferior a cinco plantas por cada explante.

Esta limitación podría ser superada mediante la incorporación estratégica de biorreactores de inmersión temporal (BIT) en distintas fases del proceso. La inmersión programada en los BIT previene problemas comunes como la hipoxia y la hiperhidricidad. Durante cada ciclo de inmersión, la totalidad de la superficie de los explantes entra en contacto con el medio de cultivo. Este contacto optimizado, junto con la presencia de hormonas, estimula una mayor cantidad de zonas de crecimiento y mejora la absorción de nutrientes, lo que se traduce en un incremento consecuente del número de brotes por explante. Por lo tanto, la implementación de una estrategia híbrida que integre el uso de medios de cultivo semisólidos con biorreactores de inmersión temporal podría ofrecer una herramienta de gran

utilidad para los programas de mejoramiento genético del banano.

Esta tecnología avanzada no solo facilitaría la obtención de plantas libres de patógenos, sino que también permitiría el desarrollo de nuevas variedades con características agronómicas superiores y aceleraría los procesos de mejora genética. En última instancia, esto generaría beneficios económicos y sociales significativos tanto para productores como para consumidores, repercutiendo positivamente en la economía y el desarrollo sostenible del sector bananero.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

2.1 Antecedentes

El presente estudio se centra en el desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* aplicadas al banano, con el propósito de optimizar el mejoramiento genético de esta fruta en Ecuador. La producción de banano en el país ha demostrado ser, a lo largo de los años, un pilar fundamental para la economía y el bienestar social, evidenciando un crecimiento sostenido en su rendimiento y un fortalecimiento progresivo de la productividad del sector. A pesar de su relevancia, un número considerable de productores aún enfrenta limitaciones en el acceso a financiamiento adecuado, lo que restringe su capacidad de expansión en el mercado. No obstante, el banano se posiciona como el principal producto agrícola generador de divisas para Ecuador y representa el segundo bien de exportación a nivel nacional. (Carranza et al., 2024)

2.2 Características botánicas, taxonomía, origen y evolución del cultivo

El banano es un cultivo que tuvo sus orígenes en la región indomalaya, donde históricamente se ha cultivado desde miles de años, este cultivo se propagó en una trayectoria que abarcó tanto las zonas del sur como las del oeste del continente, culminando su expansión hasta llegar a archipiélagos tan distantes como Hawái y la Polinesia. El banano se cultiva en todas las regiones tropicales y tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. (FAO, 2004)

Esta planta herbácea se caracteriza por una morfología muy imponente,

presentando un rizoma compacto del cual emerge un prominente pseudotallo. Esta estructura aparente, formada por unas vainas foliares, adopta una configuración cónica que puede alcanzar alturas significativas, comúnmente entre 3 y 6 metros. Dicha formación culmina en una corona foliar en su ápice. Es, en esencia, una planta de considerable altura cuya estructura principal culmina con un penacho de hojas en su parte superior, entrando en su fase de floración a partir del noveno mes.

2.3 Clasificación taxonómica del banano

En la Tabla 3 se muestra la clasificación taxonómica del banano.

Tabla 3

Taxonomía del banano

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Zingiberales
Familia:	Musaceae
Género:	Musa
Especie:	paradisiaca

Fuente: (Torres, 2017)

2.4 Importancia Económica

El cultivo de banano se posiciona como el principal generador de divisas dentro del sector agrícola ecuatoriano y representa el segundo producto de exportación a nivel nacional.

A escala global, el banano (*Musa spp.*), incluyendo variedades como Gros Michel y Williams, se considera un pilar esencial en la alimentación mundial debido a su elevado contenido de vitaminas y minerales. Este cultivo no solo es crucial para la seguridad alimentaria, sino que también funge como una fuente económica vital en numerosas regiones del planeta.

En Ecuador, la producción de banano se organiza principalmente en el marco de la economía familiar y la Economía Popular y Solidaria (EPS). Esta configuración posiciona al sector como un componente esencial para la creación de empleo y la disminución de la pobreza en las comunidades rurales. Ecuador se ha establecido como el principal exportador mundial de banano, siendo responsable de más de un cuarto (25%) del comercio global de esta fruta. En 2024, las exportaciones ecuatorianas de banano superaron los 7 millones de toneladas. (PRIMICIAS, 2025) Tradicionalmente, la propagación de esta planta se ha llevado a cabo de manera vegetativa empleando cormos. Sin embargo, este enfoque convencional genera una tasa de multiplicación considerablemente baja, lo que restringe de forma significativa la capacidad de responder a la demanda global en aumento y de ejecutar una renovación eficiente de las plantaciones existentes.

Las plantas de banano se multiplican asexualmente mediante la emergencia de vástagos desde su tallo subterráneo. Estos brotes exhiben un crecimiento vigoroso, lo que les permite generar un racimo maduro en un período inferior a un año. (FAO, 2004)

2.5 Cultivo de tejidos

2.5.1 Micropropagación como una Herramienta

Biotechnológica: Ventajas y Limitaciones

La micropropagación vegetal, una técnica avanzada derivada del cultivo de tejidos vegetales, se ha establecido como una solución robusta para la propagación masiva de plantas. Este método posibilita la generación de un elevado número de individuos a partir de pequeños fragmentos de tejido, o explantes, los cuales son cultivados bajo condiciones estrictamente controladas y asépticas.

Así mismo desde el inicio del nuevo milenio, la investigación en micropropagación se ha orientado hacia la automatización de diversas etapas del proceso. El objetivo principal de esta tendencia es la reducción de los costos asociados a la manipulación y el espacio requerido, al tiempo que se busca incrementar los volúmenes de producción y mejorar la calidad de los materiales de siembra. (García & Castro, 2011)

2.6 Ventajas

- Permite obtener clones genéticamente idénticos a la planta madre, asegurando que no haya variaciones indeseadas.

- Posibilita la producción masiva de plantas libres de enfermedades, lo que es crucial para los agricultores, ya que les proporciona plántulas sanas y vigorosas.
- Esta técnica se puede realizar durante todo el año, lo que facilita la disponibilidad de material para el cultivo de tejidos en cualquier momento.
- En el caso específico del banano, la micropropagación contribuye a una maduración uniforme de los frutos, simplificando enormemente la cosecha y reduce los costos de mano de obra.
- Las plantas de banano que provienen por esta vía maduran más pronto en la temporada, lo que puede ser beneficioso para la producción.
- La producción de plantas bajo esta técnica la hace más rentable, gracias a su favorable relación beneficio-costo.

2.7 Desventajas

Comprender las desventajas que existen en la propagación de tejidos vegetales nos ayuda a tomar la decisión correctas cuando sean necesarias:

- El cultivo de tejidos es costoso debido al alto costo de los equipos especializados y a los reactivos utilizados.
- El procedimiento es complejo.
- El experimento o procedimiento de cultivo debe ser realizado por un experto o una persona capacitada.
- Si una planta es susceptible a una enfermedad, todas las plantas de este stock clonado compartirán ese rasgo indeseable y serán susceptibles a esa enfermedad en particular.

- Existe el riesgo inherente de propagar enfermedades sistémicas si el explante inicial está contaminado
- El procedimiento de cultivo de la planta varía según la especie. Por lo tanto, para establecer un cultivo de una nueva especie, se requerirán varios experimentos y métodos de ensayo y error.
- Se requieren precauciones para proteger el cultivo de cualquier tipo de contaminación, lo que requiere mucho esfuerzo.
- Si alguna muestra de la planta está infectada, producirá todas las descendencias infectadas. Por lo tanto, es necesario examinar cuidadosamente el material para evitar el cultivo de las plantas infectadas.

2.8 Fundamentos de la Micropropagación

El cultivo de células y tejidos vegetales debe su origen a las ideas del científico alemán Haberlandt a principios del siglo XX. Los primeros estudios condujeron a cultivos de raíces, cultivos de embriones y los primeros cultivos verdaderos de callos y tejidos. El período entre las décadas de 1940 y 1960 estuvo marcado por el desarrollo de nuevas técnicas. (Thorpe, 2012)

Esta técnica ha evolucionado con el paso del tiempo, priorizando la obtención de material vegetal sin patógenos. Parte de sus fundamentos se basan en el uso de células y órganos, siendo fundamental el aprovechamiento de la totipotencialidad de las plantas.

El proceso de micropropagación generalmente se divide en varias etapas, que abarcan desde la selección del material original o plantas elites las cuáles serán las donadoras del material a establecerse *in vitro*, hasta el establecimiento

de las plantas en el campo.

Etapa 0: En esta fase se selección la Planta Madre, este paso es crucial ya que implica la cuidadosa elección de plantas donantes sanas y vigorosas, libres de enfermedades, para minimizar el riesgo de contaminación de los cultivos *in vitro*. Esta selección es un paso preventivo fundamental para asegurar la calidad y la viabilidad del proceso de micropropagación en laboratorio.

Etapa I: Establecimiento *in vitro* de los cultivos, se centra en la preparación y el inicio de los cultivos. Esta fase incluye la recolección del explante que se utilizará se debe considerar aquellas que posean las características fenotípicas deseadas, seguido de un riguroso proceso de desinfección con hipoclorito o alcohol para eliminar todo tipo de microorganismos principalmente bacterias u hongos, además de la escisión precisa del tejido meristemático y una incubación inicial en condiciones estériles, el objetivo principal de esta etapa es superar los desafíos iniciales, como la contaminación microbiana y la exudación de compuestos fenólicos que pueden dañar el explante.

La Etapa II: O multiplicación de plantas es donde se logra la proliferación de brotes a partir del explante inicial. Esto se consigue mediante la inducción de la formación de nuevas estructuras a partir de yemas, ya sean axilares o adventicias. Esta fase es fundamental para la producción masiva de plantas, para esto se debe realizar otro ciclo, con el fin de aumentar el número de invidos.

Etapa III: Enraizamiento de plántulas esto implica la transferencia de los brotes a un medio de enraizamiento específico, en esta etapa, se promueve el desarrollo de raíces y la elongación de los brotes, preparando las plántulas

para su eventual transferencia fuera del laboratorio.

Etapa IV: Aclimatación y transferencia al suelo es la fase de adaptación gradual de las plantas cultivadas *in vitro* a las condiciones *ex vitro*. Este proceso de endurecimiento es vital para la supervivencia y el establecimiento de las plántulas en el invernadero o en el campo.

Para el buen desarrollo de cada una de estas etapas se requiere una composición específica del medio de cultivo, donde incluye sales basales, vitaminas, fuentes de carbono y concentraciones precisas de cada regulador de crecimiento vegetal. La micropropagación es ampliamente reconocida por su eficiencia en la producción de un gran número de plantas clonales, que a menudo están libres de virus. La evolución de los objetivos de la micropropagación, desde la mera producción masiva hasta la priorización de la calidad y la sanidad de las plantas.

2.9 Inducción de Yemas Adventicias en Banano.

En los programas de mejoramiento genético es importante contar con un sistema de regeneración de plantas eficiente, que permita que las células modificadas genéticamente puedan desarrollarse y regenerar plantas que manifiesten las características deseadas. (García et al., 2006)

Son pequeños ápices blanquecinos que se obtienen mediante resiembras sucesivas de domos meristemáticos de vitroplantas (Ortega et al., 2010).

Las yemas adventicias son estructuras que se forman a partir de tejidos diferenciados, a diferencia de las yemas axilares que se desarrollan de meristemos preexistentes. Su regeneración a partir de una o pocas células es

altamente deseable para la implementación en los programas de mejoramiento genético y micropropagación, ya que minimiza el riesgo de formación de quimeras.

