

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Optimización de los procesos de esterilización del medio de cultivo y el sellado de frascos para la producción masiva de vitroplantas en laboratorio.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

BIÓLOGA

Presentado por:

Lisette Delia Moreno Peña

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

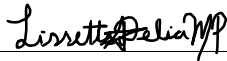
El presente proyecto lo dedico a todas las mujeres y niñas que desean ser parte del mundo de la investigación científica.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Dios y a mi familia que me han apoyado en cada paso de mi carrera. A mis profesores, especialmente a mi tutor por la dedicación y paciencia en transmitir su experiencia académica. A mis compañeros de diferentes carreras por su amistad y acompañamiento.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Lissette Delia Moreno Peña 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”



Lissette Moreno Peña

EVALUADORES

Diego Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

Eduardo Sánchez Timm

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La biofábrica de plantas meristemáticas SEBIOCA y el CIBE, un centro biotecnológico con un área de investigación enfocada en el cultivo de tejidos vegetales; tienen la necesidad de optimizar sus procesos de esterilización de medio de cultivo de tejidos y el método de sellado de sus frascos. El Vitrofurax es un biocida utilizado para la inhibición microbiana en medios de cultivo en la producción de vitroplantas. El uso del rolopack y papel aluminio para sellar los frascos involucra horas de trabajo forzoso por su procesamiento y el uso de herramientas de alto riesgo. La presentación comercial del plástico polifan evita el procesamiento con equipo de alto riesgo al tener las características ideales para su uso en laboratorio. Por ende, esta investigación tiene como fin optimizar el proceso de esterilización de medios de cultivo y sellado de frascos, mediante el uso de un inhibidor de contaminación microbiana y reemplazando el método convencional de sellado con el uso de polifan y ligas; para mejorar la producción masiva de vitroplantas en la biofábrica SEBIOCA y área de cultivo de tejidos en CIBE. Se realizaron cuatro ensayos: Uso de Vitrofurax (116 mg/L) en semillas de arroz y en banano; Uso del polifan con ligas como método de sellado en vitro plantas de banano y un ensayo tipo factorial para evaluar ambos factores. Los resultados indican que el uso del Vitrofurax es la mejor alternativa a la esterilización por autoclave y el uso del polifan con ligas presenta tasas de multiplicación tentativamente mejores a los métodos convencionales y bajos porcentajes de contaminación.

Palabras Clave: Cultivo *in vitro*, Vitrofurax, micropropagación, banano.

ABSTRACT

The plant tissue culture company SEBIOCA, and the biotechnology center CIBE with an investigation area in plant tissue culture; have the need to optimize their culture medium sterilization and sealing glass bottles processes. Vitrofur is a biocide used for microbial inhibition in culture media in the production of *in vitro* plants. The use of the stretch film and aluminum foil to seal glass bottles involves hours of forced labor due to its processing with highly dangerous tools. The commercial presentation of the polyfan plastic bag has the necessary characteristics for its use in the laboratory, avoiding the use of dangerous tools. Therefore, this research aims to optimize the process of sterilization of culture media and sealing of bottles, using a microbial contamination inhibitor, and replacing the conventional sealing method with the use of polyfan plastic bag and rubber bands; to improve the massive production of *in vitro* plants in SEBIOCA and tissue culture area in CIBE. Four types of trials were carried out: Use of Vitrofur (116mg/L) in culture medium of *in vitro* rice seeds and banana; Use of polyfan with rubber bands as a method of sealing glass bottles of banana *in vitro* plants and a factorial type test to evaluate both factors. The results indicate that the use of Vitrofur is the best alternative than using autoclave sterilization; and the use of polyfan plastic bag with rubber bands presents tentatively better multiplication rates than conventional methods and low percentages of contamination.

Keywords: in vitro culture, Vitrofur, micropropagation, banana.

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	9
1. Introducción.....	9
1.1 Objetivos.....	10
1.1.1 Objetivo General.....	10
1.1.2 Objetivos Específicos.....	10
1.2 Marco teórico.....	10
1.3 Cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	10
1.4 Medio de cultivo.....	12
1.5 Micropropagación <i>in vitro</i>	14
1.6 Vitrofurcal.....	14
1.7 Métodos convencionales de esterilización y sellado de frascos en biofábrica SEBIOCA.....	15
CAPÍTULO 2.....	16
2. Metodología.....	16
2.1 Ensayo con semillas de arroz en medio suplementado con Vitrofurcal.....	17
2.1.1 Desinfección e introducción de semillas a condiciones <i>in vitro</i>	17

2.2	Uso del polifan con ligas como método de sellado de frascos	18
2.3	Diseño experimental de tipo factorial.....	19
CAPÍTULO 3		22
3.	Resultados Y ANÁLISIS.....	22
3.1	Ensayo del uso de Vitrofurul en semillas de arroz.....	22
3.2	Ensayo del uso del Vitrofurul en banano	23
3.3	Uso del polifan con ligas como método de sellado de frascos	24
	Se evaluó el uso del plástico polifan como método de sellado de frascos en banano con la introducción a condiciones <i>in vitro</i> un total de sesenta plantas producidas y donadas por SEBIOCA para su procesamiento en CIBE de banano Cavendish de la variedad ‘Williams’ (AAA) registrando los siguientes datos según el diseño experimental:	24
3.4	Resultados del diseño experimental de tipo factorial	25
CAPÍTULO 4		28
4.	Conclusiones Y Recomendaciones	28
	Conclusiones	28
	Recomendaciones	28
BIBLIOGRAFÍA.....		30

ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indol acético
BA	N ⁶ Benciladenina
BAP	6-Bencilaminopurina
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
SEBIOCA	Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología de la Espol
MS	Murashige & Skoog
TDZ	Thidiazuron
2iP	N ⁶ (2-isopentil) adenina

