

# 03

---

Fecha de presentación: enero, 2021

Fecha de aceptación: marzo, 2021

Fecha de publicación: abril, 2021

## PROTOTIPO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL EN FASE DE MULTIPLICACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN DE BANANO CLON WILLIAMS

### TEMPORARY IMMERSION SYSTEM PROTOTYPE IN MULTIPLICATION PHASE IN THE MICROPROPAGATION OF CLON WILLIAMS BANANA

Francisco Andres Ugarte Barco<sup>1</sup>

E-mail: [fugarte\\_est@utmachala.edu.ec](mailto:fugarte_est@utmachala.edu.ec)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3405-3744>

María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga<sup>2</sup>

E-mail: [angeles.bernal@udc.es](mailto:angeles.bernal@udc.es)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3217-5986>

Nieves Pilar Vidal González<sup>3</sup>

E-mail: [nieves@iiag.csic.es](mailto:nieves@iiag.csic.es)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8046-3133>

Alexander Moreno Herrera<sup>1</sup>

E-mail: [amoreno@utmachala.edu.ec](mailto:amoreno@utmachala.edu.ec)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8898-4195>

<sup>1</sup> Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

<sup>2</sup> Universidade da Coruña. España.

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. España.

#### Cita sugerida (APA, séptima edición)

Ugarte Barco, F. A., Bernal Pita Da Vega, M. A., Vidal González, N. P., & Moreno Herrera, A. (2021). Prototipo de sistema de inmersión temporal en fase de multiplicación en la micropropagación de banano Clon Williams. *Revista Científica Agroecosistemas*, 9(1), 18-26.

#### RESUMEN

El banano es clave para la producción agrícola de Ecuador. Es común requerir grandes cantidades de plantas que se obtienen por organogénesis directa. El uso de distintos SIT ha reportado superar limitaciones de los cultivos in vitro en contacto permanente con el medio de cultivo. El propósito de este trabajo fue evaluar la multiplicación de banano (Musa AAA cv. Williams), mediante el uso de un prototipo de SIT (PSIT) de origen local comparado con SIT RITA® y sistema semisólido (SS). A los 21 días se registraron datos de tasa de multiplicación por tipo de brote y brotes totales, longitud de pseudotallo y hoja 1, raíces totales por explante, masa fresca, ceniza, contenido de fenoles solubles totales (CFST) y actividad antioxidante (AA). Las vitroplantas del PSIT presentaron una apariencia más verde, vigorosa y uniforme. No se encontraron diferencias significativas respecto a tasa total de multiplicación entre SIT. Las vitroplantas obtenidas en PSIT presentaron la mayor longitud del pseudotallo y de hoja 1, también mayor contenido de ceniza. No se encontraron diferencias significativas entre SIT respecto a masa fresca. El mayor CFST y mayor AA se evidenció en brotes obtenidos en PSIT. El uso de PSIT permite la obtención de vitroplantas de calidad superior al estándar, a la vez que se evidencia la optimización de la fase de multiplicación de brotes axilares de Musa cv. Williams.

#### Palabras clave:

Organogénesis, SIT, fenoles, antioxidantes.

#### ABSTRACT

Bananas are key to Ecuador's agricultural production. It is common to require large quantities of plants obtained by direct organogenesis. The use of different SITs has been reported to overcome limitations of in vitro cultures in permanent contact with the growing medium. The aim of this work was to evaluate the multiplication of banana (Musa AAA cv. Williams), using a prototype SIT (PSIT) of local origin compared to SIT RITA® and semi-solid system (SS). At 21 days, data were recorded on multiplication rate by shoot type and total shoots, pseudoshoot and leaf 1 length, total roots per explant, fresh mass, ash, total soluble phenol content (CFST) and antioxidant activity (AA). PSIT vitroplants were greener, more vigorous and uniform in appearance. No significant differences were found with respect to total multiplication rate between SIT. The vitroplants obtained in PSIT presented the highest pseudostem and leaf 1 length, also higher ash content. No significant differences were found between SIT with respect to fresh mass. The highest CFST and AA were found in shoots obtained in PSIT. The use of PSIT allows obtaining vitroplants of higher quality than the standard, while optimizing the multiplication phase of axillary shoots of Musa cv. Williams.

#### Keywords:

Organogenesis, TIS, phenols, antioxidants.

## INTRODUCCIÓN

El banano es un cultivo clave, de importancia histórica y económica indiscutible para la producción agrícola nacional de Ecuador. Debido a las extensiones y densidades de siembra es común requerir grandes cantidades de plantas para iniciar o renovar un cultivo, y dado que los principales cultivares que se siembran en el mundo a nivel productivo son obtenidos por biotecnología, estas plantas no se pueden obtener por vía sexual (semilla cigótica), sino por medio de clonación asexual (clon meristemático), que da origen a plantas de similar apariencia y características.

