

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Optimización de la micropropagación de plátano "Barraganete" (AAB) mediante un sistema de inmersión temporal no automatizado

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

BIÓLOGA

Presentado por:

Kenny Nicole Casal Miranda

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

Le dedico mi proyecto de grado a cada una de las personas que me ayudaron en todo este camino, para no rendirme y conseguir esta primera meta.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al profesor Eduardo Sánchez Timm, por ser uno de mis mentores durante toda la carrera universitaria. A Karen Hidalgo y José García por ser mis guías para el desarrollo de este proyecto. A todo el equipo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CIBE por tenerme mucha paciencia.

Declaración expresa

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Kenny Nicole Casal Miranda* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kenny Casal Miranda', is centered on the page. The signature is stylized and cursive.

Kenny Casal Miranda

Evaluadores

Diego Gallardo Polit

Profesor de la materia

Eduardo Sánchez Timm

Profesor tutor

Resumen

La demanda de la industria platanera en el Ecuador va en aumento cada año y se necesitan nuevas técnicas de propagación masiva de estos cultivos en laboratorio, debido a que la técnica estándar de micropropagación *in vitro* tiene sus límites. El sistema de inmersión temporal (SIT) automatizado es una técnica ampliamente utilizada en otros países de la región para diferentes cultivos, la cual consiste en sumergir las plantas en un medio de cultivo líquido por un corto periodo de tiempo y luego retirar el medio utilizando una bomba. Esta técnica es eficiente comparada a la técnica estándar, pero tiene un alto costo de producción. Por esto, se decidió utilizar un SIT manual conocido como biorreactor Biocoupler para optimizar la micropropagación del plátano Barraganete en laboratorio. Se realizó un ensayo en 3 meses para comparar la metodología estándar con el biorreactor Biocoupler según su tasa de multiplicación y áreas verdes. Los resultados obtenidos demostraron la eficiencia del Biocoupler pues tuvo una tasa de multiplicación de 4.7 en comparación con la de la técnica estándar (1.7); asimismo demostró tener mayor área verde en Biocoupler (tasa de 2.2 cm²). Lo que permite concluir que el Biocoupler tiene mayores ventajas contra la técnica estándar en cuanto a tasa de multiplicación, áreas verdes, y costos.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, Biocoupler, tasa de multiplicación, áreas verdes

Abstract

The demand of the banana industry in Ecuador is increasing every year and new techniques for mass propagation of these crops in the laboratory are needed, due to the standard technique of in vitro micropropagation has its limits. The automated temporary immersion system (SIT) is a technique widely used in other countries in the region for different crops, which consists of submerging the plants in a liquid culture medium for a short period of time and then removing the medium using a pump. This technique is efficient compared to the standard technique but has a high production cost. Therefore, it was decided to use a manual SIT known as a Biocoupler bioreactor to optimize the micropropagation of Barraganete plantain in the laboratory. A 3-month trial was conducted to compare the standard methodology with the Biocoupler bioreactor according to its multiplication rate and green areas. The results obtained showed the efficiency of the Biocoupler as it had a multiplication rate of 4.7 compared to that of the standard technique (1.7); it also showed a greater green area in Biocoupler (rate of 2.2 cm²). This leads to the conclusion that the Biocoupler has greater advantages over the standard technique in terms of multiplication rate, green area, and cost.

Keywords: *In vitro culture, Biocoupler, multiplication rate, green areas.*

Índice general

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Índice general.....	III
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VII
Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Descripción del problema.....	2
1.3 Justificación del problema.....	3
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1 Objetivo general.....	3
1.4.2 Objetivos específicos.....	3
1.5 Marco Teórico.....	4
1.5.1 Cultivo de plátano.....	4
1.5.2 Cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	4
1.5.3 Medio de cultivo.....	5
1.5.4 Sistema de inmersión temporal.....	6
Capítulo 2.....	8
2.1 Metodología.....	9
2.1.1 Medios de cultivo y material biológico.....	9
2.1.2 Desinfección del material biológico.....	9
2.1.3 Introducción <i>in vitro</i>	10
2.1.4 Toma de datos.....	11
2.1.5 Análisis estadístico.....	12

Capítulo 3.....	13
3.1 Resultados y análisis.....	14
3.1.1 Comparación de las tasas de multiplicación por pase.....	14
3.1.2 Comparación de las tasas de multiplicación por tratamiento.....	15
3.1.3 Comparación de las áreas verdes por tratamiento.....	16
Capítulo 4.....	19
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	20
4.1.1 Conclusiones.....	20
4.1.2 Recomendaciones.....	20
Referencias.....	22
Apéndice A.....	25
Apéndice B.....	26

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
SIT	Sistema de inmersión temporal
PIB	Producto Interno Bruto
MS	Murashige & Skoog
KIN	Quinetina
BAP	6-Bencilaminopurina
ES	Error Estándar
I	Introducción
P1	Pase 1
P2	Pase 2
P3	Pase 3

