

**Estudio sobre el efecto como fortificante de extractos de diferentes partes de la planta *Moringa oleífera* en el crecimiento y desarrollo de plantas de banano (*Musa AAA*) var. Williams obtenidas *in vitro*.**

**Autor: Alexander Moreno Herrera**

---

**Tesis doctoral UDC / 2023**

**Directora: María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga**

**Directora: Nieves del Pilar Vidal González**

**Programa de doctorado en Biotecnología Avanzada**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**







LA DRA. MARÍA DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA, CATEDRÁTICA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA Y LA DRA. NIEVES PILAR VIDAL GONZÁLEZ, CIENTÍFICA TITULAR EN LA MISIÓN BIOLÓGICA DE GALICIA SEDE SANTIAGO DE COMPOSTELA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**CERTIFICAN:**

Que la presente tesis doctoral titulada “Estudio sobre el efecto como fortificante de extractos de diferentes partes de la planta *Moringa oleifera* en el crecimiento y desarrollo de plantas de banano (*Musa AAA*) var. *Williams* obtenidas in vitro” presentada por el ingeniero agrónomo ALEXANDER MORENO HERRERA ha sido realizada en el Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (Machala, Ecuador) bajo nuestra dirección, y dentro del programa de doctorado de Biotecnología Avanzada y cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Biotecnología Avanzada.

Y para que así conste firmamos la presente certificación en A Coruña y Santiago de Compostela a 28 de abril del 2023

Fdo.: M<sup>a</sup> de los Angeles Bernal Pita da Veiga

Fdo.: Nieves Pilar Vidal González

Código Seguro De Verificación	ogysaW0aM4v/IJFF1g--	Estado	Data e hora	
Asinado Por	Maria de los Angeles Bernal Pita Da Veiga	Asinado	28/04/2023 12:58:13	
Observacións		Páxina	1/1	
Url De Verificación	<a href="https://sede.udc.gal/servicios/validation/ogysaW0aM4v/IJFF1g--">https://sede.udc.gal/servicios/validation/ogysaW0aM4v/IJFF1g--</a>			
Normativa	Este informe ten o carácter de copia electrónica auténtica con validez e eficacia administrativa de ORIGINAL (art. 27 Lei 39/2015).			



## **Resumen:**

El estudio realizado durante el crecimiento y desarrollo de plantas de Moringa incluyó la caracterización bioquímica de sus órganos a partir de extractos metanólicos y acuosos, observándose que las hojas de plantas en fase vegetativa y floral son ricas en nitrógeno, contenido de fenoles solubles y actividad antioxidante. Para evaluar la actividad fortificante de esta planta se prepararon diferentes concentraciones de extractos acuosos procedentes de fases vegetativa y floral y se aplicaron a vitroplantas de banano clon Williams que habían sido aclimatadas durante seis semanas. A los 21 días de la aplicación se obtuvieron plantas fortificadas con órganos de mayor crecimiento morfológico, contenido de fenoles solubles y actividad antioxidante. En las hojas se obtuvo mayor contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, así como una menor fuga de electrolitos de membranas celulares. Para la optimización del cultivo *in vitro* de banano se utilizaron plantas de banano locales brotadas en invernadero, lo que facilitó el establecimiento de cultivos asépticos e incrementó la capacidad de proliferación. El uso de sistemas de inmersión temporal RITA® aumentó la eficiencia de la multiplicación *in vitro*. Este sistema se utilizó para crear un prototipo local con contenedores y tapa de polipropileno que propició la producción de vitroplantas vigorosas cuando se añadió al medio de cultivo extracto acuoso de hojas de Moringa en fase floral.

**Palabras clave:** Moringa, banano, desarrollo, fenoles solubles, antioxidantes, fitoquímico, peroxidasa, cultivo *in vitro*, sistemas de inmersión temporal

## **Resumo:**

O estudo realizado durante o crecemento e desenvolvemento das plantas de Moringa incluíu a caracterización bioquímica dos seus órganos a partir de extractos metanólicos e acuosos, observándose que as follas das plantas en fase vexetativa e floral son ricas en nitróxeno, e teñen un elevado contido de fenóis solubles, así como unha elevada actividade antioxidante. Para avaliar a actividade fortificante desta planta, preparáronse diferentes concentracións de extractos acuosos de follas procedentes de plantas en fases vexetativa e floral que se aplicaron a vitroplantas de banano clon Williams que levaban seis semanas aclimatadas. Vinte e un días despois da aplicación, obtivéronse plantas fortificadas, con órganos de crecemento

morfolóxico máis elevados, altos contidos de fenóis solubles soluble e alta actividade antioxidante. Nas follas obtívose un maior contido de clorofilas, así como unha menor fuga de electrólitos das membranas celulares.

Para a optimización do cultivo *in vitro* de banana utilizáronse plantas de banana locais brotadas en invernadoiros, o que facilitou o establecemento de cultivos asépticos e aumentou a súa posterior capacidade de proliferación. O uso dos sistemas de inmersión temporal RITA® aumentou a eficiencia da multiplicación *in vitro*. Este sistema utilizouse para crear un prototipo local con recipientes e tapa de polipropileno que favoreceu a produción de vitroplantas vigorosas ao engadir ao medio de cultivo extracto acuoso de follas de Moringa en fase floral.

## **Summary**

The study carried out during the growth and development of Moringa plants included the biochemical characterization of their organs using methanolic and aqueous extracts. It was observed that leaves in the vegetative and floral phase are rich in nitrogen and have high soluble phenol content and antioxidant activity. To evaluate the fortifying activity of Moringa plants, different concentrations of aqueous extracts from the vegetative and floral phases were applied to banana *in vitro* plants of the “Williams” clone that had been acclimated for six weeks. Twenty-one days after the extract application, treated plants showed more growth, higher soluble phenol content and higher antioxidant activity than controls, whereas leaves had higher content of chlorophylls and lower leakage of electrolytes from cell membranes.

For the optimization of *in vitro* banana cultivation, local banana plant material was sprouted in a greenhouse, this facilitated the establishment of aseptic cultures and increased the proliferation capacity. The use of RITA® temporary immersion systems increased the efficiency of *in vitro* multiplication. This system was used to design and assemble a local prototype using polypropylene containers. Banana *in vitro* plants cultured in this prototype showed more vigour when the culture medium was supplemented with aqueous Moringa extracts obtained from leaves of plants in the floral phase.

La investigación ha sido realizada en la Facultad de Ciencias Agropecuarias (Machala, Ecuador) bajo la tutela del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña (A Coruña) y el Grupo de Biología de Especies Leñosas del Departamento de Producción Vegetal de la Misión Biológica de Galicia (Sede Santiago de Compostela), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Resultados sobresalientes en la investigación han sido divulgados en los siguientes trabajos:

**Publicaciones:**

Moreno Herrera, A., García Batista, R. G., García, C., & Montes de Oca Suárez, J. L. (2017). Análisis sistémico sustentable de una Biofábrica de vitroplantas en predios agrícolas de la UTMACH, Ecuador. *Revista Científica Agroecosistemas*, 5(1-Ext),140-149.

Ugarte-Barco, F., Lima Morales, K. A., Bernal Pita Da Veig, M. A., & Moreno-Herrera, A. (2018). Estudios preliminares del efecto fortificante de extractos de *Moringa Oleifera* Lam. en vitroplantas del clon Williams en aclimatación. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(2), 47-55.

Ordoñez Castillo, F. M., Bernal Pita Da Veiga, M. A., Vidal Gonzalez N. P., & Moreno Herrera, A. (2019). Efectos antioxidantes de *Moringa oleifera* LAM en vitroplantas de banano clon Williams enraizadas en sistemas de inmersión temporal RITA. *Revista Científica Agroecosistemas*, 7(3), 57-63.

Castillo Ontaneda, A. L., Moreno Herrera, A., García Batista, R. M. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional in vitro. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173 - 182.

Ugarte Barco, F. A., Bernal Pita Da Vega, M. A, Vidal González, N. P, & Moreno Herrera, A. (2021). Prototipo de sistema de inmersión temporal en fase de multiplicación en la micropropagación de banano Clon Williams.

**Comunicaciones en congresos nacionales:**

Francisco Ugarte-Barco, Yimabel Lalangui Paucar, Kevin Andrés Lima Morales, Alexander Moreno-Herrera. 2017. Efecto fortificante de extractos de Moringa oleifera L. en vitroplantas de banano clon Williams en aclimatación. 3eras Jornadas de Investigación Estudiantil UTMACH 2017.

**Comunicaciones en congresos internacionales:**

Moreno, A., Bernal, Á., Ugarte, F., Lima, K., Coig, M., Sánchez, C., Aldrey, A., & Vidal, N. (2019). Use of liquid medium and biofortificants for improving micropropagation and acclimation of Musa AAA cv. Williams. Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges. In: Bonga JM, Park YS, Trontin JF (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on "Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges." September 10-15, 2019. Coimbra, Portugal.

Moreno, A., N. Vidal, F. Ugarte, K. Lima, A. Bernal. (2018). Cultivo *in vitro* de banano y efecto fortificante de la Moringa. IV Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad y el XV Foro Internacional de Banano, Guayaquil, Ecuador.

**Pósters en congresos nacionales:**

Moreno Herrera A, Bernal Pita da Veiga A, Coig O'Donnell M, Sánchez Fernández C, Vidal González. Sistemas alternativos del cultivo in vitro para la multiplicación eficiente del banano (Musa AAA) variedad Williams" SECIVTV2017: Plants in vitro for the future. Madrid, 13-15 septiembre, 2017. Libro de abstracts, página 134.

## **Dedicatoria**

*A Dios por permitirme cada momento de aprendizaje.*

*A mi esposa Sally Elizabeth Gonzaga González*

*A mis padres Onelia Juliana Herrera Rodríguez y Omar Moreno Munguía*

*A mi hermano Alexey Fernández Herrera*

*A mis estudiantes de Fisiología y Biotecnología Vegetal que cada día se forman en la Universidad Técnica de Machala.*

## **Agradecimientos**

*A Dios por permitirme hoy culminar con salud el presente trabajo de investigación.*

*A mis tutoras María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga y Nieves del Pilar Vidal González por sus enseñanzas, dedicación y paciencia en mi preparación.*

*A mi esposa Sally Elizabet Gonzaga González por su amor y entrega en cada momento como pilar indispensable a mi lado en este estudio.*

*A la Universidad Técnica de Machala por la beca otorgada para este estudio Doctoral.*

*A las autoridades de la Universidad Técnica de Machala que mediante el proyecto “Micropropagación de plantas, del cultivo de células y tejidos para obtener material vegetal de calidad para Alimentación - Fitofarmacología” se creó y habilitó los espacios del laboratorio de Micropropagación Vegetal en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.*

*A los estudiantes integrantes del Grupo de Investigación Agrobiología de las Plantas “AgroPlant”: Carlos Eduardo Romero Ruiz, Kevin Andrés Lima Morales, Francisco Ugarte-Barco, Franklin Miguel Ordoñez Castillo, próximos a graduarse otros hoy Ingenieros Agrónomos productos a las investigaciones.*

*A los estudiantes de la asignatura de Biotecnología Vegetal que cada semestre apoyaron las actividades curriculares y el proyecto en el laboratorio de Micropropagación Vegetal y área de aclimatación de plantas.*

*A mi compañero de trabajo y amigo Irán Rodríguez Delgado por su apoyo en la motivación y colaboración de los diferentes momentos de este arduo trabajo.*

*A aquellas personas que de una forma u otra colaboraron con este trabajo y que hoy no están con nosotros.*

*A mi mascota Jully que hoy extrañamos tanto, por acompañarme todas las largas noches de estudio.*

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	21
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	21
2. OBJETIVOS	25
3. CAPÍTULO I	27
Estudio de extractos de órganos de <i>Moringa oleifera</i> Lam en fases de crecimiento y desarrollo.	
3.1. INTRODUCCIÓN	29
Extractos como fuentes nutricionales y bioactivos	29
Extractos y actividad peroxidasa EC 1.11.1.7	31
Localización subcelular de peroxidasa	33
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Material vegetal	35
Preparación de las muestras de órganos deshidratados	36
Caracterización de la composición mineral del material vegetal	37
Contenido de fenoles solubles	37
Actividad antioxidante total	39
Peroxidasa (PRX)	41
Actividad de peroxidasa protoplástica y apoplástica	44
Fraccionamiento subcelular	45
Extracción de enzimas enlazadas a membranas celulares	45
Extracción de enzimas enlazadas a paredes celulares	46
Procedimiento estadístico	47
3.3. RESULTADOS	48
Análisis de la composición mineral en órganos de <i>M. oleifera</i>	48
Contenido de fenoles solubles en órganos de <i>M. oleifera</i>	49
Capacidad antioxidante total en órganos de <i>M. oleifera</i>	51
Actividad peroxidasa en hojas	53
Actividad peroxidasa en hojas por técnica infiltración al vacío.	55
Fraccionamiento subcelular de la actividad peroxidasa en hojas	58
3.4. DISCUSIÓN	61
Composición mineral en órganos de <i>M. oleifera</i>	61
Contenido de fenoles solubles en plantas	62
Capacidad antioxidante total en plantas	63
Actividad peroxidasa en hojas	64
Actividad de peroxidasa soluble protoplástica y apoplástica en hojas	66
Fraccionamiento subcelular de la actividad de peroxidasa en hojas	67

4. CAPÍTULO II	69
Efecto fortificante de extractos acuosos de hojas de Moringa oleifera Lam de estado vegetativo y floral in vitro en plantas de banano (Musa AAA) clon Williams en condiciones de aclimatación.	
4.1. INTRODUCCIÓN	71
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	74
Material vegetal	74
Diseños experimentales	76
Modelo matemático	76
Primer experimento	77
Segundo experimento	77
Método de elaboración de los extractos	78
Toma de muestras y recolección de datos	79
Parámetros morfológicos	80
Fuga de electrolitos	81
Contenido de pigmentos fotosintéticos	82
Contenido de fenoles solubles	82
Actividad antioxidante total	83
Actividad de peroxidasa y contenidos de proteínas solubles	83
Procedimiento estadístico	83
4.3. RESULTADOS	85
Crecimiento foliar	85
Crecimiento del pseudotallo	87
Peso fresco, peso seco y cenizas	90
Protección de membrana celular	92
Estado del contenido de pigmentos fotosintéticos	93
Contenido de fenoles solubles	97
Actividad antioxidante total	100
Actividad de peroxidasa y contenidos de proteínas solubles	105
4.4 DISCUSIÓN	107
5. CAPÍTULO III	115
Control eficiente del cultivo in vitro de genotipos de banano (Musa AAA) clon Williams.	
5.1. INTRODUCCIÓN	117
Cultivo in vitro de Musa sp.	117
Automatización del cultivo in vitro	119
Extractos vegetales en la elicitación del cultivo in vitro	121

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	123
Material vegetal	123
Condiciones establecidas para el material vegetal donante	123
Establecimiento y multiplicación in vitro de genotipos de banano	125
Alternativas de sistemas de cultivo in vitro en banano	129
Prototipo de sistema de inmersión temporal local	132
Eficiencia de sistema de inmersión temporal RITA® en fase de enraizamiento de banano	136
Fortificante en Sistema de Inmersión Temporal RITA®	137
Contenido de fenoles solubles	138
Actividad antioxidante total	139
Actividad de peroxidasa y contenidos de proteínas solubles	139
Procedimiento estadístico	139
5.3 RESULTADOS	141
Respuesta in vitro de genotipos de banano Williams	141
Automatización in vitro de genotipos de banano Williams	143
Efectos de los sistemas PSITL en multiplicación	158
Eficiencia de Sistema RITA® durante el enraizamiento y respuesta durante la aclimatación de genotipos de banano Williams	161
Fortificación de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas RITA® con extractos de <i>Moringa oleifera</i>	165
5.4. DISCUSIÓN	169
Asepsia y estados iniciales in vitro en banano Williams	169
Automatización en la producción de genotipos de banano Williams	172
Alternativa de Prototipo PSITL en multiplicación de genotipos de banano Williams	176
Eficiencia y fortificación de genotipos de banano Williams enraizadas en sistemas RITA®	181
6. CONCLUSIONES	185
7. BIBLIOGRAFÍA	189

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Distribución mundial de *M. oleifera*. 21
- Figura 2. Plantas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral. A. Plántulas en estado vegetativo de 20 días de edad. B. Plantas en estado floral con rebrote de 26 días de edad. C. Plantas en estado floral a los dos años de sembrada. 36
- Figura 3. Material vegetal de plantas de *M. oleifera* utilizadas en la caracterización del potencial fitoquímico. A. Hojas. B. Raquis. C. Tallo. D) raíz. E) flores. F) soporte floral. G) semillas. H) secado de órganos de *M. oleifera* en la estufa. 37
- Figura 4. Recta de calibrado con absorbancias obtenidas según las diferentes concentraciones de ácido gálico. 38
- Figura 5. Recta de calibrado en relación de Reducción DPPH, ante diferentes concentraciones de Trolox. 41
- Figura 6. Recta de calibrado mediante diferentes concentraciones de BSA. 43
- Figura 7. Contenido de fenoles solubles en órganos de *M. oleifera* en diferentes estados fenológicos. (GAE) equivalentes de ácido gálico. A) Plántulas a 20 días (estado vegetativo), n: 48 unidades. B) Plantas de rebrote (estado floral) de 26 días, n:48 unidades. C) Plantas arbóreas (estado floral) de 2 años, n:84 unidades. Medias con letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas entre extractos y órganos de plantas para un  $p\text{-valor}\leq 0,05$  (prueba de Tukey). 50
- Figura 8. Actividad antioxidante total en órganos de *Moringa oleifera* LAM en diferentes estados fenológicos. Equivalentes Trolox (TE); A) Plántulas (estado vegetativo) de 20 días, n:48 unidades. B) Plantas de rebrote (estado floral) de 26 días, n:48 unidades. C) Plantas arbóreas (estado floral) de 2 años, n:48 unidades. Medias con letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas entre extractos y órganos de plantas para un  $p\text{-valor}\leq 0,05$  (prueba de Tukey). 52
- Figura 9. Actividad peroxidasa en hojas de plantas de *M. oleifera* en diferentes estados fenológicos. A) Actividad de enzimática de peroxidasa, n:9 unidades. B) Contenido de proteínas solubles, n:9 unidades. C) Actividad específica de peroxidasa, n:9 unidades. Medias con letras diferentes, indican diferencias significativas entre estados fenológicos para un  $p\text{-valor}\leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes). 54
- Figura 10. Modelo de evaluación fortificante de vitroplantas de Clon Williams en condiciones de aclimatación para cada experimento. A: Vitroplantas de banano libres de sustrato B: Sustrato de soporte artificial y solución nutritiva utilizados C:

- Vitroplantas de banano expuestas a extractos acuosos de *M. oleifera* de fase vegetativa y floral. D: Condiciones de invernadero. 75
- Figura 11. A. Plántulas de *M. oleifera* en estado vegetativo. B. Plantas de *M. oleifera* en estado floral. 78
- Figura 12. Vitroplantas de Clon Williams establecidas en condiciones de aclimatación. A: Eliminación de soporte artificial. B: Secado en papel de filtro C: Vitroplantas de banano en macetas listas para análisis bioquímico. 81
- Figura 13. Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en número, longitud y ancho de hoja emitida por vitroplantas de banano Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor}\leq 0,05$ ) según prueba de Duncan. 87
- Figura 14. Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en el diámetro y longitud del pseudotallo en vitroplantas de banano Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencia significativa ( $p\text{-valor}\leq 0,05$ ) para prueba Duncan. 89
- Figura 15. Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en la peso fresco, seco y cenizas en vitroplantas de banano Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencia significativa ( $p\text{-valor}\leq 0,05$ ) para prueba Duncan. 91
- Figura 16. Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en la conductividad eléctrica de discos de hojas por vitroplantas de banano Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencia significativa ( $p\text{-valor}\leq 0,05$ ) para prueba Duncan. 96
- Figura 17. Procedimiento Corte en cruz de la yema apical y adición en la cavidad herida del meristemo de 6-benzylaminopurine (6-BAP) para estimular la brotación de yemas laterales en genotipos de banano (Musa AAA) cv. Williams cultivado en canteros e invernaderos. A) Corte de yema apical, B) Adición de 6-BAP en heridas. 125
- Figura 18. Establecimiento in vitro de genotipos de banano (Musa AAA) cv. Williams cultivados en condiciones de El Oro. A) Plantas madre que crecen en sistemas

productivos locales, B) Genotipos seleccionados establecidos en canteros experimentales de la UTMACH, C) Cultivo de bananos sobre macetas en invernadero, D) Explantes para establecimiento *in vitro*, E) Paso de preesterilización en un agitador comercial, F) Explantes inoculados, G) Vitroplanta tres semanas después de la inoculación, H) Explante seccionado transversalmente para detectar contaminantes endógenos y eliminación dominancia apical. 127

Figura 19. Multiplicación *in vitro* de genotipos de banano (*Musa AAA*) cv. Williams cultivados en condiciones de El Oro. A) Líneas asépticas con explante seccionado transversal completamente en cuatro secciones, para confirmar contaminantes endógenos e inducción yemas laterales, B) Respuesta de genotipos a 21 días del primer subcultivo desde explantes con apariencia vigorosa, seleccionados para iniciar cultivos asépticos, C) Vitroplantas de tipo I, destinada a siembras en medios semisólidos y líquidos, D) Clasificación de Brotes Tipo I (BTI), Brotes Tipo II (BTII), Brotes Tipo III (BTIII). 128

Figura 20. Sistemas convencionales y de Inmersión Temporal en el cultivo *in vitro* de genotipos de banano (*Musa AAA*) cv. Williams de la provincia de El Oro. A) Jarras de cristal con medio semisólido, B) sistemas de inmersión temporal RITA®, C) sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, D) sistemas de doble frasco (SDF). 130

Figura 21. Propuesta de prototipo de sistema de inmersión temporal local (PSITL). A) Sistemas (PSITL), B) recipiente externo y material para confección de canasta superior, C) Recipiente interno compuesto por canasta superior como soporte de plantas fijado con perno a canasta inferior para permitir volumen de medios de cultivo líquido, D) Tapa con pernos conductores de entrada y salida de aire. 133

Figura 22. Sistemas valorados en fase de multiplicación de genotipos de banano. A) Jarras con medios semi sólidos, B) sistemas de inmersión temporal RITA®, C) Prototipo de sistema de inmersión temporal local (PSITL). 134

Figura 23. Efecto de los sistemas de cultivo en la respuesta *in vitro* y *ex vitro* de genotipos de banano Williams. Fase de multiplicación (21 días): A) Sistema con medios de cultivo semisólido. B) Sistema de inmersión temporal RITA®. C) Sistema de inmersión temporal PLANTFORM™. D) Sistemas de doble frasco (SDF). E) Clústeres obtenidas en semisólido. F) Clústeres obtenidas en RITA®; G) Clústeres obtenidas en PLANTFORM™. H) Clústeres obtenidas en SDF; vitroplantas en fase de enraizamiento (21 días): I) Cultivadas en semisólido. J) Cultivadas en RITA®, K) Cultivadas en PLANTFORM™. L) Cultivadas en SDF; vitroplantas en fase de

aclimatación (42 días). M) Originadas en semisólido. N) Originadas en RITA®. Ñ) Originadas en PLANTFORM™. O) Originadas en SDF. 150

Figura 24. Aspecto de los brotes obtenidos a las 3 semanas de su multiplicación en distintos sistemas de cultivo (medio semisólido e inmersión temporal comercial o local). Los brotes cultivados en medio líquido se sometieron a 8 inmersiones diarias de 4 minutos de duración. A) Sistema en medio de cultivo semisólido (MSS), B) Sistema de inmersión temporal RITA®, C) Sistema de inmersión temporal de prototipo local (PSITL), D) Calidad de vitroplantas obtenidas en Sistemas PSITL, E) Vitroplantas obtenidas en sistemas MS, F) Vitroplantas obtenidas en Sistema RITA®, G) Vitroplantas obtenidas en Sistema PSITL. 160

Figura 25. Efecto del sistema de cultivo *in vitro* en la producción de fenoles y actividad antioxidante en vitroplantas de banano multiplicadas en sistemas convencionales y sistemas de inmersión temporal. A) Contenido de fenoles solubles (CFS), B) Actividad antioxidante (AA). Sistemas de cultivo en semisólido (MSS), sistemas de inmersión temporal RITA®, sistemas de inmersión temporal en prototipo local (PSITL). Los valores representan la media, con  $\pm$  error estándar total para CFS: 0,79 y AA: 20,18. Las muestras fueron tomadas de 3 réplicas de sistemas y 3 brotes tipo I para generar nueve caracterizaciones de cada variable por sistema, a 21 días de ser multiplicadas en sistemas. Medias con letras diferentes por variable, indican diferencias significativas entre sistemas de cultivo para  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes). 161

Figura 26. Efecto del sistema de cultivo y del ciclo de inmersiones en biorreactores RITA® en el enraizamiento y respuesta ex vitro de genotipos de banano Williams. El enraizamiento tuvo lugar durante 3 semanas en MSS o biorreactores con 4 minutos de inmersión 3, 6 o 8 veces al día. A) Sistemas de medios de cultivo semisólido (MSS), B) Sistemas de inmersión temporal RITA®, C) Sistemas de inmersión temporal RITA® con vitroplantas enraizadas, D) Vitroplantas obtenidas en MSS, E) Vitroplantas obtenidas en RITA®, programados a 3 ciclos de inmersiones, F) Vitroplantas obtenidas en RITA®, programados en 6 ciclos de inmersiones, G) Vitroplantas obtenidas en RITA®, programados en 8 ciclos de inmersiones, H) Microtúnel de endurecimiento, I) Vitroplantas de 3 semanas en bandeja, J) Calidad de vitroplantas de 3 semanas para trasplante a funda, K) Vitroplantas (42 días de aclimatación) en funda de polipropileno. 164