Dentro de las técnicas de propagación asexual de banano se encuentra la organogénesis directa en tejidos meristemáticos, que permite obtener gran cantidad de éstas en un tiempo y espacio reducido; en comparación a otras, como la macropropagación. Las plantas obtenidas por esta vía se caracterizan por su calidad, vigor y sanidad (Colmenares & Giménez, 2003). A pesar de las ventajas de esta técnica existen factores que generan estrés oxidativo durante el proceso, lo que causa fallas en la morfogénesis del tejido vegetal debido a la incapacidad del tejido para producir metabolitos secundarios, entre ellos compuestos derivados de la ruta de los fenilpropanoides, los cuales promueven la actividad antioxidante celular para superar esta limitación (Arencibia, et al., 2008).

El uso de distintos Sistemas de Inmersión Temporal (en adelante SIT) ha sido descrito en procesos de organogénesis somática de varias especies vegetales, incluidos distintos cultivares de *Musa spp.* (Roels, et al., 2005; Bello-Bello, et al., 2019). Se añade que en la actualidad existen reportes de la utilidad de SIT para regenerar embriones somáticos, lo cual supone un nuevo uso de estas tecnologías y plantea la oportunidad de nueva investigación de estos sistemas como alternativa a biorreactores de inmersión temporal (BIT) para este fin.

La adaptación de algunas de las fases de micropropagación al uso de SIT ha reportado muchas ventajas, tales como superar limitaciones de los cultivos *in vitro* en contacto permanente con el medio de cultivo (semisólido e inmersión permanente), automatizar parte del proceso de micropropagación, facilitar producción a gran escala y mejorar las características morfológicas y fisiológicas del material vegetal al final del proceso (Colmenares & Giménez, 2003).

De lo último se evidencia la necesidad que existe en el desarrollo de estos sistemas en forma intermitente para superar las limitaciones que caracterizan la micropropagación *in vitro* desarrollada de forma convencional, de las cuales se destaca la variación somaclonal en *Musa spp.* (mutaciones en plantas), causada por exceso de subcultivos para llegar a un número de plantas deseado, o uso de promotores de brotación,

cuyo uso ha sido reportado y desaconsejado para la fase de multiplicación; entre otros inconvenientes.

En la actualidad no existe registro de ninguna entidad pública o privada en Ecuador que fabrique SIT. Esto, agregado al poco acceso local a estas tecnologías, cuyas causas pudieran ser falta de oferta, demanda o desconocimiento del mercado de bienes y servicios, genera un retraso en el avance de investigación científica en biotecnología vegetal. El propósito de este trabajo fue evaluar la fase de multiplicación *in vitro* de banano (*Musa* AAA cv. Williams), mediante el uso de un prototipo de SIT de origen local, para determinar la calidad morfológica y fisiológica del material vegetal obtenido al final del proceso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló durante los meses de octubre a noviembre del 2019 en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, ubicado en los predios de la granja “Santa Inés” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH) en el cantón Machala, parroquia el Cambio, provincia de El Oro y georeferenciado como (3°17'30" S; 79°54'51" W). Esta investigación contó con el apoyo del proyecto Bioali-CYTED a través de la red BIOALI (P117RT0522).

Para el ensayo se usaron plantas *in vitro* de banano (*Musa* AAA cv. Williams), brotes tipo I según Roels, et al. (2005), luego de 21 días de subcultivo 4 de multiplicación en medio semisólido Murashige & Skoog (1962), con 3% de sacarosa, 2 mg L<sup>-1</sup> 6-bencilaminopurina (BAP; Merck®), 0.65 mg L<sup>-1</sup> ácido indolacético (AIA; Merck®), pH 5.8 ajustado con 0.1 N NaOH y 0.1 N HCl; como agente gelificante 1.9 g L<sup>-1</sup> de Gellax® (Caisson Laboratories®). Previo a inocular los contenedores de cada sistema del ensayo los explantes fueron seleccionados de brotes con excelente color y vigor. Las raíces y brotes de los explantes fueron seccionados, luego se les realizó un corte transversal a ≈ 8 mm de longitud de su base y sobre la faz de este último corte se realizó otro corte longitudinal en forma de cruz con vértice en el centro del pseudotallo, con profundidad hasta el ápice, con el fin de eliminar la dominancia apical e inducir la proliferación de yemas axilares.

está compuesto por un contenedor externo con tapa hermética color blanco y una estructura conformada por dos contenedores internos (Fig. 1). El contenedor externo transparente posee una capacidad de 1.5 L. La tapa posee dos perforaciones que permiten la inserción de dos pernos modificados con sus respectivas tuercas para entrada y salida de aire, cuyos diámetros respectivos son 38,1 mm y 9.525 mm. Al interior del contenedor externo se encuentra una estructura compuesta por dos contenedores

modificados unidos en sus bases por un perno modificado de 9.525 mm de diámetro, cuya finalidad es permitir el paso de aire a presión.

El contenedor inferior funciona como depósito del medio de cultivo que retorna con rapidez en fase de desecación, y a su vez, en la fase de inmersión impulsa el medio de cultivo hacia el contenedor superior por efecto de presión neumática. El contenedor superior funciona como soporte para el material vegetal, además de permitir el paso del medio de cultivo a través de perforaciones, que a su vez impiden el paso de material vegetal. Esta modificación permite el paso de la columna de aire directo hacia la fase gaseosa, por fuera del soporte para material vegetal, durante la inmersión.