Simbología

ha	hectáreas
ton	toneladas
cm	centímetros

Índice de figuras

Figura 1.1. Sistema de inmersión temporal no automatizado.....	7
Figura 2.1. Proceso de desinfección e introducción in vitro de plátano Barraganete.....	9
Figura 2.2. Foto referencia para la toma de datos de los explantes y sus brotes.....	11
Figura 3.1. Resultados de la prueba U Mann-Whitney para dos tratamientos.....	15
Figura 3.2. Diagrama de caja para las tasas de multiplicación de los dos tratamientos del ensayo.....	16
Figura 3.3. Diagrama de bigotes y medias de las tasas de áreas verdes de los dos tratamientos.....	18

Índice de tablas

Tabla 1. Número de plátano Barraganete utilizado para el proyecto.....	11
Tabla 2. Resultados durante los cuatro meses del ensayo del biocoupler y el medio sólido.....	14
Tabla 3. Tasa de multiplicación por frasco por pase de cada tratamiento del ensayo.....	15
Tabla 4. Resultados de la prueba de medianas iguales de Mann-Whitney con respecto a las áreas verdes por pase por tratamiento.....	17
Tabla 5. Resultado de la prueba de distribuciones equitativas de Kolmogórov-Smirnov para el análisis de las áreas verdes de los dos tratamientos (Biocoupler vs Solido).....	18

Capítulo 1

1.1 Introducción

En el Ecuador, tanto el banano como el plátano son alimentos importantes, para el consumo interno del país y para su exportación, siendo el barraganete la variedad de plátano más exportada (Fernández et al., 2021). Sin embargo, existen problemáticas en los cultivos de esta especie, tales como la escasez de recursos tecnológicos de los agricultores para asegurar una mejor producción en campo, o contar con material sano para la siembra del cultivo.

La micropropagación vegetal es una tecnología que puede asegurar al productor iniciar con plantas sanas libres de enfermedades, sin embargo, esta herramienta enfrenta diversos desafíos que limitan su eficiencia y aplicación a gran escala, tales como bajas tasas de multiplicación o altos porcentajes de mortandad. Esto restringe la capacidad de satisfacer la demanda creciente de plantas de calidad y limita la expansión de la industria platanera. Abordar la problemática es clave y, por esto, se busca utilizar un sistema de inmersión temporal (SIT) no automatizado para la optimización de la propagación *in vitro* del plátano.

1.2 Descripción del problema

Ecuador, como un país agrícola, está adquiriendo nuevas demandas, pues el aumento de productores puede deberse a la alta demanda de plátano; debido a esto, el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) ha identificado una de las problemáticas del cultivo, que es la baja tasa de propagación de plántulas. Con base a lo mencionado, se plantea implementar un protocolo de cultivo de tejidos por inmersión temporal, un sistema que se erige como una alternativa viable, permitiendo una multiplicación optimizada de especies valiosas según las necesidades del sector agrícola nacional, midiendo su efectividad según la tasa de multiplicación y el área verde. La comparación entre este método y el convencional es base para la comprobación de la optimización en la propagación *in vitro* del plátano barraganete (*Musa AAB*).

1.3 Justificación del problema

Según el último censo del 2022, se reporta que el Ecuador tiene una superficie plantada de 113,145 ha. de cultivos permanentes de plátano, lo cual se traduce en un 9,3% del total de la producción agrícola anual del país (Ipiales & Cuichán, 2023). Además, los beneficios de implementar un sistema de inmersión temporal son múltiples, pero existe una diferencia marcada entre un sistema automatizado y uno no automatizado. En el presente proyecto, se plantea efectuar un sistema de inmersión temporal no automatizado, llamado biocoupler. Los biocouplers se destacan por: la simplicidad de su diseño y manejo; la alta tasa de multiplicación; entre otros. Por esto, la optimización en la micropropagación del plátano es relevante para el soporte de la demanda de la industria platanera a escala nacional.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Optimizar la micropropagación de plátano barraganete mediante un sistema de inmersión temporal no automatizado para el abastecimiento de la demanda de la industria platanera.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Diseñar un protocolo mejorado de un sistema de inmersión temporal no automatizado conocido como biocoupler, que permita la propagación masiva de plátano ("Barraganete").
2. Determinar la viabilidad del uso de un biocoupler para el aumento de la tasa de multiplicación como resultado de una mayor capacidad de absorción de las plantas.
3. Comparar la micropropagación en medio de cultivo sólido con el de inmersión de plantas de interés comercial, mediante análisis estadístico.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Cultivo de plátano

El plátano (*Musa AAB Simmonds*), que pertenece a la familia de las *Musaceae*, es de gran importancia para África, América y Asia, pues es uno de los alimentos más importantes para su dieta debido a sus propiedades como fuente de carbohidratos, potasio y vitamina B (FEN, n.d.); en donde países como China e Indonesia son los principales productores para consumo interno (Cedeño Zambrano et al., 2021). Mientras que países como Colombia (3'786,672 toneladas) y Ecuador (6'282,105 ton.), que también están entre los principales productores a nivel mundial, cuentan como grandes exportadores, siendo Ecuador el que encabeza la lista (CEDRSSA, 2019).