Figura 27. Efecto de los extractos de hojas de *M. oleifera* en el aspecto de genotipos de banano enraizados en sistemas de inmersión temporal RITA®. Sistemas en

enraizamiento (3 semanas), frecuencias de exposición de vitroplantas a medios de cultivo con inmersiones de 8 ciclos y 4 minutos de exposición. A) RITA® y medios MS, B) RITA® y medios MS más etanol 80% (MSE), C) RITA® y medio MS más extracto etanólico de *M. oleifera* (MSEE), D) RITA® y medio MS más extracto acuoso de *M. oleifera* (MSEA), E) Vitroplantas obtenidas en MS, F) Vitroplantas obtenidas en MSE, G) Vitroplantas obtenidas en MSEE, H) Vitroplantas obtenidas en MSEA 167

Figura 28. Efecto de los extractos de hojas de *M. oleifera* en el contenido de fenoles solubles y actividad antioxidantes de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas de inmersión temporal RITA®. A) Contenido de fenoles solubles (CFS), B) Actividad antioxidante (AA). RITA® y medios MS, RITA® y medios MS más etanol 80% (MSE), RITA® y medio MS más extracto etanólico de *M. oleifera* (MSEE), RITA® y medio MS más extracto acuoso de *M. oleifera* (MSEA). Los valores representan la media, con  $\pm$  error estándar total para CFS: 0,28 y AA: 7,03. Las muestras fueron tomadas de 3 réplicas de sistemas y 3 brotes tipo I para generar 9 caracterizaciones de cada variable por sistema, a 21 días de enraizamiento en sistemas programados a inmersiones de 8 ciclos y 4 minutos de exposición al medio de cultivo. Medias con letras diferentes por variable, indican diferencias significativas entre sistemas de cultivo para  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes). 168

## ÍNDICE DE TABLAS

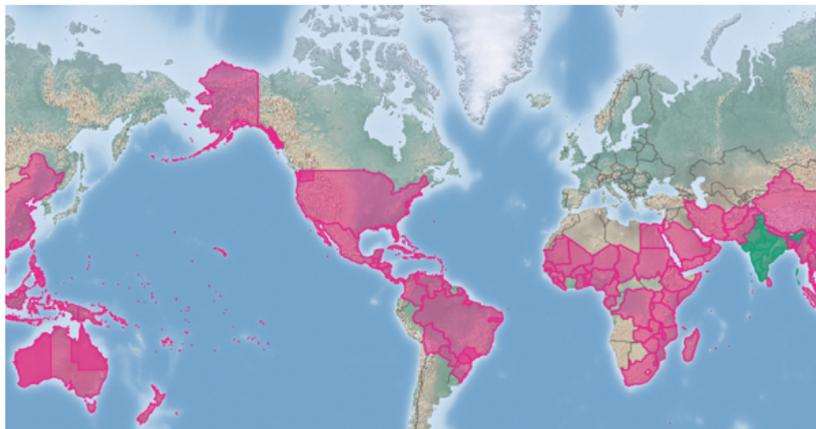
Tabla 1. Resultados de análisis de composición mineral de polvos de órganos de <i>M. oleifera</i> .	48
Tabla 2. Distribución de actividad peroxidasa protoplástica y apoplástica en hojas de plantas de <i>M. oleifera</i> en diferentes estados fenológicos.	57
Tabla 3. Distribución de las actividades peroxidasa según técnica de fraccionamiento celular en hojas de plantas de <i>M. oleifera</i> con diferentes estados fenológicos.	60
Tabla 4. Efecto de extractos acuosos de hojas de <i>M. oleifera</i> de diferentes estados fenológicos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de plantas de banano ( <i>Musa</i> AAA) variedad Williams, a los 7 días en condiciones de aclimatación.	94
Tabla 5. Efecto de extractos acuosos de hojas de <i>M. oleifera</i> de diferentes estados fenológicos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de plantas de banano ( <i>Musa</i> AAA) variedad Williams, a los 14 días en condiciones de aclimatación.	95
Tabla 6. Efecto de extractos acuosos de hojas de <i>M. oleifera</i> de diferentes estados fenológicos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de plantas de banano ( <i>Musa</i> AAA) variedad Williams, a los 21 días en condiciones de aclimatación.	97
Tabla 7. Efecto de extractos acuosos de hojas de <i>M. oleifera</i> en estado vegetativo y floral en el contenido de fenoles solubles de plantas de banano ( <i>Musa</i> AAA) variedad Williams, en condiciones de aclimatación.	100
Tabla 8. Efecto de extractos acuosos de hojas de <i>M. oleifera</i> en estado vegetativo y floral en la actividad de antioxidante total de plantas de banano ( <i>Musa</i> AAA) variedad Williams, en condiciones de aclimatación.	104
Tabla 9. Efecto de extractos acuosos de hojas de <i>M. oleifera</i> de diferentes estados fenológicos en actividad peroxidasa y contenido proteínas solubles de plantas de banano ( <i>Musa</i> AAA) variedad Williams, en condiciones de aclimatación.	106
Tabla 10. Número de explantes, volumen de medio de cultivo y capacidad de contenedores en sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de genotipos de banano	131
Tabla 11. Condiciones de sistemas <i>in vitro</i> convencionales, de inmersión temporal (RITA®) y alternativos (Prototipo Local) en fase de multiplicación de banano	135
Tabla 12. Ciclos de inmersión de biorreactores RITA® en fase enraizamiento de genotipos de banano	136
Tabla 13. Tratamientos de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas RITA® y expuestas a extractos de hojas de <i>M. oleifera</i>	138
Tabla 14. Respuesta <i>in vitro</i> de ápices de genotipos de banano Williams	142
Tabla 15. Obtención de brotes de banano en fase de multiplicación mediante el manejo de ápices meristemáticos	143

Tabla 16. Efecto del sistema de cultivo en el crecimiento de pseudotallos de banano en las fases de multiplicación, enraizamiento y su influencia en aclimatación	145
Tabla 17. Efecto del sistema de cultivo en el crecimiento foliar de banano en fases de multiplicación, enraizamiento y su influencia en aclimatación	147
Tabla 18. Efecto del sistema de cultivo en el peso de genotipos de banano <i>Williams</i> en fases de multiplicación, enraizamiento y su influencia en aclimatación	149
Tabla 19. Eficiencia de cuatro sistemas de cultivo en la obtención de brotes en fase de multiplicación de genotipos de banano <i>Willimas</i>	151
Tabla 20. Efecto del sistema de cultivo en el contenido de fenoles de órganos de banano <i>Williams</i> durante la multiplicación, enraizamiento <i>in vitro</i> y su posterior aclimatación.	153
Tabla 21. Efecto del sistema de cultivo durante las fases de multiplicación y enraizamiento <i>in vitro</i> en la actividad antioxidante (AA) de diferentes órganos de banano <i>Williams</i> en dichas fases y durante la aclimatación.	155
Tabla 22. Efecto del sistema de cultivo durante las fases de multiplicación y enraizamiento <i>in vitro</i> en la actividad peroxidasa de hojas de banano <i>Williams</i> en dichas fases y durante la aclimatación.	156
Tabla 23. Efecto del sistema de cultivo en el número de raíces y su contenido de fenoles y antioxidantes de vitroplantas de banano <i>Williams</i> .	157
Tabla 24. Efecto del sistema de cultivo (convencional, RITA® y prototipo local de inmersión temporal) en el crecimiento de genotipos de banano <i>Williams</i> durante la fase de multiplicación	158
Tabla 25. Efecto del sistema de cultivo (convencional, RITA® y prototipo local de inmersión temporal) en el tipo de brotes obtenidos en la fase de multiplicación de genotipos de banano <i>Williams</i>	159
Tabla 26. Efecto del sistema de cultivo y del número de inmersiones en biorreactores RITA® en el enraizamiento de genotipos de banano <i>Williams</i>	162
Tabla 27. Respuesta <i>ex vitro</i> de genotipos de banano <i>Williams</i> generadas en medio semisólido o mediante sistemas de inmersión temporal RITA® con 3, 6 y 8 inmersiones diarias	163
Tabla 28. Efecto fortificante de extractos de hojas de <i>M. oleifera</i> en el comportamiento morfológico de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas de inmersión temporal RITA®	166

## 1. INTRODUCCIÓN

### ***Moringa oleifera* Lam.**

*Moringa* es el único género de la familia *Moringaceae*, llamada también como marango y otros 100 nombres. Este género está compuesto por 13 especies (*M. hildebrandtii*, *M. borziana*, *M. arbórea*, *M. drouhardii*, *M. longituba*, *M. ovalifolia*, *M. rivaie*, *M. corcanensis*, *M. ruspoliana*, *M. stenopetala*, *M. peregrine*, *M. pygmaea*, *M. oleifera*) de tipo arbustiva, siendo la especie más popular *Moringa oleifera* Lam (Velázquez-Zavala et al., 2016). Esta especie es originaria de la India (Singh et al., 2020) y es conocida como Moringa, con una diversidad de adaptaciones a climas tropicales, subtropicales (figura 1) siendo considerada una planta invasiva (Vélez, 2017).



● Introducido      ● Nativo      ● Origen no reconocido

**Figura 1.** Distribución mundial de *M. oleifera*.

**Fuente:** (Vélez, 2017).

Según la clasificación taxonómica de *Moringa*, esta se ubica en el reino Plantae, subreino Tracheobionta, súper división Spermatophyta, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Dilleniidae, orden Capparales, familia Moringaceae, género *Moringa* y Especie *oleifera* (Dhongade et al., 2017). Esta especie se encuentra en el grupo de plantas leñosas, de tipo

arbusciva, con un tallo que alcanza hasta 10 metros de altura y raíces tuberosas. Con hojas pinnadas que se encuentran divididas en folíolos dispuestos sobre un raquis, que permiten la presencia de flores zigomórficas con cinco pétalos, cinco sépalos, cinco estambres funcionales y varios estaminodios pedicelos e inflorescencias axilares que generan frutos con forma de vaina larga que contiene las semillas trivalvas con alas longitudinales (Velázquez-Zavala et al., 2016).

Los requerimientos ambientales de la especie, le permiten adaptarse a un margen amplio de condiciones locales y su crecimiento no es afectado hasta una altitud de 2000 m. Esta planta puede tolerar un margen de temperaturas amplio (Muhammad et al., 2016), aunque el desarrollo óptimo lo alcanza de 24 a 32 °C, subóptimas de 22-24 a 30-32 °C y las marginales de <24 y >32 °C. Los requerimientos del pH del suelo son amplios, entre 4,5 y 9,0 aunque prefiere suelos bien drenados. La planta se adapta a suelos arcillosos o pesados que no presenten saturación por un tiempo prolongado (Reyes, 2016).

*M. oleifera* utilizada como extracto foliar, ha puesto en evidencia sus efectos fortificantes, mediante estudios como promotor de crecimiento de los cultivos. Su uso como planta bioestimulante es corroborado en plantas de trigo donde la pulverización foliar puede retrasar la maduración de los cultivos, extender el área foliar estacional y el período de llenado del grano, lo que conduce a una mayor semilla y rendimientos biológicos (Yasmeen et al., 2012). Se ha comprobado que extractos de *M. oleifera* mejoran el crecimiento del maíz híbrido cv Dekalb 5219 debido a un incremento en el contenido de clorofila y compuestos fenólicos de las plántulas procedentes de semillero (Basra et al., 2011a).

En respuesta al estrés, las plántulas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) superan el estrés por cloruro de sodio, como resultado del remojo previo en extracto de hoja de *M. oleifera*. El extracto incrementa el contenido de osmoprotectores, la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, así como, la relación  $K^+/Na^+$  (Rady et al., 2013).

En las condiciones de la provincia El Oro, la utilización de fortificantes naturales como extractos de *M. oleifera* es una alternativa que permite potencializar los sistemas productivos bananeros locales, que responden a

producciones limpias y sostenibles con el medio ambiente así como, el incremento del nivel de resiliencia de este cultivo.

Los avances en la investigación en los últimos años se encaminan a validar científicamente los usos tradicionales de *M. oleifera* al identificar los principios activos responsables de dichas actividades y profundizar en los mecanismos de acción (Nogales, 2019). El uso de estos extractos, permite el aprovechamiento de recursos naturales locales existentes en el territorio y su utilización para fortalecer las fases productivas del cultivo del banano. Las fases fenológicas de este cultivo evidencian la deficiente utilización de fortificantes a nivel local, donde lo recomendado ante esta situación es realizar estudios en mayor profundidad y con extractos estandarizados de *M. oleifera*, que posibiliten comparar los resultados obtenidos en diferentes valoraciones.

La introducción y diseminación de *M. oleifera* en el territorio ha sido como referente ornamental hasta el momento actual, lo cual demuestra su buena aceptación por las comunidades locales, acompañado de su excelente adaptación a las condiciones ambientales diversas que permite disponer de material vegetal todo el año. Esta disponibilidad convierte a la planta idónea para realizar estudios que permitan conocer su potencial fortificante en el ambiente; así como, la influencia de sus propiedades fotoquímicas en la especie prioritaria de cultivo local como es el banano variedad Williams. Esta variedad de interés local requiere del establecimiento de sistemas tecnificados que demandan de alternativas nutricionales orgánicas que reduzcan el estrés vegetal. Ante estas demandas locales, se ha trazado como hipótesis de trabajo que el extracto de *M. oleifera* presenta un efecto fortificante en vitroplantas de banano Williams. Ante estas demandas locales, se ha trazado como hipótesis de trabajo que el extracto de *M. oleifera* presenta un efecto fortificante en vitroplantas de banano Williams.



## 2. OBJETIVOS

La investigación ha tenido como objetivo principal determinar el efecto fortificante de extractos de diferentes partes de la planta de *M. oleifera* procedente de la zona del El Oro (Ecuador) en el crecimiento y desarrollo en vitroplantas de banano variedad Williams (Musa AAA).

Para el cumplimiento de este objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los extractos pertenecientes a diferentes partes de la planta de *M. oleifera* durante diferentes fases del desarrollo (vegetativo y floral) que demuestren su potencial como nutriente y antioxidante.
2. Determinar el efecto fortificante de extractos acuosos de hojas en diferentes estados fenológicos de la planta de *M. oleifera* en el crecimiento de vitroplantas de banano (*Musa AAA*) clon Williams en condiciones de aclimatación.
3. Establecer el cultivo *in vitro* de genotipos *banano Williams* mediante sistemas convencionales y de inmersión temporal eficientes para el fortalecimiento del material vegetal existente en la provincia de El Oro.

El presente trabajo ha dividido el cuerpo de la tesis en tres capítulos principales para favorecer su lectura.



### **3. CAPÍTULO I**

**Estudio de extractos de órganos de *Moringa oleifera* Lam en fases de crecimiento y desarrollo.**



### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### **Extractos como fuentes nutricionales y bioactivos**

Los extractos vegetales representan una fuente disponible de nutrientes o fitoquímicos que se convierten en los nuevos productos con propiedades bioactivas para promover una economía circular (Brito et al., 2022). A nivel local los extractos de *M. oleifera* representan una fuente valiosa de nutrientes y ricos en compuestos bioactivos.

La ubicación geográfica y momento del año condicionan el estado fisiológico de las plantas de Moringa, en especial la concentración de metabolitos debido a su interacción con factores abióticos locales como tipo y fertilidad de suelo, clima, así como la disponibilidad de agua. La composición nutricional en hojas es variable dependiendo de estos factores además de la procedencia y las prácticas de manejo (Afzal et al., 2020).

Las diversas condiciones en la distribución de la especie, evidencian la necesidad de estudios de caracterización del material vegetal local para declarar la potencialidad de sus diferentes órganos como hoja, tallo, raíz y semilla (Velázquez-Zavala et al., 2016). La hoja de la Moringa se caracteriza por presentar, en estados de crecimiento y desarrollo, un comportamiento variable en su composición como fuente fitoquímica Destacar contenido en proteínas, carbohidratos, grasas y aminoácidos esenciales (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, prolina, aspartato y glutamato en mayor cuantía). Este órgano es una fuente de vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, Vitamina E y en especial los contenidos de vitamina C. En relación al contenido mineral, destacar el calcio, potasio y hierro y en menor cuantía, el cobre, magnesio, sodio y zinc (Rubio, 2020). Las hojas (órgano más utilizado de la planta) son ricas en carotenoides, polifenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, glucosinolatos, isotiocianatos, taninos y saponinas (Leone et al., 2015).

Las hojas y raíces de *M. oleifera* presentan un importante potencial antioxidante que ayuda a prevenir daños causados por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Iqbal & Bhangar, 2006). Entre las ROS destaca peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxígeno singlete <sup>1</sup>O<sub>2</sub> así como los radicales anión

superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet-}$ ) (Carvajal, 2019). Estos radicales libres son moléculas parcialmente reducidas que poseen un electrón adicional en estado desapareado y esta configuración electrónica confiere a estas moléculas inestabilidad, fácil reacción con lípidos, proteínas así como con los ácidos nucleicos de su entorno (Vaquero-Raya & Molero-Richard, 2005; Chaverri & Rodríguez, 2018).

Los cloroplastos, mitocondrias, pared celular y peroxisomas son los principales lugares de generación de ROS. Cuando los mecanismos antioxidantes celulares responden de manera poco eficaz a los incrementos en concentración de ROS por encima de valores tolerables, se puede llegar a comprometer la supervivencia celular (Sainz et al., 2012).

Ante estas evidencias la confirmación de la actividad antioxidante en especies como *M. oleifera* es especialmente interesante, ya que en ella se identifican más de 40 antioxidantes naturales (Mahmood et al., 2010). Se ha observado la presencia de antioxidantes en diferentes órganos de la planta y en diferentes estados fenológicos.

Se han podido detectar tocoferoles (a-tocoferol, d-tocoferol, g-tocoferol) así como vainillina, quercitina, ácidos felúrico, gálico, elágico,  $\beta$ -caroteno, astrágalo, catequina, miricetina, ácido felúrico, ácido gálico, ácido elágico y kaempferol (Velázquez-Zavala et al., 2016).

En hojas de Moringa se han encontrado diversos fitoconstituyentes activos como alcaloides, proteínas, quinina, saponinas, flavonoides, taninos, esteroides, glucósidos, aceite y grasas; así como, niacina A, niacina B, niacimicina A y niacimicina B (Dhongade et al., 2017; Kumar et al., 2018). Esta diversidad de productos de actividades biológicas confirma el potencial de *M. oleifera*, donde (Ma et al., 2020) al realizar pretratamiento de semillas con aplicación de nanomateriales como nanopartículas de óxido de cinc (NZnO), incrementan fenoles, flavonoides y vitamina C.

En Ecuador la planta de Moringa es valorada como fuente proteica a partir de hojas y semillas, gracias a estudios realizados durante el estado vegetativo, así como en su proceso de almacenamiento (Coello et al., 2017). La diversidad de estudios locales confirma a las hojas como fuente de nutrientes proteicos, con una diversidad de aminoácidos, ácidos grasos saturados e insaturados; así como, carbohidratos (Isitua et al., 2015). En hojas de

diferentes edades y altura de planta, se ha evaluado la capacidad antioxidante en relación al contenido de alcaloides, fenoles totales, flavonoides y taninos (Cabrera et al., 2017).

Las características de *M. oleifera*, permiten realizar extractos de sus órganos como posibles fuentes de nutrición y antioxidantes en sistemas productivos locales, los cuales demandan de fuentes alternativas orgánicas fortificantes.

### **Extractos y actividad peroxidasa EC 1.11.1.7**

En los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, la participación de enzimas como las peroxidasas (PRXs) y su acción ante los ROS, demandan evidencias en la especie en estudio, así como la caracterización de sus funciones expresadas en un ambiente local. Cuando las condiciones fisiológicas son óptimas, las ROS se acumulan, distribuyen y se encuentran en rango óptimo por acción de diversos grupos de antioxidantes de bajo peso molecular, así como de enzimas antioxidantes que en este caso mantienen un equilibrio (Jovanović et al., 2018). Este tipo de enzimas son oxidorreductasas que utilizan peróxido de hidrógeno para catalizar reacciones oxidativas capaces de oxidar varios tipos de sustratos (Medina et al., 2017).

Las PRXs se encuentran relacionadas estructuralmente en superfamilias como peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas que responden a tres clases de enzimas basándose en sus diferencias en la secuencia de aminoácidos (Welinder, 1992). Las peroxidasas en plantas se identifican en clase I como ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) cloroplástica y citosólica en células vegetales, considerada como enzimas intracelulares muy termolábiles, así como, en clase II como peroxidasa (EC 1.11.1.7) que contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción con naturaleza glicoprotéica e inusual estabilidad térmica, localizadas en las paredes celulares y vacuolas (Hiraga et al., 2001). Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las peroxidasa-catalasa, identificándose al menos 158 peroxidasas de clase III en el genoma del maíz (*Zea mays* L.), 155 isoenzimas en el genoma del arroz (*Oryza sativa* L.), 103 isoenzimas en el genoma del *Medicago truncatula* Gaertn y 75 isoenzimas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* L. (Lüthje & Martinez, 2018).

Las plantas superiores contienen estas peroxidases específicas (peroxidasa de clase III; PRXs) que constituyen grandes familias multigénicas. Estudios de genética inversa para caracterizar la función de cada PRX revelan su participación en procesos de germinación de semillas, elongación celular, lignificación y defensa contra el estrés (Shigeto & Tsutsumi, 2016).

Las PRXs en células de maíz (*Zea mays* L.) cultivadas en suspensión, en respuestas a la polimerización de lignina, identifica a las peroxidases de clase III (PRX) con un rol prominente (Martínez-Rubio et al., 2018). Estas enzimas catalizan la oxidación de diversos sustratos, principalmente fenólicos y su correspondiente radical, existiendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor de electrones y donde esta reacción catalizada por PRX produce el radical fenoxilo por la sustracción de un electrón del compuesto fenólico (Jovanović et al., 2018). Estas oxidaciones se localizan en las membranas mitocondriales, del retículo endoplasmático y plasmática, debido a que sus fosfolípidos poseen afinidades para el alfa-tocoferol que es acumulado en estos sitios. Estos tocoferoles intervienen en la neutralización de reacciones en cadena con radicales libres como resultado de su capacidad de transferir el hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre llamado fenoxi o fenoxilo (Benítez, 2006).

Las PRX catalizan la oxidación de diversos sustratos donantes de electrones como aminas aromáticas y fenoles en presencia de peróxido hidrógeno. Estas enzimas oxidan un diverso grupo de compuestos fenólicos como ácido clorogénico, pirogalol, catecol, guayacol y catequina (Onsa et al., 2004).

Las hojas de *M. oleifera*, se encuentran disponibles en grandes cantidades en todo el año, las PRX purificada es reportada como activa en pH ácidos, con actividad estable en un 90 % a 60 °C durante 30 min, condición que brinda una excelente recuperación de estas enzimas y por contener azúcar pueden ser catalogadas como una glicoproteína (Khatun et al., 2012). La PRX en hojas de esta especie permite obtener eficiencia en los procesos metabólicos; así como, declararlas como enzimas purificadas que exhiben propiedades fisicoquímicas que la hacen apta para diversas aplicaciones biotecnológicas (Agunbiade et al., 2021). En plantas de *M. oleifera* expuestas a estrés abiótico, las POX presentan una respuesta eficiente, ante estrés hídrico, que permite obtener un aumento de varias enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y PRX (Sadak et al., 2020).

### **Localización subcelular de peroxidasa**

La célula vegetal posee dos espacios bien definidos, identificados como el protoplasto y el apoplasto. El protoplasto representa la totalidad de los constituyentes de células vivas, comprendido por el citoplasma y sus orgánulos, así como la membrana plasmática. El apoplasto es el compartimento extracelular en los tejidos vegetales, ubicado externamente a la membrana plasmática que incluye la pared celular junto con los espacios intercelulares. El compartimento apoplástico es el espacio de procesos biológicos esenciales, que incluyen la formación de la pared celular, la absorción y exportación de agua, nutrientes celulares, interacciones planta-patógeno y, respuestas de defensa frente a los mismos (Jovanović et al., 2018; O'Leary et al., 2014). En estos espacios, la pared celular es el principal compartimento de actividad peroxidasa, aunque la importancia de esta localización difiere entre especies (Perrey et al., 1989).

Atendiendo a su localización subcelular, se pueden distinguir hasta 4 tipos de isoenzimas PRX ( Li et al., 1989):

1. Enzimas solubles en el apoplasto, obtenidas a partir de lavados de tejidos por soluciones que no deterioran el plasmalema.
2. Enzimas solubles en el protoplasma, obtenidas rompiendo las células y precipitando los orgánulos y restos de paredes.
3. Enzimas iónicamente ligadas, extraídas del precipitado de membranas y paredes por soluciones salinas de alta fuerza iónica.
4. Enzimas covalentemente ligadas, mediante extracciones por tratamientos con enzimas hidrolíticas (celulasa) y que estarían covalentemente ligadas o atrapadas a las membranas y/o a la pared.

Mediante la técnica de infiltración a vacío de un tampón en el tejido vegetal, seguido de su recuperación por centrifugación suave, puede ser posible la extracción de enzimas solubles en el apoplasto o débilmente ligadas a la pared. Mediante este procedimiento, se evita la ruptura del protoplasto y dependiendo de la fuerza iónica y la composición del medio de infiltración, se

puede diferenciar la actividad enzimática libre en los espacios intercelulares, de la actividad enzimática enlazada a la pared celular (Bernal, 1993).