SIMBOLOGÍA

ml	Mililitro
cm	Centímetro
pH	Potencial de Hidrógeno
m	Metro
mg/L	Miligramos por Litro
Cl	Cloro
°C	Grados Celcius

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Lista de componentes correspondientes a los micro y macronutrientes que las plantas necesitan para su desarrollo y crecimiento. Tomado de: Essential Nutrients for Plants. (2021, March 6). https://bio.libretexts.org/@go/page/13781	12
Tabla 2.1 Diseño Experimental Ensayo con Vitorfural	16
Tabla 2.2 Diseño experimental con semillas de arroz en medio con Vitrofural	18
Tabla 2.3 Diseño Experimental con método de sellado con polifan y ligas	19
Tabla 2.4 Diseño Experimental Factorial	20
Tabla 3.1 Resultados del ensayo sobre el uso de Vitrfural en de semillas de arroz.	22
Tabla 3.2 Resultados del uso de Vitrfoural en banano.	23
Tabla 3.3 Resultados del uso del polifan como método de sellado de frascos en banano.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Métodos de esterilización de medio de cultivo y sellado de frascos en biofábrica.....	15
Figura 2.1 Corte del cormo en invernadero.....	17
Figura 2.2 Desinfección con cloro al 2% durante 20 minutos.....	17
Figura 2.3 Establecimiento in vitro del domo meristemático.....	17
Figura 2.4 Ilustración del cálculo de tasa de multiplicación.....	20
Figura 3.1 Resultados del ensayo experimental factorial.....	25
Figura 3.2 Resultados del ANOVA multifactorial en R.....	26

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es parte de los principales productores de banano de Latinoamérica donde según registros de AEBE (2021), indican que de cada cien toneladas que se exportan, treinta y cuatro son de origen ecuatoriano. El avance biotecnológico ha permitido desarrollar nuevas técnicas en beneficio de la producción agrícola del país, en especial para el cultivo de banano. La biofábrica SEBIOCA (Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología), presta sus servicios para la investigación, desarrollo, conservación y propagación masiva de plantas élites utilizando técnicas biotecnológicas, así mismo el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), cuenta con un área de investigación enfocada en el cultivo de tejidos vegetales; ambas instituciones tienen como objetivo principal mejorar la productividad agrícola del país. Sin embargo, la biofábrica tiene la necesidad de optimizar el proceso convencional de sellado de frascos debido al desperdicio de material y horas de trabajo forsozo que demanda el uso de papel aluminio y rolopack. La problemática radica en que el procesamiento del rolopack lo realizan tres personas diferentes y para su uso semanal se requieren de aproximadamente seis horas distribuidas por cada trabajador, mediante el uso de herramientas de alto riesgo como pulidoras y cuchillos. En cuanto al papel aluminio, cada frasco contiene cuatro láminas de papel aluminio que no permiten el paso de luz. Por lo tanto, se busca reemplazar estos dos materiales por plástico transparente resistente al autoclavado (polifan) y ligas; con el objetivo de disminuir los costos de producción, evitar posibles accidentes laborales, y hacer más eficiente el proceso productivo; y de esta manera aumentar el rendimiento de las plántulas al permitir mayor paso de luz hacia las vitroplantas. Las variables a medir son la tasa de multiplicación y tasa de contaminación.

En laboratorios de producción de vitroplantas, existe un alta demanda del uso del autoclave para la esterilización del medio de cultivo, lo que representa un elevado costo de adquisición, mantenimiento, y representa un cuello de botella en el proceso de preparación de medios, lo que ralentiza la producción, es por esto que el uso del inhibidor de contaminación microbiana, Vitroful, sustituye el proceso de autoclavado, contribuyendo con un ahorro de energía y tiempo. Para comprobar la

eficacia del Vitrofurax se registra la tasa de contaminación y la tasa de multiplicación para verificar si existe afectación en el desarrollo normal del material vegetal.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Optimizar el proceso de esterilización de medios de cultivo y sellado de frascos, mediante el uso de un inhibidor de contaminación microbiana y reemplazar el método convencional de sellado con el uso de polifan y ligas; para mejorar la producción masiva de vitroplantas en la biofábrica SEBIOCA y área de cultivo de tejidos en CIBE.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la aplicación de un inhibidor de contaminación microbiana (Vitrofurax), para sustituir el proceso convencional de esterilización por autoclave.
2. Determinar la viabilidad del uso de plástico transparente en reemplazo del papel aluminio y roll pack como método de sellado para la disminución en costos de producción e incrementar tasa de multiplicación vegetal como resultado de un mayor paso de luz hacia la planta.
3. Determinar el método de sellado y esterilización más eficiente para la producción masiva de plantas en la biofábrica.

1.2 Marco teórico

1.3 Cultivo *in vitro* vegetal

La técnica de cultivo *in vitro* consiste en sembrar material vegetal ya sean células, tejidos u órganos en un medio nutritivo estéril bajo condiciones fisicoquímicas controladas (Street, 1977). La base teórica del cultivo *in vitro* nace con estudios realizados por Gottlieb Haberlandt, aislando células vegetales de plantas superiores en 1902. Sus primeros resultados no fueron favorables ya que trabajó con células diferenciadas y no contaba con un medio de cultivo óptimo, sin embargo, sugirió el uso de células embriogénicas; estableciendo así el concepto de totipotencia y la importancia del cultivo

in vitro en futuras investigaciones (Haberlandt, 1902). El principio de totipotencia vegetal se refiere a la capacidad de una célula de dirigir el desarrollo completo de una planta (Sinnott, 1950). Esta capacidad la poseen un grupo específico llamado células meristemáticas, que se encuentran en puntos de crecimiento de la planta. El desarrollo completo de la planta a partir de una célula se lo denomina organogénesis y hay dos tipos; indirecta y directa. La organogénesis indirecta ocurre con la formación de brotes como resultado de una etapa intermedia de formación de callos y la directa involucra la propagación a partir de explantes sin fases intermedias de callos (George y Debergh, 2008). Estos procesos se realizan artificialmente usando reguladores de crecimiento.

