

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**INNOVACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN COMERCIAL DE BANANO
(*Musa* AAA cv. Gran Enano) UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN
TEMPORAL**

ISABEL CRUZ VILLEGAS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe Isabel Cruz Villegas, Alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor(a) Dr. Jericó Jabín Bello Bello, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “INNOVACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN COMERCIAL DE BANANO (*Musa* AAA cv. Gran Enano) UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL”

Y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director (a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a 13 de julio de 2018.



Firma
Vo.Bo. del Profesor Consejero o Director de Tesis
Dr. Jericó Jabín Bello Bello

La presente tesis, titulada: **INNOVACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN COMERCIAL DE BANANO (*Musa* AAA cv. Gran Enano) UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**, realizada por el alumno: Isabel Cruz Villegas, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR INTERNO:



DR. VICTORINO MORALES RAMOS

ASESOR EXTERNO:



DR. JOSÉ HUMBERTO CAAMAL VELÁZQUEZ

ASESOR EXTERNO:



DR. JUÁN CARLOS GARCÍA RAMOS

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, 2018

INNOVACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN COMERCIAL DE BANANO (*Musa AAA cv. Gran Enano*) UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Isabel Cruz Villegas, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESÚMEN

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) son la mejor alternativa para micropropagación comercial de plantas. Sin embargo, aunque se han reportado éxitos con los SIT, se requiere validar el sistema más adecuado para la multiplicación de banano *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue comparar la eficiencia de diferentes SIT para micropropagación de banano (*Musa AAA cv. Gran Enano*), respecto a los sistemas convencionales (inmersión parcial y semisólido). Se utilizaron los sistemas biorreactores de inmersión temporal, biorreactor de inmersión por gravedad, MATIS y SETIS. Además, se evaluó el medio líquido con inmersión parcial y cultivo en medio semisólido. A los 28 días de cultivo, se evaluó el número y longitud del brote, el número de hojas por brotes, el contenido de clorofila, el índice estomático y el porcentaje de estomas cerrados. Además, el porcentaje de supervivencia y el desarrollo *ex vitro* de las plantas fueron evaluados durante la aclimatación. Los resultados mostraron que los SIT tienen una mayor tasa de multiplicación respecto a la inmersión parcial y el medio semisólido. El contenido de clorofila, el índice estomático y los estomas cerrados son afectados por los diferentes sistemas de cultivo. Los diferentes sistemas de cultivo no tienen efecto sobre el porcentaje de supervivencia; sin embargo, se observaron diferencias durante los parámetros morfológicos *ex vitro* en la aclimatación. En conclusión, en este estudio el biorreactor SETIS resultó el sistema de cultivo más eficiente para la micropropagación comercial de banano.

Palabras clave: inmersión temporal, clorofila, estomas, aclimatización.

INNOVATION IN THE COMMERCIAL MICROPROPAGATION OF BANANO (*Musa* AAA cv. Grand Naine) USING A TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

Isabel Cruz Villegas, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Temporary Immersion Systems (TIS) are the best alternative for commercial micropropagation. However, although successes have been reported with TIS, it is necessary to establish the most suitable system for *in vitro* banana multiplication. The aim of this research was to compare the efficiency of different TIS for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) micropropagation. The temporary immersion bioreactor, gravity immersion bioreactor, MATIS and SETIS bioreactor systems were used. In addition, liquid medium with partial immersion and semi-solid medium culture were evaluated. At 28 days of culture the number and length of shoots, number of leaves per shoot, chlorophyll content, stomatal index and percentage of closed stomata were recorded. Additionally, survival percentage and *ex vitro* development of the seedlings were evaluated during acclimatization. Results showed that TIS have a higher multiplication rate with respect to partial immersion and semi-solid medium. The chlorophyll contents, stomatal index and stomata functioning are affected by the different culture systems. The different culture systems had no effect on survival percentage; however, morphological differences were observed during acclimatization. The SETIS bioreactor was more efficient than the rest of the TIS, producing better development in the plants obtained *in vitro* and *ex vitro*, proving it to be a useful alternative for banana micropropagation.

Keywords: temporary immersion systems, chlorophyll, stomata, acclimatization.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis Estudios de Maestría.

A mi director de tesis, Dr. Jericó Jabín Bello Bello, por la oportunidad, el apoyo, la confianza y la paciencia que me brindo durante este tiempo.

A los doctores integrantes de mi Consejo Particular.

A mi familia por apoyarme cada día.

CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. HIPÓTESIS	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Innovación agroalimentaria.....	5
4.2 Biotecnología vegetal.....	5
4.3 Cultivo de tejidos vegetales	6
4.4 Micropropagación	6
4.5 Sistemas de inmersión temporal	7
4.6 Banano y su importancia agroalimentaria.....	8
4.7 Micropropagación de banano.....	9
4.8 Aspectos fisiológicos en plantas <i>in vitro</i>	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1 Ubicación del área de trabajo.....	11
5.2 Método experimental	11
5.3 Cultivo semisólido y parcial	13
5.4 Biorreactor SETIS.....	13
5.5 Biorreactor de inmersión temporal y biorreactor de inmersión por gravedad	13
5.6 Biorreactor MATIS	13
5.7 Selección de la planta madre.....	14
5.8 Establecimiento de la planta madre	14
5.9 Elaboración de medio de cultivo utilizado.....	14
5.10 Multiplicación de banano.....	15
5.11 Etapa de multiplicación en diferentes sistemas de cultivo.....	15
5.12 Evaluación de los sistemas de cultivo.....	18
5.13 Índice estomático y porcentaje de estomas cerrados.....	18
5.14 Contenido de clorofila.....	18
5.15 Evaluación del porcentaje de supervivencia en la etapa de aclimatización	19
5.16 Análisis estadístico.....	19

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1 Evaluación de los sistemas de cultivo.....	20
6.2 Contenido de clorofilas	22
6.3 Determinación de índice estomático y porcentaje de estomas cerrados	24
6.4 Porcentaje de supervivencia <i>ex vitro</i>	27
7. CONCLUSIONES	31
8. LITERATURA CITADA	32
9. ANEXOS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental.	12
Figura 2. Tiempos de programación para los diferentes sistemas de inmersión temporal.....	17
Figura 3. Efecto de sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en la multiplicación de brotes de banano	21
Figura 4. Efecto de los sistemas de cultivo <i>in vitro</i> sobre el contenido de clorofilas en banano.....	23
Figura 5. Efecto de los sistemas de cultivo <i>in vitro</i> sobre el contenido y funcionamiento estomático en banano	25
Figura 6. Efecto de los diferentes sistemas de cultivo en los estomas de hojas de banano	26
Figura 7. Efecto de los sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en los parámetros morfológicos de banano.....	29
Figura 8. Protocolo para la micropropagación de banano	30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de banano Gran Enano.....	8
Tabla 2. Medios de cultivo para el establecimiento y multiplicación de banano.	15
Tabla 3. Condiciones de los sistemas de cultivo.....	16
Table 4. Efecto de sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en la multiplicación de brotes de banano.	20
Tabla 5. Efecto de los sistemas de cultivo en parámetros morfológicos durante la aclimatización	28

1. INTRODUCCIÓN

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) son una de las principales herramientas del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) para la micropropagación a nivel comercial. El principio de la Inmersión Temporal (IT) consiste en sumergir las células, tejidos u órganos en medios líquidos durante periodos de tiempo utilizando biorreactores semiautomatizados. La inmersión es suficiente para que la planta absorba sus nutrientes, reguladores de crecimiento y otros componentes (Vervit, 2017). Este sistema mejora la oxigenación del explante, produciendo una menor incidencia de asfixia y aumenta la tasa de multiplicación (Etienne y Berthouly 2002; Georgiev *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2018). La inmersión temporal (TI) influye sobre procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración, el contenido de clorofila, el funcionamiento estomático y la nutrición de las plantas, favoreciendo el desarrollo durante el proceso de aclimatación (Watt 2012, Aragón *et al.*, 2014). El diseño de los SIT influye directamente en la fisiología y el desarrollo de las plantas *in vitro*. Actualmente existen diferentes modelos de SIT, como: Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®], Alvard *et al.*, 1993), Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT[®], Escalona *et al.*, 1999), Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG), conocido como Biorreactor de Flujo-Reflujo (Tisserat y Vandercook, 1985; Ducos *et al.*, 2007), Monobloc Advance Temporary Immersion System (MATIS[®] Etienne *et al.*, 2013) y biorreactor SETIS[™] (Vervit, 2017).

Los bananos Gran Enano gigante (banano cavendish) son populares en todo el mundo y desempeñan un papel importante en la alimentación humana (Fu *et al.*, 2017). Este banano representa más del 40% de la producción bananera mundial (Dale *et al.*, 2017). Los sistemas de cultivo *in vitro* que utilizan agentes gelificantes limitan la automatización del proceso de micropropagación. Por ello la inmersión en medio líquido permite la semiautomatización y aumenta la tasa de multiplicación y la calidad de plantas. La micropropagación de banano en TIS se reportó previamente en RITA (Alvard *et al.*, (1993), en TIB (Roels *et al.*, 2006; Aragón *et al.*, 2006; 2014) y en BIG (Wilken *et al.*, (2014). Sin embargo, no ha sido definido el sistema que se adapte mejor a la micropropagación comercial de este importante cultivo. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue aumentar la proliferación *in vitro* y la

calidad del brote del banano (*Musa* AAA cv. Grand Naine) utilizando el biorreactor SETIS como método alternativo para la micropropagación comercial de esta importante especie.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo para la micropropagación a escala comercial de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) que nos permita establecer un método innovador para la obtención de brotes de calidad.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar la tasa de multiplicación de banano en los diferentes sistemas de cultivo: semisólido, inmersión parcial e IT (BIT, BIG, MATIS y SETIS).
- Evaluar el efecto del sistema de cultivo sobre el contenido de clorofila, índice y funcionamiento estomático en los brotes *in vitro* de banano.
- Evaluar el porcentaje de supervivencia durante la aclimatización de las plantas de banano obtenidas en los diferentes sistemas de cultivo.

3. HIPÓTESIS

Los SIT aumentan la tasa de multiplicación y la calidad de brotes con respecto a los sistemas convencionales en medio semisólido, permitiendo la semiautomatización en el proceso de micropropagación, innovando en la producción a escala comercial de banano.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Innovación agroalimentaria

Gran parte de los desafíos del futuro están relacionados con la sostenibilidad agrícola y producción de alimentos. La innovación en la agricultura sostenible y agroalimentaria es crucial para la mejora de la competitividad futura del sector y la creación de puestos de trabajo en investigación y desarrollo en los sistemas de producción agrícola (Sarkar *et al.*, 2017). En la agricultura se busca innovar y mejorar la producción de los productos vegetales, por ello, los sistemas agroalimentarios deben mejorar procesos para elevar su producción, implementando estrategias más innovadoras y eficientes. Actualmente, se han desarrollado diversas técnicas para mejorar cultivos (incluyendo la modificación genética) o elevar la producción de estos permitiendo la rápida propagación clonal, la regeneración y la multiplicación de clones (Wilken *et al.*, 2014) mediante la biotecnología vegetal.

4.2 Biotecnología vegetal

La biotecnología es una ciencia multidisciplinar con muchas aplicaciones potenciales, se define comúnmente como el uso de organismos vivos, o los productos de estos, para el beneficio humano (o el beneficio de su entorno) con el fin de desarrollar un producto o resolver un problema (Thieman y Palladino, 2010). La biotecnología es considerada una ciencia moderna; sin embargo, ha sido utilizada a lo largo del tiempo en diversos procesos, desde la fermentación para elaborar una cerveza hasta el desarrollo de nuevas razas de animales y cultivares mejorados o modificados; actualmente está relacionada con actividades de diversas industrias, tales como la medicina, la farmacéutica, la horticultura y la agricultura la cual hace uso de la biotecnología vegetal (Moyo *et al.*, 2011). En este sentido, la biotecnología vegetal ha tenido gran impacto, pues gracias a ella se pueden conservar cultivos de interés mediante la criopreservación y renovar las poblaciones agrícolas utilizando plantas producidas clonalmente (Belokurova, 2010). Por ello, la biotecnología vegetal es una alternativa para solucionar los problemas que enfrenta el hombre ante el mejor aprovechamiento de las plantas de interés agrícola (Pérez-Molphe *et al.*, 1999), aplicando técnicas de CTV.

4.3 Cultivo de tejidos vegetales

Se conoce como CTV al conjunto de técnicas que permiten el desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, basándose en el principio de la totipotencia, estas técnicas se realizan bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Sharma y Vashistha, 2015), permitiéndonos producir plantas libres de microorganismos y enfermedades. El CTV hace uso de diversas técnicas, dentro de las cuales se encuentra la propagación *in vitro* también conocida como micropropagación.

4.4 Micropropagación

La micropropagación es una de las técnicas de CTV, la cual consiste en obtener grandes cantidades de plantas clones genéticamente idénticas, en poco tiempo a partir de un fragmento de la planta madre conocido como explante, sin que la disponibilidad del material vegetal dependa de la temporada. La micropropagación surge como una alternativa rápida y eficiente para la propagación masiva de clones de alta calidad genética y fitosanitaria (Watt, 2012; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Además, es posible obtener individuos libres de plagas y enfermedades y menos propensos a adquirirlas cuando llegan a campo, facilitando así los procesos de fitomejoramiento convencional y la producción de plantas que no producen semillas y no responden bien a la reproducción vegetativa (Kaviani, 2015). En la actualidad, la micropropagación constituye una de las aplicaciones más utilizadas en la biotecnología vegetal. Para hacer más eficiente este proceso se han investigado y propuesto utilizar medios de cultivo líquidos para superar las limitaciones de los protocolos que se basan en medios de cultivos semisólidos (Watt, 2012).

Sistemas de cultivo en Medio semisólido. Generalmente todas las etapas de la micropropagación se llevan a cabo en medio de cultivo convencional semisólido, sin embargo, esta técnica sigue siendo costosa cuando se realiza de manera convencional debido al empleo intensivo de mano de obra y al uso de agentes gelificantes necesarios en las diversas fases de cultivo (Ziv, 2005). Como una alternativa para la reducción de costos durante la micropropagación y a demás para reducir el tiempo de subcultivo de los explantes, se ha implementado el uso de medios de cultivo líquido (Farahani y Majd, 2012).

Sistemas de cultivo en medio líquido. Las ventajas del uso del medio de cultivo líquido incluyen un tiempo de subcultivo más corto para los explantes, en este sistema de cultivo los explantes simplemente se ponen en contacto con el medio líquido (Farahani y Majd, 2012). La ausencia de un agente gelificante puede aumentar la disponibilidad de agua y sustancias disueltas para el explante. El uso de medios líquidos es ideal para la reducción de los costos de producción y (Roels *et al.*, 2006). Una problemática que existe en este sistema de cultivo es que puede ocasionar problemas de asfixia e hiperhidricidad provocados por la inmersión permanente del explante en el medio líquido (Sreedharet *et al.*, 2009). Debido a los inconvenientes encontrados en los cultivos en medio líquido se han establecido protocolos para el uso de biorreactores, reportados por primera vez desde el año de por Takayama y Misawa (1981), quienes utilizaron medios líquidos en agitación. Además de estos biorreactores, han surgido los; SIT Como una alternativa en la micropropagación de plantas.