El fraccionamiento subcelular ha proporcionado los medios necesarios para analizar la composición y las propiedades de los elementos celulares purificados (Christian et al., 1999). En la determinación de enzimas de membranas y paredes, se requiere del fraccionamiento celular, por él se obtendrán enzimas solubles en el citoplasma, y un precipitado compuesto de membranas y paredes. Las peroxidases básicas y ácidas se encuentran solubles en apoplasto y protoplasto, iónicamente ligadas a membranas y paredes celulares, y covalentemente ligadas a membranas y paredes celulares (Christian et al., 1999; Ros Barceló et al., 1989). Los extractos de células rotas se centrifugan a altas velocidades para separar los componentes celulares por tamaño y densidad (Alberts et al., 2002) Para estudiar el comportamiento subcelular de las isoenzimas PRXs en células de *M. oleifera*, utilizaremos las técnicas de fraccionamiento subcelular y de infiltración a vacío que nos permitirá a su vez, caracterizar estados fenológicos (vegetativo y floral) mediante actividades enzimáticas.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

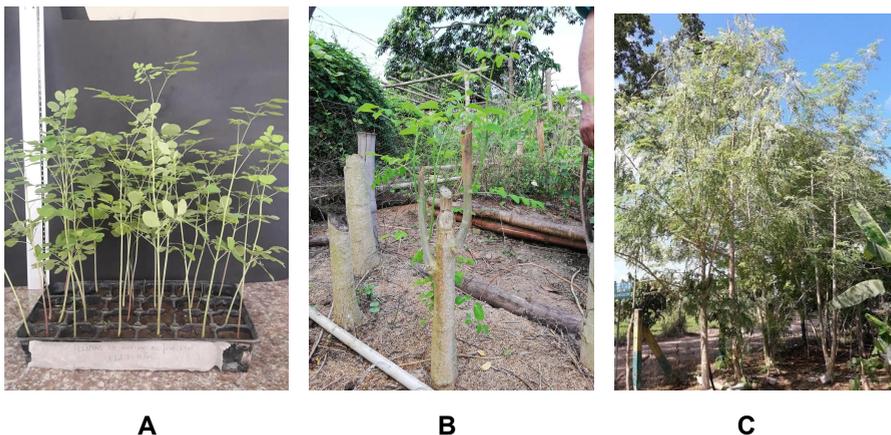
### Material vegetal

La recolección de semillas de *M. oleifera*, se realizó en los cantones de Arenilla y Machala de la provincia de El Oro, Ecuador. Estas actividades permitieron obtener muestras de semillas con madurez fisiológica, utilizadas en procesos de germinación que generaron plántulas de calidad.

El trabajo con las plántulas facilitó su caracterización, la creación de un banco de germoplasma *in vivo*, en áreas de aclimatación del laboratorio de micropropagación vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Técnica de Machala.

El establecimiento de plantas de *M. oleifera* en áreas *in vivo* permitió disponer de material vegetal para los diferentes estudios realizados, así como la producción permanente de semillas y plántulas.

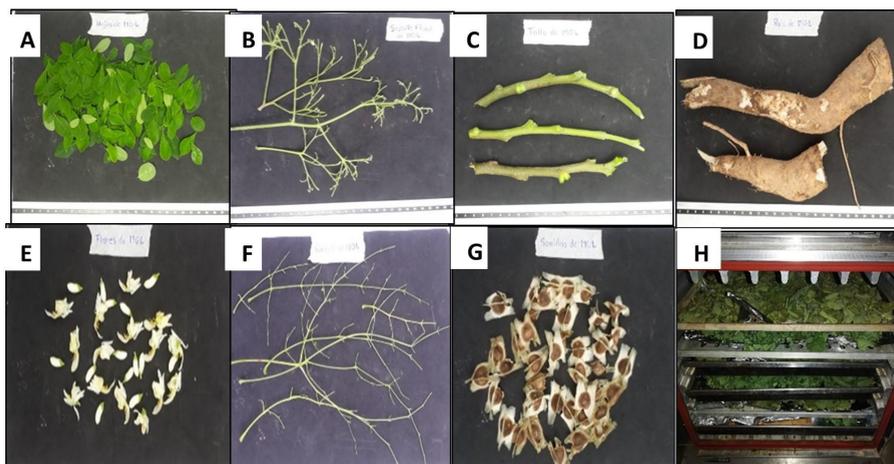
Las plantas empleadas para análisis fitoquímicos provenían de tres grupos. El primer grupo se estableció en condiciones de invernadero en bandejas plásticas y estaba compuesto por plántulas de 20 días de edad (día 1 con la germinación del 50% de las semillas) en fase de crecimiento (figura 2A). Estas plántulas permitieron generar dos grupos de plantas en diferente estado de desarrollo (establecidas en canteros tecnificados *in vivo*). Un segundo grupo de plantas con dos metros de altura fueron decapitadas a 25 cm de altura para la generación de rebrotes, que se cosecharon a 26 días de edad (figura 2B). El tercer grupo estuvo formado por plantas de crecimiento perenne (árbol) con 2 años de edad (figura 2C). Todas las plantas se establecieron en suelo, con textura franco-arcillosa y en condiciones de humedad óptima para su crecimiento y desarrollo.



**Figura 2.** Plantas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral. **A.** Plántulas en estado vegetativo de 20 días de edad. **B.** Plantas en estado floral con rebrote de 26 días de edad. **C.** Plantas en estado floral a los dos años de su siembra.

### **Preparación de las muestras de órganos deshidratados**

Para la valoración de contenido fitoquímico de extractos acuosos o metanólicos, se utilizaron plántulas de 20 días, plantas con rebrote y árboles que permitieron obtener muestras de todos los órganos (figura 3) como hojas, raquis, tallo, raíz, flores, soporte floral y semillas. Los órganos fueron recolectados, lavados con agua destilada, secados con papel de filtro y seccionados en pequeñas fracciones para ser llevados a estufa por 24 horas a 70 °C. Transcurrido el tiempo de secado, las muestras vegetales se trituraron con molino de cuchilla fina (Moulinex, Alenzón, Francia) y maceradas en mortero para obtener polvos de granulometría finas. Las muestras fueron conservadas en fundas de plástico impermeables oscuras, que permitió evitar la fotodegradación hasta el momento de caracterización.



**Figura 3.** Material vegetal de plantas de *M. oleifera* utilizadas en el proceso de caracterización del potencial fitoquímico. **A.** Hojas. **B.** Raquis. **C.** Tallo. **D.** raíz. **E.** flores. **F.** soporte floral. **G.** semillas. **H.** secado de órganos de *M. oleifera* en la estufa.

### **Caracterización de la composición mineral del material vegetal**

Las caracterizaciones elementales de las muestras de los órganos de *M. oleifera* fueron posibles por la presencia de ejemplares de esta especie en el Cantón Machala de la provincia de El Oro en Ecuador, facilitando la recolección de muestras locales por órganos. Estas muestras fueron deshidratadas con el procedimiento antes mencionado y almacenadas a temperatura ambiente en frascos ámbar. Para la caracterización se emplearon réplicas por órganos de 2 mg de masa seca para el análisis mediante el Servicio de Apoyo a la investigación de la Universidad de A Coruña (S.A.I.). Esta actividad permitió valorar la composición elemental vegetal y seleccionar el órgano potencial con fines de elaboración de extractos fortificantes.

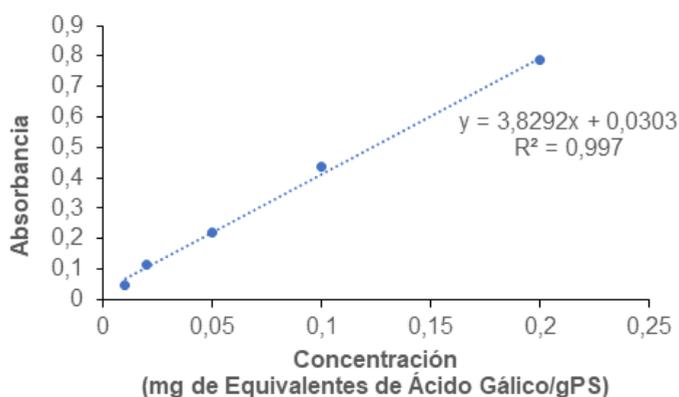
### **Contenido de fenoles solubles**

Las muestras de tejidos vegetales utilizadas en la cuantificación de fenoles, requirió de 0,1 gramo de masa seca de cada órgano para los tres grupos de plantas de *M. oleifera*, que se encontraban conservados como polvo fino en

oscuridad. Esta determinación fenólica requirió de la elaboración de una recta de calibrado con un ácido fenólico, mediante el empleo de ácido gálico. Se requirió la preparación de una solución madre de 1 mg/1mL para elaborar la recta de calibrado que permitió calcular la cantidad de fenoles presentes en las muestras. En su elaboración se utilizaron soluciones de ácido gálico en metanol al 80% a concentraciones (mg de ácido gálico/ml de metanol): 0,01 mg/ml; 0,02 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL. A partir de las mismas se tomaron 100  $\mu$ L por triplicado y se añadió 1 ml de reactivo Folin Ciocalteu diluido a proporción 1:10 (v:v)según el método de reducción del consumo de reactivos (Kraujalytė et al., 2015).

Después de 4 min de incubación en oscuridad, se aplicó a cada tubo 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7% y 400  $\mu$ L de agua destilada, volviendo a incubar los tubos durante 90 minutos en oscuridad. Después de la incubación se realizó la lectura de las muestras en espectrofotómetro (Spectronic 21D, Los Ángeles, USA) a una absorbancia 760 nm, utilizándose como blanco 100  $\mu$ L de agua destilada en lugar de ácido gálico.

La recta de calibrado obtenida facilitó la ecuación: absorbancia 760 nm=3.8292 [equivalentes de ácido gálico]+0,0303 con  $R^2 = 0,997$ , que se utilizó para el cálculo del contenido de fenoles solubles totales como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Recta de calibrado con absorbancias obtenidas según las diferentes concentraciones de ácido gálico.

Las lecturas de muestras vegetales se realizaron por triplicado para cada órgano, siguiendo el método modificado de Díaz et al. (2001), mediante una extracción a proporción 0,1:1 (p:v) con diferentes solventes como metanol al 80% y agua destilada como alternativa para posterior incubación a 70 °C durante 30 minutos en baño maría.

Una vez incubadas se centrifugaron (MiniSpin plus, Hamburgo, Alemania) 15 minutos a 10000 g recuperando el sobrenadante. A continuación, se preparó la mezcla de reacción: 100µL de sobrenadante de muestra vegetal, 1000 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu e incubación 4 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron a cada muestra 1000 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7%, 400 µL de H<sub>2</sub>O destilada, se homogeneizaron y fueron puestas en oscuridad por 90 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron las lecturas de fenoles solubles totales, el procedimiento requirió la elaboración de un blanco (1000 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 100 µL de metanol al 80% o H<sub>2</sub>O destilada según el proceso de extracción, 1000 µL de Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> y 400 µL de H<sub>2</sub>O). Una vez disponible el blanco, se procedió a la calibración del equipo y a realizar lectura de las muestras para obtener los contenidos de absorbancia a 760 nm longitud de onda. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/g PS).

### **Actividad antioxidante total**

La obtención de extractos de órganos de los tres grupos de plantas de *M. oleifera* (plántulas, rebrote y árbol) mediante extracción fenólica antes descrita, fue el material de partida para la caracterización de la actividad antioxidante total de cada órgano. Esta actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en presencia de extractos metanólicos y acuosos de órganos de plantas de *M. oleifera* en diferentes momentos fenológicos, donde la solución del radical DPPH es la absorbancia inicial (A0) (Thaipong et al., 2006).

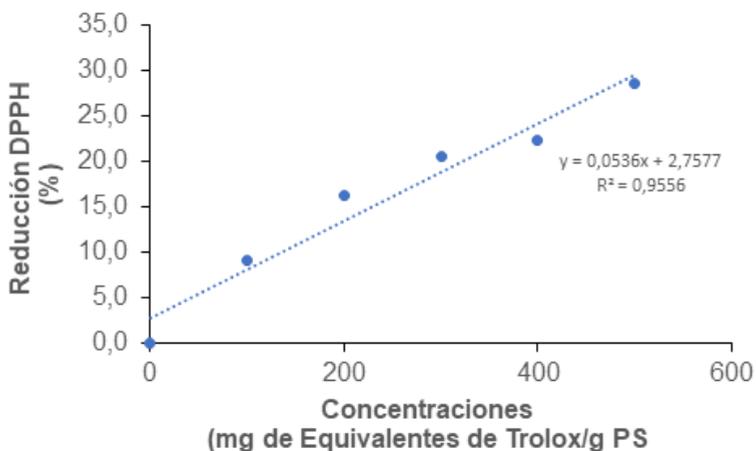
El DPPH con radical, presentó un color inicial morado que fue reduciéndose en el tiempo hasta tomar una coloración amarilla en presencia del antioxidante, debido a que se eliminan los radicales libres y tienen la habilidad de reducir el DPPH mediante la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno al radical (Fitriana et al., 2018). La pérdida de color se consideró proporcional al grado de captura del radical DPPH e indicó la eficiencia de los extractos vegetales. Esta eficiencia consideró la diferencia de color, que permitió cuantificar el porcentaje de DPPH reducido mediante la ecuación: % DHHP reducido =  $((A_0 - A_m) - A_0) \times 100$ , siendo  $A_0$  absorbancia ajustada del DPPH y  $A_m$  la absorbancia de las muestras.

Las valoraciones de las muestras se realizaron al preparar la dilución madre de DPPH 1Mm (40 mg de DPPH en 100 mL de metanol absoluto). Esta dilución se ajustó en metanol absoluto hasta alcanzar valores de absorbancia cercanos a 0.800 nm y se reaccionó 50  $\mu$ L de extractos de los órganos como estándar antioxidante con 950  $\mu$ L de DPPH ajustado en cubetas de 1 mL de metanol absoluto como blanco y primera medida DPPH con lecturas en cubetas sin tiempo de incubación. Los resultados se obtuvieron como % DHHP reducido y concentración en equivalentes de las muestras evaluadas ante una recta de calibrado con patrón externo Trolox.

La recta de calibrado se realizó con el patrón externo Trolox (ácido 6-hydroxi-2.5.7.8-tetrametilchroman-2-carboxílico) mediante la preparación de una dilución madre de 1 mm (25 mg de Trolox en etanol absoluto). A partir de esta dilución madre, se prepararon cinco diluciones de concentraciones diferentes (100, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ L). Estas diluciones permitieron valorar las cinco concentraciones por triplicado para valorar en equivalentes Trolox, tomándose la absorbancia inicial ( $A_0$ ) compuesto por disolventes de DPPH (950  $\mu$ L de metanol absoluto) y Trolox (50  $\mu$ L de metanol absoluto). Las lecturas de absorbancias a 515 nm se obtuvieron al utilizar 50  $\mu$ L de cada concentración Trolox y 950  $\mu$ L de DPPH con lecturas fijas, para elaborar la recta de calibrado.

La recta de calibrado permitió obtener la ecuación: Absorbancia 515 nm =  $0.0536$  [equivalentes de Trolox] +  $2.7577$  con  $R^2 = 0,9596$ , como se

muestra en la figura 5. Las lecturas fueron realizadas en espectrofotómetro (Spectronic 21D, Los Ángeles, USA).



**Figura 5.** Recta de calibrado en relación de Reducción DPPH, ante diferentes concentraciones de Trolox.

### **Peroxidasa (PRX)**

Mediante la actividad de PRX (EC 1.11.1.7) y el contenido en proteínas, se ha determinado la actividad enzimática en diferentes estados fenológicos de hojas de *M. oleifera*, (Ferrer et al., 1990). Estas valoraciones se realizaron en hojas de plantas germinadas a los 20 días, plantas con rebrote a 26 días y plantas de dos años de edad. Las hojas fueron recolectadas y movilizadas hasta el área de caracterización, siempre en conservación a 4 °C. En el laboratorio las hojas fueron lavadas con agua destilada y secadas con papel de filtro, se pesaron en muestras divididas por pesos semejantes de aproximado 1 g, posteriormente fueron llevadas a 80 °C hasta el momento de homogeneizado. Las muestras de hoja una vez retiradas de conservación, se procedieron a homogeneizar en mortero con arena fina de mar a relación de 1:5 (p:p) a 4 °C, a una proporción 1:5 (p:v) de tampón de extracción compuesto por EDTA 1 mM, KCL 1 Mm, y Tris HCl 5 Mm, ajustado a pH 7.5 y PVPP40 a 0,5 por 100 mg de tejido.

El homogeneizado obtenido se filtró en gasas de celulosa de aproximadamente 2 mm de malla, que estaban frías y el material retenido fue descartado, obteniéndose una solución que se centrifugó por 30 minutos a 1000 g en condiciones refrigeración a 4 °C en centrífuga (Hermle, Los Ángeles, USA). El sobrenadante de esta centrifugación fue considerado para determinar el contenido de peroxidasa soluble total que se destinó a dializar en tampón tris HCL 50 mM PH 7,5 en membranas de celulosa para diálisis por 24 horas en agitación magnética a 4°C.

Una vez obtenida las muestras, se procedió a las lecturas de actividad enzimática frente a 4-Metoxi- $\alpha$ -Nafthol como sustrato. Los medios de reacción estaban compuestos por 4-Metoxi- $\alpha$ -Nafthol 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01 mM, tampón Tris CLH 50 mM pH 7.5 y solución enzimática. Los valores de absorbancia se obtuvieron a 595 nm en un espectrofotómetro (Spectronic21D, Los Ángeles, USA) en cubetas de plástico de 1 mL. Las actividades enzimáticas fueron calculadas y cuantificadas en los tratamientos, mediante coeficiente de extinción de  $\epsilon = 593 \text{ de } 21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el producto de la oxidación enzimática el 4-Metoxi- $\alpha$ -Nafthol y fueron expresadas en nkat.gramos de masa fresca para los ensayos enzimáticos (cantidad de enzima que convierte un nmol por segundo ( $\text{nmol s}^{-1}$ ) de sustrato en producto).

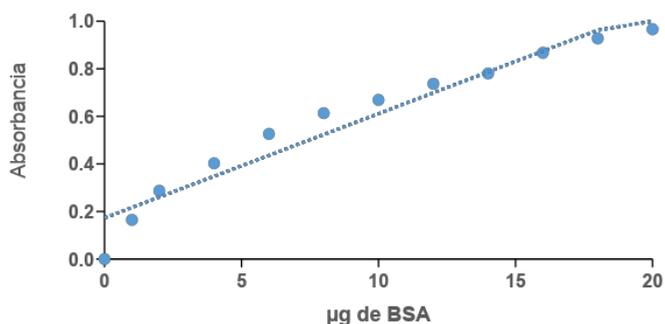
A partir de las muestras dializadas, se determinó el contenido de proteínas totales cuantificadas de forma rutinaria de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bovino como proteína estándar. Esta valoración proteica se realizó a partir de extractos de hojas de *M. oleifera*, utilizadas en el análisis de actividad peroxidasa de muestras conservadas a - 80°C. En el momento de análisis, las muestras fueron expuestas a descongelación a temperatura ambiente y llevadas a hielo para mantener la conservación a 4 °C. Seguidamente se centrifugaron en (MiniSpin plus, Los Ángeles, USA) a temperatura ambiente a 13000 rpm por 1 min, se prepararon las soluciones compuestas por 900  $\mu\text{L}$  de reactivo Bradford, 50  $\mu\text{L}$  de NaOH, 10  $\mu\text{L}$  de muestra, 40  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O destilada, así como un blanco compuesto por los componentes antes citados menos la muestra de extracto vegetal.

Una vez preparadas todas las muestras de extracto, fueron mezcladas y puestas en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min para que se produzca la reacción que será estable por 60 minutos.

Para determinar el contenido en proteínas, se elaboró una recta de calibrado con patrón externo de albúmina de suero bovino (BSA).

Esta recta de calibrado se realizó con el patrón externo mediante la preparación de una disolución madre de BSA 0,04 % (p/v). A partir de esta disolución madre, se preparó una dilución madre de partida de 0,02% BSA para obtener siete diluciones de concentraciones diferentes (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µg de BSA), así como una solución madre de partida inicial 0,04% BSA para obtener cinco diluciones de concentraciones diferentes (10, 12, 14, 18 y 20 µg de BSA). Estas diluciones permitieron valorar las 12 concentraciones por triplicado obteniendo µg de BSA por concentración valorada, tomándose la absorbancia inicial (A0) y absorbancia en presencia de las concentraciones conocidas, compuesto por reactivo Bradford (900 µL), NaOH 1M (50 µL), 10 µL (agua destilada de reemplazo como absorbancia inicial o concentración conocida), 40 µL (agua destilada). Se agitaron los tubos, se incubaron 30 min en oscuridad para posteriormente cuantificar la absorbancia a 590 nm con lecturas fijas y elaborar la recta de calibrado.

La recta de calibrado permitió obtener la ecuación: Absorbancia 590 nm=0,0462 X [µgramos de BSA]+ 0,1148 con R<sup>2</sup>= 0,9796 como se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Recta de calibrado mediante diferentes concentraciones de BSA.

Los contenidos de proteínas totales de las muestras fueron obtenidos a 590 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Los Ángeles, USA) en cubetas de plástico de 1 mL. Los valores de absorbancia obtenidos permitieron determinar el contenido proteico expresado en  $\mu\text{gprot/ml}$ .

Una vez obtenido el contenido proteico se determinó la actividad específica de la enzima peroxidasa según la expresión: Actividad específica=actividad enzimática/concentración de proteínas, que fueron expresadas en  $\text{nakt.}\mu\text{g}$  proteína.

### **Actividad de peroxidasa protoplástica y apoplástica**

Se utilizó como material vegetal hojas de plántulas, rebrote y árboles de *M. oleifera*, para determinar la actividad enzimática en diferentes estados fenológicos mediante el aislamiento de peroxidasa de los espacios libres de la pared (apoplasto celular). Las muestras de 1 g de discos de hojas con 9 mm de diámetro, eran lavadas exhaustivamente con tampón Tris HCl 50 mM pH 7,6 a 4°C e infiltradas al vacío durante 10 minutos en el mismo tampón (con/sin  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  100 mM), en una proporción 1:5, p:v. El fluido del espacio libre de la pared, se recuperó después de exponer los discos de hoja infiltrados a centrifugación (Hermle, Los Ángeles, USA) 1000 g durante 5 minutos a 4°C (Rathmell & Sequeira, 1974).

Para obtener la fracción de peroxidasa apoplástica, los discos de hoja fueron infiltrados con tampón sin  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  100 mM llevándose a diálisis en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,6 a 4°C por 24 horas. Los extractos obtenidos fueron conservados a -80 °C hasta el momento de lectura a 595 nm en espectrofotómetro (Spectronic 21D, Los Ángeles, USA) en cubetas de plástico de 1 mL. Las actividades enzimáticas se expresaron como el producto de la oxidación enzimática el 4-Metoxi- $\alpha$ -Naftol y se expresaron en  $\text{nkat.gramos}$  de masa fresca. El contenido de proteínas totales a lecturas de 590 nm se expresó en  $\mu\text{g-prot/ml}$ . La actividad específica de la enzima peroxidasa se obtuvo según la expresión: Actividad específica=actividad enzimática/concentración de proteínas, que fueron expresadas en  $\text{nakt.}\mu\text{g}$  proteína.

### **Fraccionamiento subcelular**

El análisis se basa en la técnica de fraccionamiento subcelular. Las hojas en los diferentes estados fenológicos, se recolectaron y llevaron hasta el área de caracterización, siempre conservadas a una temperatura de 4 °C, en donde se lavaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro. Se dividieron en muestras por pesos semejantes de aproximado 1g, posteriormente llevadas a – 80 °C de temperatura hasta el momento de homogenizado.

Las muestras de hoja una vez retiradas de conservación, se procedieron a homogeneizar en mortero con arena fina de mar a una temperatura de 4 °C, en una proporción 1:5 (p:v) de tampón de extracción compuesto por sacarosa 0,25 M, (Ac O)<sub>2</sub> Mg 1M y Tris ClH 5 mM pH 7,2. Las fracciones de peroxidasa solubles, enlazadas a membranas y a paredes fueron obtenidas según la técnica de Ros Barceló et al. (1989).

El homogeneizado se filtró en gasas de celulosa de aproximado 2 mm de malla, estas permanecieron frías y el material retenido fue descartado, obteniéndose una solución que se centrifugó por 15 minutos a 1000 g en condiciones refrigeración a 4 °C en centrífuga refrigerada (Hermle, Los Ángeles, USA). El producto de esta centrifugación fue un sobrenadante considerado como la fracción soluble y un precipitado como fracción primaria de paredes.

La fracción soluble se procedió a centrifugar en 4 °C durante 20 minutos a 20000 g, obteniéndose un sobrenadante como fracciones de peroxidasa soluble llevado a diálisis y un precipitado considerado fracción de membranas.

### **Extracción de enzimas enlazadas a membranas celulares**

En la determinación de la actividad de peroxidasa enlazada a membranas en los diferentes estados fenológicos valorados, se realizó mediante la técnica de solubilización enzimática (Ros Barceló et al., 1988).

El precipitado obtenido cuando se procede a centrifugar la fracción soluble durante 20 minutos a 20000, se consideró fracción de membranas. Para solubilizar la enzima iónicamente enlazada a membranas, este precipitado se

incubó por 30 min en condiciones de 25 °C con KCL 1M y se centrifugó 20 minutos a 10000 g (este proceso fue repetido una vez más para obtener dos volúmenes de fracción de membranas que representan las fracciones de peroxidasa enlazada de forma iónica a membrana) llevándose a diálisis a continuación. En este último centrifugado, el precipitado obtenido fue resuspendido con Tampón Acetato 0,1 M, celulosa al 1% por 12 horas a 25 °C, centrifugándose seguidamente durante 20 minutos a 20000 g, obteniéndose un sobrenadante como fracción de peroxidasa enlazada de manera covalente a membrana que se destinó a diálisis.