Hacia la parte superior del soporte para materia vegetal del contenedor superior modificado emergen dos prolongaciones que se unen en forma de anillo por debajo de la tapa, lo que funciona como soporte para inmovilizar la estructura interna y permitir la fase de inmersión. Esta modificación permite el paso directo de la luz desde el contenedor externo. El volumen máximo de operación es de 450 mL, en función del ajuste de la altura del soporte.

Todos los pernos poseen dos juntas tóricas de silicona que sirven de unión entre el polipropileno de la tapa y el perno, cuya función es dar hermeticidad al sistema. Todos los pernos y tuercas están hechos de acero inoxidable. La tapa posee en su borde interno una junta tórica de tipo empaque de silicona que brinda hermeticidad al sistema. El perno modificado central de la tapa se une al perno modificado de la estructura interna por medio de una manguera de silicona transparente de 0,3125 mm de diámetro interno, fijada entre dos juntas tóricas de silicona o nitrilo (según disponibilidad), lo que permite el acople y desacople de la tapa a conveniencia. Todos los contenedores y la tapa están hechos de polipropileno de grado alimenticio. Todas las piezas fueron compradas en tiendas de la localidad (Figura 1).



Figura 1. Prototipo de SIT (PSIT).

## Evaluación de Sistemas de Cultivo en Fase de Multiplicación

Se evaluó la fase de multiplicación en sistemas de cultivo *in vitro*, mediante el uso de PSIT comparado con SIT RITA® (Vitropic, Francia) y sistema semisólido (SS). El número de explantes, volumen de medio de cultivo y capacidad de contenedor (volumen ocupado por los explantes) de cada sistema se indica en la Tabla 1. Se suplementaron los SIT con medio de cultivo líquido a razón de 50 ml por explante, en el SS se agregó gelificante. Para todos los SIT se utilizaron filtros hidrofóbicos con 0.3 µm de diámetro de poro marca Whatman™ HEPA-Vent (Cytiva®) para filtrar aire de entrada y salida.

Todos los medios de cultivo, contenedores y filtros de los sistemas fueron esterilizados en autoclave a 121° C, 110 KPa por 20 minutos. En lo que refiere a frecuencia e intervalo de tiempo de inmersión, fueron cada 3 horas y 4 minutos de forma respectiva, con renovación de fase gaseosa. Luego de 21 días se registraron datos de tasa de multiplicación por tipo de brote y brotes totales de muestras aleatorias de 11 explantes por sistema (Roels, et al., 2005).

La tasa de multiplicación por tipo de brote en cada sistema se obtuvo a partir de razón entre número de brotes totales de cada tipo (tipo I, II, III y totales) y el número total de explantes. Se tomaron 11 muestras aleatorias de brotes tipo I y se determinó la longitud de pseudotallo a la altura de inserción de la hoja 1 (mm) del extremo apical foliar, longitud del limbo de la hoja 1 (mm), número de raíces totales por explante, masa fresca (g), además, 2 muestras aleatorias para determinar ceniza (g). Se obtuvieron al menos 2 muestras aleatorias de 0.1 g de masa seca (MS) molida, de brotes tipo I por sistema de cultivo para determinar el contenido de compuestos fenólicos solubles totales (CFST) y actividad antioxidante (AA).

Las longitudes fueron obtenidas mediante un calibre digital (Truper®, México). Las masas fueron obtenidas mediante una balanza analítica (Yugo®, China). La ceniza se obtuvo mediante el uso de una mufla programable a 600° C por 24 h (Nabertherm®, Alemania). La MS para los ensayos bioquímicos fue obtenida con un horno MEMMERT® VM400 (MEMMERT®, Alemania) a 70° C por 24 h.

Tabla 1. Número de explantes, volumen de medio de cultivo y capacidad de contenedor por cada sistema de cultivo del ensayo *in vitro*.

Sistema	Número de explantes	Volumen de medio de cultivo (mL)	Capacidad de contenedor (mL)
SS	4	200	500
RITA®	4	200	500
PSIT	9	450	1500