La producción del banano, incluyendo el plátano y sus variedades, en el Ecuador representa el 50% del Producto Interno Bruto (PIB) del sector agrícola nacional (Cedeño Zambrano et al., 2021), siendo la provincia de Manabí la principal productora de esta fruta en todo el país, representando el 9,3% de su producción anual (INEC, 2022). Las dos variedades más importantes cultivadas en Ecuador son el dominico, que es el cultivado para consumo interno; y el barraganete, que es la variedad que más se siembra para exportación (Álvarez Morales et al., 2020).

1.5.2 Cultivo *in vitro* vegetal

La agricultura es un eje fundamental para el Ecuador pues representa el 8,8% del PIB total del país (Banco Mundial, 2022), que tiene sus avances, pero también posee dificultades, y por lo tanto, es indispensable plantear y rediseñar técnicas que permitan el mejoramiento de los cultivos. Así se da paso al desarrollo de métodos en laboratorio para ayudar a este campo agrícola.

El cultivo *in vitro* es un método ampliamente utilizado en la actualidad para el crecimiento de todo tipo de tejido vegetal (desde solo células hasta órganos), que necesitan desarrollarse en un ambiente estéril y controlado (Norouzi et al., 2022). Este método representa

una herramienta biotecnológica de importancia para la investigación básica y aplicada, que evita que las plántulas obtenidas tengan enfermedades y potencie la propagación de estas (Espinosa-Leal et al., 2018).

La micropropagación de material genético, es una forma de propagación *in vitro* que podría suplir la demanda de una agricultura masiva por el crecimiento de la población a nivel global, esto, a su vez, permite la obtención de plántulas que sean genéticamente iguales a la 'planta madre' (Debergeh & Zimmerman, 1990). Esta es una gran ventaja para asegurar que exista un stock de plántulas libres de cualquier tipo de patógeno (bacteria, virus u hongo), y que exista cualquier tipo de hibridación con las plantas hijas (Rédei & Evans, 2008).

El plátano, por ejemplo, al igual que con el banano, no es excluido de estos problemas de campo que se generan con el desarrollo de nuevos brotes; en realidad, el cultivo de plátano solo es viable por medio de organogénesis, debido a que los frutos comestibles no poseen semillas viables para su propagación (Agbadje et al., 2021).

1.5.3 Medio de cultivo

El desarrollo eficiente de la propagación *in vitro* de algún tejido gira en torno al medio de cultivo que se elija y este, a su vez, debe contener componentes esenciales para que la planta crezca sin dificultades (Phillips & Garda, 2019); factores o componentes como macro y micronutrientes, condiciones de luz y temperatura adecuados, entre otros (Gallego et al., 2020).

El medio de cultivo puede ser sólido, semisólido o líquido. Los dos primeros, básicamente, dependen mucho de qué tanto gelificante se le añade a la solución (agar o phytigel, otros); mientras que el líquido no lleva gelificante y, aunque no es tan utilizado como los medios sólidos y semisólidos, representa ser ventajoso para ciertos métodos y técnicas de micropropagación (Saad & Elshahed, 2012).

1.5.4 Sistema de inmersión temporal

Dentro de los métodos que se emplean para el uso de un medio de cultivo líquido, es el método por inmersión temporal. Este método se diferencia del método convencional en que el primero está en contacto intermitente con el medio, mientras que en el segundo, los explantes quedan permanentemente en contacto con el medio (Chávez-García et al., 2019).

Esta metodología permite que la tasa de multiplicación – micropropagación – de los explantes sea eficiente (mayor, supliendo la demanda masiva de una planta de interés comercial), además de que las plantas son expuestas a condiciones más similares a las naturales al no tener siempre disponibilidad de algún/os nutriente/s, minerales y otros elementos que podrían aprovechar del suelo (Castillo et al., 2020).

Los SIT pueden ser mecánicos automatizados o sencillamente no automatizados. Los SIT mecánicos automatizados utilizan software que permite el pase de aire por presión para elevar el medio líquido y que los explantes queden sumergidos por un breve periodo de tiempo (Lugo et al., 2017). Sin embargo, este sistema es costoso debido a su diseño de biorreactores y uso informático, además de que es un sistema que necesita suficiente espacio dentro de un cuarto de crecimiento (Lugo et al., 2017). Por otro lado, un sistema no automatizado tiene un atractivo que radica en la sencillez de su diseño, pero eficiencia en la propagación *in vitro* de explantes. Su diseño consiste, básicamente, en dos frascos unidos por medio de una rosca (biocoupler; Figura 1.1) que tiene un filtro, en donde uno de los frascos tendrá los explantes, y el otro frasco tendrá el medio líquido y, para que exista la inmersión de las muestras, solo se necesita girar los frascos por un periodo de tiempo corto cada día, y luego regresarlos a la posición original, teniendo así un sistema no automatizado de bajo costo y fácil instalación (Plant Cell Technology Inc., n.d.).