### **Extracción de enzimas enlazadas a paredes celulares**

La extracción de enzimas enlazadas a pared se realizó por la técnica propuesta por Ros Barceló et al. (1987), donde la fracción primaria de paredes celulares producto de la primera centrifugación, se resuspendió a relación 1:5 (v:v) con Tritón X- 100 al 1%, n-Octanol al 0,2% en Tampón Tris HCL 5M y pH 7,2. Se continuó con una centrifugación durante 10 minutos a 1000 g y el precipitado resultante, se resuspendió con el mismo tampón para la eliminación de restos membranosos. La muestra obtenida se lavó tres veces mediante tampón TRIS HCL 50 mM relación 1:5 (v:v) con centrifugaciones de 10 minutos a 1000 g para obtener un precipitado final considerado fracción de paredes.

Esta fracción de paredes resultante, se incubó dos veces en CLK 1M durante 30 minutos a 25 °C, centrifugando seguidamente 10 minutos a 1000 g, recolectando las fracciones que representan la peroxidasa iónicamente enlazada a pared, destinadas posteriormente a diálisis. Producto de estas incubaciones se recolectó el precipitado que fue resuspendido en tampón acetato 0,1 M, celulosa 1% (p:v) por 12 horas a 25 °C y centrifugado 10 minutos a 1000 g para obtener un sobrenadante que permitió determinar la actividad de la peroxidasa covalente enlazada a pared una vez efectuada la diálisis.

Una vez obtenida las muestras para lecturas de actividad enzimática frente a 4-Metoxi- $\alpha$ -Nafthol como sustrato, se prepararon los medios de reacción que estaban compuestos por 4-Metoxi- $\alpha$ -Nafthol 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,33 mM, tampón

Tris CLH 50 mM pH 7,5 y solución enzimática midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Los Ángeles, USA), en cubetas de plástico. Las actividades enzimáticas fueron expresadas en nkat.gramos de masa fresca para los ensayos enzimáticos.

A partir de las muestras dializadas se determinó el contenido de proteínas totales, utilizando la ecuación de la recta de calibrado antes elaborada.

Las soluciones para las lecturas del contenido proteico consistieron en 900  $\mu$ L de reactivo Bradford, 50  $\mu$ L de NaOH, 10  $\mu$ L de muestra, 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada, así como un blanco compuesto por los componentes antes citados excepto el extracto vegetal. Una vez preparadas todas las muestras de extracto, fueron mezcladas y puestas en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min para que se produzca la reacción que será estable por 60 minutos.

Los contenidos de proteínas totales de las muestras fueron obtenidos a 590 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Los Ángeles, USA) en cubetas de plástico. Los valores de absorbancia obtenidos permitieron determinar el contenido proteico expresado en  $\mu$ g-prot/ml. La actividad específica de la enzima peroxidasa se realizó según la expresión: Actividad específica = actividad enzimática/concentración de proteínas, que fueron expresadas en nakt. $\mu$ g proteína.

### **Procedimiento estadístico**

El análisis estadístico de datos se realizó al seleccionar muestras de órganos de *M. oleifera* por tratamiento para su valoración en al menos dos momentos experimentales. En las bases de datos que se generaron por experimento, se observó normalidad de datos (verificada con el test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (verificada con el test de Levene). Las variables dependientes cuando cumplieron estos postulados, fueron objeto de pruebas paramétricas Tukey o Duncan. Cuando se incumplió algún supuesto, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes. Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente con el paquete estadístico IBM SPSS versión 25 de prueba para Windows y se utilizó una confiabilidad en la estimación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.3. RESULTADOS

#### **Análisis de la composición mineral en órganos de *M. oleifera***

La obtención de muestras de órganos en plantas de *M. oleifera* en estado floral, permitió realizar valoraciones de N, C, H y S, presentándose diferencias significativas entre semilla, raíz, hoja y flor.

Las valoraciones de estos elementos realizadas a muestras de polvos de diferentes órganos (tabla 1), ubican a la hoja como fuente esencial de nitrógeno con valores mayores (5,05%) y diferentes estadísticamente al ser comparados con la semilla, flor y raíz. En los elementos carbono (55,96%), hidrógeno (8,32%) y azufre (1,36%) se obtuvieron los mayores valores y con diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en las semillas con los demás órganos. En estos dos últimos elementos, se destacan las hojas, que mostraron ser una fuente importante de hidrógeno (5,84%) y azufre (1,33%).

El análisis elemental de órganos de *M. oleifera* en estado floral permitió identificar a las hojas como una fuente esencial de nitrógeno mientras que las semillas son una fuente de carbono, hidrógeno y azufre.

**Tabla 1.** Resultados de análisis de composición mineral de polvos de órganos de *M. oleifera*.

Órganos	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
Semilla	4,63b	55,96a	8,32a	1,36a
Raíz	0,56d	39,29d	5,56c	0,30d
Hoja	5,05a	41,61c	5,84b	1,33b
Flor	3,76c	41,65b	5,80b	0,83c
p-valor	0,001	0,002	0,001	0,001

*Los valores medios obtenidos de órganos y elementos, representan la réplica de n: 24 unidades. Letras diferentes en cada elemento, difieren estadísticamente para cada órgano con un  $p$ -valor  $\leq 0,05$  (prueba de Tukey).*

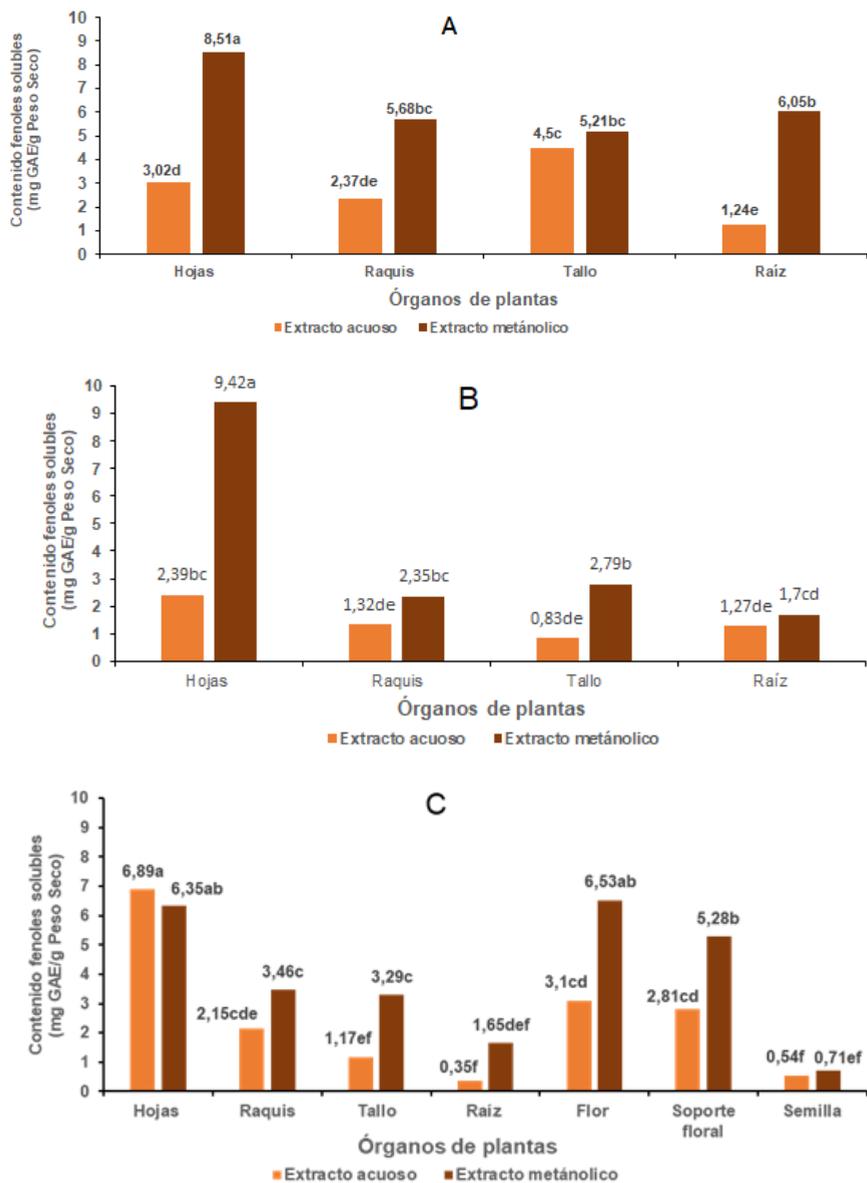
### **Contenido de fenoles solubles en órganos de *M. oleifera***

Las plantas de *M. oleifera* en estado vegetativo (figura 7A), mostraron contenidos de fenoles solubles diferentes según el extracto utilizado y órgano valorado. El extracto metanólico fue más eficiente al obtener valores mayores de compuestos fenólicos solubles con diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,001$ ) en hojas de 8,51 mg GAE/g peso seco con relación a los demás órganos cuando se utilizó extractos metanólicos y con los extractos acuosos de todos los órganos valorados.

En las plantas en estado floral de rebrote (figura 7B), cuando se utilizó extracto metanólico, los contenidos de fenoles solubles en hojas mostraron valores mayores con diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,001$ ) de 9,42 mg GAE/g peso seco comparado a los demás extractos metanólicos y acuosos.

En la figura 7C, las plantas en estado floral arbóreo el contenido de fenoles solubles en hojas, tanto para extracto acuoso como metanólico, permitieron la misma eficiencia de extracción con valores de 6,89 y 6,35 mg GAE/g peso seco. Sin embargo, en flores, cuando se utilizó extracto metanólico, se obtuvo 6,53 mg GAE/g peso seco difieren ( $p \leq 0,001$ ) a extractos de raquis, tallo, raíz y semilla.

El contenido de fenoles solubles de *M. oleifera* en los diferentes estados fenológicos, muestran a la hoja como el órgano de mayor potencial fenólico, donde el extracto metanólico resultó más eficiente en la extracción fenólica en los estados vegetativo y floral (rebrote). Sin embargo, se obtuvo la misma eficiencia en estado arbóreo, cuando se utilizó extractos acuosos y metanólicos.



**Figura 7.** Contenido de fenoles solubles en órganos de *M. oleifera* en diferentes estados fenológicos. (GAE) equivalentes de ácido gálico. **A)** Plántulas a 20 días (estado vegetativo), *n*: 48 unidades. **B)** Plantas de rebrote (estado floral) de 26 días, *n*:48 unidades. **C)** Plantas arbóreas (estado floral) de 2 años, *n*:84 unidades. Medias con letras diferentes, en cada columna,

indican diferencias significativas entre extractos y órganos de plantas para un  $p\text{-valor}\leq 0,05$  (prueba de Tukey).

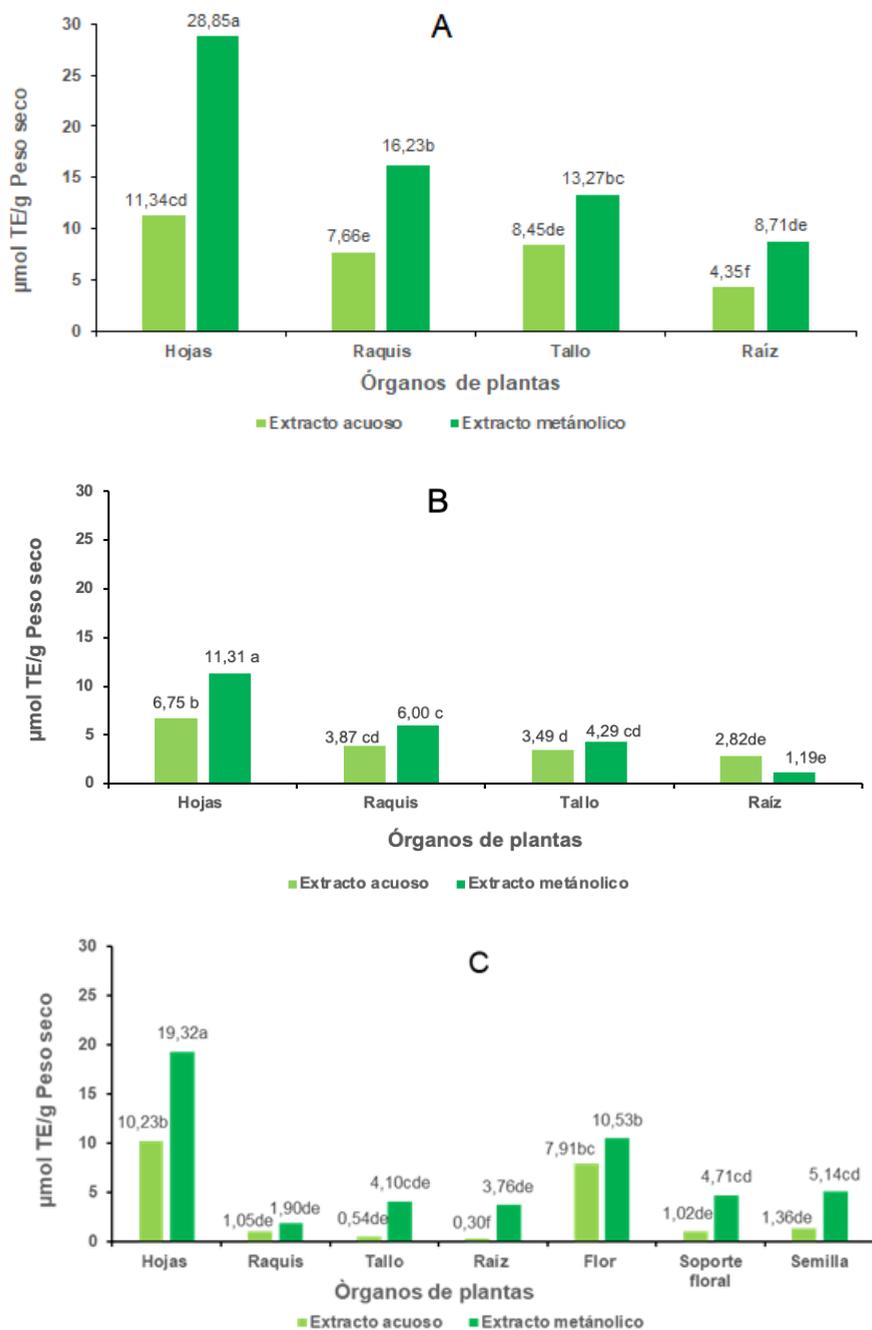
### **Capacidad antioxidante total en órganos de *M. oleifera***

Se ha determinado la presencia de antioxidantes totales en órganos de *M. oleifera*, confirmándose su variabilidad según estado fenológico valorado. En plantas en estado vegetativo (figura 8A), se observó que la utilización del extracto metanólico permitió mayor eficiencia en extracción de antioxidantes totales, donde las hojas mostraron valores altamente significativos ( $p\leq 0,001$ ) de 28,85  $\mu\text{mol TE/g}$  de peso seco.

En las plantas en estado floral de rebrotes (figura 8B) al usar extracto metanólico, las hojas presentaron los mayores valores altamente significativos ( $p\leq 0,001$ ) con 11,31  $\mu\text{mol TE/g}$  de peso seco de actividad antioxidante total, comparados a los demás órganos con ambos tipos de extracto. El extracto acuoso en hoja presentó valores significativos de 6,75  $\mu\text{mol TE/g}$  de peso seco de antioxidantes total y diferente con relación a los demás tratamientos.

El contenido de antioxidantes totales en estado floral de árboles (figura 8C), mostró a la hoja como órgano con valores diferentes y altamente significativos ( $p\leq 0,001$ ) de 19,32  $\mu\text{mol TE/g}$  de peso seco, al utilizar extracto metanólico comparado a los demás extractos. Los valores obtenidos en hoja con extracto acuoso (10,23  $\mu\text{mol TE/g}$  de peso seco) y en flores con extracto metanólico ( $\mu\text{mol 10,53 TE/g}$  de peso seco) presentan diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ).

En el análisis de los órganos de *M. oleifera* tanto en los extractos metanólicos como acuosos, se confirma la presencia de actividad antioxidante, donde los extractos metanólicos de hojas alcanzan mayores valores en los estados fenológicos vegetativo y floral (árbol) respectivamente.



**Figura 8.** Actividad antioxidante total en órganos de *Moringa oleifera* LAM en diferentes estados fenológicos. Equivalentes Trolox (TE); **A)** Plántulas (estado vegetativo) de 20 días, n:48 unidades. **B)** Plantas de rebrote (estado floral) de

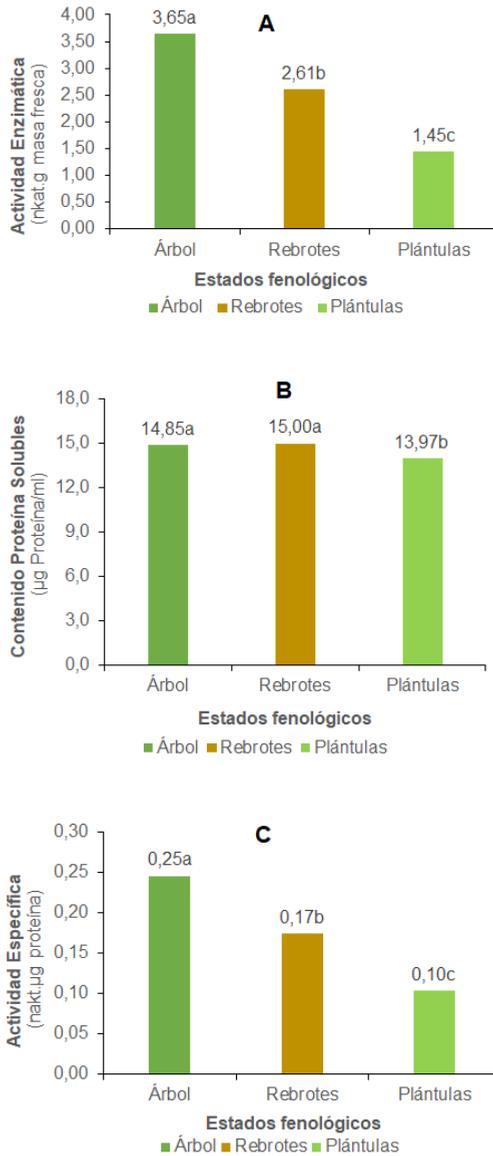
26 días, n:48 unidades. C) Plantas arbóreas (estado floral) de 2 años, n:48 unidades. Medias con letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas entre extractos y órganos de plantas para un  $p\text{-valor}\leq 0,05$  (prueba de Tukey).

### **Actividad peroxidasa en hojas**

Los resultados de extractos de *M. oleifera* de diferentes estados fenológicos, revelaron que el órgano con mayor potencial de compuestos fenólicos y antioxidante totales correspondió a hojas. Este resultado permitió priorizar este órgano para valorar la actividad peroxidasa, dada su capacidad de actuar en las oxidaciones de los procesos de crecimiento y desarrollo. La actividad enzimática (figura 9A) presentó diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) en los diferentes estados fenológicos. En muestras de hojas de árboles se obtuvieron valores mayores y diferentes estadísticamente a otros estados fenológicos. La actividad peroxidasa en relación a muestras de hojas de rebrotes, presentó valores de 1,04 nkat. g de masa fresca, y de 2,2 nkat. g de masa fresca en muestras de hoja de plántulas. Se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de proteínas totales (figura 9B), ( $p\text{-valor}\leq 0,001$ ) en hojas de rebrote, las cuales presentan incrementos de 0,88 y 1,03  $\mu\text{g}$  proteína/mL con respecto a las hojas de plantas arbóreas y plántulas.

La actividad específica de la enzima (figura 9C), presentó un comportamiento similar a la actividad enzimática, mostrando diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre estados fenológicos. Destaca mayor actividad en hojas de árboles, con incremento de 0,08 nakt.  $\mu\text{g}$  de proteína con relación a muestras de hojas de rebrotes y 0,15 nakt.  $\mu\text{g}$  de proteína con relación a muestras de hoja de plántulas. Las hojas de plantas de rebrote manifestaron un incremento en actividad de la enzima 0,07 nakt.  $\mu\text{g}$  de proteína con relación a muestras de hojas de plántulas.

La actividad enzimática en estado fenológico floral (arbóreo), presentó mayores valores a fases florales (rebrote) y vegetativa, mostrando la actividad específica un patrón similar.



**Figura 9.** Actividad peroxidasa en hojas de plantas de *M. oleifera* en diferentes estados fenológicos. **A)** Actividad de enzimática de peroxidasa, n:9 unidades. **B)** Contenido de proteínas solubles, n:9 unidades. **C)** Actividad específica de peroxidasa, n:9 unidades. Medias con letras diferentes, indican diferencias significativas entre estados fenológicos para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).

### **Actividad peroxidasa en hojas por técnica infiltración al vacío.**

Se ha estudiado la actividad de peroxidasa libre en los espacios de la pared vegetal en hojas de *M. oleifera*, en los diferentes estados fenológicos como árbol, rebrote y germinadas. Se utilizó para ello la técnica de infiltración al vacío, que permite recuperar enzimas solubles libres en dichos espacios así como aquellas enzimas iónicamente ligadas a la pared (cuando la infiltración del tejido se realiza con un tampón suplementado con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  100 mM).

En los diferentes estados fenológicos (tabla 2), para actividad peroxidasa, contenido de proteínas y actividad específica peroxidasa, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) entre fracciones celulares de estados florales y vegetativo.

Las plantas en estado arbóreo, presentaron mayor actividad peroxidasa (representa el 81,10% del total) localizada en la fracción soluble protoplástica que difirió estadísticamente de las demás fracciones. El resto de la actividad peroxidasa no presentó diferencias estadísticas, localizadas en las fracciones soluble apoplástica (10,69%) e iónicamente ligada a pared (8,21%). El contenido de proteínas en estado arbóreo, reveló valores mayores y con diferencias estadísticas significativas, en la fracción soluble protoplástica (representa el 34,15% del total) comparada con las demás fracciones. Las otras fracciones presentaron diferencias entre ellas, en fracciones soluble apoplástica e iónicamente ligada a pared que representan el 33,94% y el 31,91% del total. La actividad específica peroxidasa mostró un comportamiento similar a la actividad de peroxidasa, confirmándose mayor actividad localizada en la fracción soluble protoplástica (81,13%) con diferencias significativas. Las demás fracciones no difirieron estadísticamente entre ellas, las que representan el 10,38% de actividad en fracción soluble apoplástica y el 8,49% en fracción iónicamente ligada a pared.

En plantas en estado de rebrote se alcanzó un valor mayor y significativamente diferente en actividad peroxidasa (81,10%) localizada en la fracción soluble protoplástica respecto a las demás fracciones, las cuales no presentaron diferencias entre ellas, representando un 8,18% en fracciones soluble apoplástica y 6,29% en iónicamente ligada a pared. El contenido de

proteínas manifestó valores diferentes y significativos en la fracción soluble protoplástica que representó el 37,34% del total. Las demás fracciones difirieron entre ellas, en iónicamente ligada a pared (31,67%) y fracciones soluble apoplástica (30,99%). En este estado fenológico la actividad específica peroxidasa mostró valores mayores y significativos en la fracción soluble protoplástica (83,81%). Las demás fracciones sin diferencia estadísticamente entre ellas, representando el 9,52% de actividad en fracción soluble apoplástica y 6,67% en fracción iónicamente ligada a pared.

En plántulas en estado fenológico vegetativo con 20 días de edad, se obtuvieron valores con diferencias estadísticas significativas y con una actividad enzimática que representó el 80,81% localizada en la fracción soluble protoplástica, las demás fracciones sin diferencias entre ellas mostraron actividades localizadas en fracciones soluble apoplástica (10,10%) e iónicamente ligada a pared (9,09%). En este estado el contenido de proteínas se igualó significativamente, en fracciones soluble protoplástica (33,38%) e iónicamente ligada a pared (33,46%); sin embargo, ligeramente diferente a la fracción de la soluble apoplástica (33,16%). La actividad específica de peroxidasa obtuvo valores mayores y significativos para la fracción soluble protoplástica (81,01%) respecto a las fracciones soluble apoplástica (10,13%) e iónicamente ligada a pared (8,86%).

En el estudio enzimático realizado en hojas de *M. oleifera* en los diferentes estados fenológicos, se ha podido observar que la actividad de peroxidasa en la fracción soluble protoplástica (espacios intracelulares) fue significativamente diferentes con relación a las demás fracciones recuperada desde el apoplasto (fluido extracelular), obteniendo los mayores valores en estados florales y especialmente en estado arbóreo.

**Tabla 2.** Distribución de actividad peroxidasa protoplástica y apoplástica en hojas de plantas de *M. oleifera* en diferentes estados fenológicos.

Estado Fenológico	Fracción	Actividad Peroxidasa	Proteínas solubles	Actividad Específica Peroxidasa
		Nkat. g masa fresca	µgr proteína.ml	akt. µg proteína
Árbol	Soluble Protoplástica	1,15±0,019a	13,24±0,005a	0,086±0,001a
	Soluble Apoplástica	0,15±0,017b	13,16±0,013b	0,011±0,001b
	Iónicamente ligada a pared	0,12±0,019b	12,37±0,007c	0,009±0,001b
	p-valor	0,002	0,001	0,001
Rebrote	Soluble Protoplástica	1,36±0,059a	15,30±0,007a	0,088±0,004a
	Soluble Apoplástica	0,13±0,067b	12,70±0,011c	0,010±0,005b
	Iónicamente ligada a pared	0,10±0,001b	12,98±0,011b	0,007±0,001b
	p-valor	0,003	0,001	0,001
Plántulas	Soluble Protoplástica	0,80±0,022a	12,42±0,003a	0,064±0,002a
	Soluble Apoplástica	0,10±0,001b	12,34±0,007b	0,008±0,001b
	Iónicamente ligada a pared	0,09±0,001b	12,45±0,003a	0,007±0,001b
	p-valor	0,002	0,001	0,003

Los valores medios representan las réplicas por fracción y actividad peroxidasa, contenido de proteínas, así como, la actividad específica de peroxidasa de n:27 unidades ( $\pm$  error estándar de la media). Medias con letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas por fase y entre sus fracciones para un p-valor $\leq$ 0,05 (prueba de Tukey).