En el banano es fundamental utilizar los ápices caulinares ya que son una fuente eficaz para inducir yemas adventicias. El uso de tejidos meristemáticos organizados, como los ápices caulinares, se prefiere generalmente sobre la regeneración mediada por callos, ya que ayuda a mantener la fidelidad genética y a producir un nuevo individuo que mantiene fielmente todas las características y rasgos genéticos de la planta madre o de la variedad original. De acuerdo con García et al., 2006 para desarrollar un programa de mejora genética asistido por biotecnología es imprescindible establecer primero un sistema de regeneración de plantas que sea altamente eficientes y garantice que las células mutantes o modificadas genéticamente, puedan regenerar y dar lugar a plantas con los atributos deseados. La organogénesis directa, donde los brotes adventicios surgen directamente de los tejidos del explante sin una fase intermedia de callo, es el método de propagación comercial preferido debido a su rápida producción de brotes y sobre todo a la reducción de la variación somaclonal. La elección del explante (tejidos meristemáticos como los ápices caulinares) y la vía de regeneración (formación directa de yemas adventicias) no es simplemente una preferencia metodológica, sino una estratégica para mantener la integridad genética del material propagado, lo cual es necesario para el éxito del desarrollo de este protocolo.

Para obtener los resultados esperados de la mano también va el uso de

los reguladores de Crecimiento Vegetal, puesto que desempeñan un papel central en la inducción de yemas adventicias, el papel fundamental que ejercen las citoquininas sintéticas (6-BAP, benciladenina, TDZ, kinetina, zeatina, etc.), es romper la dominancia apical gobernada por las auxinas, liberando así las yemas o meristemas laterales de la dormancia. (Jiménez, 2017), son esenciales para inducir la proliferación de brotes y superar la dominancia apical. De acuerdo a otros trabajos de investigación se ha demostrado que el uso del Thidiazuron (TDZ) es excepcionalmente eficaz para la inducción de yemas adventicias en cultivares de banano, logrando que entre el 62% y el 83% de los explantes desarrollen yemas adventicias en solo dos subcultivos. El TDZ es menos susceptible a la degradación en comparación con otras citoquininas. En concentraciones entre 0.5 μM y 5 μM (aproximadamente 0.12-1.2 mg/L) han mostrado un aumento significativo en la proliferación de brotes, la dominancia apical, una característica fisiológica de muchos cultivares de banano, inhibe la formación de yemas adventicias, en el caso del TDZ, gracias a sus propiedades bioquímicas únicas supera esta dominancia apical, permitiendo así una inducción eficiente de yemas adventicias por lo que esta relación de causa y efecto es fundamental para el éxito de esta vía de regeneración.

Se han utilizado otras citoquininas como la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) es una citoquinina ampliamente utilizada para la multiplicación de brotes, las dosis óptimas varían entre 3 y 5 mg/L, dependiendo del genotipo, en concentraciones más altas (0.1-20 mg/L) pueden estimular la formación de yemas axilares y adventicias, mientras que, en contraste la Kinetina y la 2-Isopenteniladenina (2ip)

son generalmente menos efectivas que el TDZ para la inducción de yemas adventicias.

Las condiciones ambientales estándar son importantes para el desarrollo óptimo de los cultivos in vitro esto incluyen una temperatura de 24-25°C, un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y una humedad controlada.

2.10 Medios de Cultivo Semisólidos: Aplicación, Ventajas y Desafíos en Banano

Par el cultivo in vitro el uso del medio basal es importante debido a que las células y tejidos vegetales lo necesitan para crecer y desarrollarse la cual se puede ajustar con componentes adicionales según el tipo de tejido, especie vegetal o el objetivo de la investigación, por ejemplo, inducción de callos, enraizamiento, o micropropagación.

El medio basal de Murashige y Skoog (MS, 1962) es el más ampliamente adoptado para el cultivo de especies de Musa. Este medio se complementa con una fuente de carbono, generalmente sacarosa típicamente 20-30 g/L, vitaminas y reguladores de crecimiento vegetal.

Para solidificar el medio, se utilizan agentes gelificantes como el agar (5-8 g L⁻¹) o también el Phytigel 1.8 g L⁻¹. En algunos casos, se prefiere el Gelrite (2-4 g L⁻¹) sobre el agar debido a su mayor transparencia, lo que facilita la detección temprana de contaminación. La preparación del medio implica ajustar el pH a 5.8 antes de la esterilización, que se realiza mediante autoclavado a 121°C y 15 PSI durante 20 minutos. Es importante destacar que hormonas como el BAP y el IAA deben diluirse en NaOH para asegurar una homogeneización adecuada en el

medio de cultivo. La ventaja de los medios semisólidos se fundamenta en proporcionar un soporte físico a los explantes, lo que ayuda a prevenir la vitrificación o hiperhidratación que puede ocurrir en sistemas líquidos continuos. Además, son sistemas bien establecidos y ampliamente utilizados.

Sin embargo, los medios de cultivos semisólidos presentan varias desventajas debido a que los agentes gelificantes son muy costosos, lo que incrementa de manera significativa los costos de producción. Esta situación resalta una disyuntiva: aunque los agentes gelificantes son esenciales para la integridad estructural de los cultivos, también introducen limitaciones económicas importantes. Esta restricción en los sistemas semisólidos implica la búsqueda de otros métodos como el medio de cultivo líquido como una alternativa. En el caso del uso del sistema de uso de medios semisólidos convencionales se suele emplear recipientes pequeños, lo que restringe la densidad de explantes por envase y, consecuentemente, aumenta la necesidad de obtener un espacio físico de incubación más grande, también puede limitar el intercambio gaseoso, afectando potencialmente el crecimiento del explante.

2.11 Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).

Los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) constituyen una herramienta eficaz para la propagación de plantas in vitro, pues aumentan el coeficiente de multiplicación y la calidad de las mismas (Aragón et al., 2004).

Los biorreactores son entornos autónomos y estériles cuya función básica es proporcionar condiciones óptimas de crecimiento mediante la regulación de diversos factores químicos y físicos (Singh, 2021).

En los biorreactores, las condiciones de cultivo son más uniformes y el medio de cultivo puede ser fácilmente renovado sin cambio de envase (Castillo et al., 2019). La adaptación de las plantas a las condiciones de los Biorreactores de Inmersión Temporal es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio de cultivo en el interior del frasco (Aragón et al., 2004).

Los biorreactores de inmersión temporal (BIT) operan bajo el principio de inmersión periódica en los explantes con un medio de cultivo líquido, seguida de una fase de drenaje, este ciclo intermitente permite un intercambio gaseoso óptimo y una absorción eficiente de nutrientes por parte de las plantas, esta inmersión discontinua es fundamental para las plantas terrestres, que podrían sufrir daños por una sumersión continua este sistema también asegura una renovación completa de la atmósfera dentro del recipiente. Existen ventajas claras en el uso de los BIT sobre los sistemas convencionales semisólidos. Los BIT pueden lograr tasas de multiplicación significativamente más altas, reportándose incrementos de 3 a 4 veces en comparación con los cultivos semisólidos convencionales para el del caso del banano (*Musa spp*) en biorreactores de Inmersión Temporal se han demostrado altas tasas de multiplicación, la eliminación de los costosos agentes gelificantes en los medios líquidos y utilizar los BIT resulta en una reducción sustancial de los costos de producción.

Según lo indicado en un estudio realizado por (Murthy et al., 2023) menciona que el uso de medios líquidos y la adopción de biorreactores

incrementaron la producción de plantas sanas. Además, la automatización del manejo de los cultivos en la inoculación y cosecha en los BIT reduce significativamente el tiempo y la mano de obra en comparación con los sistemas semisólidos manuales. Otra de las ventajas en este tipo de recipientes BIT es que tienen una mayor superficie de contacto con el medio líquido, lo que mejora la disponibilidad y absorción de nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal. La calidad fisiológica en plantas regeneradas en BIT a menudo es superior, debido a que obtienen características favorables como: estomas más activas, mayor acumulación de pigmentos y una aclimatación más rápida. La constitución fisiológica de los brotes en BIT es más similar a la de los ambientes ex vitro. Los BIT permiten un control preciso de los factores físicos y químicos, y son altamente adaptables a la automatización y la producción a gran escala. También es posible cultivar una mayor densidad de explantes por recipiente. En comparación además estos sistemas BIT reducen significativamente la incidencia de hiperhidratación (vitrificación) y minimizan el estrés mecánico en los delicados tejidos vegetales. Este mecanismo combina inteligentemente las ventajas del cultivo líquido debido a la mayor disponibilidad de nutrientes, dilución de compuestos inhibidores, ahorro de costos al eliminar agentes gelificantes, con el beneficio crítico de la aireación periódica. La permite un intercambio gaseoso óptimo, previniendo la depleción de oxígeno y la hiperhidratación, problemas que son comunes en los sistemas de medios líquidos continuos. Esta sinergia entre el contacto con el medio líquido y la renovación atmosférica crea un ambiente fisiológicamente favorable, lo que se traduce en explantes más sanos y tasas de multiplicación

significativamente más altas, la inmersión intermitente genera un ambiente dinámico que optimiza tanto la absorción de nutrientes como el intercambio gaseoso. Este ambiente optimizado, a su vez, conduce a una mejora de la actividad metabólica, lo que finalmente resulta en un crecimiento superior, mayores tasas de multiplicación y plántulas más sanas. Las ventajas de los BIT en términos de producción masiva, ahorro de costos, mano de obra y tiempo, así como su capacidad de automatización, son consistentemente destacadas. La capacidad de cultivar una densidad significativamente mayor de explantes por recipiente y lograr una tasa de multiplicación 3 o 4 veces superiores a los métodos semisólidos se traduce directamente en una mayor escalabilidad y eficiencia económica, estas características posiciona a los BIT como una tecnología transformadora capaz de superar las limitaciones económicas como los altos costos, intensidad de mano de obra, que históricamente han dificultado la adopción comercial generalizada de la micropropagación en medios semisólidos. Reducción del costo de producción, por el uso de medios de cultivo líquidos y por el menor uso de mano de obra. El uso del SIT, reduce los costos de producción por planta; esto como consecuencia de la mecanización de algunas etapas de la micropropagación (Ontaneda, 2020). Este avance tecnológico en biotecnología puede contribuir en el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria a una mayor escala. Para este trabajo se utilizó sistemas de inmersión temporal con los parámetros que se muestran en la Tabla 4.