La técnica de cultivo *in vitro* es una de las herramientas de la agricultura moderna cuyo objetivo es optimizar los procesos de producción y las áreas principales de utilidad son: la multiplicación acelerada de variedades de interés, mejoramiento genético de cultivos, recuperación de clones libres de enfermedades y preservación de germoplasma; y finalmente la producción de medicamentos y productos naturales (Murashige, 1974).

Actualmente, la técnica de cultivo *in vitro* es parte de los avances en la fitonanotecnología, la cual consiste en utilizar nanomateriales que facilitan la entrega directa y controlada de nucleótidos, proteínas y moléculas fitoactivas cuyo fin es la regulación metabólica de la planta o mejoramiento genético (Scheringer, 2008). Los nanomateriales hasta ahora utilizados son los nanotubos de carbono (CNTs), nanopartículas de Sílice mesoporosa (MSNs), nanoestructuras de ADN y nanoestructuras hidróxidos dobles laminares, entre otros. Demirer et al. (2019), propone en su trabajo el uso de un nanotubo de pared simple, para la entrega eficiente de ADN plasmático en varias especies de plantas como la rúcula, algodón y trigo; con altos niveles de expresión sin la integración transgénica. Las ventajas de la fitonanotecnología es la disminución en la aplicación de productos fitosanitarios, la pérdida de nutrientes de los fertilizantes para finalmente incrementar el rendimiento mediante el manejo eficiente de los nutrientes (Wang et al, 2016).

1.4 Medio de cultivo

En cuanto al medio de cultivo, se establecen componentes importantes como lo son los micronutrientes y macronutrientes; vitaminas, carbohidratos, reguladores de crecimiento, hexitales y agente gelificante. Los macronutrientes son esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas, por lo tanto, se requieren en mayores cantidades. Estos componentes son necesarios para la síntesis de biomoléculas y la respiración celular; así mismo están involucrados en procesos metabólicos. Por otro lado, los micronutrientes se requieren en menores cantidades; la mayoría tiene funciones de regulación metabólica y balance iónico en procesos fotosintéticos (Essential Nutrients for Plants, 2021). En la Tabla 1 se detallan los elementos que componen la lista de macro y micronutrientes.

Tabla1. Lista de componentes correspondientes a los micro y macronutrientes que las plantas necesitan para su desarrollo y crecimiento. Tomado de: Essential Nutrients for Plants. (2021, March 6). <https://bio.libretexts.org/@go/page/13781>

Macronutrientes	Micronutrientes
Carbono (C)	Hierro (Fe)
Hidrógeno (H)	Manganeso (Mn)
Oxígeno (O)	Boro (B)
Nitrógeno (N)	Molibdeno (Mo)
Fósforo (P)	Cobre (Cu)
Potasio (K)	Zinc (Zn)
Magnesio (Mg)	Cloro (Cl)
Calcio (Ca)	Níquel (Ni)
Azufre (Z)	Cobalto (Co)
	Sodio (Na)
	Silicio (Si)

La formulación de sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), para el medio de cultivo es la comúnmente utilizada, y tuvo como propósito inicial asegurar que los nutrientes inorgánicos no limitaran el crecimiento celular del tabaco. Esta formulación se caracteriza por tener alto contenido de nitrato, potasio y amonio en comparación con

otras formulaciones, por ende, es la opción más utilizada en ensayos e investigaciones de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Smith y Gould, 1989).

1.1.2 Reguladores de crecimiento

Una hormona vegetal o fitohormona es aquella sustancia orgánica que en bajas concentraciones interviene en los patrones de crecimiento de la planta. Entre las principales fitohormonas están las auxinas que promueven la división, elongación y diferenciación celular; y producción de raíces. El ácido 3-indol acético (AIA) es la principal auxina de origen natural. Las citoquininas por otro lado tienen como función principal estimular el crecimiento de brotes axilares (Miller y Skoog, 1953; Miller 1961). Entre las citoquininas sintéticas mayormente empleadas en cultivo de tejidos vegetales son: 6-Bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), N⁶ Furfuriladenina (kinetina), N⁶ Benciladenina (BA) y N⁶ (2-isopentil) adenina (2-iP) (Perea Dallos et al, 2009). En cambio, las giberelinas son fitohormonas que promueven el crecimiento embrionario, la floración, estimula el crecimiento celular de acuerdo con las condiciones de luz y oscuridad e induce la germinación de semillas (Alcantara-Cortes et al, 2019).

1.1.3 Vitaminas

Las vitaminas actúan de forma catalítica en las reacciones enzimáticas, por lo que las más importantes son las de tipo B siendo la principal la tiamina (B1). Otras vitaminas como el ácido nicotínico (B3) y piridoxina (B6) son incluidas en el medio para potenciar la respuesta celular (White, 1963).

1.1.4 Carbohidratos

El material vegetal por lo general no es fotosintético, por esto se requiere de una fuente de carbono donde la sacarosa o glucosa es comúnmente usada en un 2-5% (m/v). Sin embargo, otras opciones son la fructuosa o el almidón. (Bhojwani y Dantu, 2013).

1.1.5 Hexitoles

El uso de myo-inositol en cultivo de tejidos se da por su relación con la biosíntesis de cyclitol, almacenamiento de compuestos polihídricos como reservas, germinación de semillas, transporte de azúcares, disponibilidad de minerales, estructura membranal, formación de pared celular, homeostasis hormonal y estrés fisiológico (Loewus y Loewus, 1983).