## Fraccionamiento subcelular de la actividad peroxidasa en hojas

El fraccionamiento subcelular en hojas de *M. oleifera* en diferentes estados fenológicos floral (árbol, rebrote) y vegetativo (tabla 3), para actividad peroxidasa, contenido de proteínas y actividad específica, presenta diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) al comparar las diferentes fracciones subcelulares.

Las plantas en estado arbóreo, presentaron la mayor parte de su actividad peroxidasa localizada en la fracción iónica de pared (representan 46,45% respecto al total) y covalente de pared (32,6%) con mayores valores y diferentes estadísticamente al resto de la actividad localizada en fracciones iónica de membrana (10,30%) y covalente de membrana (9,69%). La actividad de peroxidasa en la fracción soluble contribuye solamente con un 0,95% del total de peroxidasa en hojas de árboles. El contenido de proteínas en este estado fenológico, alcanzó valores mayores y diferentes estadísticamente significativos en la fracción soluble (22,05%) de proteínas, comparados con las demás fracciones subcelulares. La actividad específica presentó un comportamiento similar a la actividad de peroxidasa en fracciones subcelulares, alcanzando mayores valores en la fracción iónica de pared (47,11%) y covalente de pared (31,66%), comparado con el resto de fracciones subcelulares.

En hojas de plantas de rebrote se alcanzó una actividad peroxidasa mayor en las fracciones subcelulares covalente de pared (39,17%) e iónica de pared (36,36%), diferentes estadísticamente a las demás actividades localizadas en las fracciones covalente de membrana (9,69%) e iónica membrana (10,12%). La fracción soluble contribuyó solo con 0,52% con relación al total de peroxidasa en hojas de rebrote. En estas plantas el contenido de proteínas reveló valores mayores significativos en la fracción soluble (20,37%) respecto a las demás fracciones subcelulares. La actividad específica mantuvo un comportamiento similar a actividad peroxidasa, destacándose la fracción iónica de pared (47,09%) y covalente a pared (31,84%).

En plantas en estado vegetativo la mayor parte de actividad peroxidasa se localizó en la fracción iónica de pared (34,29%) igual a la fracción subcelular covalente de pared (32,11%), y diferente estadísticamente a la iónica de membrana (17,75%) y covalente de membrana (15,29%). La actividad de peroxidasa de fracción soluble contribuye solamente con 0,56% con relación al total de peroxidasa en hojas provenientes de plantas en estado vegetativo. El contenido de proteínas en hojas de plantas en estado vegetativo manifestó valores mayores y significativos en la fracción soluble (22,47%) comparadas con el resto de fracciones. La actividad específica en hojas presentó en la fracción iónica a pared (34,54%) una mayor actividad, diferente estadísticamente al resto de fracciones.

Los resultados obtenidos en el fraccionamiento subcelular en hojas de *M. oleifera* muestran que a medida que se produce el desarrollo de la planta (desde vegetativo hasta estados superiores florales de tipo arbóreo) se mantiene un incremento en la secreción de PRX hacia la pared.

**Tabla 3.** Distribución de las actividades peroxidasa según técnica de fraccionamiento celular en hojas de plantas de *M. oleifera* con diferentes estados fenológicos.

Estado Fenológico	Fracción Subcelular	Actividad Peroxidasa (nkat.g Masa Fresca)	Contenido Proteínas ( $\mu\text{g}$ proteínas/ml)	Actividad Específica (nakt. $\mu\text{g}$ de proteína)
Árbol	Soluble	0,26 $\pm$ 0,02b	13,90 $\pm$ 0,53a	0,02 $\pm$ 0,01b
	Iónica de Membrana	2,84 $\pm$ 0,46b	12,19 $\pm$ 0,36b	0,23 $\pm$ 0,04b
	Iónica de Pared	12,80 $\pm$ 0,58a	12,19 $\pm$ 0,28b	1,05 $\pm$ 0,05a
	Covalente de Membrana	2,67 $\pm$ 0,41b	12,04 $\pm$ 0,05b	0,22 $\pm$ 0,04b
	Covalente de Pared	8,99 $\pm$ 0,64a	12,72 $\pm$ 0,03b	0,71 $\pm$ 0,29a
	p-valor	0,002	0,010	0,002
Rebrote	Soluble	0,09 $\pm$ 0,01c	12,30 $\pm$ 0,08a	0,02 $\pm$ 0,01c
	Iónica de Membrana	1,76 $\pm$ 0,14bc	11,80 $\pm$ 0,01d	0,23 $\pm$ 0,01bc
	Iónica de Pared	6,33 $\pm$ 0,48a	12,11 $\pm$ 0,09bc	1,05 $\pm$ 0,04a
	Covalente de Membrana	2,41 $\pm$ 0,46b	11,97 $\pm$ 0,02 cd	0,22 $\pm$ 0,04b
	Covalente de Pared	6,82 $\pm$ 0,21a	12,21 $\pm$ 0,04ab	0,71 $\pm$ 0,10a
	p-valor	0,010	0,001	0,001
Plántulas	Soluble	0,09 $\pm$ 0,01d	14,03 $\pm$ 0,10a	0,01 $\pm$ 0,01d
	Iónica de Membrana	2,87 $\pm$ 0,70bc	12,13 $\pm$ 0,02bc	0,24 $\pm$ 0,06bc
	Iónica de Pared	5,54 $\pm$ 0,16a	12,03 $\pm$ 0,03c	0,46 $\pm$ 0,01a
	Covalente de Membrana	2,47 $\pm$ 0,68 cd	12,07 $\pm$ 0,02bc	0,20 $\pm$ 0,06cd
	Covalente de Pared	5,19 $\pm$ 0,39ab	12,20 $\pm$ 0,02b	0,43 $\pm$ 0,11ab
	p-valor	0,003	0,001	0,003

Los valores medios por fracción y actividad peroxidasa, contenido de proteínas así como la actividad específica de peroxidasa, representan las

réplicas de  $n:15$  unidades. Medias con letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas por estados y entre fracciones subcelulares para un  $p\text{-valor}\leq 0,05$  (prueba de Duncan).

### 3.4. DISCUSIÓN

#### Composición mineral en órganos de *M. oleifera*

El análisis de las muestras valoradas en nuestro estudio se realiza en los órganos de *M. oleifera* en materia seca, al igual que el estudio realizado por Gopalakrishnan et al. (2016), que confirman que la conservación por deshidratación mejora la vida útil de las muestras de *M. oleifera*, sin cambios en el valor nutricional.

Los resultados obtenidos muestran que la principal fuente de nitrógeno se encuentra en las hojas (5,05%), valor que es ligeramente superior (4,11%) a lo obtenido por Afzal et al. (2020). García (2017) ha podido observar que muestras de hojas procedentes de climas cálidos, mostraron mayores valores de nitrógeno (del orden del 4,92%). Tawfik et al. (2021) ha podido observar como la exposición a nanopartículas de óxido de hierro, permite incrementos significativos de contenidos de nutrientes (N, P, K y K/Na) en las hojas de *M. oleifera* crecidas en ambientes salinos.

El nitrógeno es un elemento esencial en las plantas. En el caso de hojas de *M. oleifera*, se confirman elevados valores de 2,32% en plantas de tres meses y 15 meses (Farooq et al., 2021). En estas hojas, se valoró la presencia de 19 aminoácidos esenciales y los contenidos de proteína cruda ascienden al 28,7% (Teixeira et al., 2014) y 30,3% (Busani et al., 2011). Las proteínas en hojas de *M. oleifera* pueden tener contenidos con valores entre 23,2 y 31,0%, según las condiciones ambientales climatológicas, edafológicas, de rendimiento y de acumulación de nutrientes (Rubio, 2020).

El elemento azufre (S) se presenta con valores mayores en semilla, seguido de hojas en donde se ha cuantificado con valores de 0,63 % (Busani et al., 2011) y de 0,31 a 0,67% según origen (García, 2017). Comparado con otras especies, *M. oleifera* presenta valores mayores y puede ser una fuente

principal de azufre (Lyons et al., 2017) con valores de 1,13% (Farooq et al., 2021). El azufre en planta tiene un rol crucial en procesos fundamentales como homeostasis, transporte de electrones, catálisis y regulación, así como, en otros compuestos de defensa que contienen S (glutación, glucosinolatos, fitoquelatinas, metalotioneínas). Todos ellos se encuentran involucrados en la tolerancia de las plantas a situaciones de estrés abiótico como sequía, salinidad, toxicidad por metales, temperaturas altas y bajas (Nawaz et al., 2019).

### **Contenido de fenoles solubles en plantas**

Las plantas de *M. oleifera* constituyen una fuente esencial de polifenoles. Estos se distribuyen en órganos, con cantidades específicas en diferentes estados fenológicos. La utilización de métodos de extracción acuoso y metanólico permite una gran eficacia en la cuantificación de compuestos fenólicos en hojas *M. oleifera* (Hussain & Ikram, 2020).

En nuestro estudio, en el estado floral de *M. oleifera*, se obtiene una disminución de los contenidos de fenoles en hojas para extractos metanólicos, los que se igualan a lo obtenido en flores. Este comportamiento es confirmado por Förster et al. (2015) quienes indican que esta respuesta está condicionada por la variación en la edad en los estados fenológicos avanzados y en la parte de la planta que se recolectan las hojas.

En el presente estudio cuando se recogieron las hojas *M. oleifera* en la parte baja de las plantas en estado floral adulto, se determinó un CFS de extractos metanólicos (6,35 mg GAE/g de PS) y acuosos (6,89 mg GAE/g de PS) con mayores valores en relación a los demás órganos y similares entre ellos. Cabrera-Carrión et al. (2017) plantean que este comportamiento se mantiene cuando las hojas provienen de la parte baja de plantas de Moringa de 12, 15 y 18 meses de edad, con valores superiores de 13,40; 11,27 y 10,40 mg·g<sup>-1</sup> de PS respectivamente.

García en 2017 estudia el contenido en compuestos fenólicos atendiendo al origen geográfico, analizando muestras procedentes de Galicia y Guinea. En relación a nuestros resultados, cuando se valoró el extracto acuoso de hojas *M. oleifera* los CFS (6,89 mg GAE/g de PS) fueron menores a los obtenidos en

Galicia (23,01 mg GAE/g de PS) y Guinea (17,97 mg GAE/g de PS). Sreelatha & Padma (2009) evidenciaron que la edad de las hojas influye en el CFS cuando se utilizaron extractos acuosos de hojas tiernas y maduras de plantas en desarrollo alcanzando valores de 36,02 y 45,81 mg GAE/g de PS.

El extracto acuoso en plantas en estado vegetativo mostró valores (3,0 mg GAE/g de PS) inferiores a los reportados por Bozinou et al. (2019), quienes al utilizar hojas de plantas de tres meses de edad y un proceso de extracción a temperaturas de 80 a 100 °C alcanzaron mayor eficiencia de extracción con valores de 36,59 y 31,56 mg GAE/g de PS. Esta respuesta también se ha observado mediante la aplicación de nanomateriales como el óxido de cinc (NZnO) en semillas de *M. oleifera* en procesos de germinación y crecimiento vegetativo. En esta fase de desarrollo, los compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y vitamina C, principalmente a 10 mg L<sup>-1</sup> NZnO, presentan incrementos de hasta un 543% con respecto al control (Garza-Alonso et al., 2021).

### **Capacidad antioxidante total en plantas**

La actividad antioxidante en extractos metanólicos y acuosos de órganos de plantas de *M. oleifera*, evidencian la presencia de biomoléculas antioxidantes en todos los estados fenológicos valorados. Hussain & Ikram (2020) obtienen resultados semejantes en plantas en desarrollo con actividades notables de eliminación de DPPH que oscilan entre 69,5 y 83,1% en hojas *M. oleifera*.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Farooq et al. (2021), el cual pone en evidencia que la actividad antioxidante puede variar según el momento de desarrollo en estudio. Santos et al. (2012) observan la presencia de antioxidantes específicos en órganos en estado de desarrollo, identificando al menos tres flavonoides en extractos metanólicos de hojas y flores. En hojas, los flavonoides son la clase mayoritaria con doce compuestos (Nouman et al., 2016).

En nuestro estudio la relación de extractos metanólicos de hojas y flores presentaron los mayores valores. lhakmani et al. (2013) obtienen en flores la presencia de metabolitos antioxidantes como taninos, alcaloides, flavonoides

y fenoles totales. Este comportamiento es observado en estas hojas por Suphachai (2014) al observar la presencia de flavonoides en este tipo de extracto, donde se alcanzan 65,38 mg equivalentes de quinona/g de extracto en hoja y donde se evidencia una actividad antioxidante de 1,60 mg/mL.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran a las flores de *M. oleifera* como órgano potencial de CFS (6,53 mg GAE/g de PS). Alhakmani et al. (2013) obtuvieron en extracto etanólico de estas flores valores superiores (19,31 mg GAE/g de PS) de fenoles totales y una concentración moderada de actividad antioxidante.

En los estados fenológicos estudiados, los extractos acuosos de hojas tienen una potente actividad antioxidante contra los radicales libres, presentando las plantas en fase de crecimiento, valores mayores en hojas, respecto a las demás fases. Resultados similares han sido obtenidos en plantas de dos meses con valores del 82,61 y 70,72% de inhibición del radical DPPH al realizar el proceso de extracción de 80 a 100 grados de temperatura (Bozinou et al., 2019). Estos resultados muestran que, al utilizar diferentes solventes, el más eficiente fue el acuoso para polifenoles (58,04 mg/100 g), contenido total de flavonoides (12,36 mg/100 g) y una actividad eliminadora de radicales DPPH más alta en extracto acuoso con 79,18 % (Kwon & Youn, 2014).

La actividad antioxidante en plantas en desarrollo, confirma que las hojas presentan valores altamente valiosos de reducción del radical Sreelatha & Padma (2009) obtiene en hojas tiernas y maduras, actividades antioxidantes que permiten una protección significativa ante el daño oxidativo .

Los resultados alcanzados en el presente estudio con las plantas en diferente estado de desarrollo, muestran como la edad de las hojas y el tipo de extracto, son determinantes de la actividad antioxidante producto a su vez de la eficiencia en la extracción para compuestos fenólicos específicos.

### **Actividad peroxidasa en hojas**

La actividad peroxidasa en hojas en las diferentes fases fenológicas estudiadas, permite observar su comportamiento caracterizado por un

incremento de la actividad en estado floral. En estado floral arbóreo, expresa mayor actividad en hojas maduras que la copa, siendo característico que otras posiciones en rama no representen valores de actividad significativos (Agunbiade et al., 2021).

Los resultados muestran la presencia de biomoléculas en este órgano, lo cual pone en evidencia que esta actividad enzimática estaría relacionada con los requerimientos fisiológicos y ambientales donde se desarrollan. Khatun et al., (2012) observan que la PRX en hojas de *M. oleifera* muestra una actividad óptima a pH 6,0 y que se mantiene por encima del 50% de actividad durante un rango de temperatura de 20 a 70 °C con el óptimo a 50 °C .

En plantas arbóreas con mayores exigencias fisiológicas y exposición a condiciones ambientales cambiantes, la actividad PRX es esencial en la interacción con factores abióticos. Diferentes autores han puesto en evidencia la participación de esta enzima en la oxidación de un gran grupo de compuestos fenólicos como guaiacol, pirogalol, catecol, ácido clorogénico (Onsa et al., 2004) y aminas aromáticas (Khatun et al., 2012).

Esta enzima en hojas en fases arbóreas de *M. oleifera* es muy estable cuando se purifican (Agunbiade et al., 2021). En estas condiciones, se ha podido comprobar su aumento ante situaciones de estrés hídrico la notable diversidad de isoenzimas, estaría relacionado con una amplia gama de procesos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plantas en donde las peroxidasas tienen una participación significativa. Estos procesos serían la lignificación, la suberización, el catabolismo de las auxinas y el metabolismo secundario, así como la homeostasis redox, entre otros (Jovanović et al., 2018).

En estados vegetativos la actividad enzimática y específica fue la más baja, obteniéndose resultados semejantes en tejidos vegetativos de diferentes órganos, obteniéndose la menor actividad peroxidasa cuando se valoraban extractos de hojas *M. oleifera* (Shank et al., 2013). En estados juveniles de estas plantas *in vitro*, se obtiene mayor actividad de PRX cuando se encontraban en la etapa de enraizamiento (Ridzuan et al., 2020).

### **Actividad de peroxidasa soluble protoplástica y apoplástica en hojas**

Los procesos metabólicos celulares y su interacción con el medio ambiente, requieren de la actuación de enzimas y en especial la peroxidasa, encargadas de eliminar las especies reactivas al oxígeno y radicales libres generados en procesos metabólicos que ante factores abióticos limitan el funcionamiento celular (Vaquero-Raya & Molero-Richard, 2005). Estos indicadores eROS, se han integrado de manera imprescindible en la señalización intra e intercelular (Chaverri & Rodríguez, 2018). La utilización de órganos como las hojas es estudiada en diferentes especies, asumiendo que la actividad de la enzima en el sistema ensayado, permite reflejar la actividad en el tejido y su caracterización en estado vegetativo o floral. Cuando se realizó la infiltración de muestras de hojas, el comportamiento mostró un incremento significativo en la actividad PRX a nivel protoplástico en estados florales, en relación al vegetativo. Resultados similares fueron obtenidos por Bernal (1993) cuando analiza esta actividad en pares de hojas de ambos estados fenológicos en plantas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* (Bernal, 1993).

La actividad enzimática siempre mantuvo un transporte hacia la fracción soluble protoplástica en todas las fases fenológicas y en mayor cantidad las de tipo arbóreo. Esta movilidad de enzimas también ha sido observada en otras enzimas. Por ejemplo, la ascorbato peroxidasa (APX) se han identificado los genes APX citosólicos (AcAPX1 en hojas y AcAPX2 en raíz) derivados de *Actinidia chinensis* 'Hongyang' dirigiéndose al citosol, donde revelan que AcAPX1/2 citosólico puede desempeñar un papel protector importante en las respuestas a estímulos ambientales desfavorables en kiwi (Guo et al., 2022). En *Lupinus albus* L. las PRX en base a la localización subcelular intervienen en el catabolismo de las auxinas, y en esta especie está restringida al compartimento citosólico (Ros Barceló et al., 1989).

Los valores enzimáticos como indicadores oxidativos intracelulares son motivados en fases de desarrollo en mayor medida de tipo arbustivo, en condiciones ambientales *in vivo* a las que fueron expuestas las plantas de *M. oleifera*. En estas condiciones, los radicales superóxidos en protoplastos de mesófilo de trigo bajo diferentes estreses bióticos, incrementan la producción

de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentando el nivel de superóxido apoplástico. Estos niveles se correlacionan positivamente con las actividades totales de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) (E.C.:1.15.1.1), glutatión reductasa (GR) (E.C.:1.6.4.2), ascorbato peroxidasa (APX) (E.C.:1.11.1.11) y catalasa (CAT) (E.C.:1.11.1.6) como moduladoras de las respuestas de defensa antioxidante bajo estrés fotooxidativo (Robert et al., 2009).

El apoplasto actúa como vínculo de conexión entre el medio ambiente y el protoplasto de la planta, desempeñando múltiples funciones en el metabolismo y los procesos de señalización. El método de infiltración a vacío está bien establecido como una técnica robusta para el análisis de la composición del apoplasto. Así cuando se analiza el fluido apoplástico de hojas verdes tiernas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol francés), el fluido apoplástico varía en respuesta a la especie y el genotipo, así como al desarrollo de la planta y las condiciones ambientales (Jovanović et al., 2018; O'Leary et al., 2014). Diferentes autores han puesto en evidencia cómo los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes en apoplasto de frutos del chile (*Capsicum annuum* L.) inducido por la sequía, revelan un incremento en la actividad de la peroxidasa, así como la expresión de 43 especies de proteínas de tipo defensinas, peroxidases, proteínas inhibitoras de la poligalacturonasa y proteínas superóxido dismutasa (Turhan et al., 2006; Jaswanthi et al., 2019).

### **Fraccionamiento subcelular de la actividad de peroxidasa en hojas**

Los cambios en el metabolismo celular son evidentes en los diferentes estados fenológicos y principalmente cuando las plantas requieren evolucionar del crecimiento vegetativo al desarrollo floral. En estos momentos las PRX, se involucran en una amplia gama de procesos metabólicos fundamentales relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas como la remodelación de los componentes de la pared celular o la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Chen et al., 2022). En hojas de *M. oleifera*, la mayor parte de la actividad de peroxidasa medida con 4-metoxi- $\alpha$ -naftol como sustrato, permite su localización en la fracción iónica y covalente de pared

celular que presenta mayor expresión en los estados florales y en especial el arbustivo. Esta respuesta indica las primeras interacciones de la planta con el medio, donde la pared celular es considerada como una estructura dinámica capaz de proporcionar soporte mecánico a las células vegetales, con un rol decisivo en el crecimiento y desarrollo de las plantas, que permite a las células hacer frente a diferentes estreses bióticos y abióticos (Wolf et al., 2012).

Estas respuestas de la enzima en hojas de *M. oleifera* a nivel de pared celular, pudiera estar relacionado con su participación en procesos de ensamblaje y lignificación de la pared celular en mayor medida para estados fenológicos florales de tipo arbustivos. En especial la localización de la peroxidasa básica, gracias a la técnica de fraccionamiento subcelular, se ve que se encuentra ampliamente distribuida en especies de plantas de la familia Asteraceae, actuando en las lignificaciones, donde es localizada tanto en la fracción iónica como covalente de la pared celular para facilitar el ensamblaje y lignificación de la pared celular (Ros Barceló & Aznar-Asensio, 2002).

En los estados fenológicos que son valorados como plántulas, rebrotes y arbóreas estas incrementan su interacción con el medio ambiente local a medida que transitan de estados.

#### **4. CAPÍTULO II**

**Efecto fortificante de extractos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* Lam de estado vegetativo y floral en vitroplantas de banano (*Musa AAA*) clon Williams en condiciones de aclimatación.**



#### 4.1. INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa* sp.) es una de las frutas tropicales más cultivadas en el mundo con más de 1000 variedades destinadas al consumo fresco en mercados locales e internacionales, siendo las más comercializadas las que pertenecen a los Cavendish con un 45% del mercado mundial (Falcomer et al., 2019; Tripathi et al., 2020). La producción de banano a nivel mundial en el año 2021 fue de 125 millones de toneladas destacando como principales países productores India (33 millones de toneladas), China (12 millones de toneladas) y China continental (11 millones de toneladas). En Ecuador en este mismo año se produjo 6,7 millones de toneladas, ubicándolo en el sexto mayor productor (FAOSTAT, 2023) y primer exportador de banano del mundo (Ajila et al., 2023).

En Ecuador el sector bananero tiene un gran aporte al Producto Interior Bruto (PIB) debido a que representa el 2% del PIB general y el 35% del PIB agrícola. Los sistemas de producción actuales responden en su gran mayoría, a sistemas convencionales de monocultivo establecidos con banano del grupo Cavendish a nivel nacional desde 1973. En ellos se realiza un excesivo uso de insumos químicos externos (agrotóxicos y agroquímicos) con aplicaciones terrestres y aéreas, siendo la aerofumigación la más comúnmente utilizada y la más peligrosa en términos de toxicidad al ambiente (Cedeño & Gallardo, 2022).

Los sistemas productivos bananeros en el país dependen de la importación de fertilizantes inorgánicos (Xavier & Villavicencio, 2018), en donde el impacto por el alto costo de estas fuentes de nutrientes en la agricultura ecuatoriana, conlleva una mayor inversión y menor producción en el proceso de cosecha (Garces & Leonel, 2022). Estas producciones responden a los principios de la revolución verde, dependientes de altas dosis de fertilizantes y productos químicos fitosanitarios que incorporan contaminantes a las plantaciones bananeras (Sahodaran & Ray, 2018).

El manejo actual de las producciones de banano Cavendish mediante sistemas convencionales conlleva el uso de fertilizantes químicos, que aumentan enormemente el rendimiento de los cultivos, pero generan un

desequilibrio de los minerales del suelo, destruyen la estructura del suelo y el ecosistema en general a largo plazo (Elemike et al., 2019).

La búsqueda de alternativas limpias en el manejo de plantaciones de banano requiere de cambios desde sistemas productivos convencionales hacia sistemas orgánicos sostenibles. En el momento actual, el uso emergente de los bioproductos como fuente nutricional y estimulante, está permitiendo fortalecer los cultivos aplicando los principios de una economía circular local (Carpio et al., 2022; El Sheikha et al., 2022).

Dentro de los bioproductos con carácter fortificante que están siendo utilizados en el manejo de sistemas productivos destacan diferentes tipos de extractos. Indicar el uso de extractos de compost (Oyewusi & Osunbitan, 2021), té de vermicompost, extracto de levadura (El Sheikha et al., 2022), extracto acuoso de microalga verde (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) (González-Pérez et al., 2021; Kusvuran, 2021), extractos acuosos de órganos (rizoma, raíz, vaina foliar y lámina) de la planta de banano (Roy et al., 2006), extractos acuosos de rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa* L.), hojas de acedera (*Rumex vesicarius* L.), hojas de uvas (*Vitis vinifera* L.) y cáliz de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Abo-El-Kheer et al., 2019), así como extractos acuosos foliares de *M. oleifera* en diversos cultivos.