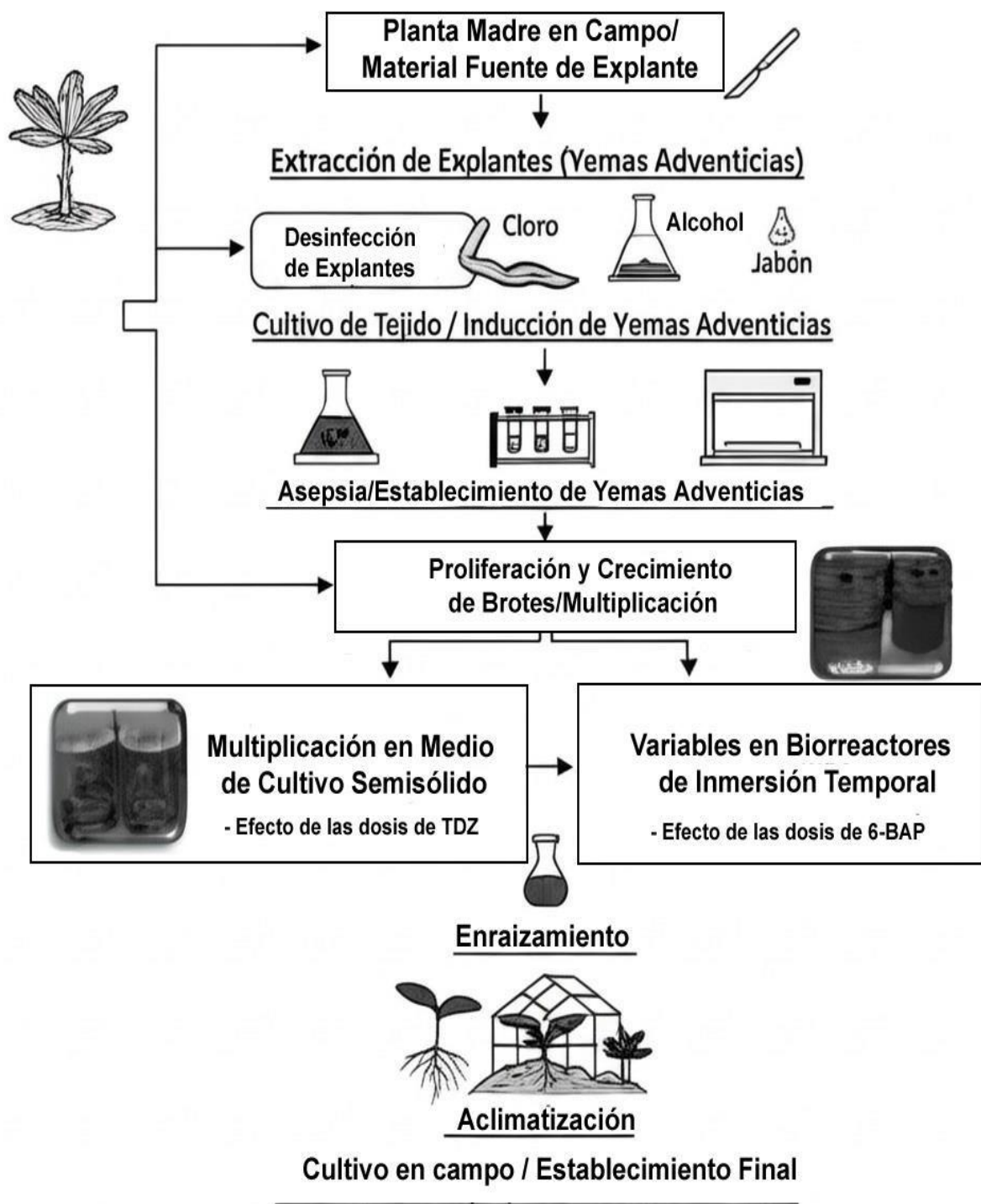
Tabla 4

Parámetros Operacionales para el Cultivo de yemas adventicias de Banano en BIT.

Parámetro Operacional	Valor/Rango Propuesto	Notas Clave
Tipo de Biorreactor	Doble frasco 1,5 L (capacidad)	Comúnmente utilizado para micropropagación de banano.
Volumen de Medio Líquido	500 ml (por biorreactor)	Permite una inmersión adecuada de los explantes.
Densidad de inóculo	Diferente densidad de inóculo/biorreactor	Puede optimizarse para mayores densidades (hasta 50 explantes/500mL).
Frecuencia de Inmersión	Diferente frecuencia de (inmersiones/día)	Promueve el intercambio gaseoso y la absorción de nutrientes.
Duración de Inmersión	2 minutos	Tiempo suficiente para contacto con el medio sin causar hiperhidratación.
Temperatura de Cultivo	25 ± 2°C	Condiciones óptimas para el crecimiento de <i>Musa spp.</i>
Fotoperíodo	16 horas luz / 8 horas oscuridad	Estándar para la mayoría de cultivos <i>in vitro</i> de plantas.
Intensidad Lumínica	42 μmol/m ² s (o 2000 Lux)	Asegura la fotosíntesis adecuada de las plántulas.
Intervalo de Subcultivo	Cada 6 semanas	Mayor duración que en medios semisólidos debido a la renovación constante de nutrientes.

Fuente: Elaboración propia (2025)

En la Figura 1, se muestra de manera esquemática la secuencia de actividades clave y las etapas metodológicas involucradas en la ejecución del presente protocolo. Este diagrama visual detalla de forma concisa el flujo de trabajo, desde las fases iniciales hasta las finales, permitiendo una comprensión clara y rápida de los procedimientos y las interacciones entre las distintas etapas descritas en este documento.



Fuente: Elaboración Propia (2025)

Figura 1. Esquema para establecimiento, regeneración y multiplicación de yemas adventicias de banano.

El éxito de la micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal BIT se encuentra fuertemente influenciado por varios factores donde se puede observar.

Que el éxito cae principalmente, en el tiempo y la frecuencia de inmersión a los que se exponen los explantes. Otros elementos cruciales incluyen la capacidad del biorreactor y la cantidad de medio de cultivo disponible por cada explante.

El tiempo de inmersión se define como el periodo, medido en minutos, durante el cual el explante permanece en contacto con el medio de cultivo. Por su parte, la frecuencia de inmersión indica el número de veces o ciclos en que el explante es sumergido en el medio líquido, y se expresa en horas.

En este trabajo se utilizó en sistemas de Inmersión Temporal Automatizado, es el más comercial de los sistemas de inmersión temporal.

2.12 Variación Somaclonal en Cultivo de Tejidos de Banano.

La variación somaclonal se refiere a las variaciones fenotípicas y genotípicas que se observan entre las plantas regeneradas a partir del cultivo de tejidos *in vitro*. Estas variaciones pueden surgir de diferencias genéticas preexistentes en el explante o ser inducidas durante el propio proceso del cultivo *in vitro*. Si bien la variación somaclonal ha sido tradicionalmente considerada una limitante en la micropropagación del banano con reportes de hasta un 90% de variantes no deseadas en condiciones de campo, como el enanismo y la deformación del racimo, esta también representa una oportunidad valiosa para generar diversidad genética en un cultivo altamente clonado. En contextos de mejoramiento genético, dicha variabilidad puede ser aprovechada para

seleccionar individuos con características agronómicas superiores, como resistencia a enfermedades o tolerancia a condiciones adversas. De este modo, según lo indicado por (Ermini et al., 2021) la variación somaclonal, lejos de ser únicamente un efecto indeseado, puede convertirse en una herramienta estratégica para ampliar la base genética del banano y acelerar la obtención de genotipos élite. Como afirma (Duta-Cornescu et al., 2023) existe dos aspectos opuestos que caracterizan la micropropagación *in vitro* de plantas el mantenimiento de la fidelidad genética para la perpetuación y preservación de las élites, y la identificación y el aprovechamiento de las variaciones somaclonales asociadas con nuevas características útiles.

Se debe tomar en cuenta que el hecho de mantener la forma tradicional de propagación conlleva un riesgo considerable en la diseminación de enfermedades que pueden propagarse rápidamente a través del material de siembra infectado.

Las causas de la variación somaclonal son muchas, la fuente del explante es un factor clave: los tejidos altamente diferenciados, por ejemplo, tallos, raíces, hojas que pasan por una fase de callo son más propensos a las variaciones que los tejidos indiferenciados o meristemáticos, como los ápices caulinares o los explantes nodales. Los reguladores de crecimiento vegetal también influyen; proporciones desequilibradas o altas concentraciones de los reguladores de crecimiento, en particular auxinas y ciertas citoquininas como el TDZ y la Zeatina, pueden inducir poliploidía y otras alteraciones genéticas. Por otra parte, el genotipo de la planta juega un papel crucial en su susceptibilidad a la variación

somaclonal. El sistema de regeneración es otro determinante; la regeneración mediada por callos generalmente conduce a tasas más altas de variación somaclonal en comparación con la organogénesis directa. Finalmente, la duración que tenga en un determinado medio de cultivo y el número de ciclos del cultivo están directamente correlacionados con un aumento en la incidencia con la variación somaclonal.

La variación somaclonal es un fenómeno natural que ocurre en los procedimientos de cultivo de tejidos. (Patiño, 2010)

La detección temprana de las variaciones es vital y puede realizarse mediante monitoreo constante, por ejemplo, alteraciones en el metabolismo del ácido giberélico, actividad fotosintética, o con el uso de análisis citológico, por ejemplo, con análisis en citometría.

Finalmente, se considera la evaluación en campo ya que es indispensable para la validación final de la fidelidad genética y el rendimiento de las plantas.

2.13 Principales enfermedades que amenazan el cultivo de banano.

Otro punto importante que se debe tomar en cuenta en el cultivo de banano es la susceptibilidad a algunas enfermedades producidas por hongos o bacterias. Entre ellas, tenemos a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), que es considerada el mayor problema fitosanitario de este cultivo. Para su control, se ha usado una diversidad de fungicidas que buscan aplacar el ataque de este hongo y sus efectos en la producción (Tuz Guncay, 2018).

La Sigatoka negra es devastadora en musáceas, principalmente en plátanos y bananos, causada por el hongo (*Mycosphaerella fijiensis*). Esta

enfermedad es la principal limitante en la producción de estas plantas a nivel mundial, afectando significativamente el área fotosintética. La enfermedad al afectar severamente las hojas limita su capacidad para realizar fotosíntesis y por ende, la producción de frutos. Adicionalmente, infecciones severas de la Sigatoka negra causan la madurez prematura del fruto (Álvarez et al., 2013). Siendo el banano uno de los productos que sostiene económicamente al país, generando plazas de empleo y divisas, además de ser uno de los alimentos de suma importancia para la seguridad alimentaria. Otra de las enfermedades que amenaza este cultivo es el denominado Moko bacteriano (*Ralstonia solanacearum* raza 2). Típicamente, los cortes transversales del tallo supuran un exudado bacteriano viscoso. (Peeters et al., 2013). Al ser un patógeno transmitido por el suelo, los campos infectados rara vez pueden reutilizarse, incluso después de rotarlos con plantas no hospedantes. La enfermedad se controla mediante el uso de cultivares resistentes y tolerantes.

En algunos casos, se ha logrado prevenir su propagación mediante la aplicación de estrictas prácticas de saneamiento profiláctico. (Peeters et al., 2013). Actualmente se debe tomar en cuenta que existe un riesgo inminente de que pueda ingresar al país el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (R4T), debido a que en países como en Colombia y Perú ya se han reportado los primeros casos. En abril de 2021, se observaron plantas de banano (*Musa* spp., Cavendish, AAA) (30% de incidencia) que mostraban síntomas típicos de FWB, como amarillamiento de las hojas, marchitez y decoloración vascular, en una finca (aproximadamente 1 ha) ubicada en Querecotillo, Perú

(Acuña et al., 2022). En América Latina y el Caribe (ALC), se reportó por primera vez en Colombia (2019), posteriormente en Perú (2021) y recientemente se declaró en Venezuela (2023) (Torres et al., 2024).

La raza 4 del hongo representa un riesgo considerable para el suministro mundial de musáceas, ya que puede afectar directamente la producción de bananos y plátanos (Martínez et al., 2023).

El hongo fitopatógeno, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical (R4T), es un patógeno muy agresivo que tiene la capacidad de ocasionar, en clones de Cavendish, la enfermedad conocida como marchitamiento del banano, Fusariosis del banano o coloquialmente “Mal de Panamá”, capacidad que no tienen las razas 1 y 2 (F. García et al., 2020)

Esto nos lleva a considerar que, ante la amenaza que representa esta agresiva cepa de R4T para las plantaciones de banano, se vuelve crucial optimizar métodos de propagación que permitan obtener material vegetal sano y uniforme de manera eficiente. En este sentido, la propagación in vitro se presenta como una herramienta de importancia, que a diferencia de la propagación tradicional por cormos debido a que la tasa de multiplicación es limitada. Una de las alternativas para la propagación de banano a gran escala es propagación in vitro. La propagación del banano se realiza mediante cormos obtenidos de hijuelos espadas y uno de los principales problemas es que la tasa de multiplicación por esta vía considerada convencional es baja (Ubilla, 2016).

La micropropagación in vitro es una técnica de cultivo en la cual se siembra el explante en un frasco de vidrio, que exige un control específico del ambiente,

tanto físico como químico, el cual contiene un medio de cultivo que se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladoras de crecimiento, azúcar, agua y agar (Guerrero & Arrieta, 2019).

En la actualidad se han desarrollado investigaciones usando como opción la automatización de una o más etapas en los procesos de micropropagación para reducir los costos y espacio, uno de los mecanismos utilizados es la utilización de medios de cultivo líquidos esta es una condición para establecer una condición en los procesos de organogénesis con sistemas como: RITA, air lift, Biorreactores de inmersión temporal (BIT), entre otros (Díaz & Castro, 2011).

La propagación in vitro vía yemas adventicias es un método de regeneración de plantas que permite obtener múltiples yemas a partir de un solo meristemo, mediante el uso de dosis elevadas de citoquininas en el medio de cultivo aprovechando así la totipotencia de las plantas, en este caso en el cultivo de banano.