4.5 Sistemas de inmersión temporal

Los SIT son una de las principales y más actuales herramientas para la micropropagación. Estos sistemas son importantes para la producción de valiosos metabolitos secundarios y expresión de complejas proteínas y nos permiten la micropropagación de material vegetal a gran escala (Georgiev *et al.*, 2014).

En la actualidad se cuenta con diferentes modelos de SIT, tales como: RITA[®] (Alvard *et al.*, 1993), BIT[®] (Escalona *et al.*, 1999), BIG (Tisserat y Vandercook, 1985; Ducos *et al.*, 2007), MATIS[®] (Etienne *et al.*, 2013) y biorreactor SETIS[™] (Vervit, 2017).

Ventajas del uso de SIT. El uso de los SIT mejora la oxigenación del explante y en ellos ocurre una menor incidencia de asfixia incrementando las tasas de multiplicación (Georgiev *et al.*, 2014), de modo que se han propuesto como un sistema de micropropagación masiva para especies de importancia agrícola altamente demandadas a nivel *in vitro* por empresas exportadoras (Aragón *et al.*, 2014).

Los SIT han tenido éxito en diversos cultivos agroalimentarios tales como: el cultivo de *Ananas comosus* (Escalona *et al.*, 1999), *Coffea arabica* (Etienne *et al.*, 2013), *Vanilla planifolia* (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016); *Saccharum officinarum* (Martinez-Estrada *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2018) y *Musa AAA cv. Gran Enano* (Wilken *et al.*, 2014) el cual se encuentra entre las frutas más populares en todo el mundo.

4.6 Banano y su importancia agroalimentaria

El banano es una planta altamente demandada por las propiedades nutricionales que posee y desempeña un papel importante en la nutrición saludable de todas las personas (Fu *et al.*, 2017).

Impacto de banano en la agricultura. El banano, es un alimento básico fuente de carbohidratos para millones de personas. Su gran importancia económica lo convierte en uno de los cultivos de investigación con mayor prioridad en la agricultura.

Variedades sobresalientes. El banano Gran Enano gigante se encuentra dentro del grupo de los bananos Cavendish que se comercializan mundialmente, estos bananos representan más del 40% de la producción bananera mundial y domina por completo el mercado de exportación de banano, representando el 15% de la producción mundial. (Dale *et al.*, 2017).

Banano Gran Enano. El banano Gran Enano pertenece a la familia de las *musaceae* (Tabla 1). Es propagado comúnmente mediante cormos e hijuelos; sin embargo, esta propagación convencional resulta ser lenta y no garantiza la sanidad de las plantas. Se ve altamente atacado por enfermedades como la Sigatoka negra también llamada BLSD (por sus siglas en inglés: Black Leaf Streak Disease) causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. La Sigatoka negra ha sido grave en los últimos años (Ferreira *et al.*, 2004), ocasionando hasta el 50% de pérdidas de cultivos y la necesidad de control ambiental, fungicidas no deseados y costosos. Para garantizar la sanidad de las plantas de banano y obtener una mayor cantidad en menor tiempo se han implementado las técnicas de micropropagación.

Tabla 1. Taxonomía de banano Gran Enano.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Zingiberales
Familia:	Musaceae
Género:	<i>Musa</i>
Especie:	<i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano

4.7 Micropropagación de banano

La micropropagación de banano ha resultado eficaz al proporcionar plantas uniformes y de alta calidad libres de plagas y enfermedades. Debido a esto en gran mayoría de las plantaciones comerciales y en menor cantidad en producciones en pequeña escala se utilizan vitroplantas. El uso de la IT para la propagación de banano se ha implementado como una técnica mejorada y ha sido reportada por diferentes autores como: Alvard *et al.*, (1993) quienes utilizaron sistemas RITA; Roels *et al.*, (2006) reportaron la aplicación de sistemas BIT; Wilken *et al.* (2014) utilizo recipientes similares al BIG y BIT; finalmente Aragón *et al.*, (2014) también reportaron el uso de BIT. Estos procesos en comparación con los sistemas convencionales proporcionan un mayor número de plantas y confieren diferentes características fisiológicas.

4.8 Aspectos fisiológicos en plantas *in vitro*

Las plantas por su naturaleza están capacitadas para adaptarse al entorno donde se encuentren. El cultivo *in vitro* puede producir efectos tanto en la morfología como en la fisiología de las plantas por diversos factores a los que están expuestas. Autores como Jova *et al.*, (2011) afirman que durante el cultivo *in vitro* en SIT influyen en procesos fisiológicos como: contenido de clorofila y funcionamiento estomático.

Pigmentos fotosintéticos: Clorofilas. Existen diversos pigmentos fotosintéticos los cuales son los responsables de darle color a la planta. La clorofila es la responsable del color verde de las plantas, la molécula de la clorofila está constituida principalmente por magnesio, debido a esto si el contenido de magnesio es deficiente las hojas pueden ponerse amarillas o blancas (Taiz y Zeiger, 2002). Existen diversos factores que influyen sobre el desarrollo de la planta como: fotoperiodo, temperatura, humedad y fuente de luz, sin embargo, la fuente y calidad de la luz es uno de los factores más relevantes para el crecimiento y el contenido de clorofila de una célula vegetal (Bello-Bello *et al.*, 2014), la clorofila tiene un papel importante para la realización del proceso fotosintético junto con el contenido y funcionamiento de los estomas.

Complejo estomático. Las hojas y tallos de las plantas tienen poros microscópicos formados por un par de células de guardia, llamadas estomas. Estas células permiten el intercambio de gases, principalmente de vapor de agua y dióxido de carbono entre los tejidos internos de la

hoja y el aire circundante. A este sistema en conjunto se le conoce como complejo estomático (Chaerle *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos, la densidad estomática es mayor en la superficie abaxial de la hoja, lo que puede ayudar a prevenir la pérdida de agua través de la transpiración, debido a que la superficie abaxial está menos expuesta al calentamiento (Martin y Glover, 2007).

Abertura y cierre de estomas. La regulación de la apertura estomática es un proceso a corto plazo en respuesta a alteraciones provocadas por las condiciones ambientales (Büßis *et al.*, 2006). La función original de los estomas es la limitación de pérdida de agua en plantas terrestres y el balance hídrico, al tiempo que permite el intercambio de gases estrechamente regulado con la capacidad de abertura y cierre de los estomas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del área de trabajo

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de CTV perteneciente al Colegio de Posgraduados-Campus Córdoba, ubicado en el Km. 348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz, C.P. 94946. Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. Localizado geográficamente a 19° 27' latitud N y 98° 53' longitud O, a 720 msnm. El cual cuenta con la certificación fitosanitaria ante el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA-Certificado: 01-016-2/COLPOS/2018. Esta certificación acredita al laboratorio para la micropropagación de plántulas libres de plagas y enfermedades manteniendo las buenas prácticas de laboratorio y cuidados con el medio ambiente bajo normas de seguridad e higiene.

5.2 Método experimental

Para la realización de este trabajo de investigación se siguió una serie de etapas fundamentales para la obtención de resultados, descritas en la Figura 1.

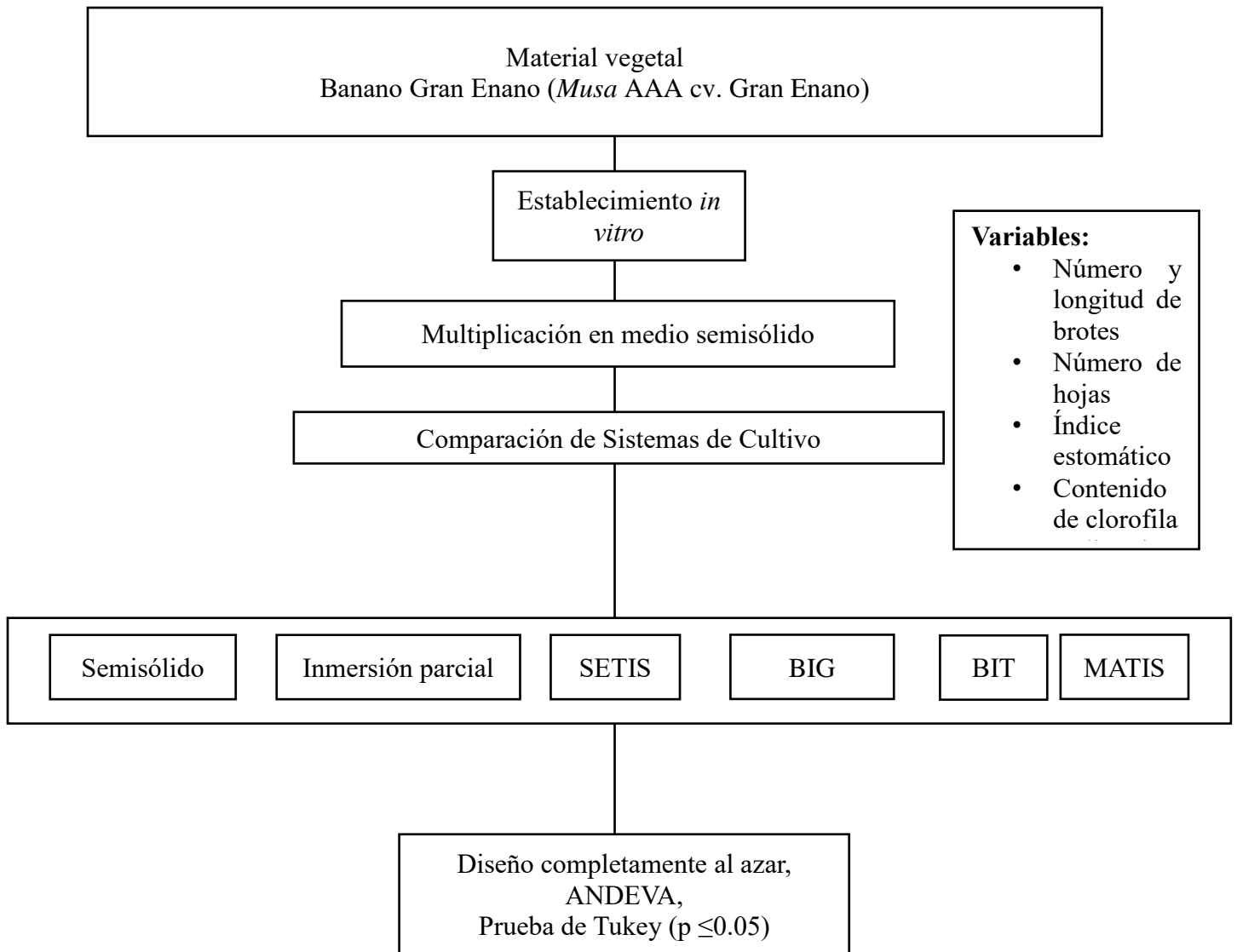


Figura 1. Estrategia experimental.

5.3 Cultivo semisólido y parcial

Para los sistemas de cultivo parcial y semisólido (sistema control), se utilizaron frascos de vidrio transparente tipo tarro con una capacidad de 1800 mL con tapas plásticas blancas de rosca,

5.4 Biorreactor SETIS

El biorreactor SETIS está construido por dos recipientes de policarbonato y dos tapas de rosca de polipropileno con dos empaques de silicón. En un recipiente se deposita el medio de cultivo y en otro recipiente el material vegetal, el recipiente donde se coloca el material vegetal tiene una capacidad de 5400 mL. Los recipientes son conectados uno al otro por una manguera de silicón (¼ in) de 20 cm. Se utilizaron dos mangueras de silicón (¼ in) de 4 cm para colocar un filtro de venteo de 0.2 µm en cada recipiente. Se ocuparon un total de tres biorreactores SETIS.

5.5 Biorreactor de inmersión temporal y biorreactor de inmersión por gravedad

Para la construcción de cada uno de estos sistemas se utilizaron dos frascos de vidrio transparente tipo tarro con una capacidad de 1800 mL, 2 tapas blancas de rosca, aproximadamente 80 cm de manguera de silicón de ¼ in, 2 empaques de caucho, 4 fittings de ¼ in, y 2 filtros de venteo de 0.2 µm. Adicionalmente, para el BIG se utilizó una esponja con un diámetro de 28 cm y un grosor de 2 cm. Para los BIT se realizaron dos perforaciones en cada tapa donde se colocaron fittings, en el extremo de un fitting se colocó una manguera de 30 cm para conectar ambos frascos por medio de la tapa, en el otro extremo se colocó una manguera de 20 cm en cada tapa, por donde sube el medio de cultivo dentro del frasco, en los dos fittings restantes se conectaron los filtros mediante una manguera de 4 cm. Para la construcción de los BIG el procedimiento fue similar, excepto que en el frasco que contiene la esponja se realizó una perforación, en el orificio se colocó un fitting y se conectó una manguera de 30 cm a otro frasco mediante la tapa. En total se construyeron tres BIT y tres BIG.

5.6 Biorreactor MATIS

Este sistema consta de un recipiente con un volumen total aproximado de 4000 mL, 2200 mL son destinados para el material vegetal y el resto para el medio de cultivo. El biorreactor MATIS está compuesto por partes transparentes de policarbonato, dos mangueras de silicón de ¼ in y dos filtros de venteo. Para su construcción se colocan los empaques y el tubo por donde fluye el medio que a su vez sirve como un gran tornillo que une al contenedor principal a la canasta y al tamiz. Incluye dos filtros de 0.2 µm unidos por 4 cm de manguera de silicón al recipiente principal para la entrada de aire y otro en la tapa para la salida de aire. En total se construyeron 3 biorreactores MATIS.

5.7 Selección de la planta madre

Se mantuvieron cinco hijuelos de banano de 50 a 60 cm de altura bajo condiciones de invernadero. Con el objetivo de mantener las plantas vigorosas y libres de plagas y enfermedades, se aplicó fertilizante (Gro-green® CAMPBELL Co. DE ROCHELLE, ILL. U.S.A) una vez por semana durante 30 días.

5.8 Establecimiento de la planta madre

A los 30 días de tratar a las plantas madres, estas se podaron de la raíz y se cortaron los pseudotallos a una altura de 15 cm aproximadamente, se lavaron con agua corriente y detergente en polvo. Posterior los ápices se introdujeron al laboratorio.

Una vez dentro del laboratorio se continuo con la desinfección superficial de las plantas madres:

1. Se lavaron nuevamente con agua y jabón; y se utilizó un cepillo de cerdas suaves hasta quitar los excesos de tierra.
2. Se enjuagaron y se colocaron en un recipiente con una disolución de hipoclorito de sodio al 0.6 %, durante 10 min.
3. Posteriormente se enjuago una vez más con agua destilada y se metieron a campana de flujo laminar.

Dentro de la campana de flujo laminar, los pseudotallos se flamearon con alcohol al 70%, posteriormente se cortaron a una altura de 2 cm aproximadamente y se les retiro las hojas hasta dejar descubierto el ápice con diámetro de 1 cm. Inmediatamente después los ápices fueron sumergidos en hipoclorito de sodio a 0.3 y 0.18% (v/v) durante 5 y 3 min, respectivamente, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Luego se sumergieron en 40 mg/L de cisteína durante 3 min. Finalmente, los explantes se colocaron individualmente en un frasco de cristal de 100 mL el cual contenía 20 mL de medio semi-sólido MS (Murashige y Skoog, 1962). Los ápices se incubaron a 24 ± 1 °C y se mantuvieron bajo luz fluorescente ($45 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) con fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad.