Las aplicaciones foliares de extractos acuosos de *M. oleifera* han sido utilizadas también en la mejora del crecimiento y vigor del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Biswas et al., 2016), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Ortiz-Rojas et al., 2017), garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Irshad et al., 2022), brócoli (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*) (Sakr et al., 2021), stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) (Sardar et al., 2021), uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) (I. Khan et al., 2020), maíz (*Zea mays* L.) (Mona, 2013), cohete (*Eruca vesicaria* L. Cav) (Afzal et al., 2012) y pastos (*Cenchrus ciliaris* L., *Panicum antidotale* Retz., *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv) (Nouman et al., 2012).

La *M. oleifera* presenta un alto potencial biotecnológico debido a su composición química reportando más de 90 nutrientes reconocidos y 46 antioxidantes (Umamaheswari et al., 2019). Los extractos acuosos de hojas

en fase floral (árbol) han sido caracterizadas por su actividad antioxidante, relacionada a su vez por su alto contenido de polifenoles (Moyo et al., 2012; Qwele et al., 2013; Verma et al., 2009). Las determinaciones fitoquímicas en extractos de estas hojas, identifican diferentes ácidos fenólicos (gálico, clorogénico, elágico y ácido ferúlico) y flavonoides (kaempferol, quercetina y rutina), hormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas), ácido salicílico y ascórbico que representan una buena fuente de antioxidantes naturales (El Sheikha et al., 2022; Umamaheswari et al., 2019). Estos extractos de hojas son ricos en zeatina, calcio y potasio que tienen un rol como promotor de crecimiento de los cultivos. Además, los extractos acuosos son de fácil preparación, lo cual permite su utilización como bioestimulantes vegetales enriquecidos en nutrientes, fitohormonas, metabolitos secundarios, aminoácidos y compuestos bioactivos (El Sheikha et al., 2022; Yuniati et al., 2022).

El uso de la *M. oleifera* como planta bioestimulante es corroborado en plantas de trigo (*Triticum* L.) donde la pulverización foliar retrasa la maduración de los cultivos, extiende el área foliar estacional y el período de llenado del grano, lo que conduce a un mayor tamaño de semilla y rendimientos biológicos (Khan et al., 2020; Yasmeen et al., 2012, 2013).

El empleo de extractos naturales de Moringa es una alternativa al uso de fertilizantes en los sistemas bananeros locales, con el objetivo de alcanzar producciones limpias y sostenibles con el ambiente, así como el incremento del nivel de resiliencia de este cultivo.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La actividad fortificante fue ensayada en vitroplantas de banano (*Musa* AAA) clon Williams de seis semanas de edad en fase de vivero. Las vitroplantas establecidas en sustrato constituido de cáscara de arroz y arena lavada 3:1, se les retiró los residuos orgánicos mediante el lavado a chorro de agua a raíces. Las vitroplantas a raíz desnuda se ubicaron en macetas de plástico de capacidad de 2 litros en condiciones de invernadero durante el período de evaluación. El sustrato utilizado estuvo compuesto por soporte artificial constituido por fibras de vidrio (lavada con agua destilada) así como una solución nutritiva de macro y micronutrientes en agua destilada que estuvo compuesta por  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (85%),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  establecida y estandarizada por el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de A Coruña. La solución nutritiva fue incorporada a las plantas a razón de 100 mL por planta cada tres días por todo el tiempo que requirieron los experimentos, permitiendo establecer el modelo fortificante (figura 10 A-D) en las condiciones locales de aclimatación (Ugarte-Barco et al., 2018).



**Figura 10.** Modelo de evaluación fortificante de vitroplantas de Clon Williams en condiciones de aclimatación para cada experimento. **A:** Vitroplantas de banana libres de sustrato **B:** Sustrato de soporte artificial y solución nutritiva utilizados **C:** Vitroplantas de banana expuestas a extractos acuosos de *M. oleifera* de fase vegetativa y floral. **D:** Condiciones de invernadero.

Las vitroplantas de banana de cada experimento a los siete días establecidas en macetas a raíz desnuda y bajo nutrición líquida en el invernadero, mostraron uniformidad de respuesta al ambiente y nueva forma de nutrición, con hojas abiertas y en posición vertical. En este momento, las vitroplantas fueron atomizadas con los extractos acuosos (vegetativo o floral) de *M. oleifera* involucrando la totalidad de las hojas, siendo expuestas a 10 mL en el haz y 10 mL en el envés, realizándose la aplicación una sola vez, evaluándose el efecto fortificante de los extractos acuosos a los 7, 14 y 21 días de iniciado cada ensayo.

Las vitroplantas requirieron de 250 mL de la solución nutritiva como sustrato, dos veces por semana debido a los requerimientos del estado fenológico de crecimiento y condiciones ambientales.

Las condiciones de invernadero fueron monitorizadas y programadas, utilizando un registro previo de temperatura y humedad relativa durante veinticuatro horas por una semana. El equipo portátil ambiental multifuncional 5/1 permitió este registro en los meses de evaluación, obtenido para ciclos naturales, valores medios en el período de evaluación con luz de 163,45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatura de 27,55 °C y humedad relativa de 64,67 %.

### **Diseños experimentales**

Se utilizó un diseño completamente al azar 5x10, en el cual el factor de estudio manipulado fue el extracto acuoso de *M. oleifera*, aplicándose cinco diluciones (tratamientos de 0, 30%, 60%, 90% y 100%) en estados vegetativo (primer experimento) y floral (segundo experimento) de la planta.

La distribución de los tratamientos en cada experimento se realizó completamente al azar en unidades experimentales (macetas de plástico con una superficie de 0,30 m<sup>2</sup> cada una) replicados diez veces, generando 50 unidades experimentales, en cada una de las cuales fueron plantadas las vitroplantas de banano.

### **Modelo matemático**

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

#### **Donde:**

$Y_{ij}$ : observación obtenida en el i-ésimo tratamiento y la j-ésima observación.

$\mu$ : media general de la variable respuesta.

$\tau_i$ : indica el efecto del i-ésimo tratamiento del factor de estudio.

$e_{ij}$ : error asociado al i-ésimo tratamiento y la j-ésima observación.

### **Primer experimento**

En la provincia (cantón Arenillas) se recolectaron semillas de *M. oleifera* con las cuales se realizó la siembra en bandejas (primer experimento). Las semillas de *M. oleifera* procedían de vainas alargadas de 20 a 25 cm de longitud, con una cubierta de color café oscuro, aladas y con una madurez aproximada de tres meses, alcanzando un diámetro promedio de 1cm. Se les retiró las estructuras aladas a las semillas y se sembraron en bandejas de plástico de 20 pocillos (10x10x10 cm) con una capacidad por pocillo de 1000 cm<sup>3</sup> que contenían como sustrato suelo de clase franco arcillosa a una profundidad de 1cm y cubriendo las semillas con el sustrato. Posteriormente se llevaron a una mesa de malla metálica, ubicadas en áreas de aclimatación en condiciones de invernadero (*ex vitro*), controlando la humedad del suelo mediante el manejo del riego automatizado por aspersión durante 4 minutos con una frecuencia de 6 riegos por día, que permitió mantener una temperatura y humedad relativa promedio de 27 °C y 80%, respectivamente.

Las bandejas a los 7 días presentaron el 50% de semillas germinadas, momento que se estableció como día 1 para establecer el estado vegetativo de las plántulas hasta alcanzar los 20 días (figura 11A). La utilización de la totalidad de las hojas de *M. oleifera* a esta edad permitió elaborar el primer extracto acuoso (vegetativo) fortificante.

### **Segundo experimento**

Se han utilizado plantas de *M. oleifera* procedentes del primer experimento, con un promedio de 25 cm de altura y con todos sus órganos endurecidos (hojas, tallo, raíz). Las plantas se trasplantaron a canteros permanentes a cielo abierto (*in vivo*), estableciéndose en sustrato de suelo de clase franco arcillosa, que requirió implementar riegos localizados y automatizados de 2 minutos y frecuencia cada 24 horas. Estas condiciones permitieron mantener la capacidad de campo en los primeros 50 cm alrededor del tallo en los meses con limitaciones de lluvias, logrando alcanzar árboles de 1,5 años de edad (figura 11B). En los momentos de toma de muestras de hojas, las condiciones ambientales locales se caracterizaron por presentar temperaturas promedio

de 28 °C de y 85% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas de oscuridad. Las muestras de hojas de *M. oleifera* fueron recolectadas de la parte baja de la copa del árbol, permitiendo elaborar el segundo extracto acuoso (floral) fortificante.



**Figura 11.** *A.* Plántulas de *M. oleifera* en estado vegetativo. *B.* Plantas de *M. oleifera* en estado floral.

### **Método de elaboración de los extractos**

La preparación de los extractos acuosos en fase vegetativa requirió todas las hojas presentes por planta mientras que en la fase floral se recolectaron las hojas de la parte baja de la copa de la planta. Las hojas fueron lavadas con agua destilada para eliminar impurezas.

Las hojas de Moringa libres de impurezas se ubicaron en una estufa a 70 °C durante 24 horas. La materia seca obtenida se trituro inmediatamente en un molinillo Moulinex con cuchillas finas, el polvo obtenido se almacenó a temperatura ambiente en un lugar seco y protegido de la luz hasta su utilización.

Para la realización de los experimentos 1 se utilizó 0,1 g de polvo de hoja de Moringa en estado vegetativo y para el experimento 2 se utilizó 0,1 g de polvo de hoja de Moringa en estado floral. La obtención del extracto acuoso se obtuvo adicionando 5 mL de agua destilada a exposición en baño María (50 °C por 15 minutos). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y a continuación

las soluciones fueron filtradas, utilizándose papel de filtro número 5 que permitió obtener extractos acuosos puros de Moringa en estado vegetativo y floral.

De cada extracto acuoso puro se tomaron 2,5 mL los cuales fueron diluidos en 250 mL de agua destilada (100% de extracto acuoso de Moringa; "Extracto A") y a partir de esta concentración se elaboraron cuatro diluciones y se conformaron por tipo de extracto (vegetativo y floral) los siguientes tratamientos:

Trat	Dilución de Extracto A	Volumen de Extracto A (mL)	Volumen total (mL)	[hoja moringa] mg/mL
T1	0	0	250	0
T2	30%	75	250	0,06
T3	60%	150	250	0,12
T4	90%	225	250	0,18
T5	100%	250	250	0,20

En el experimento 1 los extractos se prepararon con hojas de plantas en estado vegetativo y en el experimento 2 con hojas de estado floral.

### **Toma de muestras y recolección de datos**

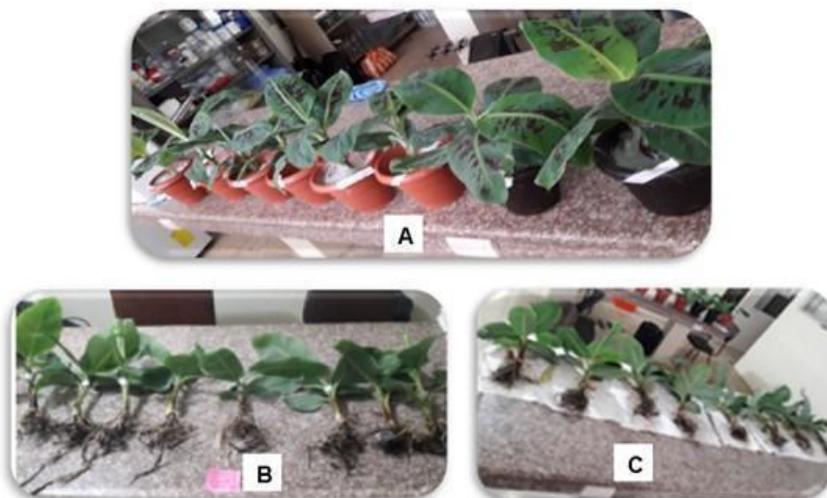
En los experimentos de extractos vegetativos y florales de *M. oleifera* a concentraciones de 0, 30, 60, 90 y 100%, se realizaron toma de muestras de vitroplantas de banano a los 7, 14 y 21 días de aplicación de los extractos. Por cada tratamiento se utilizaron cinco vitroplantas para análisis bioquímico, que fueron etiquetadas y llevadas a conservación (muestras frescas conservadas en refrigeración y secas conservadas a temperatura ambiente y

en oscuridad). Por otra parte, 15 vitroplantas se destinaron para valorar las variables morfológicas en el momento de la toma de muestras.

### **Parámetros morfológicos**

La medición de los parámetros morfológicos se realizó cada siete días en tres ocasiones después de aplicados los extractos vegetativos y florales en condiciones de invernadero. Los parámetros valorados son: número de hojas, longitud (desde la base del peciolo hasta el ápice de la hoja), ancho de la hoja D (tercera hoja, en la posición central del limbo) y longitud del pseudotallo (desde la intersección del tallo y la base del pseudotallo hasta base del peciolo de la hoja más joven) (estas medidas se han realizado utilizando regla graduada y un calibre digital (Truper®, México)). Para obtener el peso fresco, seco y de cenizas se utilizaron vitroplantas de banano completas (hojas, pseudotallos, tallo y raíz) seleccionando una unidad por tratamiento en cada momento de evaluación de los experimentos (figura 12A). Previamente se realizó extracción de la planta de banano de cada maceta (figura 12B) lavado a chorro de agua para la eliminación de residuos del sustrato (fibras de vidrio como soporte y medios nutritivo líquido) con la finalidad de realizar el secado con papel de filtro (figura 12C) y posterior pesada del peso fresco de las vitroplantas en una balanza gramera (Yugo®, China).

Las vitroplantas de banano una vez tomado el peso fresco de las muestras, fueron llevadas a estufa MEMMERT® VM400 (MEMMERT®, Alemania) a 100 °C de temperatura por 72 horas y registrado a la salida el peso seco. Las muestras seguidamente fueron llevadas a una cápsula de cristal y ubicadas en mufla programable a 600° C por 24 h (Nabertherm®, Alemania) y seguidamente se realizó la pesada del material resultante para registrar el peso de las cenizas.



**Figura 12.** Vitroplantas de Clon Williams establecidas en condiciones de aclimatación. **A:** Eliminación de soporte artificial. **B:** Secado en papel de filtro **C:** Vitroplantas de banano en macetas listas para análisis bioquímico.

### **Fuga de electrolitos**

El comportamiento de la fuga de electrolitos en hojas de vitroplantas se analizó por el método de conductividad eléctrica (Lafuente et al., 1991) empleando discos de hojas de 9 mm de diámetro obtenidos con la ayuda del tubo de corte. Los discos utilizados fueron lavados tres veces con agua destilada y desionizada mediante telas de gasa. El número de unidades de disco fue de 10 por tratamiento que se ubican en Erlenmeyer con 20 mL de agua destilada y desionizada en reposo por 20 horas a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se realizó la lectura de conductividad de la solución con un equipo pH metro–conductímetro, siendo la unidad de medida utilizada micro siemens ( $\mu\text{s}$ ). Posteriormente las muestras fueron expuestas a 50 °C por 15 min con el fin de exponer los tejidos y registrar la conductividad en la solución resultante.

La fuga de electrolitos se calculó según la siguiente ecuación: % electrolito  $(C_1/C_2) \times 100$ , donde  $C_1$  y  $C_2$  fueron las condiciones de la solución antes y después de la exposición del tejido.

### Contenido de pigmentos fotosintéticos

El poder fortificante de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral fue valorado según el contenido de clorofilas y carotenoides de vitroplantas de banano (Musa AAA) variedad Williams. Se han utilizado 0,25 g de peso fresco de hojas, conservándose en condiciones controladas de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras se homogeneizaron en mortero de porcelana a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 5 mL de acetona al 80% (v:v). Los extractos obtenidos fueron filtrados en gasa de aproximadamente 2 mm y llevados a centrifuga refrigerada Eppendorf modelo 5430 R a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y 15000 g. Se recolectó el sobrenadante y se conservó en oscuridad para su lectura en cubeta de 1 mL en espectrofotómetro a 663 nm, 647 nm, 470 nm para determinar el contenido de clorofilas *a*, clorofilas *b* y carotenos. Las concentraciones de clorofilas *a* ( $C_a$ ), clorofilas ( $C_b$ ), y carotenoides que comprenden xantofilas y carotenos ( $C_{(x+c)}$ ), fueron expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de acuerdo a ecuaciones de (Lichtenthaler & Buschmann, 2001)

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = 12,25 * A_{663} - 2,79 * A_{647}$$

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = 21,50 * A_{647} - 5,10 * A_{663}$$

$$C_{(x+c)} = (1000 * A_{470} - 1,82 * C_{\text{CHLa}} - 85,02 * C_{\text{CHLb}}) / 198$$

### Contenido de fenoles solubles

Para la valoración del contenido de fenoles solubles en vitroplantas de banano Williams se utilizaron diferentes órganos (hoja, pseudotallo y raíz) los cuales se lavaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro, llevándose a estufa por 24 horas a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente fueron triturados con ayuda del molino marca Monlinex con cuchilla fina para obtener polvos de cada órgano, que fueron conservados protegidos de la luz. Los procesos de

extracción y cuantificación de fenoles solubles se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado **3.2 (Contenido de fenoles solubles)**.

### **Actividad antioxidante total**

El resultado del proceso de extracción de fenoles solubles en órganos de vitroplantas de banano Williams, fue el material utilizado para la caracterización de la actividad antioxidante total de cada órgano (hoja, pseudotallo y raíz) determinándose mediante el procedimiento metodológico descrito en el apartado **3.3 (Actividad antioxidante total)**.

### **Actividad de peroxidasa y contenidos de proteínas solubles**

La cuantificación de la actividad enzimática (peroxidasa) y el contenido de proteínas se realizó en muestras de hojas de vitroplantas de banano Williams mediante la descripción realizada en el apartado **3.2 (Peroxidasa (PRX))**.

### **Procedimiento estadístico**

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor intergrupos para conocer si existen o no diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones de extractos acuosos de *M. oleifera* (0, 30, 60, 90 y 100%), para cada órgano analizado (vegetativo y floral) y momento de evaluación (7, 14 y 21 días) en función de las variables dependientes medidas, previo cumplimiento de los requisitos del modelo paramétrico (independencia de errores, normalidad de datos y homogeneidad de varianzas). Cuando se incumplió al menos un supuesto del modelo paramétrico en función de las variables de respuesta, se utilizó la prueba no paramétrica ANOVA de Kruskal-Wallis para detectar la presencia o no de diferencias entre los tratamientos.

Cuando se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en cada momento evaluado, en cada tipo de extractos según estado fenológico y concentración de hojas de *M. oleifera*, relacionadas con las variables dependientes estudiadas, se utilizó la prueba de rangos y comparaciones

múltiples de Duncan. Los datos obtenidos fueron procesados con el paquete estadístico SPSS versión 25 de prueba para Windows utilizándose una confiabilidad en la estimación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

### 4.3. RESULTADOS

#### Crecimiento foliar

El extracto de hoja de *M. oleifera* (figura 13A) en estado vegetativo mostró resultados similares entre ellos y el testigo, en relación al número de hojas emitidas en las vitroplantas de banano a los 7 y 21 días de aplicado. A los 14 días los tratamientos donde se aplicaron extractos de Moringa mostraron valores menores (excepto con 60% de extracto) y diferentes estadísticamente al testigo (7,7 hojas) que alcanzó el mayor valor, lo que puede estar asociado a que no se logra manifestar un control celular por parte de los extractos de *M. oleifera*.

La aplicación de extractos de hoja de *M. oleifera* en estado floral incrementó ( $p \leq 0,05$ ) la emisión de hojas en un 8% en relación al testigo cuando se utilizaron concentraciones de 30 y 60% a los 14 días, contrario a lo ocurrido a los 7 días ( $p > 0,05$ ). A los 21 días en la concentración de 100% se obtuvo el mayor valor (9,0 hojas) siendo diferente estadísticamente al resto de tratamientos, en los cuales se alcanzaron magnitudes entre 7 y 8 hojas. Esta concentración permitió valores máximos de incrementos (29%) de emisiones de hojas por vitroplantas comparadas al testigo (figura 13B).

En la figura 13C, el extracto de hoja de *M. oleifera* en estado vegetativo mostró para la longitud de hoja D valores máximos a los 7 y 14 días al utilizar concentraciones del extracto de *M. oleifera* al 100%. Este extracto mostró su mayor potencial con incremento ( $p \leq 0,05$ ) de 3% del crecimiento de este órgano a los 21 días cuando se utilizó la concentración de 30% con relación al testigo.

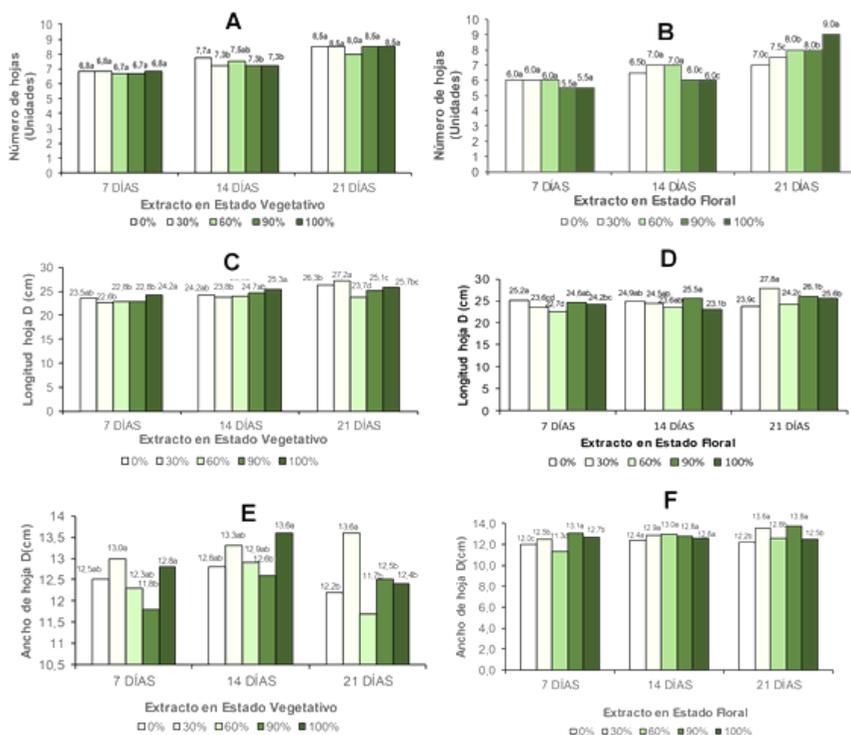
El efecto de extracto de hoja de *M. oleifera* en estado floral a los 14 días mostró un incremento en longitud de hoja (2%) cuando se utilizó la concentración de 90%. El potencial de este extracto a los 21 días permitió obtener valores máximos ( $p \leq 0,05$ ) e incrementos de 16% en el crecimiento de longitud de hoja D cuando se utilizó la concentración del 30% (figura 13D) con relación al testigo.

El extracto de *M. oleifera* en estado vegetativo mostró valores máximos de ancho de hoja D, a los 7 y 14 días cuando se aplicaron concentraciones de 30

y 100%. Este extracto permitió obtener incrementos ( $p \leq 0,05$ ) de 11% en ancho de hoja D cuando se utilizó la concentración de 30% a los 21 días con relación al testigo (figura 13E).

El extracto de hoja en estado floral, mostró a los 7 días incrementos significativos de 9% en el ancho de hoja D cuando se utilizó la concentración del 90% comparadas al testigo. Se pudo observar una respuesta similar a los 21 días con incrementos ( $p \leq 0,05$ ) de 11 y 13% en el ancho de la hoja D para concentraciones de 30 y 90% (figura 13F).

Los extractos acuosos de *M. oleifera* en estado floral permitieron la estimulación foliar del número de hojas de vitroplantas de banano a los 14 días (con 30 y 60%) y del 100% a los 21 días, así como el crecimiento en longitud (extracto vegetativo y floral al 30%) y ancho de la hoja (extracto vegetativo 60% y floral al 30 y 60%) a los 21 días de aplicados los extractos.



**Figura 13.** Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en número, longitud y ancho de hoja emitida por vitroplantas de banano Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor}\leq 0,05$ ) según prueba de Duncan.

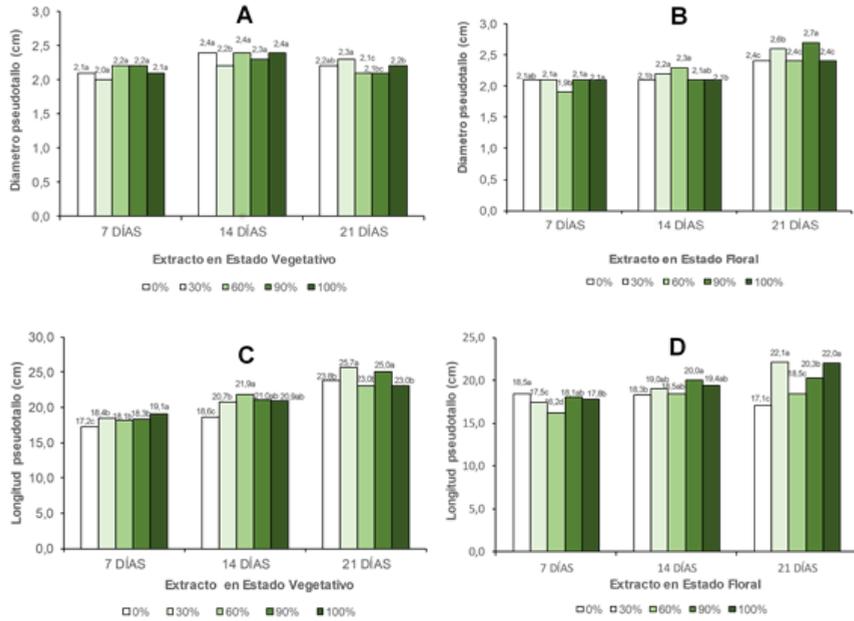
### Crecimiento del pseudotallo

El extracto de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo alcanzó valores semejantes al testigo ( $p>0,05$ ) hasta los 14 días de evaluación del diámetro del pseudotallo en las vitroplantas de banano (figura 14A), observándose el mismo comportamiento a los 21 días cuando se utilizó la concentración de 30%. El empleo de extractos en estado floral permitió a los 14 días incrementos ( $p\leq 0,05$ ) de 5% y 10% en el diámetro del pseudotallo de banano cuando se utilizaron concentraciones de 30% y 60% respecto al testigo, igualando el resto de concentraciones estudiadas a dicho testigo. Este

extracto permitió la obtención de valores diferentes estadísticamente con incrementos de 8,3 y 12,5% a concentraciones de 30% y 90% respectivamente a los 21 días (figura 14B).