1.5 Micropropagación *in vitro*

Una de las técnicas de cultivo *in vitro* vegetal es la micropropagación, en donde se extrae una parte de la planta de interés para su multiplicación uniforme y tener como resultado plantas genéticamente idénticas llamadas clones (Castillo, 2004). Existen cuatro etapas de la micropropagación *in vitro*: Fase 0, Fase I, Fase II, Fase III y Fase IV (Israeli et al, 1995). La primera fase consiste en la elección del material vegetal, el cual debe estar libre de enfermedades y en perfectas condiciones morfofisiológicas. La segunda fase involucra el establecimiento del explante en el laboratorio donde se realiza un proceso de corte y desinfección con el fin de obtener una muestra manejable y lo más libre posible de contaminación, para su procesamiento y desinfección en el flujo laminar o condiciones asépticas para su introducción en el medio de cultivo. En la siguiente fase el medio de cultivo contiene alto porcentaje de fitohormonas para promover división celular y por ende su multiplicación. Como fase final está la aclimatación en invernadero donde la planta recibe condiciones óptimas que le permitan adaptarse a un ambiente menos controlado como lo fue *in vitro* y más cercano a su lugar de origen.

1.6 Vitrofurax

Se trata de un inhibidor de crecimiento microbiano utilizado en medios de cultivo *in vitro* para sustituir el proceso convencional de esterilización por autoclave. El componente farmacéutico presente en el Vitrofurax, que actúa como bactericida y fungicida de amplio espectro es el 1-(5-bromo-fur2-il)-2-bromo-2-nitroetano o comercialmente llamado Furvina. El mecanismo de acción de la furvina consiste en inhibir el sitio P del ribosoma 30S, por lo tanto, interfiere en la iniciación de la traducción; los primeros pasos de la síntesis proteica (Fabbretti et al, 2012). Sin embargo, otra investigación sobre su mecanismo de acción menciona que está basado en las modificaciones no específicas

de grupos funcionales tiol (-SH) concluyendo que el efecto final de la furvina es una suma de reacciones intermedias y los efectos de la conversión de productos (Allas et al, 2016). En estudios realizados en caña de azúcar y el uso de Vitrofurul como método de esterilización del medio de cultivo en BIT (Biorreactores de Inmersión Temporal), se presentaron valores significativamente mayores en cuanto a variables de respuesta como número de brotes por explante, longitud de los brotes (cm), número de hojas por brote, número de raíces, longitud de la raíz más larga (cm), masa fresca y seca de los brotes y las hojas. Además, no hubo síntomas de fitotoxicidad del Vitrofurul sobre los brotes por lo que concluyen que “la esterilización química con Vitrofurul de los medios de cultivo para la propagación in vitro de caña de azúcar var. C1051-73 en Biorreactores de Inmersión temporal favorece la calidad morfofisiológica de los brotes.” (Rivero et al, 2018, p.93).

Por otro lado, según el trabajo de Orlikowska et al. (2012), evaluando el efecto del Vitrofurul en bacterias aisladas de medios de cultivo contaminados y en microbrotes de plantas en diferentes medios; este biocida limita el crecimiento de *M. lusitanum* por veintiún días, *P. putida* por catorce días, *Paenibacillus spp.* Por siete días y *S. marcescens* por un día. Además, aclaran que su influencia depende de la concentración del Vitrofurul, el genotipo de la planta, tipo de material vegetal y el medio de cultivo utilizado.

1.7 Métodos convencionales de esterilización y sellado de frascos en biofábrica SEBIOCA.



Figura 1.1 Métodos de esterilización de medio de cultivo y sellado de frascos en biofábrica.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Introducción de material vegetal para ensayo con Vitrofurax

Se introdujeron setenta y dos plantas producidas en CIBE de banano Cavendish de la variedad 'Williams' (AAA) a condiciones *in vitro* en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con el siguiente diseño experimental:

Tabla 2.1 Diseño Experimental Ensayo con Vitrofurax

Medio	Plantas
Medio MS con Vitrofurax (116 mg/L)	36
Medio MS sin Vitrofurax	36
TOTAL	72

El protocolo de introducción consiste en las siguientes fases: selección del material, corte y desinfección y siembra en condiciones *in vitro*.

2.1.2 Protocolo de introducción de banano a condiciones *in vitro*

Se realizó un lavado con agua destilada (estéril) en invernadero para seguir con los primeros cortes. Se hizo el corte del cormo hasta obtener un tamaño aproximado de 3 cm de ancho por 3 cm de largo, para continuar con el proceso de desinfección en laboratorio como se observa en la Figura 2.1. El material vegetal se sumergió durante veinte minutos en una solución de cloro al 2% (Figura 2.2). Transcurrido el tiempo se realizaron de 3 a 5 enjuagues con agua destilada estéril dentro del flujo laminar en condiciones asépticas, para luego reducir el tamaño a 1 cm de ancho por 1 cm de largo. El domo meristemático se sembró en medio de cultivo MS con algunas modificaciones en su concentración de reguladores de crecimiento para su introducción *in vitro* (Figura 2.3). Cada día se contabilizaron los frascos contaminados para el cálculo del porcentaje de contaminación.



Figura 2.1 Corte del corno en invernadero.



Figura 2.2 Desinfección con cloro al 2% durante 20 minutos.

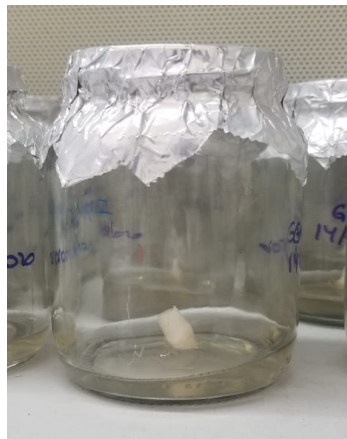


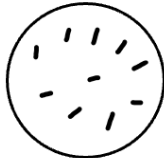
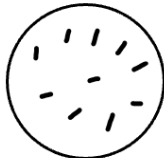
Figura 2.3 Establecimiento *in vitro* del domo meristemático.