5.9 Elaboración de medio de cultivo utilizado

Para el establecimiento y multiplicación de banano se utilizó el medio Murashige y skoog (MS) previamente preparado en soluciones stock con una concentración de 100X, suplementado con sacarasa (azúcar comercial blanca refinada), Bencilaminopurina (Sigma-Aldrich Chemical

Company, MO, USA) como regulador de crecimiento y azul de metileno. El pH de los medios utilizados fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N e hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, se adiciono Phytigel® (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA) como agente gelificante únicamente a los medios semisólidos (Tabla 1). Una vez finalizada la preparación del medio, estos se esterilizaron a 120 °C por 20 min en autoclave (FE-299 Felisa®, MEX).

Tabla 2. Medios de cultivo para el establecimiento y multiplicación de banano Gran Enano.

	Establecimiento semisólido	Multiplicación semisólido	Multiplicación líquido
Medio MS	10 mL L ⁻¹	10 mL L ⁻¹	10 mL L ⁻¹
Sacarosa	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
Bencilaminopurina	0.2 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹
Azul de metileno	1 mL L ⁻¹	1 mL L ⁻¹	1 mL L ⁻¹
Phytigel	2.5 g L ⁻¹	2.5 g L ⁻¹	0
pH	5.8	5.8	5.8

5.10 Multiplicación de banano

Transcurridos 15 días de cultivo los ápices se desarrollaron formando un explante. El explante se cortó a la altura de la unión de las hojas entre 2 a 3 cm aproximadamente para romper dominancia apical y favorecer la multiplicación de los brotes. El cultivo se llevó a cabo en frascos de 500 mL que contenían 30 mL de medio de cultivo semisólido, colocando un explante por matraz para el primer subcultivo. Para subcultivos posteriores, se usaron tres explantes, realizando un total de cuatro subcultivos de 20 días cada uno. Los brotes regenerados de estos subcultivos se usaron para la evaluación de diferentes sistemas de cultivo. Los explantes obtenidos se colocaron previamente en medio de multiplicación sin agente gelificante para habituarlos al medio líquido.

5.11 Etapa de multiplicación en diferentes sistemas de cultivo

Después de permanecer cinco días los explantes en medio líquido fueron transferidos a los diferentes sistemas de cultivo: en medio semisólido (como control), medio líquido en inmersión parcial y cuatro diferentes SIT: BIT, BIG, Biorreactor SETIS y MATIS. Se realizaron tres repeticiones por cada sistema.

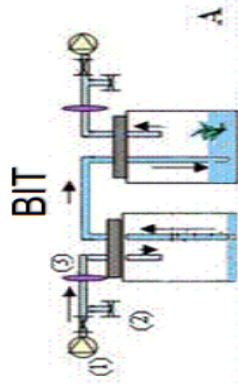
El volumen de medio total en el sistema semisólido y líquido de inmersión parcial fue de 100 y 50 mL, respectivamente. En los SIT se agregaron 50 mL de MS por explante, el mismo volumen que

Wilken *et al.*, (2014) utilizaron. El número de explantes en todos los sistemas fue de acuerdo con el espacio útil para material vegetal, proporcionándoles 200 mL a cada explante. De modo que el espacio de cabeza (espacio atmosférico) para cada explante fue el mismo volumen en todos los sistemas de cultivo, tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de los sistemas de cultivo: número de explantes, espacio de cabeza y volumen de medio líquido para cada sistema de cultivo.

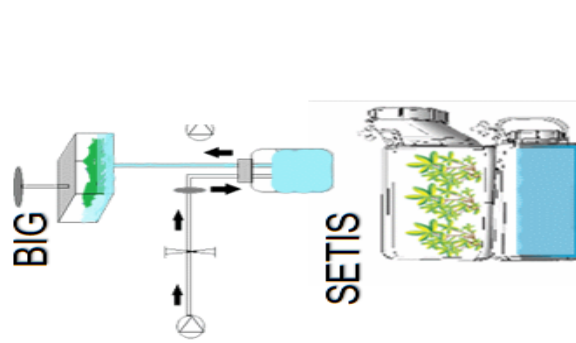
Sistema de cultivo	Espacio de cabeza	No. de explantes utilizados	Volumen total de medio líquido
Semisólido	1800 mL	9	100 mL
Inmersión Parcial	1800 mL	9	50 mL
SIT			
SETIS	5400 mL	27	1350 mL
BIG	1800 mL	9	450 mL
BIT	1800 mL	9	450 mL
MATIS	2200 mL	11	550 mL

Para el funcionamiento de los SIT se utilizó un Controlador Lógico Programable llamado PLC (por sus siglas en inglés: Programmable Logic Controller) capaz de semiautomatizar el proceso. Este sistema fue programado para alimentar a los biorreactores con una presión positiva originaria de una compresora, la cual envía una presión de 1.8 kgcm^{-2} a los biorreactores a través de líneas de tubos conectados directamente a los filtros de entrada de aire, donde el aire es esterilizado al pasar por ellos. Los tiempos y frecuencia de inmersión fueron programados para los diferentes biorreactores de modo que todos los explantes tuvieran el mismo tiempo de contacto con el medio de cultivo tal como se muestra en la Figura 2.



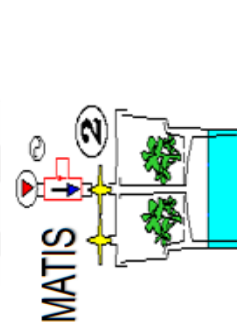
Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 08 00 00 am pm	Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 12 00 00 am pm	Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 08 00 00 am pm	Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 12 00 00 am pm	Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 04 00 00 am pm	Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 12 00 00 am pm	Llenado Q1 Hr Min Seg am pm 04 00 00 am pm
Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 08 04 00 am pm	Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 12 04 00 am pm	Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 08 04 00 am pm	Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 12 04 00 am pm	Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 04 04 00 am pm	Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 12 04 00 am pm	Vaciado Q1 Hr Min Seg am pm 04 04 00 am pm

Activación de válvulas 60



Activación Q2 Hr Min Seg am pm 08 10 00 am pm	Activación Q2 Hr Min Seg am pm 12 10 00 am pm	Activación Q2 Hr Min Seg am pm 08 10 00 am pm	Activación Q2 Hr Min Seg am pm 12 10 00 am pm	Activación Q2 Hr Min Seg am pm 04 10 00 am pm	Activación Q2 Hr Min Seg am pm 12 10 00 am pm	Activación Q2 Hr Min Seg am pm 04 10 00 am pm
--	--	--	--	--	--	--

Tiempo activación 240



Activación Q3 Hr Min Seg am pm 08 20 00 am pm	Activación Q3 Hr Min Seg am pm 12 20 00 am pm	Activación Q3 Hr Min Seg am pm 08 20 00 am pm	Activación Q3 Hr Min Seg am pm 12 20 00 am pm	Activación Q3 Hr Min Seg am pm 04 20 00 am pm	Activación Q3 Hr Min Seg am pm 12 20 00 am pm	Activación Q3 Hr Min Seg am pm 04 20 00 am pm
--	--	--	--	--	--	--

Tiempo activación 120

Activación Q4 Hr Min Seg am pm 08 30 00 am pm	Activación Q4 Hr Min Seg am pm 12 30 00 am pm	Activación Q4 Hr Min Seg am pm 08 30 00 am pm	Activación Q4 Hr Min Seg am pm 12 30 00 am pm	Activación Q4 Hr Min Seg am pm 04 30 00 am pm	Activación Q4 Hr Min Seg am pm 12 30 00 am pm	Activación Q4 Hr Min Seg am pm 04 30 00 am pm
--	--	--	--	--	--	--

Tiempo activación 120

Figura 2. Tiempos de programación para los diferentes sistemas de inmersión temporal.

5.12 Evaluación de los sistemas de cultivo

Para cumplir con nuestros objetivos, después de 28 días de cultivo se evaluaron las número y longitud de brotes, número de hojas, índice estomático, porcentajes de estomas cerrados y contenido de clorofila en todos los sistemas.

Número y longitud de brotes. Para la variable número de brotes por explante, los brotes de 30 explantes se tomaron al azar de cada sistema de cultivo con tres repeticiones y se midió la longitud de cada uno de estos brotes. La longitud de los brotes se midió colocando los brotes sobre un papel estéril junto a una regla milimétrica de papel.

Número de hojas. Se contabilizaron las hojas desarrolladas que contenía cada brote evaluado.

5.13 Índice estomático y porcentaje de estomas cerrados

Fueron observados estomas de hojas intermedias de diferentes brotes, tomando 10 muestras de la parte central abaxial de la hoja en cada sistema de cultivo, colocando una fina capa de esmalte transparente (Xu y Zhou, 2008), la cual se retiró 3 min después. Este procedimiento se realizó inmediatamente después de haber sido destapados los sistemas de cultivo. Una vez obtenida la muestra se observó en un microscopio óptico (Axio Lab.A1, ZEISS) utilizando los objetivos 10X y 40X. Se contabilizo el número de estomas abiertos y cerrados, número de células epidérmicas y posteriormente se determinó el índice estomático. El índice estomático se calculó utilizando la formula sugerida por Wilkinson, (1979): $IE = (NE)/(CE+NE) * 100$

Donde:

NE: número de estomas

CE: número de células epidérmicas

5.14 Contenido de clorofila

El contenido de clorofila se estimó según el método de Harborne (1973). Se homogeneizaron 0.2 g de hojas frescas de cada tratamiento en un mortero. El homogeneizado se transfirió a un tubo de ensayo de 25 mL, se aforo a 2,5 mL usando una mezcla 1:1 (v/v) de 80% de acetona y agua destilada. Se guardo por 24 h a una temperatura de -4 °C. Posteriormente se aforo a 6.25 mL con 80% de acetona. La absorbancia se midió a 663 nm (clorofila a), 645 nm (clorofila b) en un espectrofotómetro. Las clorofilas se determinaron con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a (C)} = \frac{[(12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645})] (V)}{(1000 * P)}$$

$$\text{Clorofila b (C)} = \frac{[(22.9 * A_{645}) - (4.70 * A_{663})] (V)}{(1000 * P)}$$

$$\text{Clorofila total (C)} = \text{Clorofila a} + \text{Clorofila b}$$

Donde: A = Absorbancia, los subíndices indican la longitud de onda (645 y 663 nm).

C = Concentración (mg g⁻¹ PF (peso fresco)).

V = Volumen de aforado (mL⁻¹).

P = Peso de muestra (g).

1000 = factor de conversión.

5.15 Evaluación del porcentaje de supervivencia en la etapa de aclimatización

Los brotes obtenidos en los diferentes sistemas se sacaron del área de incubación sin pasar por la etapa de enraizamiento. Se desenroscaron las tapas de los recipientes dos días previos a salir del laboratorio con el fin de romper con la atmosfera controlada y para que las plantas pasaran por un proceso de endurecimiento antes de ser transferidas a charolas con sustrato musgos de turbera esterilizado. Transcurrido dos días los bananos se sacaron de los recipientes y se sumergieron en agua corriente hasta eliminar el tejido necrosado. Se colocaron en agua corriente con 1 g de fertilizante foliar (Gro-green® CAMPBELL Co. DE ROCHELLE, ILL. U.S.A) durante 30 min antes de sembrarlos en charolas de plástico negro con 38 cavidades. Se evaluaron tres bloques con 38 plantas de cada sistema de cultivo. Después de 45 días, se evaluaron la longitud de la planta, el número de hojas, el número y la longitud (≥ 1 cm) de las raíces.

5.16 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Todo el experimento se realizó por triplicado. Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS 22 (para Windows). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias de acuerdo con Tukey ($p \leq 0.05$), cuando fue requerido. La transformación de Arcoseno se realizó para los datos experimentales tomados en porcentajes antes de someterlos al análisis estadístico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de los sistemas de cultivo

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo para las variables evaluadas (Tabla 4). El mayor número de brotes se obtuvo en SETIS, con 7.30 ± 0.42 , brotes por explante, seguido de los biorreactores BIT, MATIS y BIG, 5.00 ± 0.31 , 4.70 ± 0.42 , 5.00 ± 0.31 brotes por explante, respectivamente. Mientras que, la menor producción de brotes se obtuvo en los sistemas de cultivo en medio semisólido y líquido en inmersión parcial, con 2.86 ± 0.25 y 2.60 ± 0.22 brotes por explante, respectivamente. Respecto a la longitud del brote, la mayor altura se observó en el sistema semisólido (3.83 ± 0.19 cm) y SETIS (3.80 ± 0.14 cm), sin presentar diferencias significativas con los sistemas BIT y medio líquido. Los BIG y MATIS mostraron las menores longitudes de brotes con 2.82 ± 0.08 y 2.74 ± 0.10 cm, respectivamente.

Table 4. Efecto de sistemas de cultivo *in vitro* en la multiplicación de brotes de banano (*Musa AAA* cv. Gran Enano).

Sistemas de cultivo	No. De brotes/explantes	Longitud de brotes (cm)	No. De hojas/brote
Semisólido	2.86 ± 0.25^c	3.83 ± 0.19^a	2.38 ± 0.08^b
Inmersión parcial	2.60 ± 0.22^c	3.42 ± 0.20^{ab}	2.18 ± 0.08^b
SIT:			
SETIS	7.30 ± 0.42^a	3.80 ± 0.14^a	3.12 ± 0.11^a
BIG	4.60 ± 0.28^b	2.82 ± 0.08^b	3.08 ± 0.09^a
BIT	5.00 ± 0.31^b	3.29 ± 0.21^{ab}	3.10 ± 0.10^a
MATIS	4.70 ± 0.42^b	2.74 ± 0.10^b	3.59 ± 0.15^a

* Los valores representan la media \pm EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$), a los 28 días de cultivo *in vitro*.

Para el número de hojas, los SIT presentaron el mayor número de hojas por explante, mientras que los sistemas de cultivo en medio semisólido y líquido en inmersión parcial fueron los brotes que tuvieron la menor cantidad de hojas por explante (Figura 3).