La utilización de diferentes concentraciones de extracto de *M. oleifera* en estado vegetativo, incrementó la longitud del pseudotallo de banano hasta los 14 días de evaluación en relación con el testigo. Se produjo un incremento del 11% en la longitud del pseudotallo ( $p \leq 0,05$ ) a los 7 días a concentración del extracto del 100% con relación al testigo. También presentó diferencias con las concentraciones de 30, 60 y 90%. Así a los 14 días la concentración de 60% alcanzó un 18% de incremento respecto al testigo y a los 21 días las concentraciones de 30% y 90% incrementaron un 8% y 5% respectivamente, en relación con el testigo (figura 14C).

El extracto en estado floral favoreció con valores significativos e incrementos del 29% en longitud de pseudotallo de banano en las concentraciones de 30% y 100% a los 21 días, respecto al testigo (figura 14D).

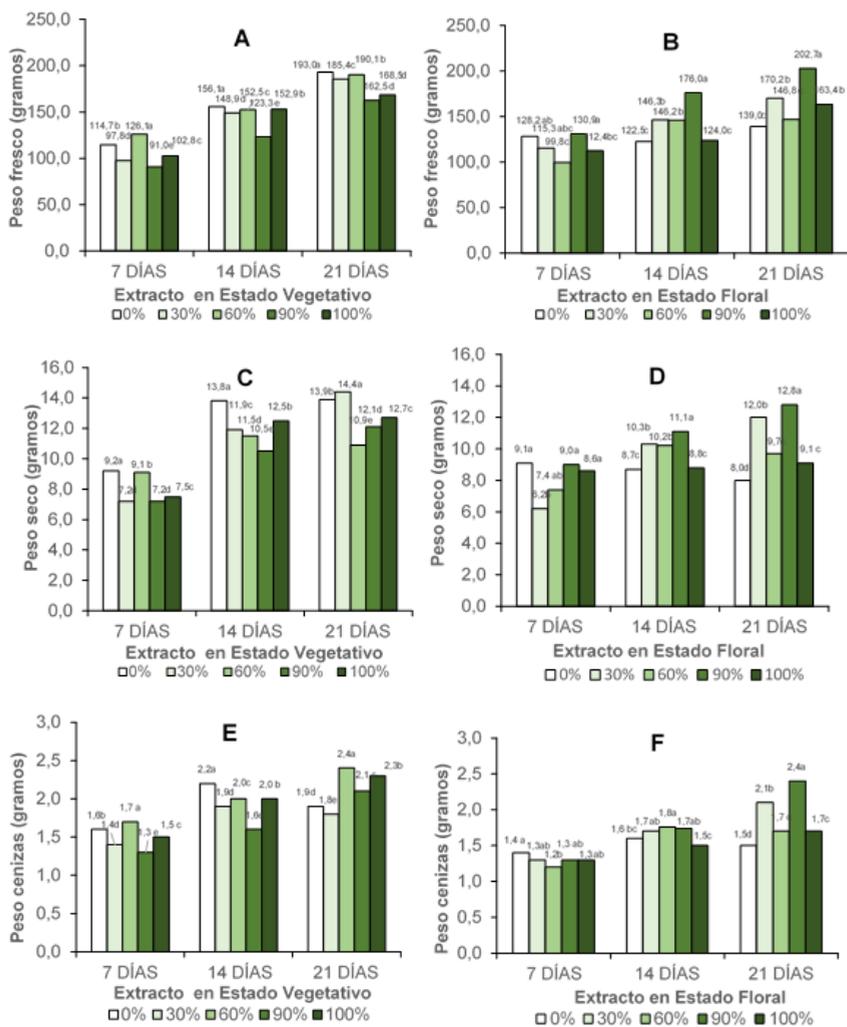


**Figura 14.** Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en el diámetro y longitud del pseudotallo en vitroplantas de banana Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencia significativa ( $p$ -valor $\leq 0,05$ ) para prueba Duncan.

### **Peso fresco, peso seco y cenizas**

El efecto fortificante de extractos acuosos *M. oleifera* fue registrado en el peso fresco de vitroplantas de banano cuando se utilizó extracto en estado vegetativo al 60% de su concentración (7 días), mientras que en extractos florales fue necesario el 90% (14 y 21 días).

La eficiencia en conversión de masa seca fue registrada con extractos en estado vegetativo al 30% (21 días) y extracto floral al 90% (14 y 21 días). En cuanto al incremento en el contenido de cenizas, la eficiencia de los extractos en estado vegetativo fue al 60% (7 y 21 días) cuando el estado floral es efectivo al 60% (14 días) y con mejores efectos en 30 y 90% (21 días).

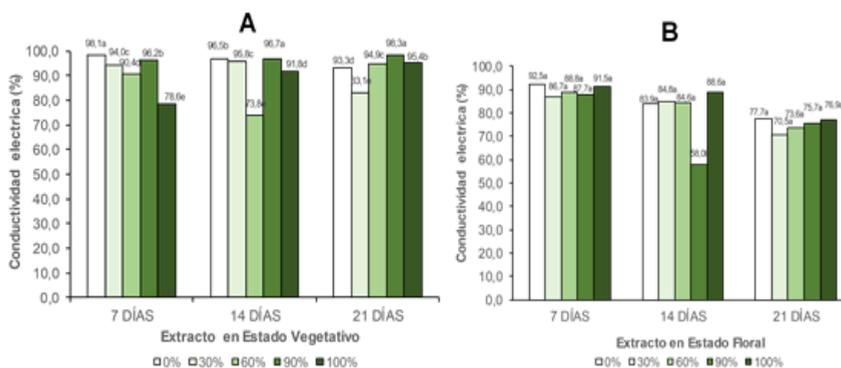


**Figura 15.** Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en la peso fresco, seco y cenizas en vitroplantas de banana Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencia significativa ( $p$ -valor $\leq 0,05$ ) para prueba Duncan.

## Protección de membrana celular

En la figura 16A se puede observar como el extracto en estado vegetativo obtuvo valores más bajos de conductividad eléctrica, con disminuciones ( $p \leq 0,05$ ) de 20% (7 días), 24% (14 días) y 11% (21 días) a concentraciones de 100%, 60% y 30% con relación al testigo. En la figura 16B el extracto en estado floral obtuvo valores más bajos, y mostró diferencia estadística significativa con disminuciones de 31% (14 días) a concentración de 90%. Este extracto manifestó valores más bajos con disminuciones de 9% (21 días) a concentración de 30%, aun cuando no difirió estadísticamente del testigo.

Los extractos acuosos de *M. oleifera* permitieron una mayor protección de membrana celulares en las hojas de vitroplantas de banano, al utilizar concentraciones de extratos de hojas en fase vegetativa a 100 (7 días), 60 (14 días) y 30% (21 días). Sin embargo, la mayor protección fue ejercida con extracto de hojas de fase floral a 90% (14 días).



**Figura 16.** Efecto fortificante de *M. oleifera* según extractos acuosos de hoja en estado vegetativo y floral en la conductividad eléctrica de discos de hojas por vitroplantas de banano Williams en condiciones de aclimatación. Para cada parámetro y origen del extracto (vegetativo o floral), letras diferentes indican diferencia significativa ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) para prueba Duncan.

### **Estado del contenido de pigmentos fotosintéticos**

El contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de banano a los 7 días, resultó favorecido ( $p \leq 0,05$ ) cuando se utilizó extracto de hoja de *M. oleifera* en estado vegetativo (tabla 4) a concentración del 30% para variables de clorofilas *a*, *b*, total (*a+b*) y relaciones (*a+b*) / carotenos con incrementos de 3,60; 36,42; 14,10 y 44,30% respectivamente con relación al testigo. El contenido de caroteno cuando se utilizó la concentración de 90% alcanzó el mayor valor (13,24 mg/g peso fresco) diferente estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) con relación a los demás tratamientos. Comparado con el testigo, se alcanzó un incremento de 23,16%. La relación clorofílica de *a/b* requirió del 60% de concentración del extracto para lograr valores máximos significativos ( $p \leq 0,05$ ) que superaron al testigo en 38,49%.

La aplicación de extracto de hojas de *M. oleifera* en estado floral (tabla 4), permitió obtener valores diferentes estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) entre la concentración de 100% y los demás tratamientos en las variables como contenidos de clorofilas *a*, *b*, total y relación (*a+b*) / carotenos, así como, incrementos de 98,78; 77,67; 92,18 y 157,44% con relación al testigo, respectivamente. El contenido de carotenos obtuvo valores máximos significativos a concentración de 30%, alcanzando un incremento de 6% en comparación con el testigo. Esta concentración permitió valores ( $p \leq 0,05$ ) e incremento en el contenido de clorofilas *a/b* de 49,30%.

El extracto de hoja de *M. oleifera* confirmó que el estado vegetativo favoreció el contenido de clorofilas cuando se aplicó al 30% de concentración para las clorofilas *a*, *b*, total (*a+b*), relaciones (*a+b*) / carotenos. Sin embargo, se requirió mayores concentraciones en carotenos (90%) y relación *a/b* (60%).

La utilización del 100% de concentración de extractos florales, alcanzó los mayores valores significativos estadísticamente respecto al resto de tratamientos en las variables contenido de clorofilas *a*, *b*, total (*a+b*) y relaciones (*a+b*) / carotenos con incrementos en relación al testigo de 98,88; 77,67; 91,18 y 157,45 mg/g peso fresco, respectivamente. La utilización de la concentración del 30% produjo los mayores valores, con diferencias

significativas estadísticamente en relación al resto de tratamientos, en las variables carotenos (17,73 mg/g peso fresco) y relación *a/b* (3,21 mg/g peso fresco) respecto al testigo obtuvo incrementos de 5,79 y 49,30%, respectivamente.

**Tabla 4.** Efecto de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* de diferentes estados fenológicos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de plantas de banano (*Musa* AAA) variedad Williams, a los 7 días en condiciones de aclimatación.

EF	C (%)	Contenido de pigmentos fotosintéticos (mg/g peso fresco)					
		a	b	c	Total (a+b)	a/b	(a+b)/c
V	0	33,35±0,36b	15,65±0,03b	10,75±0,25b	48,99±0,39b	2,13±0,02c	4,56±0,07b
	30	34,55±0,04a	21,35±0,22a	8,50±0,09c	55,90±0,19a	1,62±0,02d	6,58±0,09a
	60	18,89±0,08e	6,43±0,19e	10,40±0,06b	25,32±0,11d	2,95±0,10a	2,44±0,02d
	90	24,54±0,08d	10,74±0,19c	13,24±0,22a	35,28±0,26c	2,29±0,03c	2,67±0,06d
	100	25,40±0,06c	9,96±0,22d	11,19±0,48b	35,36±0,16c	2,56±0,06b	3,19±0,15c
	p-valor	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F	0	10,75±0,98c	4,97±0,34c	16,76±0,06b	15,72±1,32d	2,15±0,05d	0,94±0,08d
	30	15,92±0,01b	4,96±0,07c	17,73±0,03a	20,88±0,08c	3,21±0,05a	1,18±0,01c
	60	17,24±0,16b	6,79±0,01b	13,95±0,03d	24,03±0,17b	2,54±0,02c	1,72±0,02b
	90	12,35±0,07c	4,41±0,06c	16,08±0,02c	16,76±0,01d	2,81±0,06b	1,04±0,01cd
	100	21,38±0,67a	8,83±0,11a	12,48±0,09e	30,21±0,55a	2,43±0,11c	2,42±0,03a
	p-valor	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Los valores medios obtenidos representan las muestras replicadas  $n=6$ , medias con letras diferentes indican diferencia significativa mediante prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Estado fenológico (EF), vegetativo (V), floral (F), concentración (C), clorofilas (a, b) y carotenos (c).

La valoración del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de banano a 14 días, mostró que al utilizar extracto de hoja de *M. oleifera* en estado vegetativo (tabla 5) se pudo obtener valores máximos ( $p \leq 0,05$ ) a concentración del 100%, de clorofilas a, b, total (a+b) y relaciones (a+b) / carotenos con incrementos de 57,90; 144,06; 81,94 y 168,24%

respectivamente comparados a las demás concentraciones. El contenido de carotenos a 30% de concentración del extracto fue la única concentración que se igualó al testigo, mientras que en la relación de clorofila *a/b* ningún tratamiento superó al valor observado en el testigo o control.

El contenido en clorofila al aplicar extracto de hojas de *M. oleifera* en estado floral (tabla 5), mostró valores diferentes ( $p \leq 0,05$ ) a los demás tratamientos cuando se utilizó la concentración de 30% en contenidos de clorofilas *a*, *b*, total y relación (*a+b*) / carotenos con incrementos de 228,43; 573,85; 324,88 y 703,13%, respectivamente. El contenido de carotenos y relación de clorofilas *a/b* en extractos utilizados, fueron inferiores al testigo.

Los extractos vegetativos de *M. oleifera* a concentración del 100%, permitió obtener mayores contenidos de clorofilas *a*, *b*, total (*a+b*) y relaciones (*a+b*) / carotenos. Sin embargo, en estado floral la concentración de 30% de extracto acuoso alcanzó el mismo comportamiento en los contenidos de clorofila.

**Tabla 5.** Efecto de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* de diferentes estados fenológicos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de plantas de banano (*Musa* AAA) variedad Williams, a los 14 días en condiciones de aclimatación.

		Contenido de pigmentos fotosintéticos (mg/g peso fresco)					
EF	C (%)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	Total ( <i>a+b</i> )	<i>a/b</i>	( <i>a+b</i> )/ <i>c</i>
V	0	20,64±0,13c	7,99±0,23c	13,56±0,10a	28,63±0,36c	2,59±0,06a	2,11±0,04c
	30	16,99±0,04d	7,99±0,15c	12,83±0,40a	24,98±0,19d	2,13±0,03b	1,96±0,08d
	60	30,82±0,02b	14,79±0,16b	11,85±0,02b	45,60±0,15b	2,09±0,02b	3,85±0,02b
	90	11,12±0,26e	5,01±0,17d	11,25±0,02b	16,13±0,43e	2,22±0,02b	1,43±0,04e
	100	32,59±0,05a	19,50±0,03a	9,21±0,03c	52,09±0,08a	1,67±0,01c	5,66±0,01a
	p-valor		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F	0	9,78±0,01d	3,48±0,01e	13,87±0,01a	13,26±0,01e	2,81±0,01b	0,96±0,01e
	30	32,86±0,63a	23,45±0,05a	7,31±0,03e	56,31±0,57a	1,40±0,02e	7,71±0,11a
	60	17,24±0,45b	7,85±0,09c	13,45±0,03b	25,09±0,36c	2,20±0,8c	1,87±0,02c
	90	32,12±0,35a	19,58±0,06b	9,28±0,03d	51,70±0,41b	1,64±0,01d	5,57±0,06b

100	12,29±0,01c	4,06±0,01d	10,07±0,01c	16,35±0,01d	3,02±0,01a	1,62±0,01d
p-valor	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Los valores medios obtenidos, representan las muestras replicadas  $n=6$ , medias con letras diferentes indican diferencia significativa mediante prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Estado fenológico (**EF**), vegetativo (**V**), floral (**F**), concentración (**C**), clorofilas (**a**, **b**) y carotenos (**c**).

El contenido de pigmentos en hojas de banano a los 21 días, expuestas a extracto de hoja de *M. oleifera* en estado vegetativo (tabla 6), presentó en el contenido de carotenos los valores máximos en la concentración de 60% (12,20 mg/g) diferentes estadísticamente al testigo con un incremento de 96,77% y a concentración de 30% donde se obtuvo un incremento del 13,93%. Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes al testigo.

La aplicación de extracto de hojas de *M. oleifera* en estado floral (tabla 6), permitió obtener valores ( $p \leq 0,05$ ) a concentración de 100% en los contenidos de clorofilas *a*, *b*, total y relación (*a+b*) / carotenos con incrementos de 79,07; 117,16; 91,81 y 208,29% comparados al testigo. Este comportamiento fue destacado con valores significativos a concentración de 30% e incrementos de 77,15; 97,18; 83,88 y 138,34% con relación al testigo. El contenido de carotenos no presentó diferencias estadísticas comparado al testigo. Este extracto permitió valores ( $p \leq 0,05$ ) al utilizar la concentración de 60%, con un incremento del contenido de clorofilas *a/b* con 14,93% en la relación al testigo.

Las aplicaciones de extractos vegetativos de *M. oleifera* a los 21 días permitieron estimular la producción de pigmentos no clorofílicos (carotenos) en vitroplantas de banano, donde se destacó las concentraciones de 60 y 30%; sin embargo, los extractos florales a concentraciones de 100 y 30% incrementaron los contenidos de clorofilas *a*, *b*, total y la relación clorofila (*a+b*) / carotenos.

**Tabla 6.** Efecto de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* de diferentes estados fenológicos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de plantas de banano (Musa AAA) variedad Williams, a los 21 días en condiciones de aclimatación.

EF	C (%)	Contenido de pigmentos fotosintéticos (mg/g peso fresco)					
		a	b	c	Total (a+b)	a/b	(a+b)/c
V	0	18,44±2,08a	13,98±0,46a	6,10±0,13c	32,41±1,62a	1,35±0,19a	5,30±0,15a
	30	20,50±3,01a	17,22±1,15a	10,50±0,51b	37,73±1,86a	1,28±0,26a	3,59±0,01b
	60	17,59±1,88a	14,25±0,66a	12,20±0,31a	31,85±1,22a	1,28±0,19a	2,61±0,03c
	90	17,72±2,91a	14,99±1,17a	11,38±0,48ab	32,71±1,74a	1,30±0,30a	2,87±0,03c
	100	16,77±2,72a	14,79±1,03a	11,78±0,46ab	31,55±1,69a	1,23±0,27a	2,67±0,04c
	p-valor	0,871	0,147	0,000	0,077	0,998	0,000
F	0	17,77±0,49c	8,86±0,02e	13,81±0,28a	26,62±0,47d	2,01±0,06b	1,93±0,01c
	30	31,48±0,32a	17,47±0,31b	10,70±0,27b	48,95±0,63b	1,80±0,01c	4,60±0,18b
	60	22,27±0,37b	9,73±0,11d	13,60±0,23a	32,01±0,47c	2,29±0,01a	2,36±0,07c
	90	20,72±0,47b	10,61±0,13c	13,33±0,26a	31,33±0,60c	1,95±0,02b	2,35±0,01c
	100	31,82±0,08a	19,24±0,17a	8,77±0,55c	51,06±0,25a	1,65±0,01d	5,95±0,40a
	p-valor	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Los valores medios obtenidos representan las muestras replicadas  $n=6$ , medias con letras diferentes indican diferencia significativa mediante prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Estado fenológico (EF), vegetativo (V), floral (F), concentración (C), clorofilas (a, b) y carotenos (c).

### Contenido de fenoles solubles

En el estado fenológico vegetativo, el contenido de fenoles solubles en hojas de banano a los 7 días presentó diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones de extracto de *M. oleifera* ( $p \leq 0,05$ ), excepto la concentración del 90% que alcanzó valores iguales al testigo. A 14 días mostró efectos ( $p \leq 0,05$ ) en hojas de banano las concentraciones de 30 y 90%, generando incrementos del contenido de fenoles solubles en 43,49 y 33,09% en relación al testigo. Sin embargo a los 21 días, el mayor valor de

fenoles solubles totales se alcanzó en el testigo, diferente al resto de tratamientos en que se aplicó el extracto a diferentes concentraciones. Esto podría estar asociado con que el aporte del extracto de moringa en las hojas de las plantas de banano después de los 14 días no contribuye a la formación de fenoles (tabla 7).

El extracto de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo a los 7 días, mostró efectos significativos ( $p \leq 0,05$ ) en los pseudotallos de banano, cuando se utilizó la concentración de 30% alcanzando el mayor valor con un incremento de 41,67%. A los 14 días el extracto de Moringa utilizado en los diferentes tratamientos, provocó una disminución de la cantidad de fenoles solubles debido a que en el testigo se presentaron los mayores valores. A los 21 días la concentración de 60% alcanzó el mayor valor de fenoles solubles totales con un incremento de 218,18% al efectuar la comparación con el testigo.

En la raíz de las plantas de banano se alcanzaron valores del contenido de fenoles solubles diferentes ( $p \leq 0,05$ ) cuando se utilizó el extracto a concentraciones del 30 y 100% a los 7 días, generando incrementos de 21,68 y 9,09%, respectivamente. A los 14 y 21 días los resultados obtenidos son diferentes, en los cuales no se presenta un efecto del extracto de Moringa a partir de los 7 días que permita la producción de fenoles en la raíz.

El extracto de hojas de *M. oleifera* en estado floral (tabla 7) a los 7 días favoreció el contenido de fenoles solubles en hojas de plantas de banano al presentar diferencias estadísticas ( $p \leq 0,05$ ) de la concentración del 60% con el resto de tratamientos, y permitió un incremento de 36,03% con relación al testigo. A los 14 días de evaluación cuando se utilizó el extracto de *M. oleifera* a una concentración del 100%, se obtuvo un valor mayor y diferente estadísticamente al resto de los tratamientos ( $p \leq 0,05$ ) con relación al testigo se produjo un incremento del 17,27%. Transcurridos 21 días de realizada la evaluación el extracto de *M. oleifera* utilizado a las concentraciones de 30; 60; 90 y 100%, favorecieron la producción de fenoles solubles en hojas de banano, generando valores diferentes ( $p \leq 0,05$ ) con relación al testigo, que posibilitó incrementos de 116,37; 114,62; 119,88 y 130,99%, respectivamente.

El extracto floral de *M. oleifera* aplicado a plantas de banano, mostró un incremento del contenido de fenoles solubles en los pseudotallos a concentraciones de 60% a los 7 días, igual estadísticamente al testigo y diferente al resto de tratamiento que utilizaron el extracto. Similar respuesta se produjo a los 14 días, donde las concentraciones de 60 y 100% alcanzaron valores no diferentes estadísticamente al testigo. A 21 días de aplicados los extractos de *M. oleifera* a diferentes concentraciones, se estimuló la producción de fenoles solubles en plantas de banano, generando diferencias estadísticas ( $p \leq 0,05$ ) cuando se utilizaron las concentraciones de 60 y 90% en relación al testigo, produciéndose, de forma respectiva, incrementos de 357,24 y 412,87%.

El extracto floral aplicado en las plantas de banano a los 7 días, permitió incrementos del 25,00% del contenido de fenoles solubles en raíz cuando se utilizó la concentración del 100% ( $p \leq 0,05$ ) en relación al testigo. A los 14 y 21 días de efectuada la aplicación de las diferentes concentraciones de extractos de *M. oleifera*, no se obtuvo incrementos de fenoles solubles en relación al testigo el cual, a los 14 días, no mostró diferencias estadísticas en relación a las concentraciones de extractos de *M. oleifera* aplicados. Sin embargo, a los 21 se mantuvo la misma tendencia, aunque las concentraciones de 30 y 100% fueron menos eficientes.

Los extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral permitieron obtener los mayores contenidos de fenoles solubles en órganos de vitroplantas de banano, cuando se utilizaron extractos vegetativos a concentraciones de 30 y 90% (14 días) en hojas, 30% (7 días) y 60% (21 días) en pseudotallos y a 30% (7 días) en raíces; sin embargo, en extractos florales requirió 60% (7 días), 100% (14 días) y; a 30 y 100% (21 días) en hojas; 60 y 90% (21 días) en pseudotallos y 100% (7 días) en raíces.

**Tabla 7.** Efecto de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral en el contenido de fenoles solubles de plantas de banano (Musa AAA) variedad Williams, en condiciones de aclimatación.