2.1 Ensayo con semillas de arroz en medio suplementado con Vitrofurál

2.1.1 Desinfección e introducción de semillas a condiciones *in vitro*.

Para este ensayo se utilizaron las semillas maduras de arroz provenientes de la empresa Agripac, que no han pasado por piladora, por ende, contienen su embrión intacto y cáscara. El diseño experimental está estructurado de la siguiente manera:

Tabla 2.2 Diseño experimental con semillas de arroz en medio con Vitrofurul



Medio	Ilustración	Total
Medio MS con Vitrofurul (116 mg/L)	 <p>10 semillas en cada caja petri con 5 réplicas</p>	500 semillas en 50 cajas petri
Medio MS sin Vitrofurul	 <p>10 semillas en cada caja petri con 5 réplicas</p>	500 semillas en 50 cajas petri

Luego de una incubación de las semillas a 55 °C por toda la noche, se retiró la cascarilla de la semilla sin dañar el embrión, para luego continuar con el proceso de desinfección que consiste en sumergir y agitar en etanol (70%) durante dos minutos. Se retiró el etanol para luego proceder con la desinfección en cloro comercial al 50% en agitación durante 20-30 minutos. Finalmente se realizaron de 3 a 4 enjuagues con agua destilada estéril, para finalmente introducir en medio MS para inducción de callos (suplementado con 2,4 2mg/L Diclorofenoxiacético, 0,5 mg/L kinetina, 200 mg/L caseína hidrolizada, 3% maltosa, 8g/L Agar-Agar, pH 5,8) con Vitrofurul y sin Vitrofurul. Las cajas petri se envolvieron con papel aluminio para estar bajo oscuridad durante 7 a 10 días con una temperatura de 26°C. Luego de 7 días se registraron los datos de porcentaje de contaminación y germinación.

2.2 Uso del polifan con ligas como método de sellado de frascos

Se realizó la introducción de sesenta plantas producidas y donadas por SEBIOCA de banano Cavendish de la variedad 'Williams' (AAA) para ser procesadas a condiciones *in vitro* en las instalaciones de CIBE siguiendo el siguiente diseño experimental:

Tabla 2.3 Diseño Experimental con método de sellado con polifan y ligas.





Método de sellado	Ilustración	Total
Papel Aluminio y Rolopack		30 plantas
Plástico transparente (polifan) y ligas		30 plantas

Luego de su introducción a condiciones *in vitro* mediante el protocolo anteriormente mencionado al inicio de la metodología, permanecieron en el cuarto de crecimiento donde recibieron 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 26°. Cada día se registraron los frascos contaminados y al primer mes se realizó el corte en dos partes del domo meristemático para su siembra en medio MS con la adición de suplementos hormonales como BAP, AIA y kinetina como parte de la fase de multiplicación.

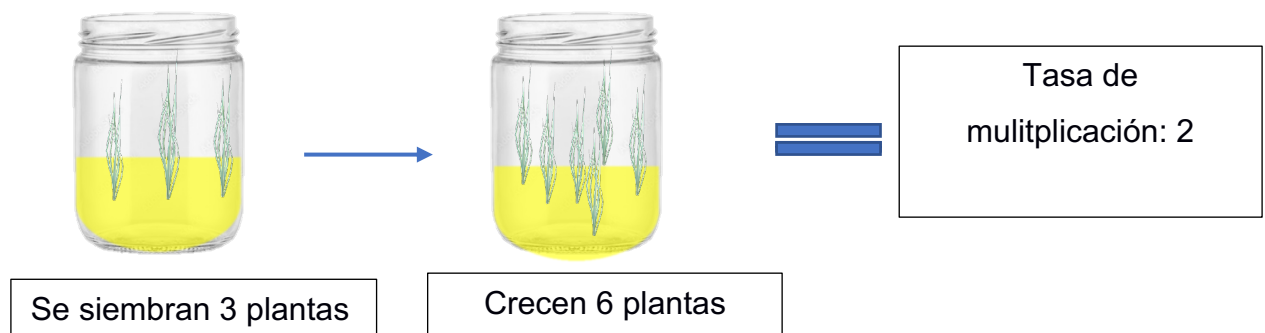
2.3 Diseño experimental de tipo factorial.

Para obtener registros de la tasa de multiplicación fue necesario que las plantas estén durante mínimo tres meses en condiciones *in vitro* luego de su introducción por lo que se vio la necesidad de realizar un diseño experimental factorial. El fin del diseño factorial es estudiar el efecto de los dos factores que en este caso son el método de esterilización y sellado de los frascos ante la tasa de multiplicación. Se sembraron doscientas plantas producidas en CIBE de banano Cavendish de la variedad 'Williams' (AAA) estando en condiciones *in vitro* con un mínimo de tres meses, siguiendo el siguiente diseño experimental:

Tabla 2.4 Diseño Experimental Factorial

Tratamiento	Cantidad	Ilustración
Polifan & Ligas + medio con Vitrofurul (116 mg/L)	10 frascos con 5 plantas banano Cavendish variedad Williams en cada uno.	
Polifan & Ligas + medio normal	10 frascos con 5 plantas banano Cavendish variedad Williams en cada uno.	
Papel aluminio & rolopack + medio con Vitrofurul (116 mg/L)	10 frascos con 5 plantas banano Cavendish variedad Williams en cada uno.	
Papel aluminio & rolopack + medio normal	10 frascos con 5 plantas banano Cavendish variedad Williams en cada uno.	