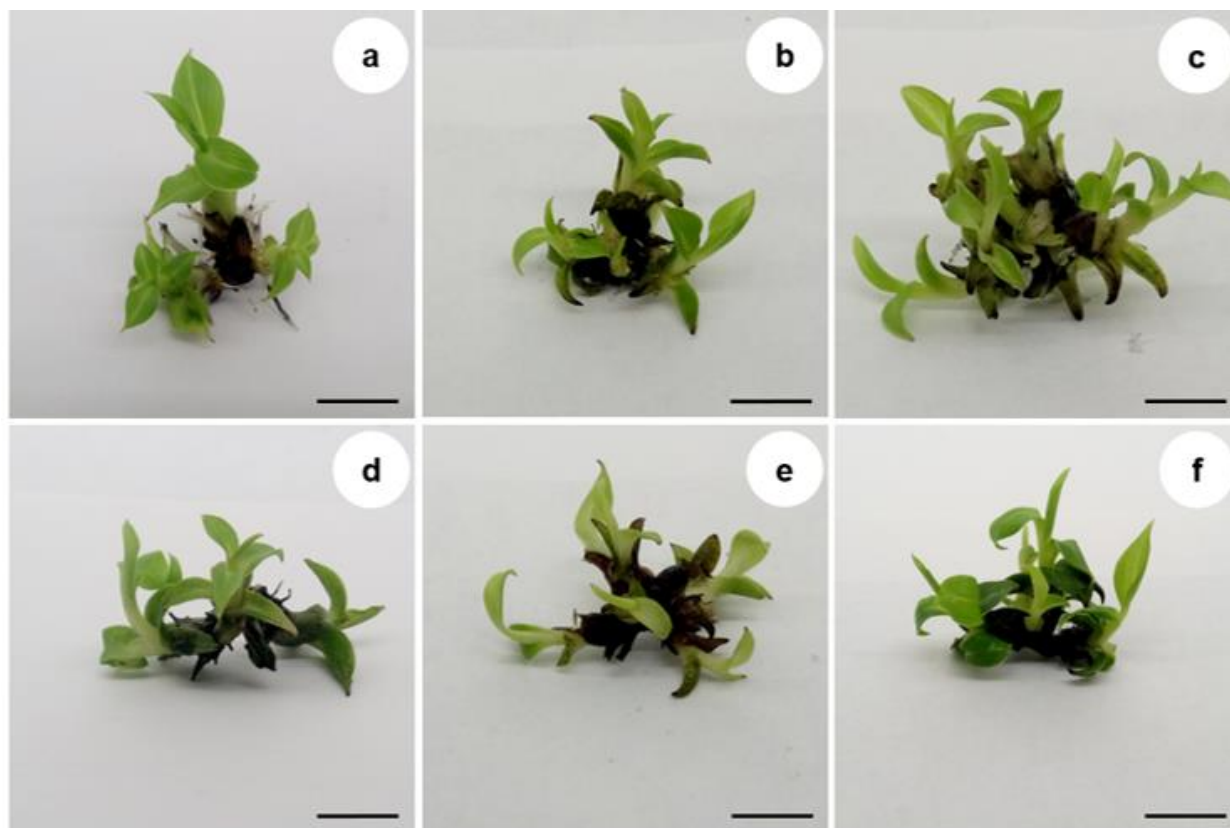


Figura 3. Efecto de sistemas de cultivo *in vitro* en la multiplicación de brotes de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) a los 28 días de cultivo. a) Semisólido, b) Inmersión parcial, c) SETIS, d) biorreactor de inmersión por gravedad, e) Biorreactor de inmersión temporal y f) MATIS. Bar = 1 cm.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la eficiencia de la IT en la proliferación de brotes de banano en comparación con el sistema de cultivo en medio semisólido y líquido en inmersión parcial.

La utilización de SIT para la micropropagación de banano ha sido reportada por Alvard *et al.*, (1993) quienes compararon el sistema RITA con medio semisólido y medio líquido en agitación e inmersión permanente, para la micropropagación de banano cv. Gran Enano obteniendo la mayor tasa de multiplicación en RITA con 5.2 brotes por explante en, años después Roels *et al.*, (2006) lograron aumentar el número de brotes de banano cv. CEMSA 3/4 (AAB) en BIT, incrementando la tasa de multiplicación a 6.4 brotes por explantes. Aragón *et al.*, (2014) nuevamente mostraron los efectos positivos de BIT en cv. CEMSA 3/4 (AAB) y recientemente Wilken *et al.*, (2014) trabajó con SIT con una capacidad de 5000 mL, aumentando el número de brotes a 7 por explante en cv. Gran Enano.

En nuestro estudio, SETIS alcanzó una tasa de multiplicación alta, incluso superior a los resultados reportados por Roels *et al.*, (2006) y Wilken *et al.*, (2014) quienes trabajaron con los sistemas BIT y banana CEMSA $\frac{3}{4}$ (AAB) y SIT comercial de 5000 mL con banana cv Gran Enano, respectivamente. Sin embargo, Wilken *et al.*, (2014) reportó brotes obtenidos comparando únicamente dos SIT, en cambio en nuestra investigación se compararon cuatro SIT y sistema de medio semisólido y e inmersión parcial. Aun cuando en el sistema de cultivo en medio semisólido y líquido en inmersión parcial se reportó la menor formación de nuevos brotes, estos alcanzaron una altura mayor a los 3 cm. Este hecho puede explicarse debido a que al obtenerse una menor cantidad de brotes por explante existe una menor competencia, por lo tanto, mayor disponibilidad de espacio, agua, luz y nutrientes. El número de hojas fue igual en todos los SIT, teniendo una mayor pigmentación en los biorreactores SETIS y MATIS, ocasionada por un mayor contenido de clorofila en estos sistemas.

6.2 Contenido de clorofilas

Al evaluar el contenido de clorofilas en brotes obtenidos en los diferentes sistemas de cultivo se encontró una disminución en la concentración de clorofila a en los sistemas BIT y BIG con 0.08 y 0.11 mg g⁻¹ PF, respectivamente. Mientras que, el resto de los sistemas presentaron los valores más altos de clorofila a. Para clorofila b, MATIS presentó la mayor cantidad, con 0.21 mg g⁻¹ PF, mientras que el BIG presentó la menor cantidad, con 0.13 mg g⁻¹ PF (Figura 4).

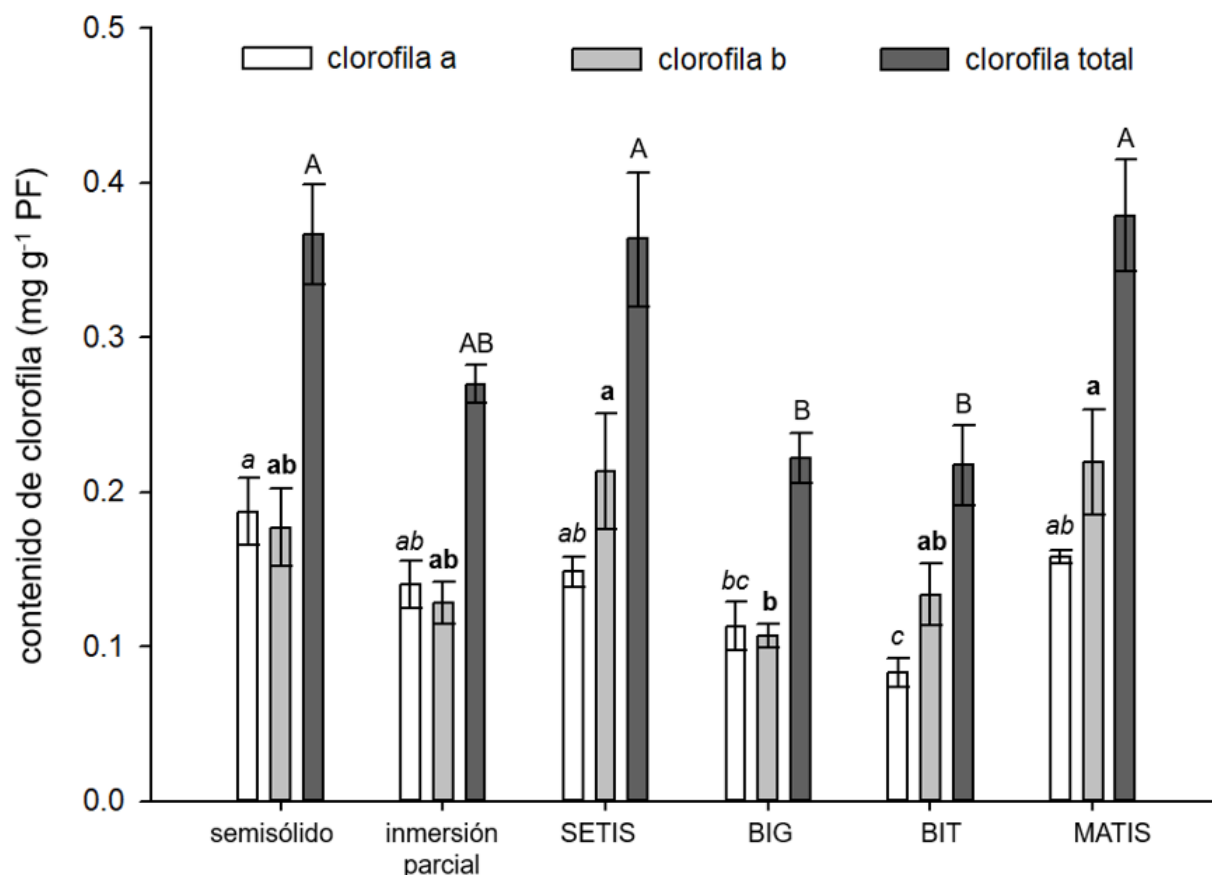


Figura 4. Efecto de los sistemas de cultivo *in vitro* sobre el contenido de clorofilas en banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) después de 28 días de cultivo. Diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EE.

Respecto al contenido de clorofila total, los sistemas de cultivo MATIS, SETIS, semisólido e inmersión parcial, mostraron los mayores contenidos de clorofila 0.37, 0.36, 0.36 y 0.26 mg g⁻¹ PF, respectivamente. Mientras que las menores concentraciones de clorofila total se encontraron en BIG y BIT, con 0.22 y 0.21 mg g⁻¹ PF, respectivamente.

El aumento en la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los SIT evaluados en este estudio pudo deberse al suministro de aire externo, probablemente el intercambio gaseoso ocasiona una mayor actividad fotosintética. De acuerdo con Roels *et al.*, (2006) y Aragón *et al.*, (2009) los SIT permiten la renovación del espacio atmosférico permitiendo la entrada O₂ y el enriquecimiento de CO₂ previniendo que este se acumule. SIT proporciona una excelente opción de utilizar medio líquido y controlar el ambiente gaseoso al mismo tiempo (Steingroewer *et al.*, 2013). El mecanismo de intercambio gaseoso permite que las plantas *in vitro* mejoren su capacidad mixotrófica presentando

una mayor actividad fotosintética preparando a las plantas para su posterior transferencia a *ex vitro* (Aragón *et al.*, 2005; Roels *et al.*, 2006).

Aragón *et al.*, (2005) obtuvo valores de fotosíntesis más altos que en cultivo semisólido y reporto que los BIT influyen positivamente sobre el proceso de fotosíntesis en la micropropagación de banana. Recientemente Ramírez-Mosqueda *et al.*, (2016) trabajo con micropropagación de *Vanilla planifolia*, comparando SIT reportando altos contenidos de pigmentos fotosintéticos en BIG en comparación con BIT y RITA; sin embargo, en nuestra investigación los sistemas BIG y BIT no presentaron diferencias para la micropropagación de banana, debido a que la eficiencia de los SIT depende tanto de la especie vegetal como del diseño y el material con el que están contruidos. SETIS está contruido por vasos de policarbonato y tapas de rosca de polipropileno y MATIS se compone solo de partes transparentes de policarbonato estos materiales facilitan el paso de luz, la cual es un factor importante que controla el desarrollo de las plantas influyendo sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos.

6.3 Determinación de índice estomático y porcentaje de estomas cerrados

Al evaluar los diferentes sistemas de cultivo en el porcentaje de índice estomático y estomas cerrados (Figura 5) se encontró un mayor índice estomático en el MATIS, con 10.17%, mientras que el resto de los sistemas de cultivo presentaron un menor índice estomático sin mostrar diferencias significativas. En estomas cerrados el mayor porcentaje de estomas cerrados se encontró en SETIS, con 79.10%, seguido de los sistemas líquido en inmersión parcial y BIG, con 57.75 y 44.96%, respectivamente. Los sistemas con menor porcentaje de estomas cerrados fueron en semisólido, BIT y MATIS, con 17.08, 10.62 y 12.39%, respectivamente.

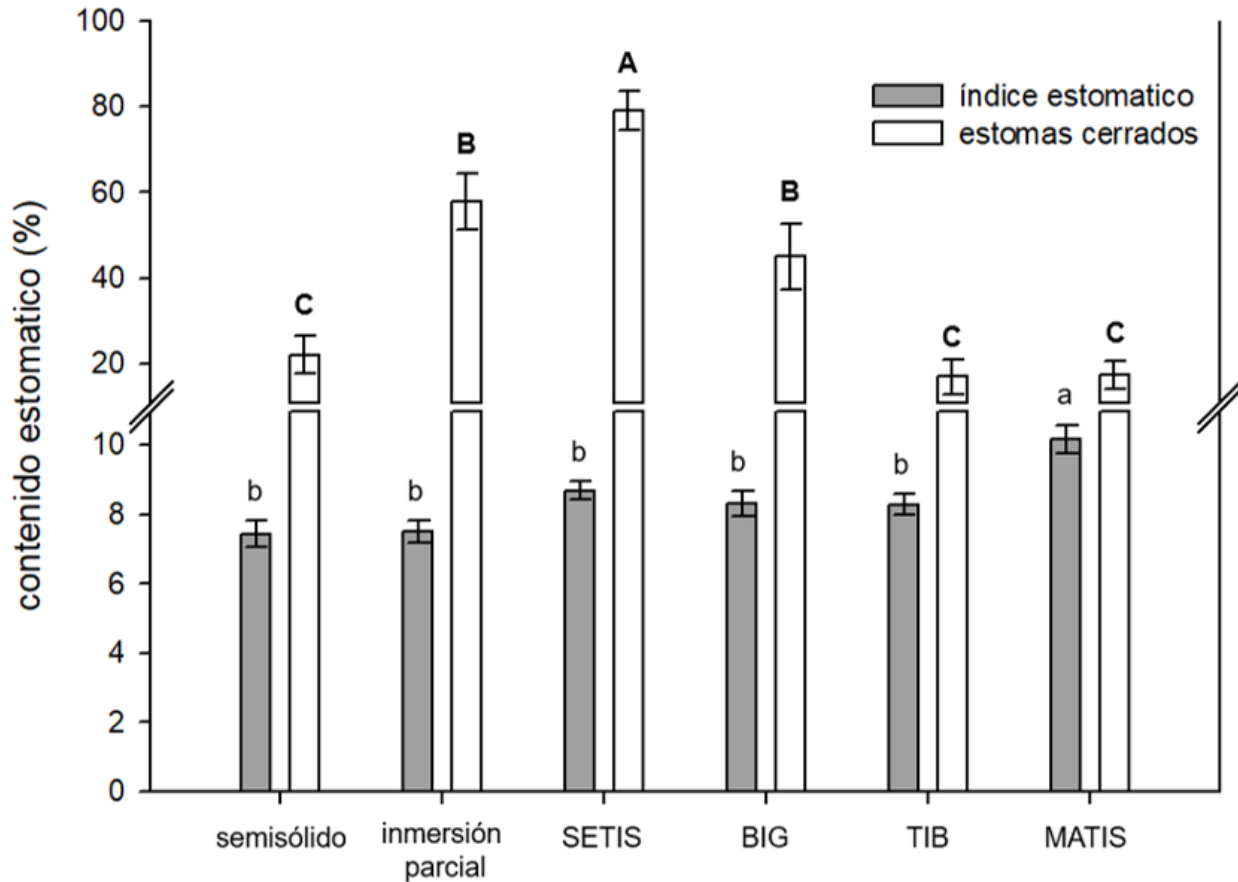


Figura 5. Efecto de los sistemas de cultivo *in vitro* sobre el contenido y funcionamiento estomático en banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) después de 28 días de cultivo. Diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey $p \leq 0.05$. Las barras representan la media \pm EE.