## Determinación de Contenido de Fenoles Solubles Totales

Los CFST de *Musa* cv. Williams fueron determinados mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) con modificaciones (Díaz, et al., 2001), a partir de extractos acuosos de MS (0.1 mg MS en 1 mL de agua destilada) en Eppendorf tubes® (Eppendorf®) incubados a 100° C durante 30 minutos. Luego se llevaron a centrifuga MiniSpin® plus (Eppendorf®, Alemania) por 15 minutos a 10000 g, después se extrajo el sobrenadante y se enrasó a 5 ml. Las muestras se subdividieron en triplicado para obtener 6 réplicas por sistema de cultivo analizado. A muestras de 100 µL de extracto acuoso de MS o estándar de ácido gálico se les añadió 1000 µL de FC, luego, se homogeneizaron e incubaron por 4 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Seguido se añadió a cada muestra 1000 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7%, 400 µL de H<sub>2</sub>O destilada, se homogeneizaron e incubaron en oscuridad por 90 minutos a temperatura ambiente. Las lecturas de absorbancias de CFST y AA se realizaron mediante uso de un espectrofotómetro UV-vis Spectronic 21D® (Bausch & Lomb®, E.U.A.). Al finalizar se registró la absorbancia a 760 nm sobre la base de una reacción redox colorimétrica de un patrón de recta ( $y = 3.8292x + 0.0303$ ,  $R^2 = 0.997$ ) de una solución estándar de ácido gálico de 5 diferentes concentraciones (0.01 , 0.02 , 0.05 , 0.10 y 0.20 ). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de MS (mg EAG g<sup>-1</sup> MS).

## Determinación de Actividad Antioxidante total

Se evaluó la actividad captadora de radicales libres (ACRL) mediante el ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de acuerdo al procedimiento anterior con modificaciones. Se preparó una solución a 1mM de DPPH en metanol absoluto como absorbancia inicial (A0), cuya dilución registró valores de absorbancia cercanos a 0.800 y se elaboró una recta patrón ( $y = 0.1352x + 0.9449$ ,  $R^2 = 0.984$ ) a partir de 5 diferentes concentraciones (100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM y 500 µM). Muestras de 50 µL de extracto acuoso descrito arriba fueron reaccionadas sin incubación con 950 µL de DPPH en cubetas de 1 mL, para ser determinadas a 515 nm, se usó metanol absoluto como blanco. La AA se expresó en micromoles de compuestos activos equivalentes de Trolox por gramo de MS .

## Condiciones de Cultivo y Automatización

Los sistemas fueron incubados en el cuarto de crecimiento a temperatura fija de con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de a , suministrada por luz solar indirecta y lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 60 W (Philips®, Países Bajos) en fotoperiodo de . La fase de inmersión y desecación de los SIT fue controlada mediante el ingreso de de presión

positiva de aire de un compresor automatizado ajustada por un manómetro conectado a válvulas solenoides trifásicas y manifolds de manguera de polietileno rígido de 3/8". Las lámparas y las válvulas solenoides fueron automatizadas mediante temporizadores digitales (Woods®, E.U.A.). La humedad relativa dentro del cuarto de crecimiento osciló entre 90% y 100%.

## Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El diseño del ensayo fue por completo aleatorio. La varianza se determinó mediante prueba de ANOVA de una vía en la plataforma de programación MATLAB® online ver. R2020b (Mathworks®, E.U.A.). Se compararon diferencias significativas entre grupos mediante análisis post hoc de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). Todos los datos fueron procesados por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de Sistemas de Cultivo en Fase de Multiplicación

Las vitroplantas tipo I de *Musa* cv. Williams obtenidas por medio del PSIT presentaron una apariencia más verde, vigorosa y uniforme respecto a los demás sistemas (Fig. 2). Los resultados de tasas de multiplicación se muestran en la Tabla 2. La mayor tasa de multiplicación de brotes tipo I y III se observó en RITA® (2.36 y 7.36), mientras que la de brotes tipo II fue la de PSIT (2.90). No se encontraron diferencias significativas respecto a la tasa de multiplicación total entre RITA® y PSIT (12 y 8.81), no así con respecto al SS, el cual registró diferencias significativas con respecto a los SIT y obtuvo la más baja (2.90).

Resultados similares reportaron Giménez & Colmenares (2004), al evaluar un prototipo de SIT comparado con RITA® en fase de multiplicación de *Musa* cv. Williams, a los 40 días de cultivo, en los que no se encontraron diferencias significativas en la tasa de multiplicación total entre RITA® y el prototipo (6.6 y 5.8). Roels, et al. (2005), señalaron la superioridad morfológica de vitroplantas de plátano CEMSA ¾ AAB obtenidas por multiplicación mediante uso de SIT en comparación con SS a los 28 días de cultivo, además indicaron la utilidad de obtención de brotes tipo I para dar inicio a ciclos sucesivos de multiplicación en SIT.

De esta forma, el uso del PSIT propuesto en nuestro estudio aumentó la eficiencia de la multiplicación, al permitir inocular un mayor número de explantes (9) al tener mayor diámetro en cesta y altura del frasco en comparación con RITA® (4) y SS (4), para obtener un número similar de brotes tipo I (9.81) en cada ciclo de forma sucesiva.



Figura 2. Resultados de 21 multiplicación de banano (*Musa*. AAA cv. Williams) en distintos sistemas de cultivo *in vitro*: SS (A, D), RITA® (B, E), PSIT (C, F).

La utilidad de estos materiales (Figura 2, F) de disponibilidad local presenta una nueva oportunidad de uso con fines de innovación en biotecnología vegetal (Tabla 2).