Las tasas de multiplicación se calcularon de la siguiente manera:



Fórmula para cálculo de tasa de multiplicación:

X0: Número inicial de plantas

X1: Número total de plantas final

Figura 2.4 Ilustración del cálculo de tasa de multiplicación.

Análisis estadístico de ANOVA multifactorial con el programa R commander (R versión 4.1.2 (2021-11-01)) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos del diseño experimental de tipo factorial.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Ensayo del uso de Vitrofurax en semillas de arroz.

Se evaluaron en total cien cajas petri con 10 semillas de arroz cada una, donde cincuenta fueron sembradas en medio con Vitrofurax (116 mg/L) y la otra mitad en medio normal; obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 3.1 Resultados del ensayo sobre el uso de Vitrofurax en de semillas de arroz.

Tratamiento	Semillas Germinadas/Total	Porcentaje de Germinación	Porcentaje de contaminación
MS con Vitrofurax Réplica 1	6/100	66,66%	0%
MS con Vitrofurax Réplica 2	95/100		
MS con Vitrofurax Réplica 3	95/100		
MS con Vitrofurax Réplica 4	89/100		
MS con Vitrofurax Réplica 5	48/100		
MS Réplica 1	96/100	94,80%	2%
MS Réplica 2	89/100		
MS Réplica 3	98/100		
MS Réplica 4	97/100		

MS Réplica 5	94/100		
-----------------	--------	--	--

Como se observa en la Tabla 3.1 el porcentaje de germinación de las semillas de arroz sembradas en medio con Vitrofurul se ve afectado en un 33,34%. Por otro lado, el porcentaje de germinación de las semillas de arroz en medio normal, es decir, sin Vitrofurul cuenta con un alto valor de 94,80%. Indicando que el uso del Vitrofurul en su concentración recomendada 116 mg/L, afecta drásticamente el porcentaje de germinación en semillas de arroz. Con respecto al porcentaje de contaminación, el uso del Vitrofurul efectivamente contribuyó a la esterilización del medio de cultivo teniendo un porcentaje nulo de contaminación. Por otro lado, el método convencional usado para autoclavar el medio de cultivo cuenta con un 2% de contaminación, el cual es admisible, por lo tanto, se comprueba la eficacia de ambos métodos al esterilizar el medio de cultivo. Estudios sobre el uso del Vitrofurul para esterilización del medio de cultivo se han realizado en la germinación *in vitro* de embriones somáticos de caña de azúcar comprobando su eficacia en eliminar contaminación, así mismo brindar protección química a los endoespermos sintéticos y reducir las concentraciones de agentes gelificantes en un 33% (Quiala et al, 2002)

3.2 Ensayo del uso del Vitrofurul en banano

Para el ensayo del uso del Vitrofurul para la esterilización del medio de cultivo en banano se introdujeron setenta y dos plantas producidas en CIBE de banano Cavendish de la variedad 'Williams' (AAA) a condiciones *in vitro* obteniendo los siguientes resultados sobre el porcentaje de contaminación:

Tabla 3.2 Resultados del uso de Vitrofurul en banano.

Tratamiento	Frascos contaminados	Porcentaje de contaminación
MS con Vitrofurul (concentración recomendada 116mg/L)	9 frascos de 36	25,00%

MS	8 frascos de 36	22,22%
----	--------------------	--------

Como se muestra en la Tabla 3.2 el porcentaje de contaminación entre los dos tratamientos solo se diferencian en 2,78%. El tiempo requerido para el uso del medio cultivo luego de la esterilización por autoclave es de alrededor de entre 3 a 7 días, por lo que representaría un notable retraso para la investigación y el proceso de producción. Además, el autoclave es un equipo de uso común en las diferentes áreas de CIBE por lo que su uso implica un gran costo en mantenimiento y en varias ocasiones; problemas de logística y producción si se llega a averiar. Ante esto el uso del Vitrofurul es una alternativa efectiva para la esterilización del medio de cultivo para evitar retrasos en producción y en resultados de las diferentes investigaciones en curso.

3.3 Uso del polifan con ligas como método de sellado de frascos

Se evaluó el uso del plástico polifan como método de sellado de frascos en banano con la introducción a condiciones *in vitro* un total de sesenta plantas producidas y donadas por SEBIOCA para su procesamiento en CIBE de banano Cavendish de la variedad 'Williams' (AAA) registrando los siguientes datos según el diseño experimental:

Tabla 3.3 Resultados del uso del polifan como método de sellado de frascos en banano.

Tratamiento	Primer Registro	Segundo Registro	Porcentaje de Contaminación	Porcentaje de sobrevivencia
Papel Aluminio y Rolopack	Contaminados: 5 de 30 Necrosados: 3 de 30	Contaminados: 2 de 25 Necrosados: 0	12,88%	90,00%
Plástico transparente (polifan) y ligas	Contaminados: 1 de 30 Necrosados: 1 de 30	Contaminados: 2 de 29 Necrosados: 0	3,33%	96,67%

Como se evidencia en la Tabla 3.3 el porcentaje de contaminación con menor valor se obtiene al usar el polifan como método de sellado de frascos con un 3,33%. Sin embargo,

el uso del papel aluminio junto al rolopack presentaron un porcentaje de contaminación del 12,88%. Con respecto a la sobrevivencia se obtuvo que los porcentajes solo se diferencian en un 6,67%. La tasa de multiplicación no se registró porque debe realizarse a partir del cuarto mes luego de su introducción a condiciones *in vitro*.