Este estudio demuestra que tanto el contenido como la funcionalidad de los estomas son afectados por los diferentes sistemas de cultivo (Figura 6). Büssis *et al.*, 2006 mencionan que la regulación de la apertura estomática es una respuesta a condiciones ambientales para realizar un intercambio gaseoso entre la planta y la atmosfera. Los resultados obtenidos en el sistema semisólido con alto porcentaje de estomas abiertos indican la baja o nula funcionalidad estomática. Lo anterior lo confirmamos con Aragón *et al.*, (2014) quien reporta que el sistema semisólido presenta una menor tasa fotosintética y una mayor tasa de respiración con respecto a los BIT, lo que nos indica que los estomas de las plantas que obtuvo en sistema semisólido se encuentran abiertos con una baja o nula funcionalidad. Las plantas del cultivo inmersión parcial se encuentran en un estado de hipoxia, debido a esto cierran sus estomas para regular el consumo de O_2 disponible. En el

biorreactor MATIS el medio de cultivo y los explantes se encuentran en el mismo recipiente, ocasionando alta humedad relativa similar a las del sistema semisólido, obteniendo en su mayoría estomas abiertos.

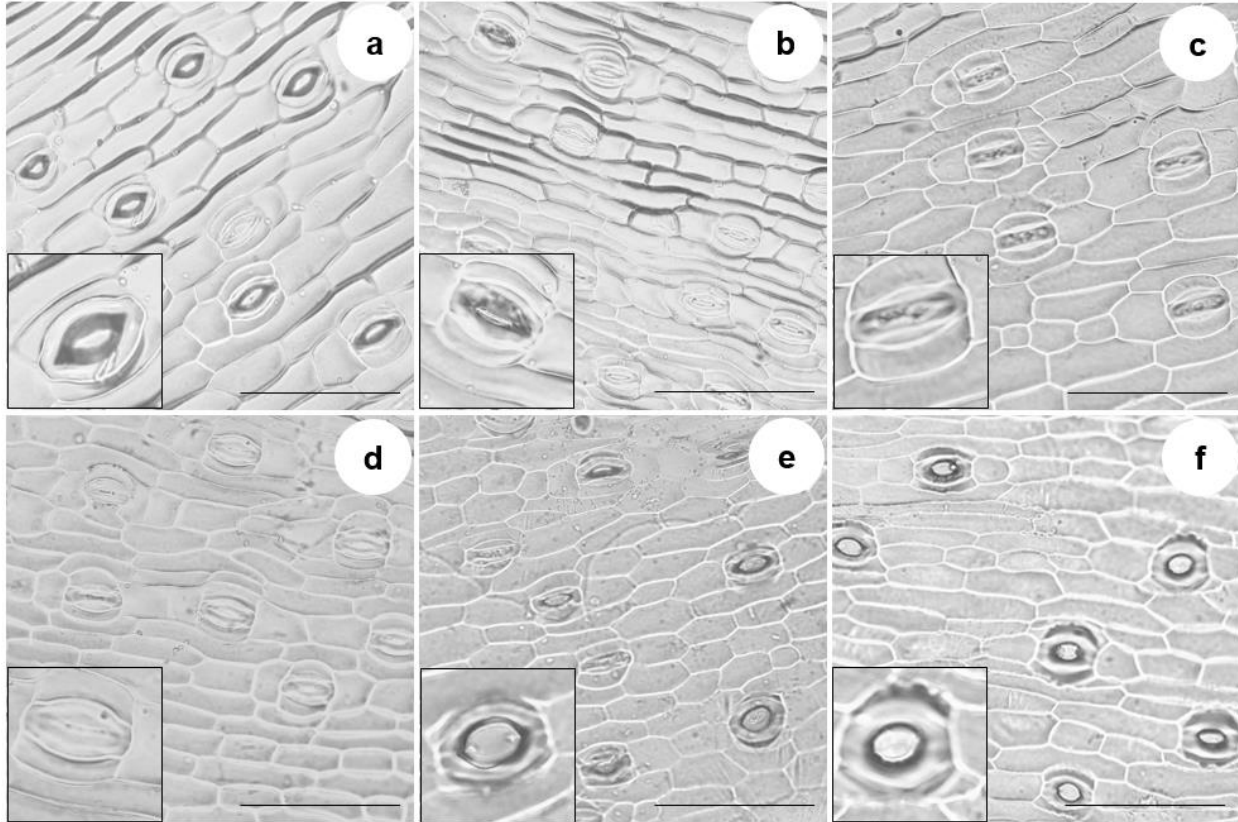


Figura 6. Efecto de los diferentes sistemas de cultivo en los estomas de hojas de banano (*Musa AAA cv. Gran Enano*) después de 28 días de cultivo *in vitro*. a) Semisólido, b) Inmersión parcial, c) SETIS, d) biorreactor de inmersión por gravedad, e) Biorreactor de inmersión temporal y f) MATIS. Bar = 100 μm .

En BIG y SETIS la mayoría de los estomas se encuentran funcionales, es decir, cerrados debido a que el suministro de aire para transferir el medio es lento. Los estomas cerrados y el bajo índice estomático generan una baja tasa de transpiración, lo cual evita pérdida de agua y deshidratación (Taiz y Zeiger, 2002; Vieira *et al.*, 2015). Aragón *et al.*, (2010) demostraron que al adicionar CO_2 a los BIT permiten una baja tasa de transpiración y mayor tasa fotosintética, lo cual contribuye a un mejor desarrollo de las plantas de banano. Las plantas obtenidas en nuestro estudio mostraron que la inmersión parcial, semisólido, BIG, BIT y SETIS tiene un bajo índice estomático; sin embargo, SETIS tiene un alto porcentaje de estomas cerrados, lo que resulta en una baja tasa de transpiración y probablemente una mayor tasa de fotosíntesis. En este estudio constatamos que la

funcionalidad estomática depende del sistema en el cual se desarrolle la planta, siendo posible que esta respuesta tenga un efecto durante la etapa de aclimatización.

6.4 Porcentaje de supervivencia *ex vitro*

Las características morfológicas durante la aclimatización mostraron diferencias significativas entre sistemas de cultivo (Tabla 5). Sin embargo, cuando se evaluó la supervivencia de las plántulas no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Respecto a la longitud de la plántula, los sistemas de cultivo SETIS e inmersión parcial presentaron la mayor altura, con 13.16 ± 0.33 y 11.83 ± 0.60 cm de altura, respectivamente. Mientras que las plantas de menor tamaño se obtuvieron en el sistema BIT y MATIS con 7.13 ± 0.18 y 6.73 ± 0.17 cm de altura, respectivamente. Para la variable número de hojas, las plántulas obtenidas de los sistemas de cultivo en SETIS e inmersión parcial obtuvieron la mayor formación de hojas, con seis hojas en promedio, seguido por el sistema de cultivo en semisólido, con cinco 5 hojas por planta. El menor número de hojas se obtuvo en el resto de los sistemas evaluados. Para la variable número de raíces, las plántulas obtenidas de los sistemas SETIS, BIG e inmersión parcial presentaron el mayor número de raíces por planta, con 5.33 ± 0.33 , 3.66 ± 0.33 , 3.66 ± 0.66 , respetivamente. En el resto de los tratamientos se obtuvo el menor número de raíces por planta. Finalmente, las plántulas obtenidas en los sistemas de cultivo con mayor longitud de raíz fueron SETIS, inmersión parcial y semisólido, con una longitud promedio de 6 cm. Para el resto de los sistemas de cultivo se obtuvo una longitud de raíz por debajo de los 4.3 cm.

Tabla 5. Efecto de los sistemas de cultivo en parámetros morfológicos de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) durante la aclimatización.

Sistemas de cultivo	Supervivencia (%)	Longitud de la planta(cm)	No. de hojas/planta	No. de Raiz/planta	Longitud de raíz (cm)
Semisólido	100.00±0.00 ^a	10.83±0.16 ^b	5.00±0.00 ^{bc}	2.8.00±0.57 ^b	6.37±1.35 ^a
Inmersión parcial	100.00±0.00 ^a	11.83±0.60 ^{ab}	6.00±0.00 ^{ab}	3.66±0.66 ^{ab}	6.27±0.60 ^a
SIT:					
SETIS	100.00±0.00 ^a	13.16±0.33 ^a	6.33±0.57 ^a	5.33±0.33 ^a	6.05±0.49 ^a
BIG	100.00±0.00 ^a	9.00±0.28 ^c	4.66±0.57 ^c	3.66±0.33 ^{ab}	4.30±0.72 ^b
BIT	96.66±3.33 ^a	7.13±0.18 ^d	4.66±0.57 ^c	2.66±0.33 ^b	2.40±0.46 ^b
MATIS	96.66±3.33 ^a	6.73±0.17 ^d	4.00±0.00 ^c	2.66±0.88 ^b	1.76±0.36 ^b

* Los valores representan la media ± EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$), a los 28 días de cultivo *in vitro*.

Las plántulas de banano tienen alta supervivencia aun cuando estas no hayan pasado por una etapa de enraizamiento previo a su aclimatización. La alta supervivencia *ex vitro* de las plantas obtenidas en los SIT ha sido demostrada por Aragón *et al.*, (2014), quien reporto una mayor tasa de supervivencia en BIT con respecto al medio semisólido. Ramírez-Mosqueda *et al.*, (2016), al evaluar la eficiencia de BIT, BIG y RITA en micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks), encontraron que las plántulas obtenidas en BIG tenían el mayor contenido de clorofila, obteniendo una menor tasa de supervivencia durante aclimatización. En esta investigación el contenido de clorofila no tuvo un efecto sobre la supervivencia *ex vitro* de las plantas. Durante la aclimatización, si el índice estomático es alto y los estomas se encuentran abiertos puede ocurrir una rápida deshidratación de la planta (Vieira *et al.* 2015) y por lo tanto puede afectar su desarrollo. Las plantas obtenidas en el SETIS presentaron un menor índice estomático y casi el 80% de estomas cerrados. Esto explica el mayor desarrollo de las plantas *ex vitro*. De acuerdo con Hazarika (2006), los estomas cerrados indican su funcionalidad correcta durante el cultivo *in vitro*. Con estos resultados se comprobó que el contenido y funcionalidad estomática no tiene efecto en la supervivencia, pero si en desarrollo de la planta *ex vitro* (Figura 7).



Figura 7. Efecto de los sistemas de cultivo *in vitro* en los parámetros morfológicos de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) 45 días después de ser aclimatizadas. a) Semisólido, b) Inmersión parcial, c) SETIS, d) Biorreactor de inmersión por gravedad, e) Biorreactor de inmersión temporal y f) MATIS. Bar = 2 cm.

Los SIT se han utilizado exitosamente en la micropropagación de una gran variedad de especies. De acuerdo con Roel *et al.*, (2006), el éxito de los SIT se debe a una ventilación forzada dada durante la transferencia del medio líquido de un recipiente a otro, provocando la renovación y suministro de aire. Este estudio reporta por primera vez una comparación de diferentes modelos de biorreactores en la micropropagación de banano. Como resultado, encontramos que el SETIS resulto el sistema más eficiente para la micropropagación de banano (Figura 8), proporcionando una mayor cantidad de plantas *in vitro* y más vigorosas *ex vitro*. Este sistema dispone de un espacio horizontal, donde los explantes tienen una adecuada distribución del medio de cultivo, sin dejar restos de medio realizando el principio correcto de la IT.

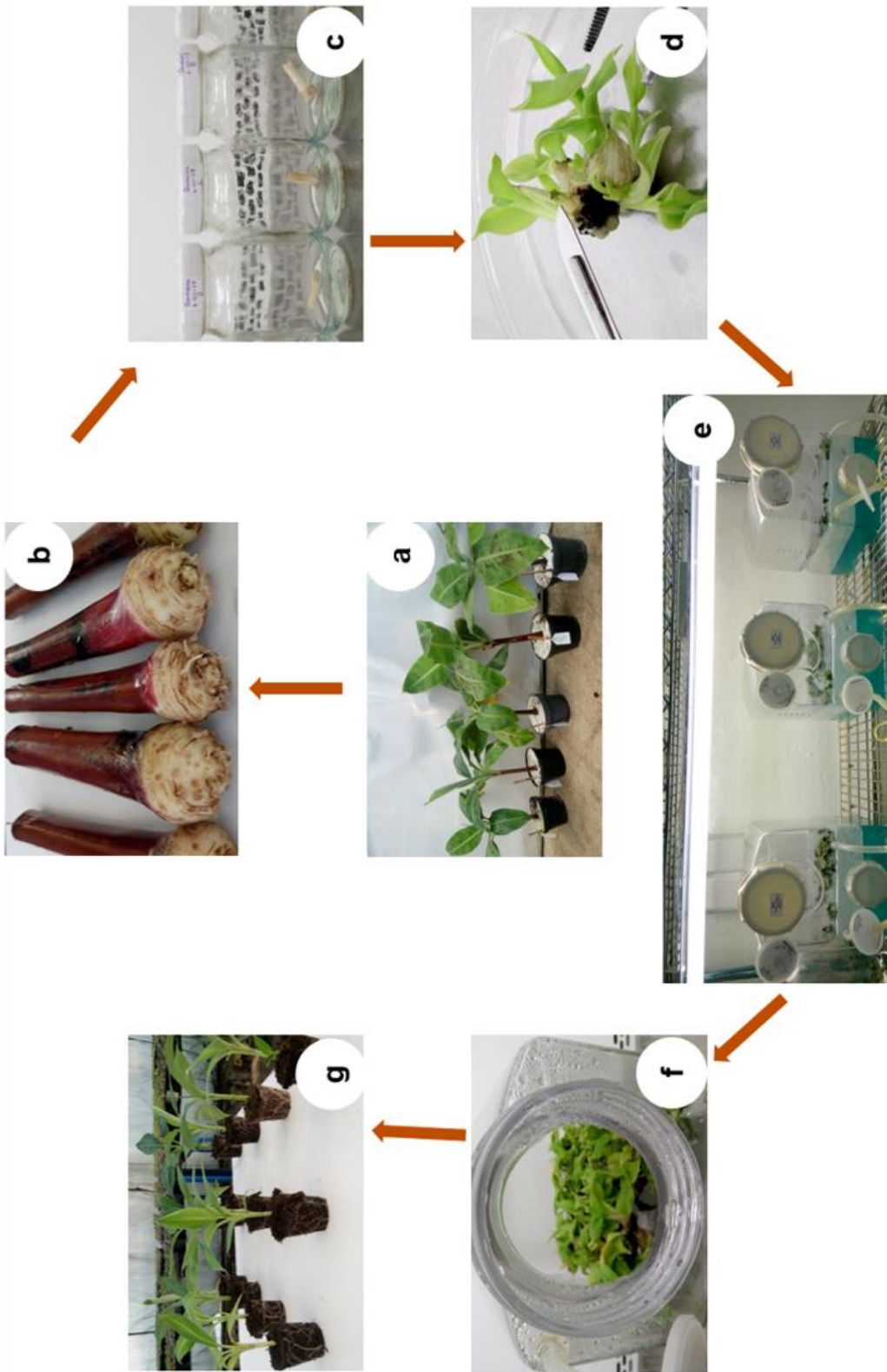


Figura 8. Protocolo para la micropropagación de banano. a) Selección de la planta madre, b y c) Establecimiento *in vitro*, d) Multiplicación, e) Multiplicación en biorreactor SETIS, f) obtención de plántulas y g) plántulas aclimatizadas.