2.14 Material vegetal

Se seleccionan hijuelos sanos y vigorosos de *Musa spp. Williams*, con una altura de 40 a 100 cm, provenientes de plantas madre libres de enfermedades.

La preparación del explante implica varios pasos meticulosos, primero, se les retira las raíces y el exceso de tierra de los hijuelos, lavándolos a fondo bajo agua corriente luego, se recortan las vainas foliares externas eliminando toda impureza que pueda provocar un futuro deterioro en el explante, se realiza cortes hasta dejar el explante con un tamaño de aproximado de 5 cm. los explantes son sumergidos en una solución de hipoclorito sodio al 3 % con una gota de Tween

20/80 durante 30 minutos, luego se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril. Una esterilización inadecuada o incompleta puede producir la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos) dentro del cultivo, lo que resulta en una contaminación generalizada, la muerte del explante y, en última instancia el fracaso del proceso de micropropagación, por lo tanto, un protocolo de esterilización exhaustivo y redundante es un requisito fundamental para lograr altas tasas de éxito y viabilidad económica.

Finalmente, y ya bajo condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar, se realiza cortes en los ápices caulinares retirándole cuidadosamente los tejidos superficiales, hasta obtener un ápice caulinar cónico de 3 cm de longitud, incluyendo una porción de rizoma de 1-2 mm, los cultivos se incubaron a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 25-30 días, donde se cambia a medios de cultivo de multiplicación según sea conveniente.

2.15 Preparación de Medios de Cultivo para Inducción y Multiplicación

La base fundamental para la preparación de medios de cultivo es el medio basal de Murashige y Skoog (MS, 1962), es la base para todos los medios de cultivo utilizados en este estudio, es un paso que requiere precisión en la composición y el manejo.

Para los medios semisólidos, se utiliza un agente gelificante como el Phytigel a 1.8 g/L. El Gellan Gun (2-4 g/L) es otra alternativa que ofrece una mayor transparencia, lo que facilita la detección temprana de cualquier contaminación. Antes de la esterilización, el pH del medio se ajusta a 5.8 utilizando NaOH todos los medios se esteriliza mediante un autoclavado a 121°C

y 15 PSI (1.2 kg/cm²) durante 20 minutos en la siguiente tabla se detalla la composición propuesta para los medios de cultivo, donde se proporciona una guía precisa para la preparación de los mismos.

Para la inducción de yemas adventicias en medios semisólidos, se emplean frascos vidrio, en cada frasco se dispensan 30 ml de medio de cultivo semisólido.

Las condiciones ambientales durante el cultivo in vitro son estrictamente controladas en una cámara de crecimiento, con el objetivo de proporcionar un ambiente óptimo para la proliferación y desarrollo de los explantes. La temperatura se mantiene entre 24 y 25 °C, rango considerado ideal para favorecer la actividad metabólica y enzimática de los tejidos vegetales, así como para promover la división celular y la diferenciación de órganos. La humedad relativa se mantiene al 70%, parámetro crítico para evitar la pérdida de agua por transpiración excesiva en un sistema cerrado, lo que podría comprometer la viabilidad de los explantes.

La iluminación para las vitroplantas consistió en un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, utilizando lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad lumínica aproximada de 40 a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta configuración lumínica imita las condiciones diurnas naturales, estimulando la fotosíntesis y regulando procesos fisiológicos mediados por fitohormonas. La combinación de estos parámetros, temperatura, humedad, fotoperíodo e intensidad lumínica destaca la importancia de mantener un ambiente controlado. Durante el periodo de cultivo, las plántulas en desarrollo son sometidas a

recambios periódicos de medio de cultivo fresco. En la Tabla 5 se muestra la composición detallada de medios de cultivo para la inducción y multiplicación de yemas adventicias en banano.

Tabla 5: *Composición Detallada de Medios de Cultivo para Inducción y Multiplicación de Yemas Adventicias en Banano*

Componente del Medio	Concentración (mg L⁻¹)	Propósito/Etapa
Medio Basal MS	Estándar (Murashige & Skoog, 1962)	Inducción y Multiplicación
Sacarosa	30000 mg L ⁻¹	Fuente de carbono
Agente Gelificante (solo para semisólido)	Phytigel: 2000 mg L ⁻¹	Solidificación del medio
TDZ (Thidiazuron)	0.5 - 2.0 mg L ⁻¹ (aprox. 2.0 - 8.0 µM)	Inducción de yemas adventicias
BAP (6-Bencilaminopurina)	3.0 - 6.0 mg L ⁻¹ (aprox. 13.3 - 26.6 µM)	Multiplicación de brotes
AIA (Ácido Indol-3- acético)	1.0 - 1.3 mg L ⁻¹ (aprox. 5.7 - 7.4 µM)	Co-regulador para multiplicación
pH	5.8	Estabilidad del medio

Fuente: Elaboración propia (2025)

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Establecimiento de plantas in vitro de banano Williams a partir de material adaptado en invernadero.

El desarrollo de protocolos in vitro requiere de una fuente de suministro periódico de explantes, que sea de fácil acceso y en condiciones semicontroladas de cultivo, para monitorear y mejorar el estado fisiológico y fitosanitario de la planta donante, por lo que fue necesario establecer plantas de banano Williams en el invernadero de la EELS para la cuarentena, como paso previo al desarrollo del protocolo de inducción de las yemas adventicias.

Material vegetal: El material vegetal para establecer el banco consistió en hijos espadas de las plantas de banano cv Williams con 18 meses año de establecidas en el jardín clonal de la EELS.

Tanto para la siembra como para el manejo del material de banano durante la cuarentena en invernadero se procedió de acuerdo a lo descrito en el Informe Anual del laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP (Quiala et al. 2022).

A los 45 días de sembradas, las plantas fueron retiradas de las camas y se les cortó la parte superior, dejando 10 cm del pseudotallo. Luego, se eliminaron los restos de sustrato lavándolas con agua corriente y utilizando un cepillo de cerdas duras. Posteriormente, los cormos fueron pelados y reducidos hasta obtener colinos con dimensiones de 5 cm de ancho en la base por 5 cm de altura.

Finalmente, estos colinos se llevaron al laboratorio para comenzar el

proceso de establecimiento *in vitro*.

3.1.1 Establecimiento de plantas *in vitro*.

En el laboratorio, los colinos provenientes del invernadero, con dimensiones de 5 x 5 cm, fueron desinfectados sumergiéndolos durante 40 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 3%. Luego, se redujeron hasta obtener un ápice meristemático de 3 x 4 cm. Tras este primer paso, el material vegetal se trasladó a la cabina de flujo laminar, donde se realizó una segunda desinfección, nuevamente con hipoclorito de sodio, durante 20 minutos. A continuación, utilizando pinzas y bisturíes esterilizados, se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 0,7 cm de base por 1 cm de altura. Estos fueron sembrados en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo Murashige y Skoog (1986), enriquecido con sacarosa y reguladores del crecimiento. Después de 35 días, los explantes que no presentaban signos visibles de contaminación fueron transferidos a un nuevo medio de cultivo para iniciar la etapa de multiplicación.

3.2 Inducción de yemas adventicias *in vitro*.

En este método de propagación, para formar las yemas adventicias se requiere añadir al medio de cultivo elevadas concentraciones de citoquininas (CK). Es por ello que, en el ensayo 1 se evaluaron diferentes tratamientos con este tipo de regulador del crecimiento, en este caso de TDZ, incorporado al medio de cultivo semisólido durante dos subcultivos sucesivos, con una frecuencia de 30 días. Los explantes resultantes de este Ensayo 1 se inocularon en los biorreactores de inmersión temporal (BIT) para estimular la multiplicación y el

crecimiento de las yemas adventicias hasta lograr la formación de plantas verdes y viables, dando lugar al Ensayo 2, cuyo objetivo fue determinar la influencia que tiene la dosis de TDZ utilizada durante la fase de inducción de las MY en el medio de cultivo semisólido, en la posterior multiplicación de las MY y la regeneración de plantas en estos sistemas semiautomatizados. Finalmente, con el objetivo de incrementar la tasa de regeneración de plantas se diseñó un tercer experimento (Ensayo 3), para determinar el efecto de diferentes dosis de la citoquina 6-BAP en la multiplicación de MY y la regeneración de plantas de banano Williams en los BIT.

3.2.1 Ensayo 1: Efecto de diferentes dosis de TDZ en la inducción de yemas adventicias en medio de cultivo semisólido.

El material vegetal utilizado en este estudio correspondió a ápices meristemáticos de plantas del cultivar William, previamente establecidos in vitro a partir de material procedente del invernadero. Estos explantes se encontraban en el tercer subcultivo de multiplicación (P3), y el proceso de establecimiento, así como la multiplicación inicial, se llevaron a cabo conforme al protocolo propuesto por Orellana (1995).

Inducción de Yemas Adventicias

La inducción de yemas adventicias o multiyemas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por García et al. (2006). Para ello, se emplearon secciones de brotes de aproximadamente 0,5 cm² que incluían la región meristemática. Se colocaron cinco explantes por frasco de cultivo de 220 mL de capacidad, cada

uno conteniendo 30 mL de medio específico para la formación de multiyemas (MFY). El medio de cultivo estuvo compuesto por sales minerales según la formulación de Murashige y Skoog (1962), suplementadas con 1.0 mg L^{-1} de tiamina, 30 g L^{-1} de sacarosa y cuatro concentraciones diferentes del regulador de crecimiento Tidiazuron (TDZ). Como controles, se incluyeron dos tratamientos adicionales: uno con medio MS suplementado con 4.0 mg L^{-1} de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (denominado TM) y otro basado en el protocolo propuesto por Strosse et al. (2006) (TSS), utilizado para la inducción de multiyemas en banano. En total, se evaluaron seis tratamientos experimentales.

Los medios fueron solidificados con $7.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar y el pH se ajustó a 5.8 antes de proceder a la esterilización mediante autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos.

Los explantes fueron transferidos periódicamente a un medio de cultivo fresco con la misma composición, realizando los subcultivos cada 30 días. Al finalizar un periodo de 90 días de cultivo in vitro, se llevó a cabo la evaluación de la respuesta morfogénica de los explantes.

Se determinó el porcentaje de explantes por frasco que presentaron formación de yemas adventicias y de brotes con hojas verdes. Asimismo, se contabilizó el número promedio de yemas adventicias y de brotes verdes desarrollados por explante, con el fin de evaluar la eficiencia del proceso de inducción y multiplicación.

Evaluación de las yemas adventicias: se identificaron como yemas adventicias a las estructuras globosas, de color blanquecino y de tamaño entre

1.0 - 3.0 mm, que se desarrollaron en la superficie del explante (García et al., 2006).

Tabla 6. Descripción de los tratamientos con diferentes dosis de TDZ.

Tratamientos	Número de explantes/frasco	Número de frascos/tratamiento	Total de explantes /tratamiento
T1	5	5	25
T2	5	5	25
T3	5	5	25
T4	5	5	25
T5	5	5	25
T6	5	5	25

Leyenda: Los tratamientos contenían el medio de cultivo MS (Murashige y skoog, 1962). T1: TM (control): 4.0 mg L⁻¹ + 0.65 mg L⁻¹, T2: TSS 0.0 mg L⁻¹ de TDZ+22,5 L⁻¹ mg 6 Bap: T3: 1.0 mg L⁻¹ de TDZ, T4: 2.0 mg L⁻¹ de TDZ, T5: 3.0 mg L⁻¹ de TDZ, T6: 4.0 mg L⁻¹ de TDZ.

3.2.2 Ensayo 2. Efecto de la concentración de TDZ en la inducción de yemas adventicias sobre la regeneración in vitro de banano cv. Williams en los BIT.