Tabla 2. Tasas de multiplicación por tipo de brote entre sistemas de cultivo *in vitro* de banano (*Musa* cv. Williams) luego de 21 días de cultivo, letras distintas significan diferencias significativas entre sistemas según prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Tipos de sistema	Tasa de multiplicación de brotes tipo I	Tasa de multiplicación de brotes tipo II	Tasa de multiplicación de brotes tipo III	Tasa de multiplicación total
SS	1.81±0.29b	0.45±0.24b	0.63±0.24b	2.90±0.62b
RITA®	2.36±0.38a	2.27±0.55a	7.36±2.12a	12.00±2.30a
PSIT	1.09±0.28b	2.90±0.47a	4.81±0.73ab	8.81±0.68a

Las vitroplantas tipo I de *Musa* cv. Williams obtenidas en PSIT presentaron la mayor longitud de pseudotallo y de hoja 1 (28.57 mm y 29.20 mm), como también el mayor contenido de ceniza (0.0691 g). No se encontraron diferencias significativas entre SIT RITA® y PSIT con respecto a masa fresca (1.01 g y 1.23 g), por otra parte, el SS difirió del resto con la masa fresca más alta (1.55 g). No se halló presencia de raíces en ningún brote obtenido mediante el PSIT, mientras que entre RITA® y SS se encontraron diferencias significativas (4.81 y 1.09) (Tabla 3). En comparación, Bello-Bello, et al. (2019), obtuvieron la mayor longitud de pseudotallo (38 mm), la tasa de multiplicación más alta (7.30) y mejor pigmentación foliar al multiplicar explantes de banano (*Musa* AAA cv. Grand Naine) en SIT SETIST™ por 28 días, evidenciaron presencia de raíces en brotes, pero no refirieron datos al respecto, luego, obtuvieron vitroplantas con el mayor porcentaje de cierre de estomas que demostraron 100% de éxito de aclimatación mediante uso del mismo sistema. Afirmaron también que, debido al material de fabricación de los contenedores, los SIT de polipropileno y policarbonato promovieron la actividad fotosintética de las vitroplantas al brindar mejores condiciones de disponibilidad de luz, además de la renovación permanente de la fase gaseosa del contenedor mediante la fase de inmersión, lo que evitó la acumulación de etileno y mantuvo estables los niveles de CO<sub>2</sub>.

Arencibia, et al. (2008), obtuvieron las más altas tasas de crecimiento, mayor pigmentación de clorofila y vigor fisiológico, que evidenciaron como indicador de metabolismo fotomixotrófico del tejido vegetal al evaluar la respuesta genómica diferencial en micropropagación de vitroplantas *Saccharum officinarum* spp. cv. Badila en BIT, en consecuencia, indicaron a este sistema como el método más natural para cultivar plantas *in vitro*.

El crecimiento radical de las vitroplantas es un efecto indeseado en fase de multiplicación en virtud de los reguladores de crecimiento suministrados y la finalidad del proceso, el cual es generar brotes. En adición a

lo anterior, Bidabadi & Mohan Jain (2020), afirmaron que el estrés de factores abióticos como temperatura y concentración salina influyen en el crecimiento radical.

Szopa, et al. (2019), evaluaron la producción de biomasa y metabolitos secundarios a partir de microbrotes de *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., al comparar SIT RITA® y SIT PLANTFORM™ con 3 diferentes BIT de origen local en 30 y 60 días de ciclo de cultivo, reportaron ventajas para la producción de biomasa en RITA®, mientras que, al haber obtenido los valores más elevados de metabolitos secundarios mediante uso de SIT de origen local, resaltaron la importancia del diseño de estos en la correcta renovación de fase gaseosa y disponibilidad de nutrientes.

Dutta Gupta & Agarwal (2017) afirmaron que la intensidad y la calidad espectral de la luz ejerce efectos significativos sobre la diferenciación celular, el crecimiento y el metabolismo secundario *in vitro*, además, que los atributos espectrales junto con diferentes tipos de fotorreceptores son los factores clave que gobiernan la morfogénesis de las plantas, señalaron que el éxito de la regeneración de plantas *in vitro* depende en gran medida de un espectro de luz adecuado y la eficiencia de los fotones de las fuentes de luz, lo que conduce a mayor contenido de fotosintatos en la célula vegetal.

Por lo tanto, en evidencia de lo expuesto se comprobó el efecto de PSIT en la correcta disposición de medio de cultivo para el tejido vegetal, y composición de fase gaseosa al interior del contenedor (debido a mayor volumen de fase gaseosa por explante con respecto a los otros sistemas), lo que promovió la eficiencia de uso de agua y nutrientes en las vitroplantas para convertirse en asimilados que indujeron una respuesta fisiológica superior de carácter fotomixotrófica, en comparación a los sistemas RITA® y SS.