7. CONCLUSIONES

- En este estudio los SIT evaluados son eficientes en la micropropagación de banano respecto al medio de cultivo tradicional en medio semisólido.
- El biorreactor SETIS tuvo un efecto positivo respecto al número y longitud de brotes y contenido estomático, lo anterior nos sugiere que SETIS promueve el desarrollo *in vitro* de banano respecto al resto de los biorreactores evaluados.
- El diseño de los biorreactores SETIS y MATIS permitieron un mayor contenido de clorofila en brotes respecto al resto de los SIT.
- En todos los sistemas cultivo evaluados en este estudio se obtuvo 100% de supervivencia durante la aclimatización de las plantas. El contenido de clorofila, contenido y funcionamiento estomático no influyen en el porcentaje de supervivencia *ex vitro* de banano; sin embargo, sí afectan el desarrollo de las plantas.
- En este estudio el biorreactor SETIS es la mejor opción para la micropropagación comercial de banano. Sin embargo, como una alternativa, en caso de no contar con este modelo de biorreactor se puede optar por utilizar BIT o BIG.

8. LITERATURA CITADA

- Alvard D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32:55-60.
- Aragón CE, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodríguez R, Cañal MJ, Sandoval J, Roels S, Deberch P, Gonzalez-Olmedo J (2005) Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa* AAB) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:550-554.
- Aragón CE, Escalona M, Rodriguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 46:89-94.
- Aragón CE, Sánchez C, Gonzalez-Olmedo J, Escalona M, Carvalho L, Amâncio S (2014) Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors y gelled medium during *in vitro* growth y acclimatization. *Biol Plant* 58:29-38.
- Bello-Bello JJ, Pérez-Sato JA, Cruz-Cruz CA, Martínez-Estrada E (2017) Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. In: Chlorophyll. InTech (ed). pp 93-103.
- Belokurova VB (2010) Methods of Biotechnology in System of Efforts Aimed at Plant Biodiversity Preservation (Review). *Cytol Genet* 44 (3):174-185.
- Büßis D, Von Groll U, Fisahn J, Altman T (2006) Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. *Funct Plant Biol* 33:1037-1043.
- Chaerle L, Saibo N, Van Der Straeten D (2005) Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends Biotechnol* 23(6):308-315.
- Dale J, James A, Paul JY, Khanna H, Smith M, Peraza-Echeverria S, Garcia-Bastidas F, Kema G, Waterhouse P, Mengersen K, Harding R (2017) Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nat Commun* 8:1496.
- Ducos JP, Labbe G, Lambot C, Pétiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:652-659.
- Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez B, Danquita M, Desjardins Y, Barroto CG (1999) Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr), micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Rep* 18:743-178.
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215-231.
- Etienne H, Bertrand B, Georget F, Lartaud M, Montes F, Dechamp E, Verdeil JL, Barry-Etienne D (2013) Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiol* 33:640-653.

- Farahani F, Majd A (2012) Comparison of liquid culture methods and effect of temporary immersion bioreactor on growth and multiplication of banana (*Musa*, cv. Dwarf Cavendish). *Afr. J. Biotechnol* 11(33):8302-8308.
- Ferreira CF, Silva SO, Sobrihno NP, Paz OP (2004) Molecular characterization of banana (AA) diploids with contrasting levels of black and yellow sigatoka resistance. *Am J Appl Sci* 1:276-278.
- Fu X, Cheng S, Liao Y, Huang B, Du B, Zeng W, Jiang Y, Duan X, Yang Z (2018) Comparative analysis of pigments in red and yellow banana fruit. *Food chem* 239:1009-1018.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci* 14:607-621.
- Harborne JB (1973) Nitrogen compounds. In: Harborne JB (ed) *Phytochemical methods*, Springer, The Netherlands, pp 166-211.
- Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci horti* 108(2):105-120.
- Jova MC, Kosky RG, Cuellar EE (2011) Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos'). *Biotechnol Agron Soc* 15(4):515.
- Kaur A, Malhotra PK, Manchanda P, Gosal SS (2018) Micropropagation and Somatic Embryogenesis in Sugarcane. In: *Biotechnologies of Crop Improvement*. Springer, Cham (ed). pp 1:57-91.
- Kaviani B (2015) Some Useful Information about Micropropagation. *J Ornam Plants* 5(1):29-40.
- Martin C, Glover BJ (2007) Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Curr Opin Plant Biol* 10:70-82.
- Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH, Salinas-Ruíz J, Bello-Bello JJ (2017) Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 53(6):553-560.
- Moyo M, Bairu MW, Amoo SO, Van Staden J (2011) Plant biotechnology in South Africa: Micropropagation research endeavours, prospects and challenges. *S Afr J Bot* 77(4):996-1011.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth y bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Pérez-Molphe EM, Ramírez-Malagón R, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (1999) *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. pp 179.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT[®], BIG, and RITA[®]) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 52:154-160.
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodríguez R, Debergh P (2006) The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa* AAB) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84:155-163.

- Sarkar SF, Poon JS, Lepage E, Bilecki L, Girard B (2017) Enabling a sustainable and prosperous future through science and innovation in the bioeconomy at Agriculture and Agri-Food Canada. *New biotechnol* 40:70-75.
- Sharma H, Vashistha BD (2015) Plant tissue culture: a biological tool for solving the problem of propagation of medicinally important woody plants-a review. *Int J Adv Res* 3(2):402-411.
- Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, Pérez-Sato, JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Cul* 129(2):195-207.
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Neelwarne B (2009) Hyperhydricityrelated morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). *J Plant Growth Regul*, 28:46-57
- Steingroewer J, Bley T, Georgiev V, Ivanov I, Lenk F, Marchev A, Pavlov A (2013) Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sci* 13:26-38.
- Taiz L, Zeiger E (2002) Photosynthesis; physiological and ecological considerations. In: Taiz L, Zeiger E (eds) *Plant physiology*, Sinauer Associates, Massachusetts, pp 171-192.
- Thieman WJ, Palladino MA (2010) Introducción a la biotecnología. Pearson (ed). Madrid, España. pp 406.
- Tisserat B, Vandercook CE (1985) Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 5:107-117.
- Vervit (2018) SETIS™ Bioreactor Temporary immersion systems in plant micropropagation. <http://www.setis-systems.be>. Cited 10 de Feb 2018
- Vieira LN, Fraga HPF, dos Anjos KG, Puttkammer CC, Scherer RF, da Silva DA, Guerra MP (2015) Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) ‘Nanicão Corupá’ *in vitro* plantlets. *Theor Exp Plant Physiol* 27:91-98
- Wang F, Chen ZH., Shabala S (2017) Hypoxia sensing in plants: on a quest for ion channels as putative oxygen sensors. *Plant Cell Physiol* 58:1126-1142
- Watt MP (2012) The status of temporary immersion system (SIT) technology for plant micropropagation. *Afr. J. Biotechnol* 11(76):14025-14035.
- Wilken D, Gonzalez EJ, Gerth A, Gómez-Kosky R, Schumann A, Claus D (2014) Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. ‘Grande naine’AAA). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 50:582-589.
- Wilkinson H (1979) The plant surface (mainly leaf). In: Metcalfe CR and L Chalk (eds). *Anatomy of Dicotyledons*. Oxford, London, UK. Clarendon Press, pp 97-165.
- Wu HC, Kuo ML, Chen CM (2018) Promotion of Vegetative Growth in Force-ventilated *Protea cynaroides* L. Explants Cultured in Modified Temporary Immersion Culture Vessels. *HortScience* 53:231-235.
- Xu Z, Zhou G (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a Grass. *J. Exp. Bot* 59:3317-325.

Ziv M (2005) Simple bioreactors for mass propagation of plants. In: Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer, Dordrecht (eds). pp 81:277-285.

9. ANEXOS

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant

A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine)

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IVPL-D-18-00187R1
Full Title:	A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (<i>Musa</i> AAA cv. Grand Naine)
Article Type:	Original Research
Keywords:	SETIS™ biorreactor; Chlorophyll; Stomata; Acclimatization
Corresponding Author:	Jericó Jabín Bello-Bello Colegio de Postgraduados Campus Cordoba Amatlán de los Reyes, Veracruz MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Colegio de Postgraduados Campus Córdoba
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Isabel Cruz-Villegas
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Isabel Cruz-Villegas
	Carlos Alberto Cruz-Cruz
	Juan Carlos Pérez-Guerra
	Jericó Jabín Bello-Bello
Order of Authors	

Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Temporary Immersion Systems (TIS) are among best alternative for commercial micropropagation. However, although successes have been reported with TIS, it is necessary to establish the most suitable system for <i>in vitro</i> banana multiplication. The aim of this research was to compare the efficiency of different TIS for banana (<i>Musa</i> AAA cv. Grand Naine) micropropagation. The Temporary immersion bioreactor, Ebb- and-Flow, MATIS and SETIS bioreactor systems were used. In addition, liquid medium with partial immersion and semi-solid medium culture were evaluated. At 28 days of culture the number and length of shoots, number of leaves per shoot, chlorophyll content, stomatal index and percentage of closed stomata were recorded. Additionally, survival percentage and <i>ex vitro</i> development of the seedlings were evaluated during acclimatization. Results showed that TIS have a higher multiplication rate with respect to partial immersion and semi-solid medium. The chlorophyll contents, stomatal index and stomata functioning are affected by the different culture systems. The different culture systems had no effect on survival percentage; however, morphological differences were observed during acclimatization. The SETIS bioreactor was more efficient than the rest of the TIS, producing better development in the plants obtained <i>in vitro</i> and <i>ex vitro</i>, proving it to be a useful alternative for banana micropropagation.</p>

**A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa*
AAA cv. Grand Naine)**

Isabel Cruz-Villegas¹, Carlos Alberto Cruz-Cruz², Juan

Carlos Pérez-Guerra³, Jericó Jabín Bello-Bello⁴

¹Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba, Carretera federal Córdoba-Veracruz Km. 348, Amatlán de los Reyes, 94946 Veracruz, México

²Universidad Veracruzana-Facultad de Ciencias Químicas, Oriente 6, No. 1009, Orizaba, 94340 Veracruz, México

³VERVIT bvba, Karnemelkstraat 2-4, 9060 Zelzate, Belgium

⁴CONACYT-Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba, Carretera federal Córdoba- Veracruz Km. 348, Amatlán de los Reyes, 94946 Veracruz, México. Email address: jericobello@gmail.com

Abstract

Temporary Immersion Systems (TIS) are among best alternative for commercial micropropagation. However, although successes have been reported with TIS, it is necessary to establish the most suitable system for *in vitro* banana multiplication. The aim of this research was to compare the efficiency of different TIS for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) micropropagation. The Temporary immersion bioreactor, Ebb-and-Flow, MATIS and SETIS bioreactor systems were used. In addition, liquid medium with partial immersion and semi-solid medium culture were evaluated. At 28 days of culture the number and length of shoots, number of leaves per shoot, chlorophyll content, stomatal index and percentage of closed stomata were recorded. Additionally, survival percentage and *ex vitro* development of the seedlings were evaluated during acclimatization. Results showed that TIS have a higher multiplication rate with respect to partial immersion and semi-solid medium. The chlorophyll contents, stomatal index and stomata functioning are affected by the different culture systems. The different culture systems had no effect on survival percentage; however, morphological differences were observed during acclimatization. The SETIS bioreactor was more efficient than the rest of the TIS, producing better development in the plants obtained *in vitro* and *ex vitro*, proving it to be a useful alternative for banana micropropagation.

Keywords: SETIS™ bioreactor; Chlorophyll; Stomata; Acclimatization.

Introduction

Temporary Immersion Systems (TIS) are one of the most advanced tools for commercial micropropagation. They are based on the operating principle of simply immersing the cells, tissues or organs into liquid media for periods of time using semi-automated bioreactors (Vervit 2018). This system improves the explant's aeration, producing a lower incidence of asphyxia and thus increasing multiplication rates (Etienne and Berthouly 2002; Georgiev *et al.* 2014; Wu *et al.* 2018). Temporary Immersion (TI) promote physiological processes such as photosynthesis, respiration, chlorophyll content, stomatal functioning and plant nutrition, thereby favoring the development during acclimatization process (Aragón *et al.* 2014).

A TIS design directly influences the physiology and development of plants *in vitro*. Today, there are several different TIS models, such as: Recipient for Automated Temporary Immersion (RITA[®], Alvard *et al.* 1993), Temporary Immersion Bioreactor (TIB[®], Escalona *et al.* 1999), Ebb-and-Flow bioreactor (Tisserat and Vandercook, 1985; Ducos *et al.* 2007), Monobloc Advance Temporary Immersion System (MATIS[®]) (Etienne *et al.* 2013) and SETIS[™] Bioreactor (Vervit 2018).

Bananas are among the most popular fruits worldwide and play an important role in providing healthy nutrition to people of all ages (Fu *et al.* 2018). Grande Naine accounts for >40% of the world's banana production and completely dominates the banana export market, amounting to 15% of world production (Dale *et al.* 2017). Several options exist for large-scale banana micropropagation in terms of ease and efficiency. Switching from traditional methods based on semi-solid media to TIS can considerably reduce handling whilst increasing multiplication rate and banana plant quality. Micropropagation of banana in TIS has been previously reported in RITA (Alvard *et al.* 1993), in TIB (Roels *et al.* 2006; Aragón *et al.* 2005; 2014) and Ebb-and-flow

bioreactor (Wilken *et al.* (2014). However, which system is best adapted to commercial micropropagation of this important crop has yet to be determined. In this regard, the aim of this research was to increase *in vitro* proliferation and shoot quality of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) using a SETIS-Bioreactor as an alternative method for commercial micropropagation of this important species.

Materials and methods

Plant material and *in vitro* establishment

Five banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) suckers were collected and placed under greenhouse conditions for 2 months. After that, the plants' leaves and roots were removed. The pseudostems of 15 cm were transferred to the lab, where they were washed with tap water, soap and 0.6% sodium hypochlorite and then transferred to a laminar flow and trimmed to a size of 2 cm in length and 1 cm in diameter to obtain the apices. These, in turn, were immersed in sodium hypochlorite at 0.3 and 0.18% (v/v) for 5 and 3 min, respectively, and then rinsed three times with sterile distilled water. Then they were dipped into 40 mg L⁻¹ cysteine for 3 min as an antioxidant. Finally, five apices were individually cultured in 100 mL flasks containing 25 mL of MS (Murashige and Skoog, 1962) semi-solid medium complemented with 3% (w/v) of sucrose without growth regulators. The culture medium was adjusted to pH 5.7 with 0.1 N NaOH and 0.1 N HCl, 0.22% (w/v) Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®] Chemical Company, St. Louis, MO) was added as a gelling agent before being sterilized in an autoclave at 120°C and 115 kPa for 20 min. The explants were incubated at 25±1°C under irradiance of 45 µmol·m⁻²·s⁻¹ with a 16 h light/8 h dark photoperiod. After 1 week of culturing, the explants were subcultured on MS proliferation medium containing 4 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) (Sigma-Aldrich[®]). The culture was carried out in 500 mL

glass flasks containing 30 mL of culture medium, placing one explant per flask for the first subculture. For subsequent subcultures, three explants were used, making a total of four subcultures of 20 days each. The regenerated shoots of these subcultures were used for the evaluation of different culture systems.

Evaluation of different culture systems

In the multiplication phase, the explants (with two shoots each) were cultivated in semi-solid culture medium (control) and liquid medium with partial immersion maintained stationary (without agitation) with 100 and 50 mL of growth media per system, respectively. These systems were compared with the TIS: TIB[®] (Escalona *et al.* 1999); Ebb-and-Flow bioreactor (Ducos *et al.* 2007); MATIS[®] (Etienne *et al.* 2013) and SETIS[™] (Vervit 2018), using the culture medium MS supplemented with 4 mg L⁻¹ BAP and incubation conditions described above, without gelling agent with a volume of 50 mL per explant for each TIS. The number of explants was correlated to the volume available for plant material in each culture system, allowing a headspace volume for each explant of 200 mL. In the case of the semi-solid system, partial immersion, TIB and Ebb-and-Flow bioreactor, 1800 mL flasks were used, placing 9 explants per system. In the case of SETIS[™] and MATIS, 27 and 11 explants were used, respectively. The immersion frequency was 4 min (Aragón *et al.* 2014) every 4 h for all TIS for 28 days. A total of 27 explants for semi-solid, partial immersion, TIB and Ebb-and-Flow bioreactor, 81 explants for SETIS bioreactor and 33 explants for MATIS bioreactor were used. All assays were carried out in triplicate.