Este ensayo tuvo como finalidad analizar la influencia de diferentes concentraciones del regulador de crecimiento Tidiazuron (TDZ), utilizadas en la etapa de inducción de yemas adventicias bajo condiciones de cultivo semisólido, sobre la subsecuente multiplicación en sistemas de biorreactores de inmersión temporal (BIT) y la capacidad regenerativa de dichas estructuras en plantas

verdes viables. Para ello, se emplearon como inóculo los explantes multigemados obtenidos en el Ensayo 1. Estos fueron introducidos en los BIT a razón de cinco explantes por frasco, manteniendo la trazabilidad del tratamiento original con TDZ al que fueron sometidos. Cada biorreactor recibió 500 mL de medio de cultivo de multiplicación TM en su forma líquida. Con el fin de evaluar el efecto residual del TDZ empleado durante la formación de multiyemas, se establecieron seis tratamientos correspondientes a las variantes del medio MFY, y cada uno fue replicado tres veces, resultando en un total de 18 biorreactores.

A los 45 días de cultivo, se procedió a la renovación del medio mediante la incorporación de TM fresco, con el objetivo de promover la elongación de las yemas y el desarrollo de brotes verdes. Posteriormente, a los 21 días, se añadió un volumen adicional de 500 mL de medio MCY por biorreactor. A los 90 días posteriores a la inoculación, se realizó la cosecha y evaluación del experimento, registrando el número total de brotes verdes viables generados por cada biorreactor, así como la longitud promedio de dichos brotes.

3.2.3 Ensayo 3. Efecto de diferentes dosis de 6-BAP en la regeneración de yemas adventicias de banano Williams cultivadas en los BIT.

Con el objetivo de incrementar el número de plantas que regeneran a partir de los explantes con multiyemas inoculados en los BIT, se procedió a determinar el efecto de diferentes dosis de la citoquinina 6-BAP en la multiplicación de las MY y la regeneración de plantas en estos biorreactores simples.

Para este ensayo se indujo la formación de nuevos lotes de explantes con MY en medio de cultivo semisólido, en este caso se utilizó el mejor tratamiento

con TDZ determinado en el Ensayo 1, para la inducción de las yemas adventicias. Una vez obtenidos los explantes con MY, estos se inocularon en los biorreactores de inmersión temporal (BIT).

Se estudiaron tres dosis diferentes de 6-BAP (11.25, 22.5 y 33.75 mg L⁻¹) en comparación con el medio de cultivo control de multiplicación de brotes de banano (TM), para un total de cuatro tratamientos.

Por cada biorreactor se distribuyó 500 ml de medio de cultivo TM y se inocularon tres explantes con MY por cada frasco de biorreactor. Cada BIT se replicó cinco veces para un total de 20 biorreactores (Tabla 7).

A los 45 días se renovó el medio de cultivo por medio de cultivo fresco TM. A los 70 días se agregó 500 ml más de medio de cultivo MCY a cada biorreactor y a los 90 días después de la inoculación se procedió a la cosecha de los brotes y evaluación del ensayo. Se evaluó el número de brotes verdes viables formado por cada biorreactor y la longitud de los brotes.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos con diferentes dosis de 6-BAP en los BIT.

Tratamientos	Número de explantes/frasco	Número de frascos/tratamiento	Total de explantes /tratamiento
T1	5	5	25
T2	5	5	25
T3	5	5	25
T4	5	5	25

Leyenda: Los tratamientos contenían el medio de cultivo MS (Murashige y skoog, 1962). T1 (TM) (control): 4.0 mg L⁻¹ + 0.65 mg L⁻¹, T2: 11.25 mg L⁻¹ de 6-BAP,

T3 (TSS): 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP, T4: 33.75 mg L⁻¹ de 6-BAP.

3.3 Aclimatación de plantas en invernadero.

Las plantas de banano regeneradas de las multiyemas, una vez cosechadas de los BIT y culminada la evaluación de los parámetros de crecimiento, se lavaron con abundante agua para eliminar los restos de medio de cultivo. Se colocaron en bandejas con una solución fungicida de contacto por 2 minutos previo a la transferencia ex vitro.

En el invernadero se prepararon fundas de polietileno negro con sustrato compuesto por 50% turba + 25% de cascarilla de arroz + 25% de arena, previamente lavada y pasteurizada. Las fundas con las plantas se colocaron en cama de 3 m², con riego por microjet. Las camas se cubrieron con una estructura de túnel y malla de sombreo tipo zarán de color negro, que permitía reducir al 50% la luz solar.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento de plantas in vitro de banano Williams a partir de material adaptado en invernadero.

4.1.1 Establecimiento de plantas en invernadero.

Con el objetivo de garantizar la calidad fisiológica y sanitaria de los explantes para el establecimiento in vitro, previamente se realizó la cuarentena de los colinos procedentes de campo.

Se seleccionaron un total de 210 colinos, obtenidos de hijos espadas de plantas sintomatológicamente sanas y productivas del jardín clonal establecido en la EELS (Fig. 2). Se distribuyeron 30 plantas por camas de 3 m² con sustrato compuesto por suelo de la EELS y cascarilla de arroz en una proporción 3:1 (v/v) (Fig. 3A).



Figura 2. Plantas de banano Williams, sembradas en campo a los 18 meses después de la siembra.

Después de la cuarentena, se extrajeron las plantas de las camas y se trasladaron los colines al laboratorio para la preparación y desinfección del material previo al establecimiento *in vitro* (Fig. 3B).

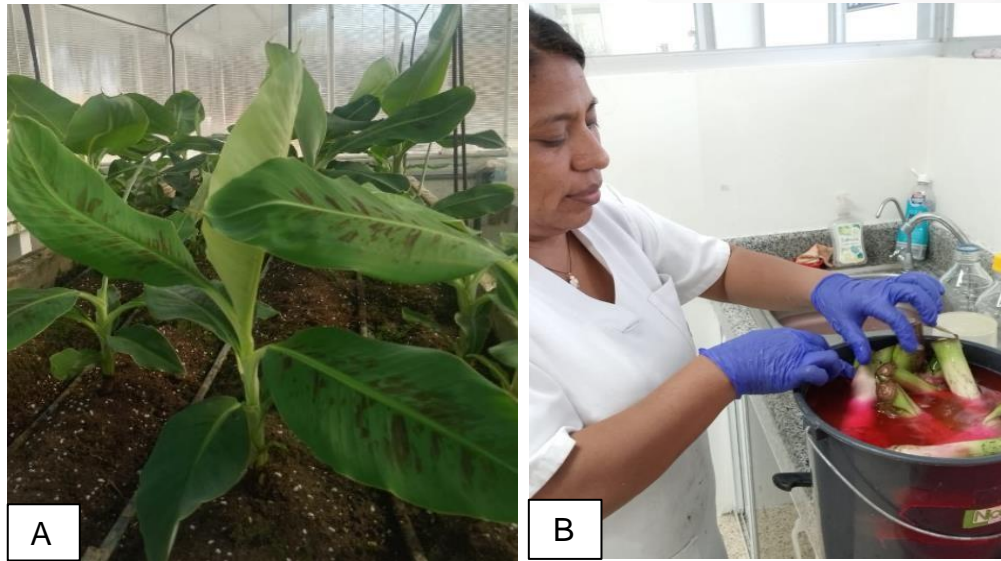
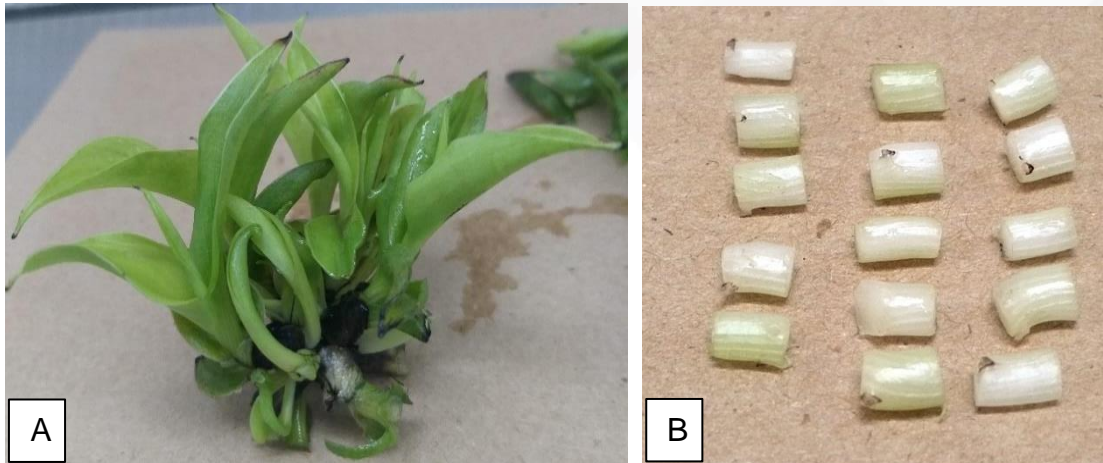


Figura 3. Plantas establecidas en invernadero, a los 45 días después de la siembra. B) Preparación y desinfección del material vegetal para el establecimiento *in vitro*.

4.1.2 Establecimiento de plantas *in vitro*.

La aplicación del protocolo de propagación masiva descrito por Orellana (1995) para bananos y plátanos permitió establecer *in vitro* un total de 158 ápices de Williams Orange. A los 35 días después del establecimiento *in vitro*, se logró obtener plantas bien desarrolladas y vigorosas a partir de los ápices caulinares meristemáticos, con una altura superior a los 7 cm y con un grosor del tallo de aproximadamente 2 cm. Después de repicadas y transferidas a medio de cultivo fresco de multiplicación durante tres subcultivos (Fig. 4), se tomaron los explantes para la inducción de yemas adventicias.

4.2 Inducción de yemas adventicias *in vitro*.



Ensayo 1: Efecto de diferentes dosis de TDZ en la Figura 4 A) Plantas en fase de multiplicación procedentes del tercer subcultivo. B) Explantes de 0.5 mm³ utilizados para la inducción de multiyemas.

4.2.1 inducción de yemas adventicias en medio de cultivo semisólido.

En la Figura 5 se muestra el efecto de los tratamientos con TDZ estudiados en la frecuencia de formación de las Multiyemas y brotes después de dos subcultivos, a los 90 días de cultivo.

En todos los tratamientos con TDZ y el control TSS (22,5 mg L⁻¹ de 6-BAP), la frecuencia de explantes con formación de multiyemas fue elevada, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, respecto al control (TM), solo se determinaron diferencias significativas con los tratamientos T2, T4 y T6.

En cuanto a la frecuencia de formación de brotes verdes, esta solo fue significativamente inferior al control en los tratamientos con las dosis más elevadas de TDZ (T5 y T6).

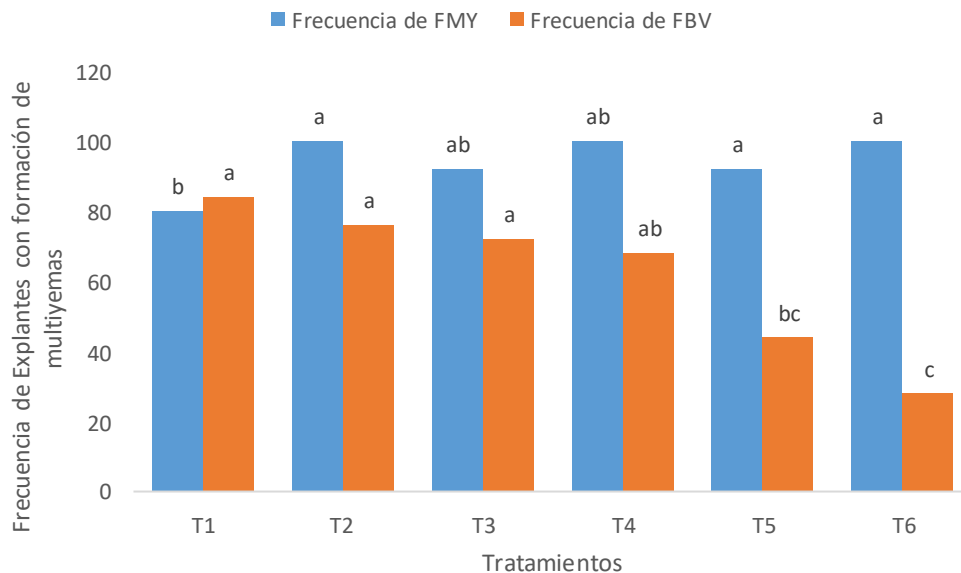


Figura 5. Efecto de diferentes tratamientos con TDZ en la frecuencia de explantes con formación de yemas adventicias o multiyemas (FMY) y de brotes verdes (FBV), después de dos subcultivos sucesivos cada 30 días en medio de cultivo semisólido (90 días de cultivo). Leyenda: T1: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP, T2: TSS (control) MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS+ 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. T4: MS+ 2.0 mg L⁻¹ de TDZ. T5: MS+ 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. T6: MS+ 4.0 mg L⁻¹ de TDZ. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; $p \leq 0,05$).