Figura 2.1

Sistema de inmersión temporal no automatizado, conocido como biocoupler
(Singh, 2023)



Capítulo 2

2.1 Metodología

2.1.1 Medio de cultivo y material biológico

Se preparó medio MS, cuyos ingredientes estándar para la preparación de este medio se adjuntan en una tabla del Apéndice A (Murashige & Skoog, 1962); sin embargo, se utilizó phytigel (3 g/L) como gelificante (uso estándar del laboratorio de Cultivo de Tejidos del CIBE), además se hicieron modificaciones en cantidades. Se utilizaron 50 plantas adultas de plátano barraganete (AAB) sembradas en invernadero, en condiciones controladas para asegurar su crecimiento y su baja tasa de contaminación para su introducción *in vitro*. Los tratamientos usados fueron medio sólido, en frascos de vidrio, y el medio líquido en Biocoupler, adquirido de la empresa Plant Cell Technology (<https://www.plantcelltechnology.com/>).

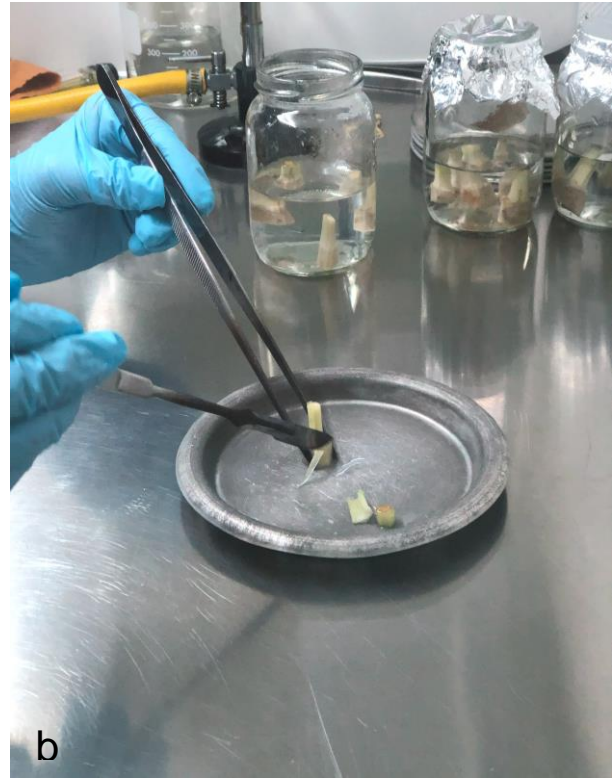
2.1.2 Desinfección del material biológico

En invernadero, se realizaron cortes con cuchillo dejando aproximadamente 3 cm de altura, retirando las capas externas de la planta para una posterior desinfección en el laboratorio (Figura 2.1.a). Se procesó el material biológico utilizando una mezcla de cloro comercial diluido en agua destilada, con una concentración final de 4%. Las muestras fueron sumergidas en esta mezcla por 20 minutos, para luego retirarlas y realizar lavados con agua destilada estéril. Se las dejó secar en un platillo de aluminio estéril por aproximadamente 10 minutos antes de sembrarlas en los medios de cultivo. El proceso en laboratorio fue llevado a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

Figura 3.1

Proceso de desinfección e introducción in vitro de plátano Barraganete

En la foto izquierda (a) se puede observar cómo debe quedar el tallo con su base para proceder a los pasos de desinfección en laboratorio; mientras que en la foto derecha (b), ya se puede observar los cortes de las últimas capas del tallo para introducir los explantes al medio.




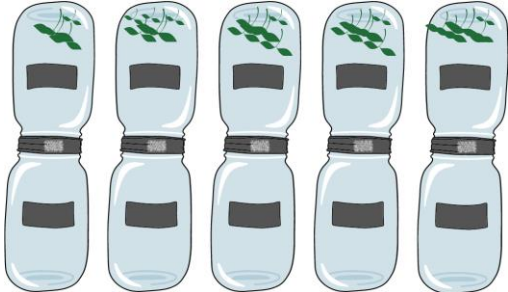
2.1.3 Introducción in vitro

El tamaño de los explantes se redujo hasta 1.5 x 1.5 cm (altura x base), utilizando instrumentos esterilizados por calentamiento (Figura 2b). Las muestras fueron sembradas solo en medio MS sólido. Se seleccionaron 50 plantas homogéneas en el pase 4 luego de la introducción (Tabla 1) para la ejecución del diseño experimental. Aquí se utiliza el medio MS, pero con más hormonas citoquininas (quinetina, KIN, y 6-bencilaminopurina, BAP) para la multiplicación de plantas debido a la aplicación de citoquininas.