3.4 Resultados del diseño experimental de tipo factorial

Con el fin de evaluar el efecto de dos factores ante la tasa de multiplicación de plantas de banano: el método de esterilización y sellado de frascos, se realizó un diseño experimental de tipo factorial donde se obtuvieron las siguientes tasas de multiplicación:

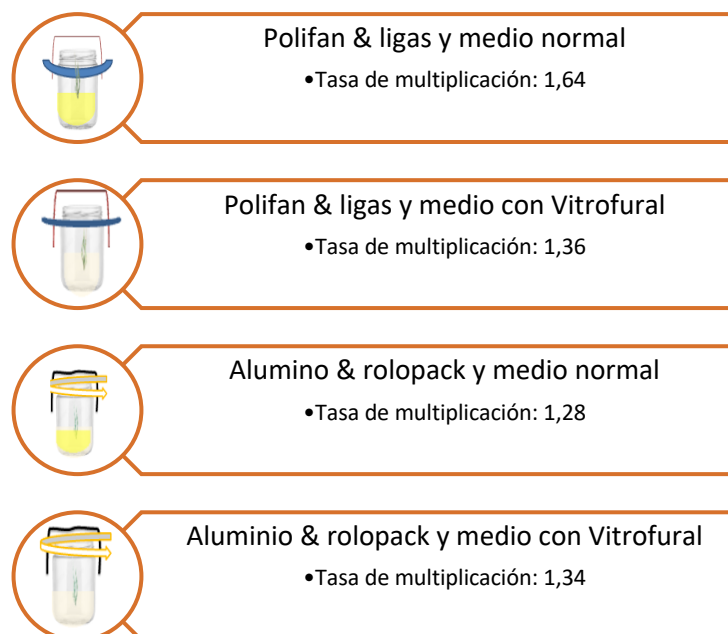


Figura3.1 Resultados Ensayo Experimental Factorial

Como se muestra en la Figura 3.1, las tasas de multiplicación presentan valores casi cercanos, sin embargo, el valor del tratamiento de sellado con polifan usando medio de cultivo normal se destaca con 1,64. Para comprobar estadísticamente la existencia de diferencias significativas entre tratamientos se realizó la prueba ANOVA multifactorial, obteniendo los siguientes resultados:

```

Rcmdr> Anova(AnovaModel.1)
Anova Table (Type II tests)

Response: Tasa.de.multiplicación
Sum Sq Df F value Pr(>F)
Tratamiento 0.771 3 1.6797 0.1886
Residuals 5.508 36

Rcmdr> Tapply(Tasa.de.multiplicación ~ Tratamiento, mean, na.action=na.omit,
Rcmdr+ data=facto) # means
T1 T2 T3 T4
1.64 1.36 1.28 1.34

Rcmdr> Tapply(Tasa.de.multiplicación ~ Tratamiento, sd, na.action=na.omit,
Rcmdr+ data=facto) # std. deviations
T1 T2 T3 T4
0.5641119 0.3238655 0.3155243 0.2988868

Rcmdr> xtabs(~ Tratamiento, data=facto) # counts
Tratamiento
T1 T2 T3 T4
10 10 10 10

```

Figura3.2 Resultados ANOVA multifactorial en R.

El resultado del análisis estadístico de la ANOVA factorial presenta el valor p , el cual nos indicará si se niega o acepta la hipótesis nula. Donde, hipótesis nula: Todos los tratamientos son iguales e Hipótesis Alternativa: Al menos un tratamiento es diferente. Con un nivel de significancia del 0,05; se evalúa el valor p . El valor p al ser mayor a 0,05 con un valor de 0,1886 se procede a afirmar la hipótesis nula, concluyendo que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias, por lo tanto, los tratamientos son iguales, debido probablemente a la alta variabilidad y a que las plantas se encontraban en un pase alto, esta información será contrastada con el experimento mostrado en la Tabla 2.3 . Sin embargo, el uso del polifan con ligas con medio normal tiene una tasa de multiplicación mayor lo que representaría un incremento económico en la producción. Por ejemplo, si se procesan cien mil plantas con la tasa de polifan con ligas en medio normal, se tienen \$28,800 dólares adicionales a lo obtenido mediante el

sellado convencional por cada cien mil plantas producidas; siendo la capacidad productiva de SEBIOCA un millón de plantas anuales cuyo costo por planta es de \$0,80. De acuerdo con estudios realizados en plantas intactas, la manipulación de las condiciones de luz procura ser potencialmente ventajoso en las diferentes etapas de la micropropagación (Lumsden et al, 2012). El plástico polifan permite un mayor paso de luz hacia la planta lo que posiblemente esté beneficiando el desarrollo fisiológico de las plantas de banano Cavendish variedad Williams.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. El Vitrofurial es un inhibidor de contaminación microbiana en medios de cultivo utilizados en la micropropagación masiva de plantas meristemáticas. El uso del Vitrofurial bajo la concentración recomendada de 116 mg/L en semillas de arroz, afecta en un 33,34% el porcentaje de germinación. No obstante, el Vitrofurial fue efectivo al esterlizar el medio de cultivo al no presentarse contaminación en ninguna placa. Por lo tanto, se concluye que se deben realizar ensayos con diferentes concentraciones de acuerdo con el material vegetal sujeto a investigación. En cuanto al uso del Vitrofurial en banano se tienen porcentajes de contaminación similares entre el método de esterilización por autoclave por lo que se concluye que su uso sería la mejor alternativa por el ahorro en tiempo y energía.
2. El uso del plástico polifan con ligas como método de sellado presentó valores bajos de contaminación con un 3,33% mientras que por el método convencional se registró un 12,88%. Es posible que esta diferencia en porcentajes de contaminación sea producto de la alta manipulación que se realiza con el método convencional al utilizarse el papel aluminio y la envoltura de rolopack que sufre un procesamiento en condiciones no estériles antes de uso.
3. El tratamiento con mejor tasa de multiplicación la obtuvo el uso del polifan con ligas usando la esterilización por autoclave con un valor de 1,64. Por ende, el uso del polifan con ligas reemplazaría el método convencional de sellado sin afectar la producción y además representa un beneficio económico.