El mayor número de multiyemas por explante se obtuvo en el tratamiento con la dosis más elevada de TDZ, correspondiente al tratamiento T6, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, este alcanzó un promedio de siete MY por explante. En los demás tratamientos el número de MY formadas fue similar al tratamiento control TM (Fig. 6). Mientras que, ocurrió lo contrario con el número de brotes verdes, este fue significativamente superior en

el tratamiento control TM, registrándose el menor promedio de FBV en el tratamiento T6, con la dosis más elevada de TDZ (Fig. 7).

Se observaron variaciones morfológicas en los explantes respecto al desarrollo de brotes entre el primer y segundo subcultivo. En el tratamiento control (TM), predominó la formación de brotes foliares verdes, mientras que la producción de estructuras multigemadas fue mínima. En contraste, a los 60 días posteriores al segundo subcultivo, todos los explantes expuestos a las diferentes concentraciones de TDZ desarrollaron estructuras globosas multiyemáticas de tonalidad blanco-cremosa, con una reducida presencia de brotes verdes (Fig. 8).

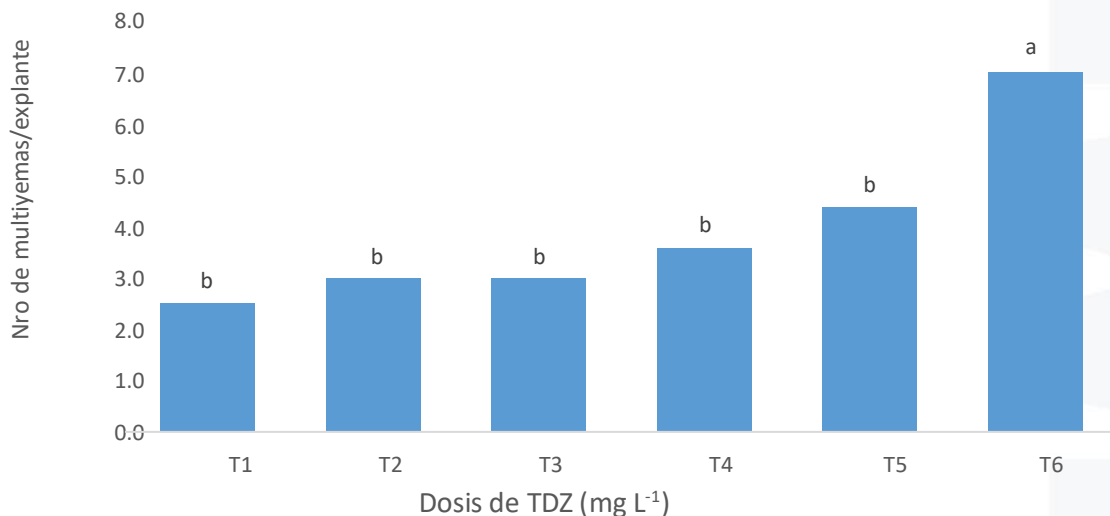


Figura 6. Efecto de diferentes tratamientos con TDZ en el número de MY, después de dos subcultivos sucesivos cada 30 días en medio de cultivo semisólido (90 días de cultivo). **Leyenda:** T1: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP, T2: TSS (control) MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS+ 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. T4: MS+ 2.0 mg L⁻¹ de TDZ. T5: MS+ 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. T6: MS+ 4.0 mg L⁻¹ de TDZ. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; p≤0,05).

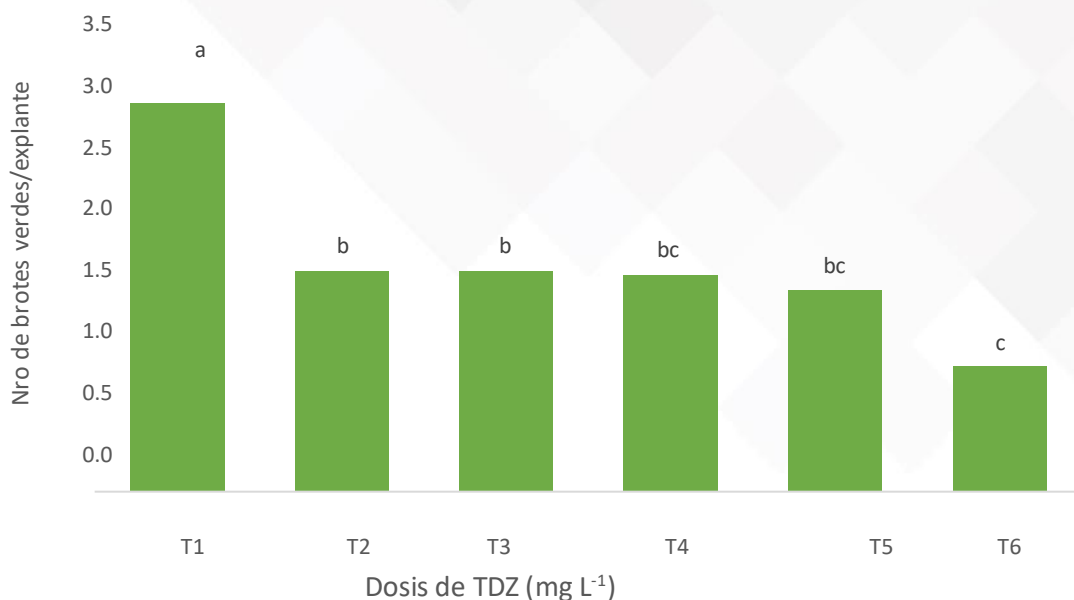


Figura 7. Efecto de diferentes tratamientos con TDZ en el número de brotes verdes, después de dos subcultivos sucesivos cada 30 días en medio de cultivo semisólido (90 días de cultivo). Leyenda: T1: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP, T2: TSS (control) MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS+ 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. T4: MS+ 2.0 mg L⁻¹ de TDZ. T5: MS+ 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. T6: MS+ 4.0 mg L⁻¹ de TDZ. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; $p \leq 0,05$).



Figura 8. Explantes de banano en segundo subcultivo en medio de cultivo de formación de yemas adventicias con diferentes tratamientos con citoquininas a los 90 días. A) T1: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP. B) T2: TSS (control)

MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. C) T3: MS+ 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. D) T4: MS+ 2.0 mg L⁻¹ de TDZ. E) T5: MS+ 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. F) T6: MS+ 4.0 mg L⁻¹ de TDZ.

Solo dos subcultivos fueron necesarios para lograr el desarrollo de yemas adventicias en los tratamientos con dosis iguales o superiores a 2 mg L⁻¹. Sin embargo, en el tratamiento control TSS persistía la formación de brotes verdes, aunque de pequeño tamaño y en forma de roseta. En este tratamiento con dos subcultivos no se logra la formación de las estructuras globosas de color blanquecino. Lo cual es un indicador de que se requieren varios subcultivos más con altas dosis de 6-BAP para lograr este objetivo.

4.2.2 Ensayo 2. Efecto de la concentración de TDZ en la inducción de yemas adventicias sobre la regeneración in vitro de banano cv. Williams en los BIT.

El número de plantas regeneradas a partir de los explantes cultivados con diferentes dosis de TDZ se incrementó significativamente en los tratamientos T2, T3 y T4 con respecto a los controles TM y TSS.

El mayor número de plantas se obtuvo a partir de los explantes con MY previamente cultivados en el tratamiento T4, que contenía la dosis más alta de TDZ (Fig. 9).

En cuanto a la longitud de las plantas, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. La longitud promedio de los brotes fue de 20 - 24 cm, a los 90 días de cultivo en los BIT.

En la segunda semana de cultivo, después de inoculados los explantes con multiyemas en los BIT, se pudo observar que estas estructuras globosas se multiplicaron y comenzaron a formar brotes verdes (Fig. 11). Los brotes

comenzaron a elongar, después de la primera renovación del medio de cultivo TM, realizado a los 30 días. Después de la segunda renovación el frasco del biorreactor se llenó de brotes. A los 90 días se cosecharon los BIT para evaluar el número de plantas regeneradas a partir de las multiyemas.

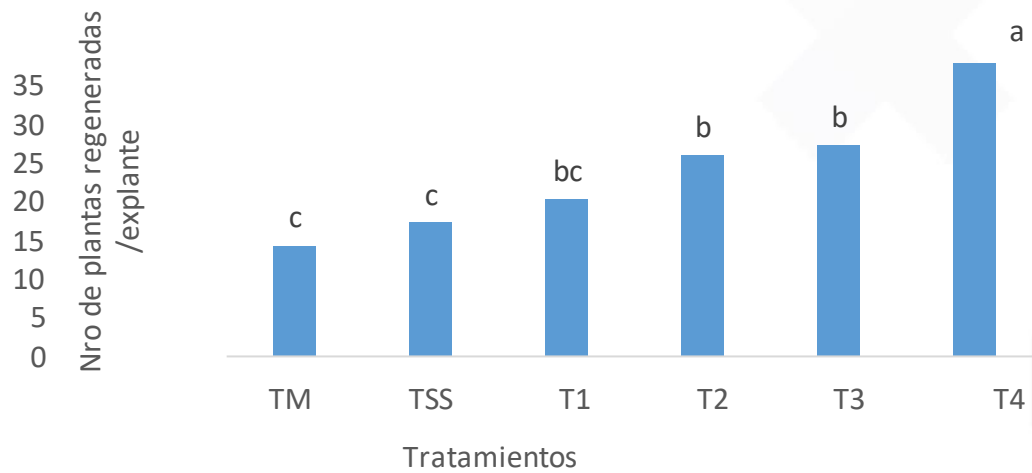


Figura 9. Número de plantas regeneradas en los BIT, a partir de explantes procedentes de diferentes tratamientos de TDZ en medio de cultivo semisólido (90 días). **Leyenda:** T1: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP, T2: TSS (control) MS +22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS+ 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. T4: MS+ 2.0 mg L⁻¹ de TDZ. T5: MS+ 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. T6: MS+ 4.0 mg L⁻¹ de TDZ. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; p≤0,05).

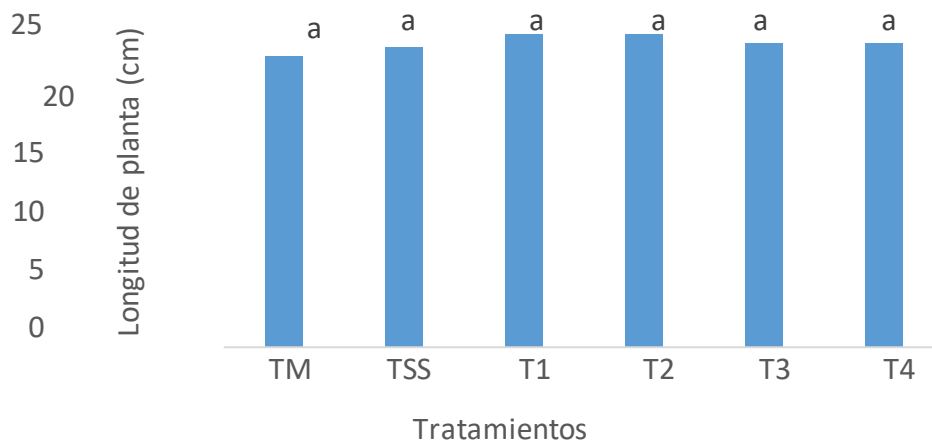


Figura 10. Longitud de las plantas regeneradas en los BIT, a partir de explantes procedentes de diferentes tratamientos de TDZ en medio de cultivo semisólido (90 días). **Leyenda:** T1: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP, T2: TSS (control) MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS+ 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. T4: MS+ 2.0 mg L⁻¹ de TDZ. T5: MS+ 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. T6: MS+ 4.0 mg L⁻¹ de TDZ. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; p≤0,05).