Tabla 3. Morfología de brotes tipo I entre sistemas de cultivo *in vitro* de banano (*Musa* cv. Williams) luego de 21 días de fase de multiplicación, letras distintas significan diferencias significativas entre sistemas según prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Tipos de sistema	Longitud Pseudotallo (mm)	Longitud de la hoja 1 (mm)	Raíces totales por explante	Masa fresca (g)	Ceniza (g)
SS	16.54 ±2.29c	19.09±2.68b	1.09±0.31b	1.5509±0.1028a	0.0080±0.0010b
RITA®	21.00±0.80b	25.90±2.63ab	4.81±0.94a	1.0145±0.0917b	0.0032±0.0005b
PSIT	28.57±1.43a	29.20±2.59a	0b	1.2341±0.0264b	0.0691±0.0036a

#### Compuestos Fenólicos Solubles Totales

Los CFST obtenidos de brotes tipo I de *Musa* cv. Williams mostraron diferencias significativas en todos los sistemas (Fig. 3). El mayor CFST se evidenció de forma notable en brotes obtenidos en PSIT (8.46 mg EAG g<sup>-1</sup> MS). En comparación, Ayoola, et al. (2017), obtuvieron un contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de 21.81 mg EAG g<sup>-1</sup> MS en hojas de brotes de 42 días de *Musa sapientum* en fase de multiplicación, luego determinaron la correlación presente entre CFT, contenido de flavonoides totales y AA ( $r^2 = 0.5$  y  $r^2 = 0.6$ ) e interpretaron esto como un indicio del mayor protagonismo de la presencia de flavonoides sobre la actividad antioxidante del tejido vegetal de *Musa spp.*, respecto a los CFT; por último, afirmaron que los CFT del tejido vegetal *in vitro* pudieron ser acumulados por el estrés de las condiciones de cultivo, irradiación fotónica, temperatura y humedad relativa.

Someya, et al. (2002), determinaron un alto contenido de galocatequina en hojas de *Musa* AAA cv. Cavendish, el cual correspondió a la mayor AA de muestra vegetal analizada. Por otro lado, Arencibia, et al. (2008), evaluaron el efecto del ácido ascórbico como antioxidante añadido al medio de cultivo líquido en la fase multiplicación de *Saccharum officinarum spp* en SIT. A los 25 días de cultivo evidenciaron total inhibición del oscurecimiento del tejido vegetal en SIT con suplemento de ácido ascórbico (), mientras que observaron mayor pigmentación y vigor foliar en vitroplantas de SIT sin ácido ascórbico añadido. Concluyeron que existe una relación cercana entre el contenido de compuestos fenólicos esenciales y regulación de genes que codifican enzimas relacionadas con la producción de flavonoides, señales de estrés y defensa celular; afirmaron que la tasa de multiplicación no fue afectada por la presencia de fenoles en el tejido y que ésta estuvo en función de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) presentes en el medio de cultivo.

En adición, China, et al. (2011), determinaron el contenido de CFT de muestras de tejido de flores de distintos cultivares de *Musa spp.*, identificaron el mayor contenido de CFT, el mayor porcentaje de rendimiento de MS y el mayor contenido de flavonoides en equivalentes de quercitina (EQ) (11.94 mg EAG g<sup>-1</sup> MS, 80.94%, 0.174 g EQ g<sup>-1</sup> MS) en muestras del cultivar *Musa sp.* Kacha, lo cual sugirió una relación directa entre estos elementos en la constitución del tejido vegetal.

En recientes publicaciones Szopa, et al. (2019), indicaron la relación de contenido de fenoles y flavonoides totales de microbrotes *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., con las condiciones de estrés mecánico en el tejido vegetal en fase de inmersión de BIT, además de otros factores incidentes como medio de cultivo, RCV, sistema de cultivo y duración del periodo de cultivo *in vitro*.

Oyeyinka & Afolayan (2020), determinaron la constitución fitoquímica y AA de muestras de pulpa y piel de *Musa spp.*, afirmaron que un alto contenido de CFT pudo ser evidencia de la AA observada, debido al efecto de los flavonoides como precursores de antioxidantes en el tejido vegetal.

Por lo tanto, en correspondencia a la aptitud morfológica superior ya mencionada, se comprobó el efecto positivo del PSIT en la competencia del tejido vegetal para generar compuestos fenólicos a partir de asimilados, los cuales guardan relación a la activación de genes de resistencia y síntesis de antioxidantes (Figura 3).

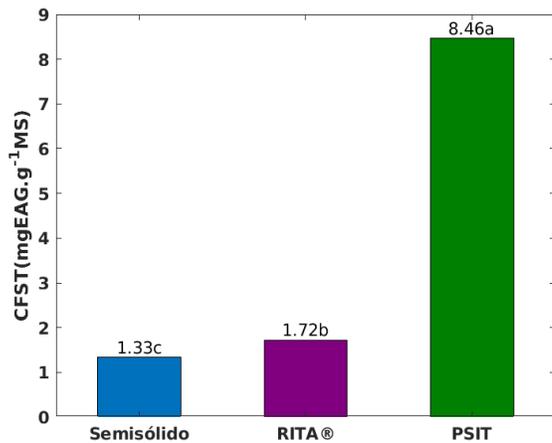


Figura 3. Compuestos fenólicos solubles totales de banano (*Musa* cv. Williams) expresados en mg EAG g<sup>-1</sup> MS, letras distintas significan diferencias significativas entre sistemas según prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan (p < 0.05).