Tabla 2

Número de plátano Barraganete utilizado para el proyecto

Se muestra cómo fueron armados los medios sólido y líquido (biocouplers) para la introducción.

Medio de cultivo	Plantas	Ilustración
BN sólido	25	
BN líquido	25	
Total	50	

2.1.4 Toma de datos

Los datos se tomaron una vez al mes cuando se necesitaba cambiar los explantes a un nuevo medio (Figura 2.2). Cuando se tomaban los datos, los explantes del medio líquido pasaban al sólido hasta el siguiente día cuando se volvía a ensamblar los biocouplers.

Se llenó la bitácora detallada en la Apéndice B para una posterior digitalización y análisis de datos.

Figura 2.2

Foto referencia para la toma de datos de los explantes y sus brotes.

Las fotos que se tomaron eran necesarias para la obtención del área verde de la planta por medio del software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). En la caja Petri de la izquierda siempre se colocaban los explantes de Sólido y en la caja derecha los de Biocoupler



Fecha:					
No. de frasco	Sólido		Biocoupler		Observaciones
	No. explantes	No. brotes	No. explantes	No. brotes	
F1					
F2					
F3					
F4					
F5					

2.1.5 Análisis de datos

Los parámetros considerados para el análisis de datos fueron: tasa de multiplicación por tratamiento, y tasa de áreas verdes. Se utilizó Microsoft Excel (Microsoft, 2023) para el análisis de promedios; para el análisis general de la tasa de multiplicación y tasa de áreas verdes entre tratamientos se hizo la prueba no paramétrica, U de Mann-Whitney, del software de acceso libre PAST (Hammer, 2020); y para el análisis del contraste de normalidad entre las áreas verdes de los tratamientos, se utilizó la prueba Kolmogórov-Smirnov, del mismo programa.

Capítulo 3

3.1 Resultados y análisis

3.1.1 Comparación de las tasas de multiplicación por pase

Se evaluaron 5 frascos por tratamiento, con 5 explantes por frasco como introducción con 3 pases (un pase por mes, consecutivamente) al finalizar, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 2

Resultados durante los cuatro meses del ensayo del biocoupler y el medio sólido

Pase	Tratamiento	Frascos					Promedio	Total
		F1	F2	F3	F4	F5		
P0	Biocoupler	5	5	5	5	5	5	25
	Sólido	5	5	5	5	5	5	25
P1	Biocoupler	12	10	10	6	10	9.6	57.6
	Sólido	6	5	5	5	6	5.4	32.4
P2	Biocoupler	18	42	20	8	18	21.2	127.2
	Sólido	11	8	9	6	11	9	54
P3*	Biocoupler	-	90	52	22	12	44	176
	Sólido	-	10	13	6	18	11.75	47
E.S							2.53	

Como se observa en la Tabla 2 existió una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos como promedio para cada tratamiento en cada pase, diferencia que se muestra mejor utilizando la tasa de multiplicación por frasco de cada pase por tratamiento para saber si realmente existía una diferencia significativa entre pase y pase (ver Tabla 3). En la Tabla 2, el pase P3 muestra ausencia de datos para el frasco F1 debido a que hubo contaminación en los explantes, lo que se descartó como plántulas viables pues la contaminación es un factor influyente en el desarrollo de nuevos brotes en la propagación *in vitro* de una planta.

Tabla 3

Tasa de multiplicación por frasco por pase de cada tratamiento del ensayo

	Tratamiento	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5
P1	Biocoupler	2.4	2	2	1.2	2
	Solido	1.2	1	1	1	1.2
P2	Biocoupler	3.6	8.4	4	1.6	3.6
	Solido	2.2	1.6	1.8	1.2	2.2
P3*	Biocoupler	-	18	10.4	4.4	2.4
	Solido	-	2	2.6	1.2	3.6
E.S		0.65				

3.1.2 Comparación de las tasas de multiplicación por tratamiento

El análisis para corroborar si existía una diferencia significativa entre los tratamientos (Biocoupler y Solido) se realizó utilizando las dos únicas variables relevantes para esta comparación, obteniendo como resultado lo que se observa en las Figuras 3.1 y 3.2.

Figura 3.1

Resultados de la prueba U Mann-Whitney para dos tratamientos

Mann-Whitney test for equal medians

BIOCOUPLER

N: 14
Mean rank: 9.5357

SOLIDO

N: 14
Mean rank: 4.9643

Mann-Whitn U: 34

z: 2.9342

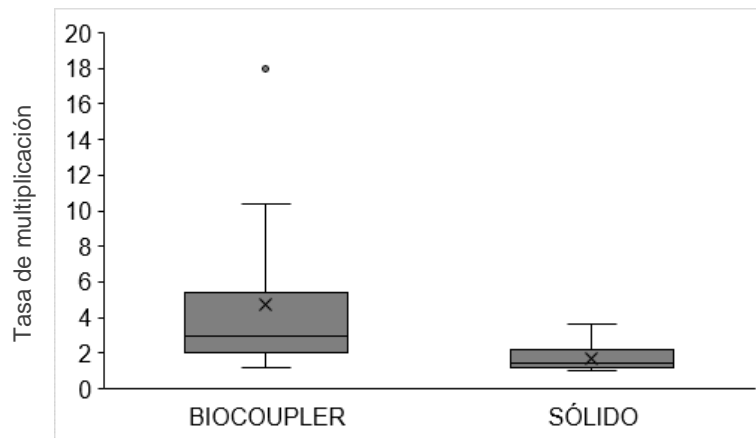
Monte Carlo permutation:

p (same med.): 0.0033442

p (same med.): 0.002

Figura 3.2

Diagrama de caja para las tasas de multiplicación de los dos tratamientos del ensayo



Para saber si había o no una diferencia significativa, el valor p debía negar o afirmar la hipótesis de que los tratamientos son iguales, siendo $p > 0.05$ el valor que afirmaba la igualdad entre tratamientos, y $p < 0.05$ negaba la igualdad. En la Figura 4, donde $p < 0.05$ con un valor de 0.00334, se demuestra que existe una diferencia importante entre los tratamientos, siendo el tratamiento Biocoupler el que posee mejores tasas de multiplicación, con un promedio de 4.7. Los resultados obtenidos para este ensayo se asemejan a la tasa de multiplicación obtenida para una investigación similar con la misma variedad de plátano, diferenciando en el tipo de análisis puesto que aquella investigación evaluaban varias variables, por tanto, utilizaron ANOVA (Roels et al., 2005).

3.1.3 Comparación de las áreas verdes por tratamiento

Cabe mencionar que el análisis de los resultados obtenidos con respecto a la tasa de multiplicación por pase no fue tomado en cuenta para las diferentes pruebas estadísticas llevadas a cabo en el proyecto debido al bajo número de muestras del ensayo. Sin embargo, el análisis de las áreas verdes sí se pudo realizar utilizando la prueba Mann-Whitney, la cual muestra que los pases P2 y P3 sí tienen una diferencia significativa (0.0009 y 0.0154, respectivamente; ver Tabla 4 B y C); mientras que, el pase P1 presenta medias iguales (0.47).

Tabla 4

Resultados de la prueba de medianas iguales de Mann-Whitney con respecto a las áreas verdes por pase por tratamiento

(A) resultado del análisis de medianas para el pase P1; (B) resultado del análisis de medianas para el pase P2; (C) resultado del análisis para el pase P3

A

Mann-Whitney test for equal medians			
BIOCOUPLER		SÓLIDO	
N:	22	N:	22
Mean rank:	10.545	Mean rank:	11.955
Mann-Whitn U :	211		
z :	0.71592	p (same med.):	0.47404

B

Mann-Whitney test for equal medians			
BIOCOUPLER		SÓLIDO	
N:	20	N:	20
Mean rank:	13.325	Mean rank:	7.175
Mann-Whitn U :	77		
z :	3.3136	p (same med.):	0.00092091

C

Mann-Whitney test for equal medians			
BIOCOUPLER		SOLIDO	
N:	20	N:	20
Mean rank:	12.5	Mean rank:	8
Mann-Whitn U :	110		
z :	2.421	p (same med.):	0.015479

Por otro lado, para el análisis general de las áreas verdes con respecto a los tratamientos, se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov debido a que se tenían más de 50 datos univariados. Esta prueba arrojó como resultado una distribución significativa entre los datos, con un valor de 0.001, es decir menor al valor p predeterminado ($p > 0.05$, ver Tabla 5), lo cual se observa gráficamente en el diagrama de bigotes con media de la Figura 3.3. El diagrama muestra un intervalo de 95% para establecer las diferencias entre las medias, es decir que, como no existe un cruce entre los intervalos ni las medias, los tratamientos no son iguales y es el tratamiento Biocoupler el que muestra un mejor crecimiento de las áreas verdes de los explantes.

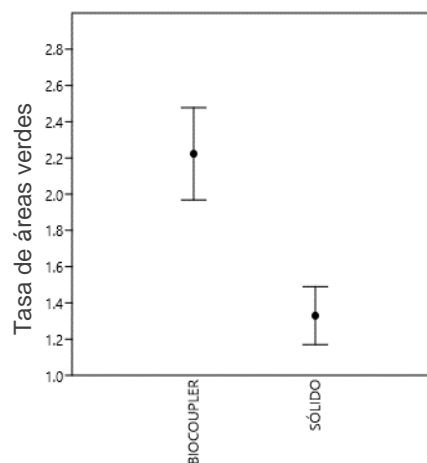
Tabla 5

Resultado de la prueba de distribuciones equitativas de Kolmogórov-Smirnov para el análisis de las áreas verdes de los dos tratamientos (Biocoupler vs Solido)