Figura 11. Multiplicación y regeneración de yemas adventicias de banano Williams en Biorreactores de inmersión Temporal.



4.3 Ensayo 3. Efecto de diferentes dosis de 6-BAP en la regeneración de yemas adventicias de banano Williams cultivadas en los BIT.

La adición de altas dosis de 6-BAP los primeros 30 días de cultivo de las MY en los BIT tuvo un efecto positivo en el número de brotes regenerados a partir

de las yemas adventicias formadas, en comparación con el tratamiento control T0 (TM). El mayor número de plantas regeneradas, se alcanzó con el tratamiento T1 (11.25 mg L⁻¹ de 6-BAP), concentraciones superiores de esta citoquinina no incrementaron el número de plantas por explante (Fig. 12). En este tratamiento las plantas alcanzaron la mayor longitud, similar a las del tratamiento control y superior a los T2 y T3 (Fig. 13).

Las plantas regeneradas en los BIT, con 11.25 mg. L⁻¹ de 6-BAP durante 30 días y posteriormente por 60 días en medio de cultivo TM (Fig. 14A), después de cosechadas (Fig. 14A y 14B) se encontraban listas para la transferencia directa al invernadero (Fig. 14C).

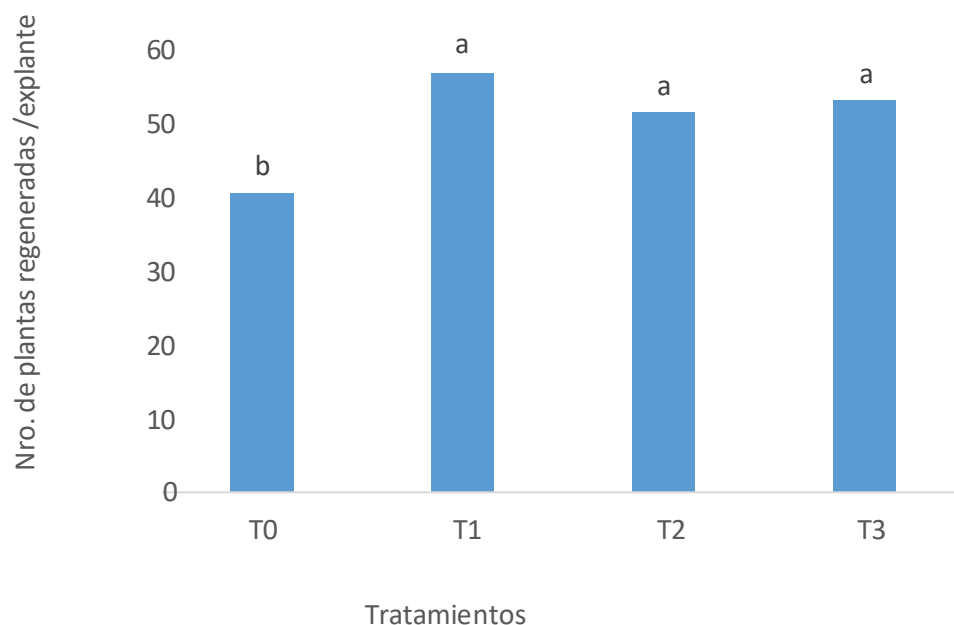


Figura 12. Número de plantas regeneradas en los biorreactores, a partir de explantes cultivados con diferentes tratamientos de 6-BAP, a los 90 días de cultivo en los BIT. **Leyenda:** Explante procedentes de: T0: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP. T1: MS + 11.25 mg L⁻¹ de 6-BAP T2: (TSS) MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS + 33.75 mg L⁻¹ de 6-BAP. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; p≤0,05).

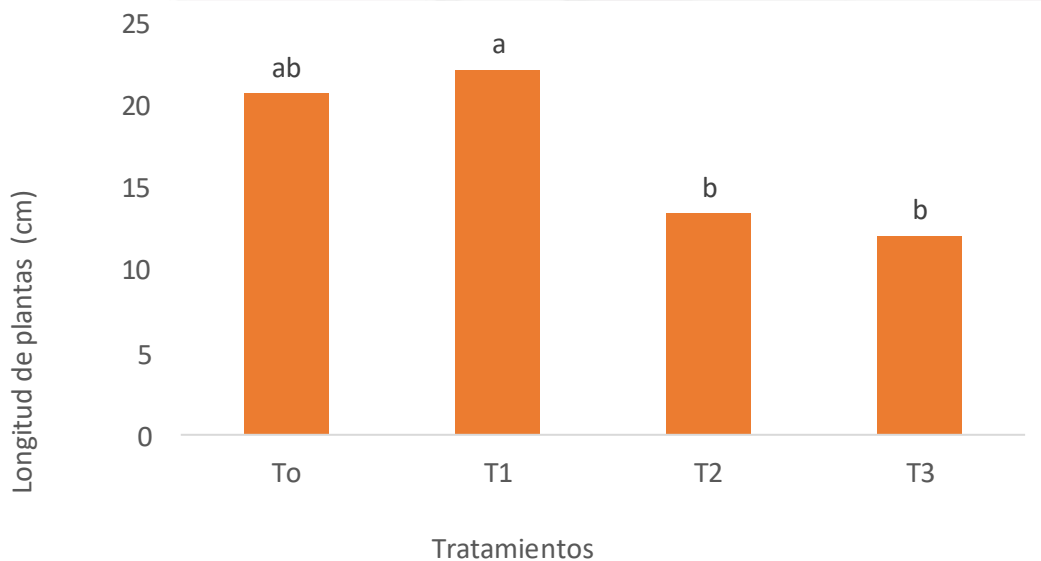


Figura 13. Longitud de las plantas regeneradas a partir de explantes cultivados con diferentes tratamientos de 6-BAP, a los 90 días de cultivo en los BIT. **Leyenda:** T0: TM (control) MS+ 4.0 mg L⁻¹ de 6-BAP. T1: MS + 11.25 mg L⁻¹ de 6-BAP T2: (TSS) MS + 22.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. T3: MS + 33.75 mg L⁻¹ de 6-BAP. * Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; p≤0,05).



Figura 14. A, B) Plantas regeneradas en los biorreactores, a partir de yemas adventicias cultivadas con 11.25 mg. L⁻¹ de 6-BAP durante 30 días y posteriormente por 60 días en medio de cultivo TM (MS+4 mg. L⁻¹ de 6-BAP+ 0.65 mg. L⁻¹ de AIA) en los BIT. B) Plantas cosechadas listas para la transferencia a invernadero.

4.4 Aclimatación de plantas en invernadero

Las plantas de banano Williams obtenidas a partir de yemas adventicias regeneradas en los BIT, sembradas en bandejas con sustrato en el invernadero (Fig. 15 A), sobrevivieron con una frecuencia del 100% y a los 30 días después de la transferencia estas se encontraban listas para el repique la transferencia a condiciones de endurecimiento en el túnel de campo (Fig. 15 B).



Figura 15. A) Plantas cosechadas de los BIT, transferidas a sustrato en invernadero. B) Plantas de banano cv Williams a los 30 días después de la transferencia ex vitro, previo a la transferencia al túnel de campo para el endurecimiento.

En la Figura 16 se muestra el esquema desarrollado para la regeneración de plantas de banano cv Williams con el uso combinado del sistema de cultivo en medios

semisólidos y los Biorreactores de Inmersión temporal para la regeneración de plantas a partir de yemas adventicias.

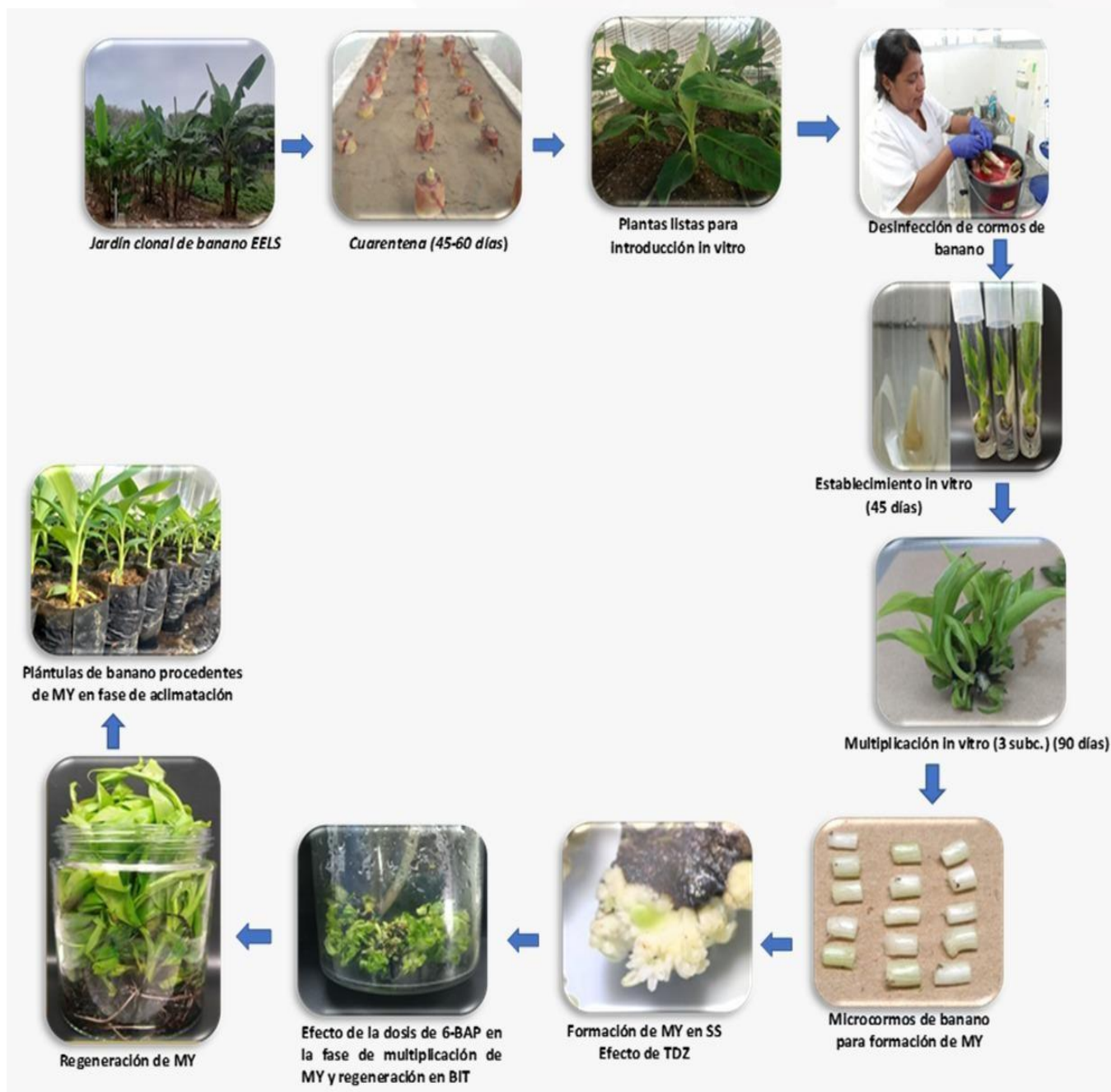


Figura 16. Protocolo desarrollado para la regeneración de plantas de banano cv Williams vía yemas adventicias con el uso combinado del sistema de cultivo en medios semisólidos y Biorreactores de Inmersión temporal.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que el Tidiáuron (TDZ) fue altamente efectivo para la inducción de multiyemas en explantes de banano cv. Williams cultivados en medio semisólido. La concentración de $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ destacó significativamente al generar en promedio siete multiyemas por explante, superando las eficiencias previamente reportadas en la literatura internacional para este tipo de cultivos.