### Actividad Antioxidante total

La AA de brotes tipo I de *Musa* cv. Williams difirió entre los sistemas (Fig. 4). La mayor AA se obtuvo en PSIT (317.72 μmol ET g<sup>-1</sup> MS), lo cual fue consecuente con el CFST determinados. De forma similar, en el estudio ya mencionado de China, et al. (2011), la mayor AA se determinó en el cultivar *Musa sp.* Kacha (1903), en correspondencia con los mayores valores de CFT, MS y flavonoides, por lo que afirmó la existencia de una correlación directa entre AA y CFT en *Musa spp.*

Craft, et al. (2012), indicaron que las catequinas son antioxidantes secundarios que provienen de los flavonoides, señalaron además que los mejores antioxidantes fenólicos son los compuestos que contienen grupos donadores de electrones directamente

adheridos a un anillo aromático. En el mismo ensayo anterior, Arencibia, et al. (2008), indicaron que la herida en el tejido al inicio del manejo *in vitro* desencadenó la acumulación y oxidación de compuestos fenólicos, a la vez que incrementó la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasas (PAL), la cual es clave para la síntesis de compuestos fenólicos esenciales y se relaciona con la acumulación de compuestos fenólicos que son oxidados por polifenol oxidasa (PPO) y peroxidases (POD).

Faltin, et al. (2010), afirmaron que la enzima glutatión peroxidasa (PHGPx) cumple un papel fundamental en la regeneración de brotes *in vitro* mediante la modulación de los niveles de especies reactivas en oxígeno (ERO), demostraron que la sobreexpresión de PHGPx inhibe la formación de brotes en estadios iniciales de la organogénesis somática a causa de la regulación a la baja de niveles necesarios de ERO para la desdiferenciación-diferenciación celular inicial y formación de clústers (en el caso del banano), de esta forma, evidenciaron la relación intrínseca entre señales de estrés y generación de brotes meristemáticos durante una ventana de tiempo crítica de entre 3 a 5 días. Choudhary, et al. (2020), indicaron que el radical superóxido y peróxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) actúan de forma antagonica en el mantenimiento y diferenciación de los ápices meristemáticos mediante la regulación de la expresión del factor de transcripción *SHOOT MERISTEM REGULATOR WUSCHEL* (WUS), el cual es regulado al alza por el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, mientras que la excesiva producción de ERO produce daño genético y muerte celular. Bidabadi & Mohan Jain (2020), señalaron el efecto de la herida en el tejido como precursor de activación de genes de brotación. Agregaron que el medio de cultivo suplementado con citoquininas produce la activación de WUS para generar brotes meristemáticos, al tiempo que indicaron que el uso de antioxidantes reductores de ERO afecta de forma negativa las vías metabólicas críticas en la diferenciación de órganos, y que, por el contrario, la sobreproducción de ERO está ligada a la regeneración de brotes en etapas iniciales de la regeneración meristemática (Figura 4).

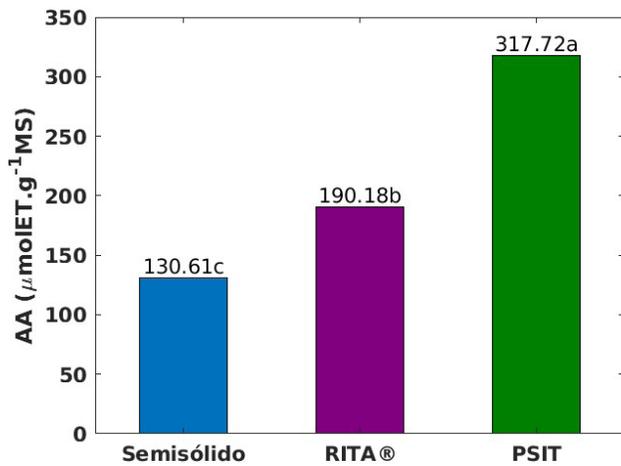


Figura 4. Actividad Antioxidante de banana (*Musa* AAA cv. Williams) expresada en  $\mu\text{mol ET g}^{-1}\text{MS}$ , letras distintas significan diferencias significativas entre sistemas según prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Diversos autores han señalado la existencia de regiones lábiles en la cromatina del genoma de *Musa spp.*, los cuales están relacionados con aberraciones genéticas o somaclones (*off-type-plants*) que pueden ser generadas, entre diversos factores, por causas relacionadas con estrés en el proceso de micropropagación *in vitro*, especial el subgrupo Cavendish (AAA) (Chong, et al., 2020).