After 28 days of culture, thirty explants per culture system were taken at random to determine morphological characteristics (number and length of shoots per explant and the number of leaves per shoot). For the variable number of shoots per explant, the shoots of 30 explants were taken at

random from each culture system with three replications and the length of each of these shoots was measured. Also, the chlorophyll content, stomatal index, percentage of closed stomata and survival percentage during acclimatization were recorded.

chlorophyll determination

The chlorophyll content was estimated according to the method of Harborne (1973). First, 0.2 g of fresh leaves from each treatment were homogenized in a mortar using a 1:1 (v/v) mixture of 80% acetone and distilled water. It was stored for 24 h at a temperature of -4°C. Subsequently, it was brought to 6.25 mL with 80% acetone. The absorbance was measured at 663 nm (chlorophyll a), 645 nm (chlorophyll b), spectrophotometer.

Stomatal index and closed stomata

For stomatal study, the abaxial sides of fully developed leaves were smeared with nail varnish in the mid-area between the central vein and the leaf edge as described by Xu and Zhou (2008), for approximately 3 min, immediately after interrupting the atmosphere of the culture system. Numbers of closed stomata and open stomata, total stomata and epidermal cells per mm² for each film strip were counted under an optical microscope (Axio Lab.A1, ZEISS) equipped with 10X and 40X lenses. Leaf stomatal index was estimated using the formula described by Wilkinson (1979).

***Ex vitro* acclimatization**

To assess the efficiency of the TIS on survival during acclimatization, plantlets were transplanted in 38-cavity trays using peat moss as substrate, three blocks with 38 plants of each culture system were evaluated. Plants were kept under greenhouse conditions (under irradiance of 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Foliar fertilizer (Gro-green[®] CAMPBELL Co. DE ROCHELLE, ILL. U.S.A) was

applied once a week, and plants were watered once a day. After 45 days, plant length, number of leaves, and number and length (≥ 1 cm) of roots were evaluated.

Experimental design and Statistical analysis

The experimental design was completely randomized. The entire experiment was replicated three times. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and using the statistical software SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL) for Windows. The data presented in percentages were arcsine transformed prior to analysis.

RESULTS

Evaluation of the different culture systems on shoot proliferation

Results obtained showed significant differences among the culture systems for the variables evaluated (Table 1). The highest number of shoots was obtained in SETIS, with 7.30 ± 0.42 shoots per explant, followed by the TIB, MATIS and Ebb-and-Flow bioreactors, with 5.00 ± 0.31 , 4.70 ± 0.42 and 5.00 ± 0.31 shoots per explant, respectively. By contrast, the lowest shoot production was obtained in the culture systems in semi-solid and liquid medium in partial immersion with 2.86 ± 0.25 and 2.60 ± 0.22 shoots per explant, respectively. Highest shoot length was observed in the semi-solid system (3.83 ± 0.19 cm) and SETIS (3.80 ± 0.14 cm), without presenting significant differences with the TIB and liquid medium systems. The shoots from Ebb-and-Flow and MATIS bioreactors had the shortest shoot lengths of 2.82 ± 0.08 and 2.74 ± 0.10 cm, respectively. The plants from TIS had the highest number of leaves per explant, while those from semi-solid medium and liquid medium in partial immersion had the lowest number of leaves per explant (Table 1, Fig. 1).

Effect of different culture systems on chlorophyll contents

When evaluating the chlorophyll content in shoots obtained in the different culture systems, a decrease in the concentration of chlorophyll a was found in the TIB and Ebb-and-Flow systems with 0.08 and 0.11 mg g⁻¹ FW, respectively (Fig. 2), while, the rest of the systems presented the highest values of chlorophyll a. For chlorophyll b, MATIS showed the highest amount, with 0.21 mg g⁻¹ FW, while the Ebb-and-Flow bioreactor had the lowest amount, with 0.13 mg g⁻¹ FW. Regarding total chlorophyll content, the MATIS, SETIS, semi-solid and partial immersion culture systems showed the highest chlorophyll contents, with 0.37, 0.36, 0.36 and 0.26 mg g⁻¹ FW, respectively, while the lowest total chlorophyll concentrations were found in Ebb-and-Flow and TIB, with 0.22 and 0.21 mg g⁻¹ FW, respectively.

Leaf stomatal index and closed stomata

When evaluating the effect of different culture systems on the stomatal index and closed stomata, a higher stomatal index was found in MATIS, with 10.17%, while the rest of the culture systems had a lower stomatal index without showing significant differences (Fig. 3). The highest percentage of closed stomata was found in SETIS, with 79.10%, followed by the partial immersion and Ebb-and-Flow systems, with 57.75 and 44.96%, respectively. The lowest closed stomata percentages were in the semi-solid, TIB and MATIS systems, with 22.08, 17.00 and 17.39%, respectively.

Effect of different culture systems on acclimatization

During acclimatization, no significant differences were observed among the treatments for plantlet survival, though for morphological characteristics significant differences were recorded among culture systems (Table 2). The SETIS and partial immersion culture yielded the longest plants, with 13.16±0.33 and 11.83±0.60 cm height, respectively, while smaller plants were obtained in

the TIB and MATIS systems, with 7.13 ± 0.18 and 6.73 ± 0.17 cm height, respectively. For the variable number of leaves, the plantlets obtained from the SETIS and partial immersion systems had the highest leaf formation, with six leaves on average, followed by the semi-solid culture system, with five leaves per plant. In the rest of the systems evaluated, significantly lower number of leaves (4) was obtained. With respect to number of roots, the plantlets obtained from the SETIS, Ebb-and-Flow and partial immersion systems formed the highest number of roots per plant, with 5.33 ± 0.33 , 3.66 ± 0.33 and 3.66 ± 0.66 , respectively. In the rest of the treatments, the lower number of roots per plant was obtained. Finally, the plantlets with the greatest root length were obtained in the SETIS, partial immersion and semi-solid culture systems, with an average length of 6 cm. For the rest of the culture systems, a root length of less than 4.3 cm was obtained (Fig. 4). After 4 months, the banana plants of the different systems maintained their survival, with the plants obtained from the SETIS system showing the greatest development.

Discussion

Effect of different culture systems for shoot proliferation

The results show the efficiency of temporary immersion systems in the proliferation of banana shoots in comparison with the semi-solid medium and liquid medium in partial immersion culture systems.

The use of TIS for banana micropropagation has been reported by Alvard *et al.* (1993) who compared the RITA system with semi-solid medium and liquid medium under agitation and permanent immersion for the propagation of cv. Grande Naine, obtaining the highest multiplication rate in RITA with 5.2 shoots per explant; years later Roels *et al.* (2006) reported an increase the number of shoots on cv. CEMSA 3/4 (AAB) using TIB, increasing the multiplication

rate to 6.4 shoots per explant. Aragón *et al.* (2014) again showed the positive effects of TIB on cv. CEMSA 3/4 (AAB) and recently Wilken *et al.* (2014) worked with TIS with a capacity of 5000 mL, reporting to increase the number of shoots to 7 per explant in cv. Grand Naine.

In our study, SETIS reached a high multiplication rate, even higher than the results reported by Roels *et al.* (2006) and Wilken *et al.* (2014) who worked with the TIB systems and plantain CEMSA ¾ (AAB) and commercial TIS of 5000 mL with banana cv Grande Naine.

Even though in the culture system in semi-solid medium and liquid medium in partial immersion the lowest number of new buds was reported, these reached a height greater than 3 cm. This can be explained by the fact that when there is a lower number of shoots per explant there is less competition, resulting in greater availability of space, water, light and nutrients. The number of leaves was the same in all TIS, having greater pigmentation in the SETIS and MATIS bioreactors, caused by the higher chlorophyll content in these systems.

chlorophyll contents

The increased synthesis of photosynthetic pigments in the TIS evaluated in this study may have been due to the external air supply. The gas exchange probably causes greater photosynthetic activity. According to Roels *et al.* (2006) and Aragón *et al.* (2010), TIS allow ethylene, O₂ and CO₂ exchange. TIS provide an excellent way of using liquid medium and controlling the gas environment at the same time (Steingroewer *et al.* 2013). The gas exchange mechanism allows *in vitro* plants to improve their mixotrophic capacity, for *ex vitro* condition (Aragón *et al.* 2005; Roels *et al.* 2006).

Aragón *et al.* (2005) obtained higher photosynthesis values in TIB than in semi-solid culture, so they reported that TIBs have a positive influence on the photosynthesis process in banana micropropagation. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) recently worked with micropropagation of

Vanilla planifolia, using different TIS, reporting high contents of photosynthetic pigments in the Ebb-and-Flow bioreactor compared to TIB and RITA; however, in our research the Ebb-and-Flow and TIB systems showed no differences for banana micropropagation, since the efficiency of the TIS depends both on the plant species and on the design and material with which they are constructed. SETIS is constructed of polycarbonate vessels and polypropylene screw caps and MATIS is composed of only transparent polycarbonate parts; these materials facilitate the passage of light, which is an important factor that controls the development of plants by influencing the content of photosynthetic pigments.

Stomatal index and closed stomata

This study that both the index and closed stomata are affected by the different culture systems. Büssis *et al.* (2006) mentions that the regulation of stomatal opening is a response to environmental conditions when carrying out a gas exchange between the plant and the atmosphere. The results obtained in the semi-solid system with a high percentage of open stomata indicate low or no stomatal functionality. According to Aragón *et al.* (2014), the semi-solid system has a lower photosynthetic rate and a higher respiration rate with respect to the TIB. On the other hand, the partial immersion culture plants are probably in a hypoxic state. In this sense, Wang *et al.*, 2017 mentioned that plants close their stomata to regulate the consumption of available O₂. In the MATIS bioreactor the culture medium and the explants are in the same container, causing high relative humidity similar to that of the semi-solid system, thus obtaining mostly open stomata. Our results suggest that in the different culture systems when finding closed stomata, they are probably functioning correctly (Hazarika 2006). Closed stomata and low stomatal indexes generate a low transpiration rate, which prevents water loss and dehydration (Taiz and Zeiger 2002; Vieira *et al.* 2015). Aragón *et al.* (2010) showed that adding CO₂ to the TIBs allows a low transpiration

rate and a higher photosynthetic rate, which contributes to better banana plant development. The plants obtained in our study showed that semi-solid, partial immersion, Ebb-and-Flow, TIB and SETIS has a low stomatal index; however, SETIS has a high percentage of closed stomata, resulting in a low transpiration rate and probably a higher photosynthetic rate. In addition to this, SETIS allows for better explant distribution. In this study we found that stomatal functionality depends on the system in which the plant is developed, being possible that this response has an effect during the acclimatization stage regarding the development of *ex vitro* plants.

Acclimatization

Banana plantlets have a high survival rate even when they have not gone through a rooting stage prior to acclimatization. The high *ex vitro* survival of the plants obtained in TIS has been demonstrated by Aragón *et al.* (2014), who reported a higher survival rate in TIB compared to semi-solid medium. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016), in evaluating the efficiency of TIB, Ebb-and-Flow and RITA on vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks) micropropagation, found that the plantlets obtained in Ebb-and-Flow had the highest chlorophyll content, obtaining a lower survival rate during acclimatization. However, in our research, chlorophyll content had no effect on the *ex vitro* survival of the plants. During acclimatization, if the stomatal index is high and the stomata are open, a rapid dehydration of the plant can occur (Vieira *et al.* 2015) and therefore could affect its development.

In contrast, the plantlets obtained in the SETIS had a lower stomatal index and almost 80% closed stomata. This explains possibly the greater development of the *ex vitro* plants. According to Hazarika (2006), closed stomata indicate their correct functionality during *in vitro* culture. With these results it was determined that stomatal content and functionality has no effect on survival but does on the development of the *ex vitro* plant.

Conclusions

TIS have been used successfully in the micropropagation of a wide variety of species. According to Roel *et al.* (2006), the success of TIS is due to the forced ventilation given during the transfer of the liquid medium from one container to another, causing air renewal and supply. This study reports for the first time a comparison of different bioreactor models used in banana micropropagation. As a result, we found that SETIS was the most efficient system for banana micropropagation, resulting in a greater number of *in vitro* shoots and more vigorous plants during *ex vitro* acclimatization.

In conclusion, the design of each TIS affects the development of banana plants. As a result, we found that the SETIS bioreactor is a suitable option for commercial banana micropropagation. We also recommend comparing at least two different TIS to determine which system is suitable according to the species one wishes to micropropagate on a commercial basis.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors would like to thank CONACYT-Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba for the financial support.

References

- Alvard D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32:55-60.
- Aragón CE, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodríguez R, Cañal MJ, Sandoval J, Roels S, Deberch P, Gonzalez-Olmedo J (2005) Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa* AAB) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:550-554.
- Aragón CE, Escalona M, Rodriguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 46:89-94.
- Aragón CE, Sánchez C, Gonzalez-Olmedo J, Escalona M, Carvalho L, Amâncio S (2014) Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors y gelled medium during *in vitro* growth y acclimatization. *Biol Plant* 58:29-38.
- Büssis D, Von Groll U, Fisahn J, Altman T (2006) Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. *Funct Plant Biol* 33:1037-1043.
- Dale J, James A, Paul JY, Khanna H, Smith M, Peraza-Echeverria S, Garcia-Bastidas F, Kema G, Waterhouse P, Mengersen K, Harding R (2017) Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nat Commun* 8:1496.
- Ducos JP, Labbe G, Lambot C, Pétiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:652-659.

- Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez B, Danquita M, Desjardins Y, Barroto CG (1999) Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr), micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Rep* 18:174-178.
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215-231.
- Etienne H, Bertrand B, Georget F, Lartaud M, Montes F, Dechamp E, Verdeil JL, Barry-Etienne D (2013) Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiol* 33:640-653.
- Fu X, Cheng S, Liao Y, Huang B, Du B, Zeng W, Jiang Y, Duan X, Yang Z (2018) Comparative analysis of pigments in red and yellow banana fruit. *Food Chem* 239:1009-1018.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci* 14:607-621.
- Harborne JB (1973) Nitrogen compounds. In: Harborne JB (ed) *Phytochemical methods*, Springer, The Netherlands, pp 166-211.
- Hazarika BN (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci horti* 108(2):105-120.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth y bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT[®], BIG, and RITA[®]) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* 52:154-160.

- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodríguez R, Debergh P (2006) The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84:155-163.
- Steingroewer J, Bley T, Georgiev V, Ivanov I, Lenk F, Marchev A, Pavlov A (2013) Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sci* 13:26-38.
- Taiz L, Zeiger E (2002) Photosynthesis; physiological and ecological considerations. In: Taiz L, Zeiger E (eds) *Plant physiology*, Sinauer Associates, Massachusetts, pp 171-192.
- Tisserat B, Vandercook CE (1985) Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 5:107-117.
- Vervit (2018) SETIS™ Bioreactor Temporary immersion systems in plant micropropagation. <http://www.setis-systems.be>. Cited 10 de Feb 2018
- Vieira LN, Fraga HPF, dos Anjos KG, Puttkammer CC, Scherer RF, da Silva DA, Guerra MP (2015) Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) ‘Nanicão Corupá’ *in vitro* plantlets. *Theor Exp Plant Physiol* 27:91-98
- Wang F, Chen ZH., Shabala S (2017) Hypoxia sensing in plants: on a quest for ion channels as putative oxygen sensors. *Plant Cell Physiol* 58:1126-1142
- Wilken D, Gonzalez EJ, Gerth A, Gómez-Kosky R, Schumann A, Claus D (2014) Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. ‘Grande naine’ AAA). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 50:582-589.
- Wilkinson H (1979) The plant surface (mainly leaf). In: Metcalfe CR and L Chalk (eds). *Anatomy of Dicotyledons*. Oxford, London, UK. Clarendon Press, pp 97-165.

Wu HC, Kuo ML, Chen CM (2018) Promotion of Vegetative Growth in Force-ventilated *Protea cynaroides* L. Explants Cultured in Modified Temporary Immersion Culture Vessels. HortScience 53:231-235.

Xu Z, Zhou G (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a Grass. J. Exp. Bot 59:3317-325.

Figure 1. Comparison of culture systems of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot proliferation after 28 days of culture. a) semi-solid, b) partial immersion, c) SETIS, d) Ebb-and-Flow, e) temporary immersion bioreactor and f) MATIS. *Bar* = 1 cm

Figure 2. Comparison of culture systems on chlorophyll content in banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) after 28 days of culture. Different letters within a bar denote statistically significant differences according to Tukey's range test at $p \leq 0.05$. Bars represent mean \pm SE.

Figure 3. Comparison of culture systems in banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) on stomatal index and closed stomata after 28 days of culture. Different letters within a bar denote statistically significant differences according to Tukey's range test at $p \leq 0.05$. Bars represent mean \pm SE.

Figure 4. Comparison of culture systems on morphological parameters of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) after 45 days of acclimatization. a) semi-solid, b) partial immersion, c) SETIS, d) Ebb-and-Flow, e) temporary immersion bioreactor and f) MATIS. *Bar* = 2 cm.

Table 1. Comparison of culture systems of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot proliferation after 28 days of culture.

Culture systems	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)	No. of leaves/ shoot
Semi-solid	2.86±0.25 ^c	3.83±0.19 ^a	2.38±0.08 ^b
Partial Immersion	2.60±0.22 ^c	3.42±0.20 ^{ab}	2.18±0.08 ^b
TIS:			
SETIS	7.30±0.42 ^a	3.80±0.14 ^a	3.12±0.11 ^a
Ebb-and-Flow	4.60±0.28 ^b	2.82±0.08 ^b	3.08±0.09 ^a
TIB	5.00±0.31 ^b	3.29±0.21 ^{ab}	3.10±0.10 ^a
MATIS	4.70±0.42 ^b	2.74±0.10 ^b	3.59±0.15 ^a

*Means ± standard with different letters are significantly different according to Tukey's test ($p \leq 0.05$)

Table 2. Comparison of different culture systems on survival (%) and morphological parameters of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) during acclimatization.

Culture systems	Survival (%)	Plant length (cm)	No. leaves/Plant	No. Roots/Plant	Root length (cm)
Semi-solid	100.00±0.00 ^a	10.83±0.16 ^b	5.00±0.00 ^{bc}	2.80±0.57 ^b	6.37±1.35 ^a
Partial Immersion	100.00±0.00 ^a	11.83±0.60 ^{ab}	6.00±0.00 ^{ab}	3.66±0.66 ^{ab}	6.27±0.60 ^a
TIS:					
SETIS	100.00±0.00 ^a	13.16±0.33 ^a	6.33±0.57 ^a	5.33±0.33 ^a	6.05±0.49 ^a
Ebb-and-Flow	100.00±0.00 ^a	9.00±0.28 ^c	4.66±0.57 ^c	3.66±0.33 ^{ab}	4.30±0.72 ^b
TIB	96.66±3.33 ^a	7.13±0.18 ^d	4.66±0.57 ^c	2.66±0.33 ^b	2.40±0.46 ^b
MATIS	96.66±3.33 ^a	6.73±0.17 ^d	4.00±0.00 ^c	2.66±0.88 ^b	1.76±0.36 ^b

*Means ± standard with different letters are significantly different according to Tukey's test ($p \leq 0.05$)

Figure 1.

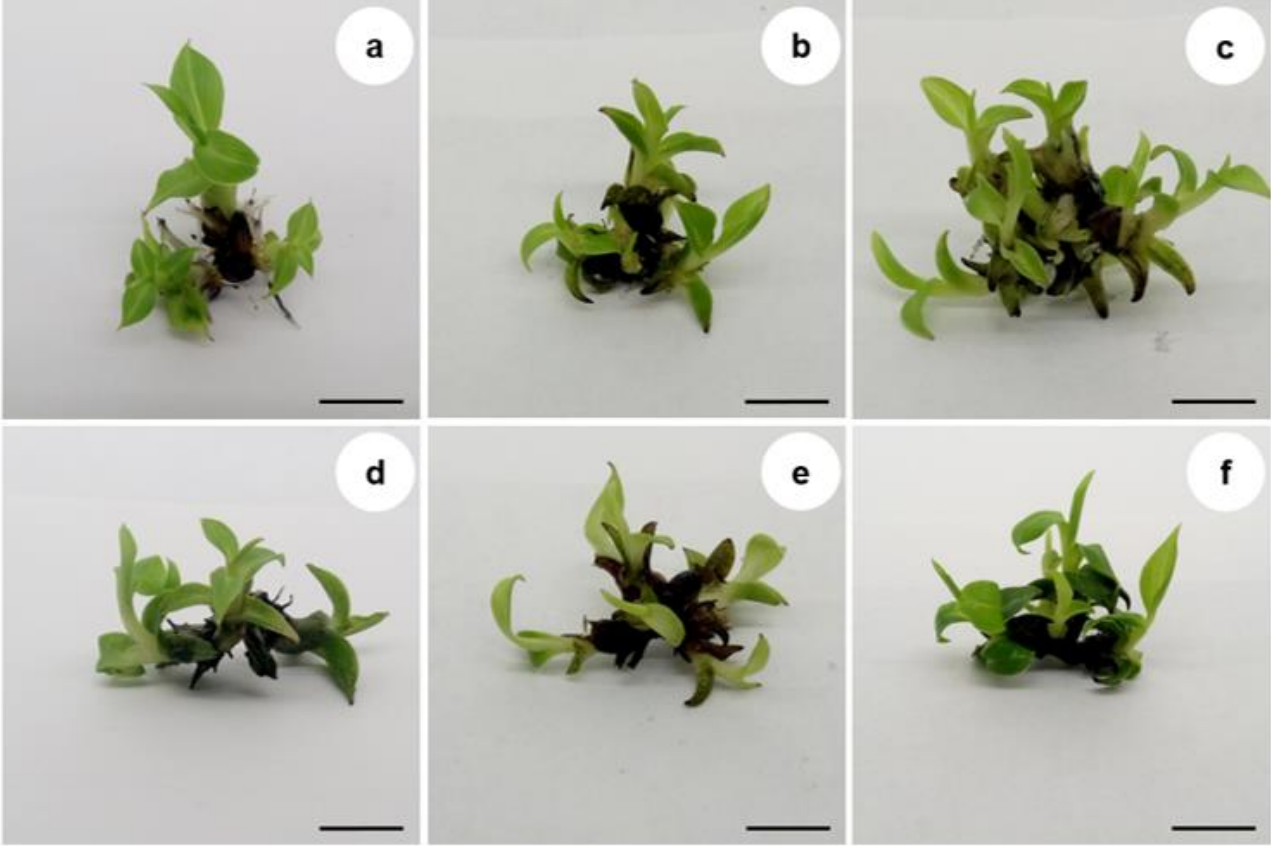


Figure 2.

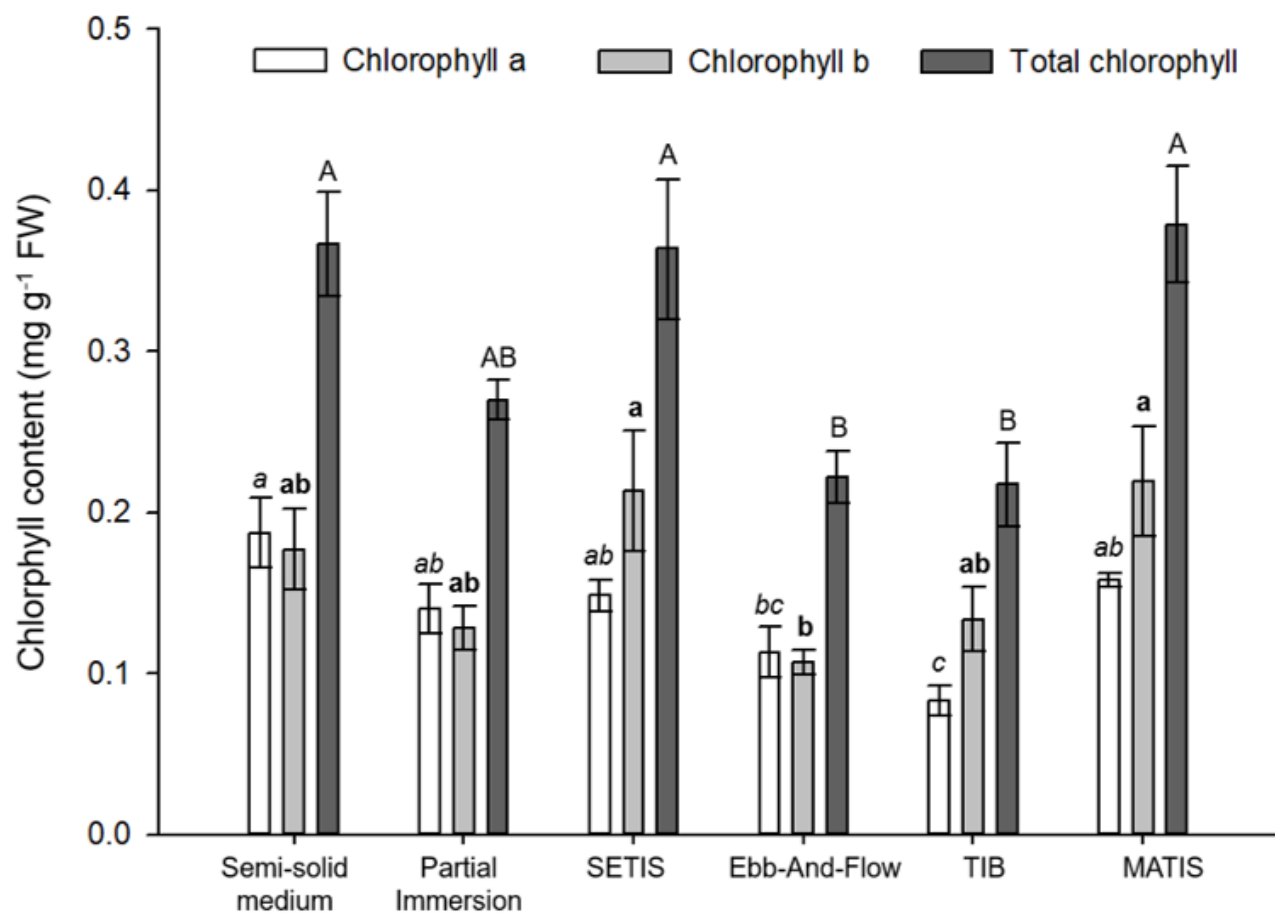


Figure 3.

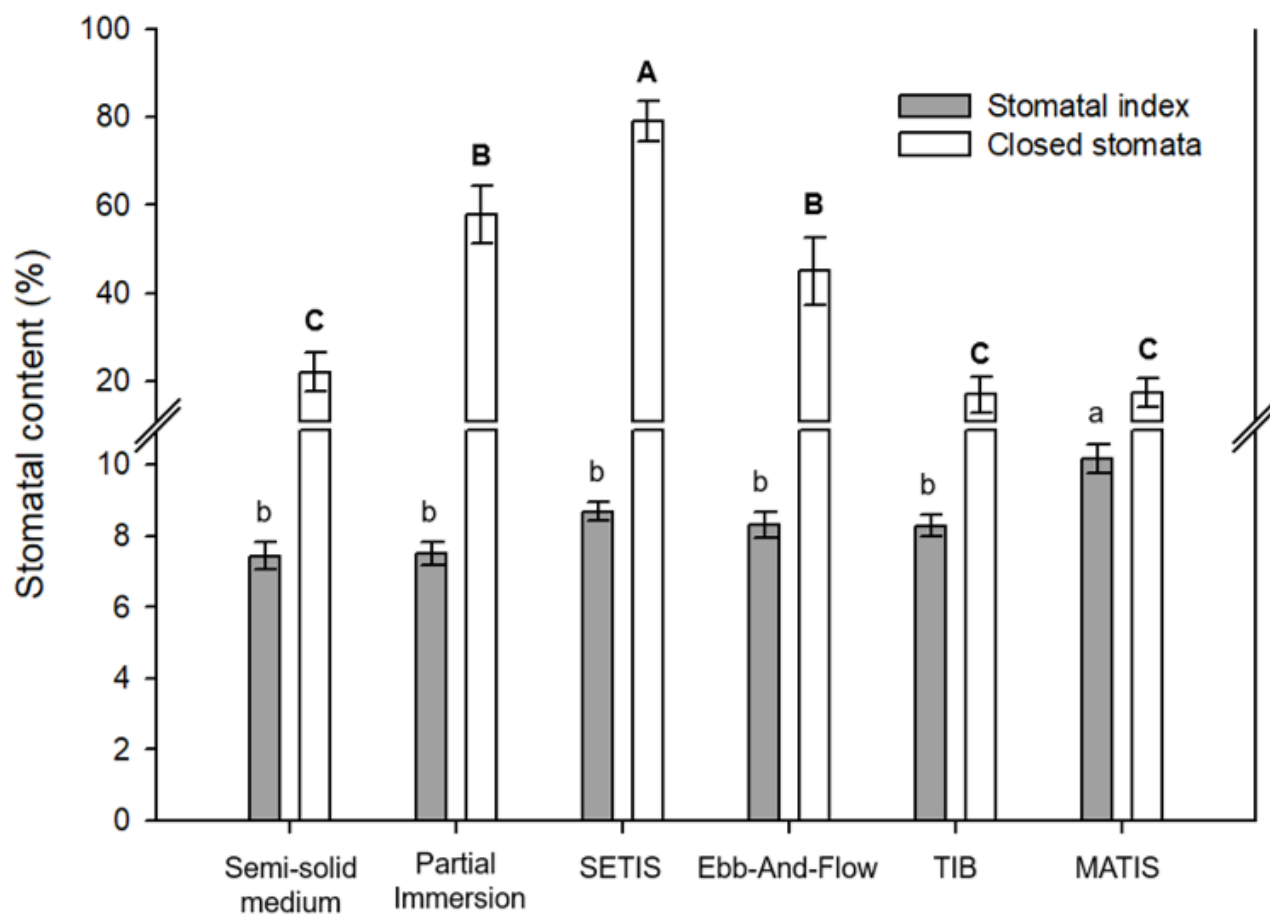


Figure 4.