Tradicionalmente, el TDZ ha sido ampliamente empleado para inducir yemas adventicias en especies dicotiledóneas, especialmente en aquellas de hábito leñoso, debido a su capacidad de promover una respuesta organogénica robusta incluso a bajas concentraciones (Mok et al., 1987). No obstante, su aplicación en cultivos de banano ha sido escasamente reportada, y con resultados limitados. García et al. (2006) mencionan en el cultivar 'Gran Enano' una inducción eficiente de multiyemas utilizando $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ durante dos subcultivos, aunque el número de estructuras formadas y su capacidad regenerativa resultaron considerablemente inferiores a los observados en el presente trabajo.

En contraste, protocolos tradicionales para la inducción de multiyemas en banano han recurrido al uso intensivo de citoquininas del tipo aminopurina, particularmente 6-bencilaminopurina (6-BAP). Srangsam y Kanchanapoom (2003), así como Strosse et al. (2006), proponen concentraciones que superan los $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, combinadas con múltiples ciclos de subcultivo (hasta cinco), para lograr una respuesta morfogénica comparable. El protocolo ampliamente adoptado de

Strosse et al. implica la exposición sucesiva al medio P5 con $22.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 6-BAP, mientras que Roux et al. (2000) reportan el uso de $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante seis subcultivos para el mismo objetivo. Estos esquemas, aunque eficaces, son menos eficientes en términos de tiempo, costos y número de pasos.

Una de las ventajas comparativas del TDZ radica en su menor susceptibilidad a la degradación enzimática, lo cual permite mantener su actividad biológica en los tejidos vegetales durante períodos prolongados (Mok et al., 1987). Esta característica, sumada a su alta potencia como citoquinina, justifica la mayor eficiencia observada con dosis moderadas en este ensayo.

La superioridad de la dosis de $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ también se reflejó en la fase de regeneración de plantas en biorreactores de inmersión temporal (BIT), donde las multiyemas provenientes de este tratamiento mostraron la mayor tasa de regeneración, tanto en número de brotes verdes viables como en longitud. Es importante destacar que el sistema BIT ofrece múltiples ventajas frente a los métodos de cultivo semisólido convencionales, no solo por permitir una mayor densidad de explantes y un control riguroso de las condiciones ambientales, sino también por su eficiencia en términos de manejo, automatización y costos (Murthy et al., 2023).

Además, el contacto intermitente con el medio líquido en los BIT mejora la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento, promoviendo un desarrollo morfogénico más eficiente y homogéneo. Diversos autores coinciden en que este sistema reduce la incidencia de hiperhidratación, facilita la producción a escala y mejora la calidad fisiológica de las plántulas (Etienne & Berthouly, 2002).

En este estudio, las plantas desarrolladas en BIT alcanzaron longitudes superiores a los 20 cm y presentaron una tasa de supervivencia del 100% durante la fase de aclimatación, lo que evidencia su alto grado de adaptación y vigor. En suma, la combinación de TDZ en medio semisólido para la inducción y el uso de BIT para la regeneración representa una estrategia biotecnológica altamente eficiente para la propagación masiva del banano cv. Williams, superando tanto en rendimiento como en calidad a los protocolos tradicionales basados en 6-BAP.

5.2 Conclusiones

Se logró establecer un banco de plantas donante de explantes para el cultivo in vitro a nivel de campo, invernadero y laboratorio.

Se estableció la dosis de 4.0 mg L⁻¹ de TDZ como la concentración óptima para la inducción y multiplicación de las multiyemas de banano en medios de cultivo semisólido.

Se logró incrementar la eficiencia en la regeneración de plantas de banano Williams a partir de multiyemas, mediante el uso de 11.25 mg L⁻¹ de 6-BAP como dosis óptima en los biorreactores de inmersión temporal.

Se obtuvo por primera vez un protocolo novedoso de inducción y regeneración de plantas de banano a partir de yemas adventicias, mediante el uso combinado de medios de cultivo semisólido y biorreactores de inmersión temporal.

5.3 Recomendaciones

1. Utilizar el protocolo descrito como método de regeneración de plantas en programas de mejoramiento genético que tengan como base la inducción de variabilidad génica mediante variación somaclonal y la mutagénesis.
2. Continuar optimizando el protocolo de regeneración de yemas adventicias en los BIT, a partir del estudio de otros factores como la frecuencia y tiempo de inmersión, la densidad de inóculo, volumen de medio de cultivo, entre otros.

Referencias Bibliográficas

Acuña, R., Rouard, M., Leiva, A. M., Marques, C., Olortegui, J. A., Ureta, C., Cabrera- Pintado, R. M., Rojas, J. C., Lopez-Alvarez, D., Cenci, A., Cuellar, W. J., & Dita,

M. (2022). First Report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense Tropical Race 4 Causing Fusarium Wilt in Cavendish Bananas in Peru. *Plant Disease*, 106(8), 2268. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>

Álvarez, E., Pantoja, A., Gañan, L., & Ceballos, G. (2013). La Sigatoka negra en plátano y banano. Guía para e.pdf.

Aragón, C. E., Escalona, M., Capote, I., Pina, D., Cejas, I., & González-Olmedo, J. (2004). Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas in vitro de plátano cv. CEMSA ¾. *Biotechnología Vegetal*, 4(3), Article 3. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/413>

Carranza, E. I. Q., Carpio, E. C. P., Macías, C. A. V., & Minuche, J. P. R. (2024). Análisis de los Beneficios Económicos y Ambientales: Producción de Banano Orgánico. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(1), Article 1. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1.10031

Castillo, A., Ashfield, R., Bentancor, M., Bentancor, L., Bonilla, M. B., Ceppa, M., Franco, R., Silva, N., Cabrera, D., & Rodríguez, P. (2019).

Micropropagación de Plantas en Biorreactores de Inmersión Temporal (bit).

Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). Multiplicación in vitro *Musa* spp.

Mediante sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 468–477.

Díaz, J., & Castro, D. (2011). Propagación clonal in vitro de plantas de banano (*Musa AAA*) clon “Giant cavendish” en biorreactores de inmersión temporal.

Duta-Cornescu, G., Constantin, N., Pojoga, D.-M., Nicuta, D., & Simon-Gruita, A. (2023). Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>

Ermini, J. L., Tenaglia, G. C., Parisod, C. G., & Pratta, G. R. (2021). Banana somaclonal variation assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism profiles at early cycles of in vitro culture. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v38.n2.33260>

FAO. (2004). *La Economía Mundial del Banano 1985-2002*.
<https://www.fao.org/4/y5102s/y5102s03.htm>

García, F., Pachacama, S., Jarrín, D., Iza, M., Ayala, M., Ortiz, H., Dix, O., Echegaray, J., Farfán, M., Martínez, I., Beltrán, C., & Zeballos, G. (2020). Guía andina para el diagnóstico de *Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)*.

García, J., & Castro, D. (2011). Propagación clonal in vitro de plantas de banano (*Musa AAA*) clon “Giant cavendish” en biorreactores de inmersión temporal.

García, Pérez, J., Bermúdez, I., Orellana, P., Novisel, V., García, L., Padrón, Y., & Romero, C. (2006). Desarrollo de yemas adventicias en banano (*Musa sp.*) cv. Gran Enano (AAA).

Jiménez, A. (2017). Obtención de yemas adventicias in vitro en los cultivares de *Musa* ‘Manzano’ (AAB) y ‘Gros Michel’ (AAA).

García, L. Pérez, J., Bermúdez, I., Orellana, P., Novisiel, V., García, L., Padrón, Y., & Romero, C. (2006). Nuevo protocolo para la rápida inducción de yemas adventicias y la regeneración de plantas en banano cv. 'Grande naine' (Musa AAA).

Martínez, G., Olivares, B. O., Rey, J. C., Rojas, J., Cárdenas, J., Muentes, C., & Dawson, C. (2023). The Advance of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Musaceae of Latin America and the Caribbean: Current Situation. *Pathogens*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020277>

Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: Present scenario and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159588>

Ontaneda, A. L. C. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional in vitro.

Ortega, N., Korneva, S., Ruiz, O., Santos, E., & Peralata, E. (2010). Obtención de Multimeristemas y callos de diferentes variedades de banano.

Patiño, C. (2010). Variación somaclonal y selección in vitro con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión.

Peeters, N., Guidot, A., Vaillieu, F., & Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology*, 14(7), 651–662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>

PRIMICIAS. (2025, April 28). Sector bananero analiza cómo sostener la competitividad en medio de aranceles. Primicias. <https://www.primicias.ec/economia/exportadores-productores-banano-ecuador-cumbre-aranceles-competitividad-mercado-95053/>

Singh, A. (2021, October 26). DIY Temporary Immersion Bioreactor. Plant Cell Technology. <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blog-diy-temporary-immersion-bioreactor>

Thorpe, T. (2012). History of Plant Tissue Culture. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa- Alejo (Eds.), Plant Cell Culture Protocols (pp. 9–27). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_2

Torres. (2017). Efecto biofungicida del gel aloe vera y extracto de moringa sobre la pudrición de corona en la fruta de banano [bachelorThesis, Machala: Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/11710>

Torres, J. P., Sandoval F, J. A., & Segura, R. (2024). Estado actual del mejoramiento genético en el cultivo del banano (Musa AAA, subgrupo Cavendish), y plátano (Musa AAB). Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia/Acorbat Journal of Technology and Science, 1(1). <https://doi.org/10.62498/ARTC.2402>

Tuz Guncay, I. G. (2018). Manejo integrado del cultivo de banano (musa x paradisiaca l.) clon williams, usando biocarbón y microorganismos eficientes. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/13263>

Anexos

Análisis estadístico del Ensayo 1: Efecto de la dosis de TDZ en la inducción de yemas adventicias

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Frecuencia de FMY	30	0.47	0.36	9.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1560.00	5	312.00	4.25	0.0065
Tratamientos	1560.00	5	312.00	4.25	0.0065
Error	1760.00	24	73.33		
Total	3320.00	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=16.74598

Error: 73.3333 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.
T4	100.00	5	3.83 A
T2	100.00	5	3.83 A
T6	100.00	5	3.83 A
T5	92.00	5	3.83 A B
T3	92.00	5	3.83 A B
T1	80.00	5	3.83 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Frecuencia de FB	30	0.71	0.64	22.81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11480.00	5	2296.00	11.48	<0.0001
Tratamientos	11480.00	5	2296.00	11.48	<0.0001
Error	4800.00	24	200.00		
Total	16280.00	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=27.65507

Error: 200.0000 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.
T1	84.00	5	6.32 A
T2	76.00	5	6.32 A
T3	72.00	5	6.32 A
T4	68.00	5	6.32 A B
T5	44.00	5	6.32 B C
T6	28.00	5	6.32 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nro. MY/Exp	30	0.69	0.63	25.40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	58.27	5	11.65	10.93	<0.0001
Tratamientos	58.27	5	11.65	10.93	<0.0001
Error	25.60	24	1.07		
Total	83.87	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.01964

Error: 1.0667 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T6	7.00	5	0.46	A
T5	4.40	5	0.46	B
T4	3.60	5	0.46	B
T1	3.40	5	0.46	B
T3	3.00	5	0.46	B
T2	3.00	5	0.46	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nro. BV/Exp	30	0.82	0.78	16.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11.07	5	2.21	22.13	<0.0001
Tratamientos	11.07	5	2.21	22.13	<0.0001
Error	2.40	24	0.10		
Total	13.47	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.61839

Error: 0.1000 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T1	3.00	5	0.14	A
T3	2.00	5	0.14	B
T2	2.00	5	0.14	B
T5	1.60	5	0.14	B C
T4	1.60	5	0.14	B C
T6	1.00	5	0.14	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)