Durante la desdiferenciación y diferenciación en el proceso de organogénesis se inducen procesos de reprogramación celular acelerada, los cuales pueden inducir a fallas de transcripción del ADN o fallas en la modulación de respuesta epigenética a estímulos de estrés, como factor evolutivo de supervivencia del organismo. Además, Bahadur, et al. (2015), indicaron fallas en la actividad de la PPO y POD en somaclones de *Musa spp.*

Por su parte, Rath, et al. (2019), evaluaron un protocolo de micropropagación de *N. arbor-tristis* de explantes nodales, determinaron la homogeneidad genética de las plántulas regeneradas *in vitro*, mediante uso de perfiles de marcadores SCoT, junto con una evaluación comparativa de sus moléculas bioactivas y antioxidantes. Observaron homogeneidad completa del perfil genético, además de similitud en niveles de contenidos de metabolitos secundarios característicos al comparar plantas regeneradas y plantas donantes. Por ende, demostraron que los compuestos bioactivos son una herramienta para confirmar plantas verdaderas a su tipo (*true-to-type plants*), lo cual se tradujo en un correcto mecanismo de regulación de síntesis de antioxidantes al final del proceso de micropropagación, lo que el indicaron, podría ser de utilidad en elaboración de protocolos de micropropagación vegetal, sin embargo se requiere más investigación que permita comprender mejor la relación entre mecanismos de regulación de crecimiento que desempeñan las ERO en vitroplantas y los

compuestos antioxidantes que actúan sobre estos en la micropropagación *in vitro*.

Por lo tanto, la caracterización de los CFST y la AA de *Musa* cv. Williams permitió comprender la respuesta de adaptación del tejido vegetal al ambiente *in vitro* y determinar el sistema más adecuado durante la fase de multiplicación, en consideración a los compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante, sinergia de citoquininas y disponibilidad de luz, nutrientes y fase gaseosa, los cuales se conjugaron en PSIT para obtener los resultados descritos.

## CONCLUSIONES

El uso de PSIT permite llevar a cabo el proceso de multiplicación por organogénesis directa de *Musa* AAA cv. Williams con recursos de origen local, y así, la obtención de vitroplantas de calidad superior al estándar del estado de la técnica actual, lo que a su vez brinda mayor eficiencia en uso de recursos y asegura la obtención de plantas verdaderas a su tipo (*true-to-type plants*).

Esta innovación además favorece la obtención de plantas fortificadas, al generar biocompuestos antioxidantes de interés, a la vez que se evidencia la optimización de la fase de multiplicación de brotes axilares de *Musa* cv. Williams mediante la implementación de un PSIT.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arencibia, A. D., Bernal, A., Yang, L., Cortegaza, L., Carmona, E. R., Pe, A., ... Santana, I. (2008). New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science*, *175*, 487–496.
- Ayoola, I. O., Gueye, B., Sonibare, M. A., & Abberton, M. T. (2017). Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of field and *in vitro* grown *Musa* L. species. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*(2), 488–499.
- Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (2015). *Plant biology and biotechnology: Volume II*. Springer.
- Bello-Bello, J. J., Cruz-Cruz, C. A., & Pérez-Guerra, J. C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *121*, 219–223.
- Bidabadi, S. S., & Mohan Jain, S. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*, *9*(6), 10–13.

- China, R., Dutta, S., Sen, S., Chakrabarti, R., Bhowmik, D., Ghosh, S., & Dhar, P. (2011). In vitro antioxidant Activity of Different Cultivars of Banana Flower (*Musa paradiscus*L.) Extracts Available in India. *Journal of Food Science*, 76(9), 1292–1299.
- Chong, P. A., & Newman, D. J. (2020). *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*. Springer International Publishing.
- Choudhary, A., Kumar, A., & Kaur, N. (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 42(1), 33–43.
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). *In vitro* Musa spp. multiplication in the temporary immersion system. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 1–11.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173.
- Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., & Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 161(1), 179–188.
- Dutta Gupta, S., & Agarwal, A. (2017). *Light emitting diodes for agriculture: Smart lighting*. Springer.
- Faltin, Z., Holland, D., Velcheva, M., Tsapovetsky, M., Roedel-Drevet, P., Handa, A. K., Abu-Abied, M., Friedman-Einat, M., Eshdat, Y., & Perl, A. (2010). Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for *in vitro* plant differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 51(7), 1151–1162.
- Giménez, C., & Colmenares, M. (2004). Sistemas prototipos para la micropropagación por inmersión temporal. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 21(4), 1–7.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiología Plantarum*, 15, 473–497.
- Oyeyinka, B. O., & Afolayan, A. J. (2020). Comparative and Correlational Evaluation of the Phytochemical Constituents and Antioxidant Activity of *Musa sinensis* L. And *Musa paradisiaca* L. Fruit Compartments (Musaceae). *Scientific World Journal*, 5, 1-12.
- Rath, S. C., Seth, S., Mishra, S. K., Yadav, P. K., Gupta, A. K., & Panigrahi, J. (2019). Correction to: Genetic homogeneity assessment of *in vitro*-regenerated plantlets of *Nyctanthes arbor-tristis* L. and comparative evaluation of bioactive metabolites and antioxidant activity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(6), 733.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J. J., Sandoval, J., Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 57–66.
- Someya, S., Yoshiki, Y., & Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry*, 79(3), 351–354.
- Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Bednarz, M., Jaferník, K., Luczkiewicz, M., & Ekiert, H. (2019). Bioreactor type affects the accumulation of phenolic acids and flavonoids in microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139(1), 199–206.