Kolmogorov-Smirnov test for equal distributions			
BIOCOUPLER		SOLIDO	
N:	62	N:	62
D :	0.3387	p (same dist.):	0.001135

Figura 3.3

Diagrama de bigotes y medias de las tasas de áreas verdes de los dos tratamientos



Estos resultados indican, entonces que, en cada nuevo pase, los explantes de los Biocouplers van obteniendo más área verde para el desarrollo de nuevos brotes, permitiendo que su propagación sea más eficiente, también se puede suponer que la fenolización es baja en este sistema debido a que las plantas no están en contacto constante con el medio de cultivo, provocando un tipo de estrés que ayuda a la multiplicación, pero que necesita ser estudiado con más precisión en investigaciones futuras específicamente en este cultivo. Asimismo, el Biocoupler posee un diseño sencillo, práctico y ahorrativo, pues para el ensayo se necesitó comprar 5 biorreactores Biocouplers y los 10 frascos de vidrio, con un costo total de \$120; mientras que, el valor de un biorreactor de un SIT automatizado puede variar según la marca, sin mencionar el costo de la bomba y el mantenimiento del sistema.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y Recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

1. Los SIT son una técnica ventajosa para muchas plantas de interés comercial que tienen una baja tasa de multiplicación con los métodos convencionales de propagación *in vitro*, como es el caso del plátano Barraganete. Al finalizar el ensayo, se obtuvo 176 brotes de los 4 biocouplers que quedaron debido a que uno se contaminó. Eso concluye que manteniendo las condiciones de asepsia en laboratorio, se puede realizar una micropropagación masiva de la especie estudiada y otras similares, pero también se puede recurrir a métodos adicionales para la prevención de contaminación.
2. Se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las tasas de multiplicación de cada tratamiento por frasco, por pase y general, teniendo promedios en tasas entre 9 y 44 brotes por pase para Biocoupler, y entre 5 y 12 por pase para Solido. Mientras que el tratamiento Biocoupler tuvo una tasa de multiplicación de 4.7. Esto quiere decir que el uso de un SIT no automatizado como el Biocoupler no solamente es viable, sino que demuestra una propagación más eficiente que los métodos que utilizan medio sólido y semisólido.
3. Las tasas de multiplicación para el Biocoupler destacaron significativamente del medio Solido, pero también sucedió con los valores del área verde de los explantes de Biocoupler en donde, a pesar de que no se dejaba mucho tallo en los explantes para tomar medidas de crecimiento, era suficiente para que pudiera ayudar en el desarrollo de nuevos brotes, mejorando la tasa de multiplicación. Se concluye entonces que, según los análisis de Mann-Whitney y el de Kolmogórov-Smirnov, existe una diferencia marcada ventajosa para el biocoupler con respecto al cultivo de plátano Barraganete.

4.1.2 Recomendaciones

- Se sugiere retirar el filtro de cada Biocoupler antes de que este sea autoclavado, para luego añadir un nuevo filtro o una gasa que sirva como filtro en su defecto. Esto es importante para el control de los patógenos que se puedan acumular en el filtro.

- Se recomienda el uso de un biocida desde la introducción o desde el primer pase del ensayo para la disminución de la proliferación de microorganismos en el medio de cultivo y, por tanto, evitar la contaminación.

Referencias

- Agbadje, E. T. A. E., Agbidinoukoun, A., Zandjanakou-Tachin, M., Cacaï, G. T. H., & Ahanhanzo, C. (2021). Mass Production of Bananas and Plantains (*Musa* spp.) Plantlets through in vitro Tissue Culture Partway: A Review. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 2(4), 1–8. <https://doi.org/10.24018/ejbio.2021.2.4.229>
- Álvarez Morales, E. L., León Córdova, S. A., Sánchez Bravo, M. L., & Cusme Macías, B. L. (2020). Evaluación socioeconómica de la producción de plátano en la zona norte de la Provincia de los Ríos. *Journal of Business and Entrepreneurial Studies*, 4–2(2576–0971), 86–95. <https://doi.org/10.37956/jbes.v4i2.781.1.1><http://journalbusinesses.com/index.php/revistael> SSN:2576-0971
- Banco Mundial. (2022). *Agricultura, valor agregado (% del PIB) - Ecuador*. <https://datos.bancomundial.org/indicador/NV.AGR.TOTL.ZS?locations=EC>
- Castillo, L., Moreno, A., & García, R. (2020). Efficiency of the Temporary Immersion System Versus the Conventional in Vitro Propagation Method. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2631–2662), 173–182. <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/284/315>
- Cedeño Zambrano, J. R., García Párraga, J. V., Solórzano Cobeña, C. M., Jiménez-Flores, L. A. J., Ulloa Cortazar, S. M., López-Mejía, F. X., Avellán Vásquez, L. E., Bracho Bravo, B. Y., & Sánchez Urdaneta, A. B. (2021). Fertilización con magnesio en plátano 'Barraganete' (*Musa* AAB) Ecuador. *La Granja*, 35(1), 8–19. <https://doi.org/10.17163/lgr.n35.2022.01>
- CEDRSSA. (2019). Reporte La producción y el comercio del plátano. In *Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria*. [http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/13La producción y el comercio de plátano.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/13La%20producci3n%20y%20el%20comercio%20de%20pl3tano.pdf)