Recomendaciones

Se recomiendan más estudios con respecto al uso del plástico polifan como método de sellado de frascos para confirmar efectivamente que la tasa de multiplicación en banano no se ve afectada o por otro lado, se incrementa.

Se recomienda realizar pruebas con diferentes concentraciones de Vitrofurafal dependiendo del material vegetal sujeto a investigación para evitar complicaciones con su desarrollo fisiológico o con el tipo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador. (2021). Unidos contra el Fusarium R4T. *Bananotas*, 147, 19-20. Recuperado el 11 de noviembre de 2021, de https://fb329f0a-8a6c42169e2fdcf8067bce4d.filesusr.com/ugd/f4cd67_65dcc93e9e914b4b967bfbdb9c6a4565.pdf?indextrue

Alcantara-Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Main hormonal regulators and their interactions in plant growth. *Nova*, 17(32), 109-129.

Allas, Ü., Toom, L., Selyutina, A., Mäeorg, U., Medina, R., Merits, A., ... & Tenson, T. (2016). Antibacterial activity of the nitrovinylfuran G1 (Furvina) and its conversion products. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.

Bedre, R., Mangu, V. R., Srivastava, S., Sanchez, L. E., & Baisakh, N. (2016). Transcriptome analysis of smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel), a monocot halophyte, reveals candidate genes involved in its adaptation to salinity. *BMC genomics*, 17(1), 1-18.

Bhojwani S.S., Dantu P.K. (2013) Zygotic Embryo Culture. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_11

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA, Uruguay*.

Demirer, G. S., Zhang, H., Goh, N. S., González-Grandío, E., & Landry, M. P. (2019). Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. *Nature protocols*, 14(10), 2954-2971. Y es una cita más actualizada.

Essential Nutrients for Plants. (2021, March 6). <https://bio.libretexts.org/@go/page/13781>

Fabbretti, A., Brandi, L., Petrelli, D., Pon, C. L., Castanedo, N. R., Medina, R., & Gualerzi, C. O. (2012). The antibiotic Furvina® targets the P-site of 30S ribosomal subunits and

inhibits translation initiation displaying start codon bias. *Nucleic acids research*, 40(20), 10366-10374.

Gautheret, R. J. (1939). Sur la possibilite´ de re´aliser la culture inde´finie des tissus de tubercules de carotte. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Se´ances de l’Acade´mie des Sciences*, 208, 118–120.

George EF, Debergh PC (2008) Micropropagation: Uses and Methods. En: George, EF, Hall M A, De Klerk GJ (Eds) *Plant propagation by tissue culture 3 rd Edition*, pp. 29-64. Springer. Dordrecht

George, E.F., M.A. Hall and G.J. De Klerk, 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edn., Springer, Dordrecht, Netherlands, Pages: 501

Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math. -Naturwiss. Kl., Abt.*, 1(111), 69–92.

Israeli, Y., Lahav, E., & Reuveni, O. (1995). In vitro culture of bananas. In *Bananas and plantains* (pp. 147-178). Springer, Dordrecht.

Joshi, R., Ramanarao, M. V., Lee, S., Kato, N., & Baisakh, N. (2014). Ectopic expression of ADP ribosylation factor 1 (SaARF1) from smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel) confers drought and salt tolerance in transgenic rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(1), 17-30.

Loewus, F. A., & Loewus, M. W. (1983). Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 34, 137–167.

Lumsden, P. J., Nicholas, J. R., & Davies, W. J. (Eds.). (2012). *Physiology, growth and development of plants in culture*. Springer Science & Business Media.

Miller, C. O. (1961). Kinetin and related compounds in plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 12, 395–408.

Miller, C. O., & Skoog, F. (1953). Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *American Journal of Botany*, 40, 768–773.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol* 25:135–166

Orlikowska, T., Zawadzka, M., Zenkteler, E., & Sobiczewski, P. (2012). Influence of the biocides PPMTM and Vitrofurax on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(3), 223-230.

Perea Dallos, M., González, T., Campos Mosos, H. A., Guillot Monroy, G., & Cogua Suárez, J. E. (2009). Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio.

Quiala, E., Jiménez, E., de Feria, M., Alvarado, Y., Chávez, M., Agramonte, D., ... & Capote, A. (2002). Empleo del Vitrofurax en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var Cuba 87-51. *Bioteología vegetal*, 2(4).

Rivero, A. M., Frómata, O. M., Daquinta, M., & Morgado, M. M. E. (2018). Efecto del Vitrofurax® en la calidad morfofisiológica de brotes de caña de azúcar var. C 1051-73 propagados en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal*, 18(2).

Scheringer, M. Environmental risks of nanomaterials. *Nature Nanotech* 3, 322–323 (2008). <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.145>

Smith, R. H., & Gould, J. H. (1989). Introductory essay. In J. Janick (Ed.), *Classic papers in horticultural science* (pp. 52–90). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press.

Street, H. E. (1977). Introduction. In H. E. Street (Ed.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 1–10). Oxford, UK: Blackwell.

Sinnott, E. W. (1950). Cell and psyche the Biology of purpose.

Thorpe, T. A. (1990). The current status of plant tissue culture. In S. S. Bhojwani (Ed.), *Plant tissue culture: Applications and limitations* (pp. 1–33). Amsterdam: Elsevier.

Thurston, K. C., Spencer, S. J., & Arditti, J. (1979). Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. *American Journal of Botany*, 66, 825–835.

Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in plant science*, 21(8), 699-712.

White, P. R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*, 26, 59–64.

White, P. R. (1963). *The cultivation of animal and plant cells* (2nd ed.). New York: Ronald Press.

Wilmar, J. C., & Doornbos, T. (1971). Stability of abscisic acid isomers to heat sterilization and light. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, & H. Veldstra (Eds.), *Effects of sterilization on components in nutrient media* (pp. 139–147). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific.