- Chávez-García, J. A., Andrade-Rodríguez, M., Juárez-López, P., Villegas-Torres, O. G., Sotelo-Nava, H., & Perdomo-Roldán, F. (2019). EVALUACIÓN DE TRES SISTEMAS DE CULTIVO in vitro PARA LA MULTIPLICACIÓN DE MICROCORMOS DE GLADIOLO EVALUATION OF THREE in vitro CULTURE SYSTEMS FOR THE MULTIPLICATION OF GLADIOLUS MICROCORMS J . Antonio Chávez-García , María Andrade-Rodríguez *, Porfirio J. *Fitotecnica Mexicana*, 41, 551–554.
- Deberge, P., & Zimmerman, R. H. (1990). Micropropagation. In *Micropropagation: Technology and Application* (pp. 1–13). https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_1
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- FEN. (n.d.). *Plátano*. Plátano. <https://www.fen.org.es/MercadoAlimentosFEN/pdfs/platano.pdf>
- Fernández, F., Pico, J., & Avellán, B. (2021). *Guía para la producción y manejo integrado del cultivo de plátano* (Vol. 1). www.agricultura.gob.ec
- Gallego, P. P., Hameg, R., Arteta, T. A., Landin, M., & Barreal, M. E. (2020). Modeling and Optimizing Culture Medium Mineral Composition for in vitro Propagation of *Actinidia arguta*. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.554905>
- Hammer, O. (2020). *Software PAST* (4.03).
- INEC. (2022). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. In *ESPAC*.
- Ipiates, O., & Cuichán, M. (2023). *Boletín técnico: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*.
- Lugo, O., Arellano, G., & Hernández, D. (2017). Automatización de un sistema de inmersión temporal con base en plataformas abiertas de hardware y software. *Revista Terra Latinoamericana*, 35(3), 271–277. <https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v35n3/2395-8030-tl-35-03-00269.pdf>
- Microsoft. (2023). *Microsoft Excel* (No. 2308).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.

<https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>

Norouzi, O., Hesami, M., Pepe, M., Dutta, A., & Jones, A. M. P. (2022). In vitro plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-09066-3>

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. [https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-](https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5)

5

Plant Cell Technology Inc. (n.d.). *No Title*. New Biocoupler. Retrieved June 29, 2023, from

<https://www.plantcelltechnology.com/new-biocoupler/>

Rédei, G. P., & Evans, N. E. (2008). Chapter 10 Micropropagation. In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics* (Vol. 3, pp. 93–103).

Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J., & Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 57–66.

<https://doi.org/10.1007/s11240-004-6746-y>

Saad, A. I. M., & Elshahed, A. M. (2012). Plant Tissue Culture Media. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (Vol. 1, pp. 29–39). <https://doi.org/10.5772/52760>

Singh, A. (2023). *Plant Cell Technology*. How Can The Biocoupler™ Help Your Plant Business Grow? <https://www.plantcelltechnology.com/bloghow-can-the-biocoupler-help-your-plant-business-grow/>

Apéndice A

(Murashige & Skoog, 1962)

A. Mineral salts

Major elements			Minor elements		
Salts	mg/l.	mM	Salts	mg/l.	μ M
NH ₄ NO ₃	1650	N 41.2	H ₃ BO ₃	6.2	100
KNO ₃	1900	18.8	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	3.0	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6	30
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	1.5	KI	0.83	5.0
KH ₂ PO ₄	170	1.25	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	1.0
Na ₂ -EDTA	37.3 ¹	Na 0.20	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 ¹	Fe 0.10	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.1

¹ 5 ml/l of a stock solution containing 5.57 g FeSO₄ · 7H₂O and 7.45 g Na₂-EDTA per liter of H₂O.

B. Organic constituents

Sucrose	30 g/l.	Agar	10 g/l.
Edamin (optional)	1 g/l.	<i>myo</i> -Inositol	100 mg/l.
Glycine	2.0 mg/l.	Nicotinic acid	0.5 mg/l.
Indoleacetic acid ²	1-30 mg/l.	Pyridoxin · HCl	0.5 mg/l.
Kinetin ²	0.04-10 mg/l.	Thiamin · HCl	0.1 mg/l.

Apéndice B

Bitácora comparativa de la micropropagación del plátano barraganete

En la bitácora se registraba los datos más relevantes para saber si el método implementado funcionaba.

Fecha:					
No. de frasco	Sólido		Biocoupler		Observaciones
	No. explantes	No. brotes	No. explantes	No. brotes	
F1					
F2					
F3					
F4					
F5					