Órganos	C. (%)	E. F. Vegetativo			E. F. Floral		
		Contenido Fenoles Solubles (mg EAG/g peso seco)					
		7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
H	0	3,12±0,06a	2,69±0,14b	9,76±0,24a	2,47±0,38b	4,40±0,21b	1,71±0,10b
	30	2,50±0,08b	3,86±0,16a	7,22±0,69b	2,50±0,12b	3,40±0,12c	3,70±0,15a
	60	1,95±0,10c	2,92±0,12b	6,96±0,48bc	3,36±0,07a	4,09±0,10b	3,67±0,46a
	90	2,85±0,07a	3,58±0,23a	5,37±0,06cd	2,57±0,06b	4,53±0,15b	3,76±0,14a
	100	1,94±0,03c	1,71±0,03c	4,72±0,11d	2,56±0,08b	5,16±0,11a	3,95±0,16a
	p-valor	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,005
P	0	1,44±0,19b	6,13±0,19a	1,54±0,07c	1,60±0,04a	3,02±0,07a	1,52±0,09d
	30	2,04±0,05a	1,91±0,04c	1,38±0,05c	1,03±0,04b	0,93±0,03b	3,14±0,12b
	60	1,40±0,03bc	1,62±0,21c	4,90±0,23a	1,61±0,05a	3,17±0,24a	6,95±0,12a
	90	1,00±0,02d	2,74±0,08b	3,07±0,08b	0,92±0,07b	1,83±0,33b	7,06±0,12a
	100	1,02±0,04 cd	2,78±0,20b	1,09±0,03c	0,81±0,02b	2,89±36a	2,31±0,28c
	p-valor	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
R	0	1,43±0,09b	2,95±0,07ab	3,27±0,07ab	1,60±0,09bc	1,87±0,11ab	1,58±0,06a
	30	1,74±0,03a	3,34±0,21a	2,56±0,04 bc	1,33±0,07d	1,39±0,08b	1,34±0,04bc
	60	0,91±0,07c	1,90±0,08c	3,33±0,39a	1,43±0,07d	1,44±0,06b	1,61±0,08a
	90	1,12±0,03c	2,67±0,06b	2,06±0,10cd	1,79±0,10ab	1,59±0,11b	1,52±0,03ab
	100	1,56±0,06ab	2,47±0,02bc	1,71±0,04d	2,00±0,07a	1,30±0,06b	1,23±0,06c
	p-valor	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,001

Los valores medios obtenidos, representan las muestras replicadas  $n=9$ , medias con letras diferentes indican diferencia significativa mediante prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Estado fenológico (E.F.), hojas (H), pseudotallo (P), raíz (R), concentración (C), equivalentes de ácido gálico (EAG).

### Actividad antioxidante total

El extracto de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo (tabla 8) aplicado en plantas de banano, manifestó a los 7 días en las hojas valores diferentes

( $p \leq 0,05$ ) de actividad antioxidante total. Transcurridos 14 días de la aplicación de las diferentes concentraciones del extracto de *M. oleifera*, la actividad antioxidante en las hojas de banano se comportó de forma similar estadísticamente entre todos los tratamientos estudiados. A los 21 días la aplicación del extracto de *M. oleifera* permitió en las hojas de banano obtener valores diferentes estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) entre la concentración de 30% que alcanzó la mayor magnitud (133,92  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) y los demás tratamientos, manifestando un incremento en la actividad antioxidante total de 24,66% con relación al testigo.

En el pseudotallo de banano, una vez transcurridos 7 días de la aplicación de los extractos de *M. oleifera*, la actividad antioxidante total presentó diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la concentración de 30% que alcanzó la mayor magnitud (114,34  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) y los demás tratamientos, manifestando un incremento en la actividad antioxidante total de 320,55% comparado con el testigo.

A los 14 días de aplicado el extracto de *M. oleifera* en las diferentes concentraciones, no se presentó respuesta en relación a la actividad antioxidante total en el pseudotallo de banano, debido a que el testigo alcanzó el mayor valor (222,89  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco), diferente estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) a los tratamientos experimentales, aunque la utilización de la concentración de 100% (155,96  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) difirió de las concentraciones de 30, 60 y 90%.

Transcurridos 21 días de efectuada la aplicación de la concentración del 60% de extracto de *M. oleifera*, se alcanzó el mayor valor (307,57  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) en los pseudotallos de plantas de banano, diferente estadísticamente a los demás tratamientos, incluido el testigo, con un incremento de 223,49%.

En órganos de raíz la actividad antioxidante total a los 7 días mostró diferencias estadísticas ( $p \leq 0,05$ ) a las concentraciones de *M. oleiferas* de 30, 90 y 100% con relación al testigo, permitiendo incrementos de 64,85; 39,98 y 61,87%. Este órgano a 14 días obtuvo efectos ( $p \leq 0,05$ ) y mayores valores (251,57  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) de actividad antioxidante total cuando se aplicó el extracto a una concentración al 90%, para facilitar incrementos en 13,73%.

A los 21 días de aplicado el extracto de *M. oleifera*, las raíces alcanzaron el mayor valor (325,79  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) de actividad antioxidante total cuando se utilizó la concentración de 60%, siendo diferente estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) a las demás concentraciones experimentales, al mismo tiempo estos valores fueron similares al testigo.

La utilización del extracto de *M. oleifera* en estado floral (tabla 8) a los 7 días de aplicado, permitió obtener los mayores valores de actividad antioxidante total en hojas de banano y diferentes estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) cuando se utilizaron las concentraciones de 60 y 100% con relación al testigo; estas concentraciones permitieron generar un incremento de esta actividad en 50,30 y 45,18% respectivamente. A 14 días de aplicadas las concentraciones del extracto de *M. oleifera*, la actividad antioxidante en las hojas de banano, no presentó diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) entre todos los tratamientos estudiados, aunque las plantas de banano expuestas a los extractos siempre presentaron los mayores valores. Las hojas de banano a 21 días de aplicados los extractos bajo la concentración 100% de extracto de *M. oleifera* generó valores diferente estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) a los demás tratamientos, alcanzan el mayor valor (80,01  $\mu\text{mol ET/g}$  peso seco) en las hojas de plantas de banano, con un incremento de 42,70% en relación al testigo.

La aplicación de extractos de *M. oleifera* permitió obtener diferencias estadísticas ( $p \leq 0,05$ ) en los pseudotallos cuando se utilizó las concentraciones de 60; 90 y 100% a los 7 y 14 días con relación al testigo; así como, generar incrementos en la actividad de antioxidantes total en 7 días (32,41; 12,12 y 13,73%) y 14 días (28,69; 22,97 y 35,10%) respectivamente. Esta variable a 21 días mostró efecto ( $p \leq 0,05$ ) a concentraciones de 30, 60 y 90% con relación al testigo, con incrementos de actividad de 30,23; 32,32 y 22,45% respectivamente.

El extracto floral de *M. oleifera* (tabla 8) influyó en la actividad antioxidante total en raíces de banano, con valores mayores y diferentes estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) a los 7 días, cuando se aplicó la concentración de 100% en relación a todos los tratamientos; generando incrementos de 55,95% comparado con el testigo. A 14 días de aplicados los extractos de *M. oleifera*, las

concentraciones de 60 y 100% alcanzaron los valores mayores de actividad antioxidante; diferentes estadísticamente respecto al testigo, con un incremento de 15,08 y 14,61%, respectivamente. Al valorar la actividad antioxidante a los 21 días en vitroplantas de banano, se evidenció que todos los tratamientos donde se aplicaron extractos de *M. oleifera* fueron diferentes estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) respecto al testigo; sin embargo, la concentración de 100% alcanzó el mayor valor con un incremento de 239,80% en relación al testigo.

Los extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral permitieron obtener los mayores contenidos de actividad de antioxidante total en órganos de vitroplantas de banano, cuando fueron expuestas a extractos vegetativos a concentraciones de 30% (21 días) en hojas, 30% (7 días) y 60% (21 días) en pseudotallos y a 30% (7 días), 90% (14 días) y 60% (21 días) en raíces; sin embargo, en extractos florales requirió 30 y 100% (7 días) y 100% (21 días) en hojas, concentraciones mayores a 60% (7 y 14 días), 30% (21 días) en pseudotallos y 100% (7, 14 y 21 días) en raíces.

**Tabla 8.** Efecto de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral en la actividad de antioxidante total de plantas de banano (Musa AAA) variedad Williams, en condiciones de aclimatación.

Órganos	C. (%)	E. F. Vegetativo			E. F. Floral		
		Actividad Antioxidante Total ( $\mu\text{mol ET/g}$ peso seco)					
		7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS
H	0	79,30±11,55a	65,16±4,68a	107,43±8,52b	57,42±3,36b	57,55±3,17a	56,07±1,72b
	30	49,61±3,65b	55,43±17,26a	133,92±2,08a	52,22±8,12b	79,08±5,53a	66,90±2,85b
	60	61,18±4,80ab	39,88±3,35a	112,27±2,98b	86,30±5,33a	80,99±6,99a	62,65±2,11b
	90	22,46±4,38c	66,71±3,54a	104,20±2,87b	68,61±2,12ab	74,84±12,00a	62,99±4,40b
	100	82,74±3,17a	55,48±7,03a	93,85±4,89b	83,36±7,31a	66,08±5,20a	80,01±1,62a
	p-valor	0,000	0,065	0,001	0,000	0,066	0,002
P	0	35,67±2,96b	222,89±5,46a	95,08±9,11d	70,77±3,08b	108,39±3,99b	78,27±2,52b
	30	114,34±2,65a	82,63±9,98c	140,26±5,97c	61,69±12,28b	109,14±5,97b	101,93±2,09a
	60	13,09±2,42b	45,57±10,45d	307,57±13,54a	93,71±4,28a	139,49±7,56a	103,57±3,93a
	90	33,24±9,00b	56,18±6,02cd	218,01±10,23b	79,85±1,88a	133,29±2,79a	95,84±3,17a
	100	35,28±7,33b	155,96±2,60b	25,97±5,00e	80,49±5,11a	146,44±3,46a	76,38±1,73b
	p-valor	0,001	0,000	0,000	0,009	0,001	0,000
R	0	82,30±2,96b	221,19±5,78bc	332,42±12,16a	65,52±4,46b	94,31±2,69b	15,78±2,56c
	30	135,67±2,65a	217,10±13,5bc	298,30±10,62b	72,10±5,39b	100,90±1,25ab	41,30±2,66ab
	60	39,27±2,42c	237,96±5,99ab	325,79±8,74a	72,87±6,29b	108,53±3,87a	39,29±2,05b
	90	115,20±9,00a	251,57±2,83a	242,89±7,76c	82,57±2,35b	89,32±3,99b	49,56±1,67ab
	100	133,22±7,33a	201,67±4,07c	239,14±5,97c	102,18±4,09a	108,09±1,87a	53,62±5,73a
	p-valor	0,000	0,003	0,000	0,002	0,004	0,000

Los valores medios obtenidos, representan las muestras replicadas  $n=9$ , medias con letras diferentes indican diferencia significativa mediante prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Estado fenológico (E.F.), hojas (H), pseudotallo (P), raíz (R), concentración (C), equivalentes de ácido gálico (EAG), equivalentes Trolox (ET).

### **Actividad de peroxidasa y contenidos de proteínas solubles**

El extracto de hojas de *M. oleifera* en estado vegetativo (tabla 9), mostró a los 7 días mayor actividad enzimática, al obtener valores ( $p \leq 0,05$ ) a concentración de 60% para el máximo de actividad con incremento de 32,69% respecto al testigo. Seguido a este comportamiento se obtuvo a una concentración del 30% un incremento de 17,31%. En este momento el contenido de proteínas solubles alcanzó valores ( $p \leq 0,05$ ) a concentración del 100%, con un incremento de 5,52% en relación al testigo.

A los 14 días la actividad enzimática, mostró mayores valores ( $p \leq 0,05$ ) siempre que se utilizó el extracto de hojas en estado vegetativo para mostrar incrementos de actividad enzimática en las concentraciones de 30, 90 y 100% con incrementos semejantes del 74,07% en relación al testigo, así como, en la concentración de 60% con un incremento del 55,56% respecto al testigo. En este momento el comportamiento del contenido de proteínas solubles de las plantas expuestas a extractos fue semejante al testigo, difiriendo con menores valores ( $p \leq 0,05$ ) respecto al resto de tratamientos cuando se utilizó la concentración del 90% del extracto.

La utilización de extractos de hojas de *M. oleifera* en estado floral (tabla 9), mostró solamente a los 7 días, actividad enzimática con valores ( $p \leq 0,05$ ) semejantes al testigo, aunque numéricamente, las concentraciones del 30, 60 y 100% permitieron incrementos de 16,67; 18,52 y 9,26% de actividad enzimática. El contenido de proteínas solubles en los tres momentos evaluados mostró diferencias significativas siempre que se utilizaron extractos florales.

Este extracto a 7 días permitió valores mayores ( $p \leq 0,05$ ) del contenido de proteínas solubles cuando se utilizaron concentraciones de 90 y 100%, logrando incrementos de 4,40 y 2,79%. Este comportamiento a 14 días manifestó valores mayores ( $p \leq 0,05$ ) a concentraciones de 30%, 60% y 90% con incrementos de proteínas solubles de 1,48; 1,04 y 1,93%. El contenido de proteínas solubles a veintiún días, mostró valores mayores ( $p \leq 0,05$ ) a concentraciones 60 y 100% con incrementos de 5,30 y 2,50% en relación al testigo.

La actividad enzimática y contenidos de proteínas en vitroplantas de banano a 21 días ante aplicación de extractos vegetativos, no difirieron para  $p \leq 0,05$ . En este momento, pero utilizando extracto acuoso floral si presentó diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para las dos variables evaluadas, manifestando la menor actividad de la enzima ante la exposición del extracto, ante un incremento significativo en el contenido de proteína siempre que se expusieron las plantas de banano a concentraciones de 60 (7,15 microgramos proteína por mL) y 100% (6,96 microgramos proteína por mL).

**Tabla 9.** Efecto de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* de diferentes estados fenológicos en actividad peroxidasa y contenido proteínas solubles de plantas de banano (*Musa* AAA) variedad Williams, en condiciones de aclimatación.

EF	C (%)	7 (Días)		14 (Días)		21 (Días)	
		AE (U/mL <sup>-1</sup> )	CPS (µg prot/mL <sup>-1</sup> )	AE (U/mL <sup>-1</sup> )	CPS (µg prot/mL <sup>-1</sup> )	AE (U/mL <sup>-1</sup> )	CPS (µg prot/mL <sup>-1</sup> )
V	0	0,52±0,01c	7,97±0,14b	0,27±0,04b	8,19±0,08ab	0,45±0,05a	8,22±0,05a
	30	0,61±0,03b	7,13±0,05d	0,47±0,01a	8,31±0,12ab	0,39±0,06a	8,40±0,04a
	60	0,69±0,02a	7,62±0,06c	0,42±0,08a	8,47±0,08a	0,54±0,07a	8,37±0,02a
	90	0,58±0,03bc	7,64±0,12c	0,47±0,02a	8,03±0,03c	0,52±0,06a	8,39±0,04a
	100	0,52±0,02c	8,41±0,01a	0,47±0,03a	8,46±0,14a	0,47±0,04a	8,40±0,13a
	p-valor	0,002	0,000	0,040	0,049	0,385	0,332
F	0	0,54±0,03a	6,82±0,03c	0,65±0,04a	6,75±0,01c	0,50±0,01a	6,79±0,01c
	30	0,63±0,01a	6,89±0,03c	0,51±0,01b	6,85±0,01ab	0,34±0,02b	6,85±0,04bc
	60	0,64±0,04a	6,89±0,03c	0,48±0,07bc	6,82±0,01ab	0,36±0,02b	7,15±0,02a
	90	0,43±0,05b	7,12±0,01a	0,36±0,03c	6,88±0,04a	0,40±0,03b	6,87±0,02b
	100	0,59±0,02a	7,01±0,03b	0,46±0,01bc	6,78±0,03bc	0,41±0,04b	6,96±0,01a
	p-valor	0,010	0,000	0,006	0,016	0,012	0,000

Los valores medios obtenidos, representan las muestras replicadas  $n=6$ , medias con letras diferentes indican diferencia significativa mediante prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Estado fenológico (EF), vegetativo (V), floral (F), concentración (C), actividad específica (AE) y contenido de proteínas solubles (CPS).

#### 4.4 DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación revelan que el extracto acuoso de hoja *M. oleifera* en estado floral permite mayor eficiencia en el número de hojas (figura 13B) de vitroplantas de banano a concentración de 100% a los 21 días. Estos resultados son similares a los obtenidos por Basra et al. (2011) quien observó en el cultivar de maíz Dekalb-5219 expuesto a concentraciones del 30% y 100% de extracto de Moringa, alcanzó valores superiores al testigo permitiendo mejorar el porcentaje de germinación de la semilla. Nouman et al. (2012) al pregerminar semillas de pasto dentado (*Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv) en extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* a concentraciones de 30%, obtuvieron los mayores valores en número de hojas y en el número y vigor de los brotes.

La estimulación del crecimiento obtenido en vitroplantas de banano con el uso de los extractos acuosos de *M. oleifera* también fue observado en el cultivo de maíz Pioneer-652 por Afzal et al. (2012) quienes obtuvieron que el extracto en concentraciones del 30% actúa como un potenciador natural del crecimiento, debido al mayor porcentaje de germinación de semilla comparado con el testigo y tratamientos expuestos a kinetina.

El extracto acuoso de *M. oleifera* muestra un efecto sobre el incremento en longitud de hojas en vitroplantas de banano. Las respuestas a los extractos, en estado vegetativo y floral, en el incremento de la longitud de hojas D (figura 13C-D), favorecen el crecimiento cuando se utiliza la concentración al 30%. Los resultados obtenidos son similares a lo alcanzado por Yasmeen et al. (2012) en plantas de maíz híbrido cultivar Dekalb-5219, a concentración de 30% comparados al testigo, mejorando significativamente la longitud de brotes y raíces. Afzal et al. (2012) obtuvieron efectos similares, en el cultivar Pioneer-652, al utilizar concentraciones de extracto al 30%, obteniéndose una mejora en el crecimiento y proporción de longitud de las raíces y brotes de las plántulas en comparación al testigo.

La respuesta a los extractos de hoja de *M. oleifera* en estado vegetativo y flora, potencia el ancho de hoja D (figura 13E-F) cuando se utilizan

concentraciones de 30 y 90% a los 21 días de evaluadas las vitroplantas de banano. Sardar et al. (2021) en plantas de Stevia, alcanzaron un efecto similar cuando utilizaron concentraciones del 20 y 30% de extractos florales, permitiendo la obtención de los valores máximos en área y número de hojas por planta en relación a los demás tratamientos. Bakr et al. (2021) al estudiar el efecto de diferentes diluciones de extracto crudo de *M. oleifera* en el crecimiento de mostaza negra (*Brassica nigra* L.), observaron un mayor crecimiento de tallos y número de brotes cuando se utilizaron diluciones del extracto relación 1:2 respecto al control. Los autores afirman “que estas respuestas inducidas por los extractos, producen un enriquecimiento en las plantas al proveer nutrientes e inducir señales al metabolismo que estimulan la división celular, condición que es posible por la presencia de zeatina en los extractos crudos de hojas de *M. oleifera*”. Resultados similares se obtuvieron en nuestro estudio donde las aplicaciones de extractos acuosos de *M. oleifera* permitieron obtener vitroplantas de banano fortalecidas.

El extracto de hoja de *M. oleifera* en estado vegetativo, en todos los momentos de la evaluación, muestra resultados semejantes e inferiores al testigo en el diámetro de pseudotallo (figura 14A). La aplicación de extractos en estado floral (figura 14B) permite valores máximos y significativos a los 14 días en concentraciones de 30 y 60%, así como a los 21 días a concentraciones de 90%, con diámetros de pseudotallo fortalecidos. Efectos semejantes obtuvieron El Sheikha et al. (2022) en habichuela verde (*Phaseolus vulgaris* L.) con una concentración de 30%, alcanzando valores mayores en diámetro en vainas (0,98 cm), longitud de vainas al primer año (16,17 cm) y al segundo año (16,72 cm) en relación a los demás tratamientos.

El estudio realizado con el extracto de *M. oleifera* en estados vegetativo y floral, permite observar incrementos en la longitud del pseudotallo (figura 14C-D), presentando valores máximos a una concentración de 30%. Efectos similares observó Mona (2013) en la estimulación de la altura, peso fresco y peso seco en plantas del género *Kniphofia* (conocidas como plantas cohete) en relación al testigo, cuando se utilizó una concentración de extracto acuoso de hoja de *M. oleifera* al 3%.

La aplicación de extracto de *M. oleifera* en estado vegetativo generó valores similares en el contenido de peso fresco (figura 15A-B) de vitroplantas de banano en los tratamientos experimentales e inferiores al testigo. Al utilizar extracto de hojas de plantas en estado floral se lograron valores máximos e incrementos cuando se empleó la concentración de 90%, condición que permite una mejor calidad de las vitroplantas. El Sheikha et al. (2022) indican que los extractos acuosos de hoja de Moringa en estado floral han mejorado el crecimiento, rendimiento y calidad de la habichuela verde (*Phaseolus vulgaris* L.) donde la concentración de 30% permite obtener los valores mayores y diferentes significativamente en la formación de vainas según peso fresco (7,17 g al primer año y 7,18 g al segundo año) y seco (11,38 g al primer año y 11,44 g al segundo año) en relación a los demás tratamientos.

Los extractos acuosos foliares de *M. oleifera* permitieron mayor producción de peso fresco en vitroplantas de banano, así como el extracto de *M. oleifera* en estado vegetativo disminuye el contenido de peso seco (figura 15C) de vitroplantas de banano a los 7 y 14 días de aplicadas. Este extracto a concentración de 30% permite obtener vitroplantas a los 21 días con valores máximos de peso seco. La utilización de extracto en estado floral permite valores máximos de peso seco (figura 15D) y significativos a los 14 y 21 días al utilizar una concentración de 90%.

Nuestros resultados manifiestan un efecto estimulante al utilizar los extractos florales, similar a lo obtenido por Rady & Mohamed (2015) en plantas de frijol común. Estos autores pudieron observar que los extractos de hoja de *M. oleifera* en estado floral al 30% generan mayor longitud de los brotes, número, área de hojas por planta y peso seco de la planta, rendimiento de vaina verde y semilla seca (peso de vaina por planta, por hectárea y peso de semilla por planta y por hectárea) y anatomía foliar. De la misma forma, Bakr et al. (2021) en linaza (*Linum usitatissimum* L.) realizaron aplicaciones de extractos acuosos florales de hojas de Moringa a concentración del 20% y obtuvieron valores superiores a todos los demás tratamientos en peso fresco y seco, longitud de raíz, peso fresco y seco de raíz y rendimiento de semilla por planta.

El extracto de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral influye significativamente en el contenido de cenizas (figura 15E-F) de vitroplantas de banano a los 21 días. Ambos extractos obtienen máximos valores de 2,4 g donde el extracto vegetativo requiere menor concentración (60%) que el extracto en estado floral (90%), aunque este último logra la mayor diferencia significativa con relación al testigo. Este efecto bioestimulante de la Moringa es reportado por Yasmeen et al. (2012) y Yasmeen et al. (2013) quienes al utilizar una concentración de 30% del extracto en plantas de trigo cv. Sehar-2006, obtuvieron en condiciones de alta salinidad, contenidos máximos de K<sup>+</sup> en los brotes (48,62%).

Los extractos de hoja *M. oleifera* muestran un efecto bioestimulante sobre las vitroplantas de banano, condición que es corroborada por Mona (2013). Este autor en plantas de Eruca, cuando se utilizan a una concentración del 3%, confirman la estimulación de la producción de peso, pigmentos clorofílicos *a*, *b*, y carotenos, tasas fotosintéticas, conductancia estomática, azúcares totales, proteínas totales, hormonas promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) y varios elementos minerales esenciales (N, K, Ca, Mg, P y Fe) en el crecimiento y desarrollo. Este control del crecimiento ejercido por aplicación foliar de extracto de hoja de *M. oleifera* es confirmado por Kanchani & Harris (2019), en plantas de quimbombó a concentración del 10% aplicado una vez por semana. Estos autores observaron aumentos en la altura/planta, número de ramas/planta, número de hojas/planta, índice de área foliar, peso seco de hojas, tallos, raíces, peso total, número de vainas/ha y peso seco de vainas.

En la presente investigación se demuestra que en condiciones de invernadero el extracto de *M. oleifera* disminuye la fuga de electrolitos en la membrana (figura 16A-B), permitiendo que las vitroplantas muestren indicadores de conductividad eléctrica más bajos, condición que favorece un funcionamiento correcto del sistema celular. La fuga de electrolitos a través de la membrana celular según Shanahan et al. (1990) permite valorar las reducciones de la actividad en las células vegetales ante efectos adversos como puede ser el estrés en ambientes determinados.

El extracto en estado vegetativo permite las menores fugas de electrolitos (figura 16A) cuando se aplica en vitroplantas de banano a concentración de 60% (14 días). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Camejo et al. (2005) quienes en plantas de tomate Campbell-28 a altas temperaturas, muestran la pérdida de integridad de las membranas asociada con la sensibilidad del genotipo a altas temperaturas. El extracto en estado floral reduce significativamente la fuga de electrolitos (figura 16B) cuando se utiliza la concentración de 90% a los 14 días. La utilización del extracto floral reduce significativamente la fuga de electrolitos al fortalecer las membranas celulares de vitroplantas de banano. Ramírez et al. (2021) indican que esta condición es favorecida producto a que las hojas de Moringa tienen una mayor abundancia de ácido  $\alpha$ -linolénico ( $C_{18}H_{30}O_2$ ), compuesto fundamental en el funcionamiento de las membranas celulares.

Los extractos de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral permiten obtener los mayores contenidos de clorofilas (tabla 4, 5 y 6) en hojas de vitroplantas de banano. En estado vegetativo se obtuvo mayores valores de clorofilas *a* y *b* en concentraciones de 30 y 100% (7 y 14 días) y carotenos al 30% (21 días). Sin embargo, en estado floral a los 7 (100%), 14 y 21 días (30%) se alcanzaron los mayores contenidos de clorofilas *a* y *b*.

Los resultados de nuestro estudio están de acuerdo a los obtenidos por El Sheikha et al. (2022) quienes en dos temporadas de siembra del cultivo de frijol (habichuela), cuando se realizan aplicaciones foliares de extractos de hoja de *M. oleifera* a una concentración de 30%, obtienen un efecto bioestimulante en los pigmentos clorofílicos totales con valores de 55,79 y 64,53 unidades SPAD, mayores y diferentes estadísticamente a los demás tratamientos.

Irshad et al. (2022) confirman efectos sobre el contenido en clorofilas utilizando extractos acuosos de *M. oleifera* en estado floral en una concentración del 3%. A Los 7 días de aplicados foliarmente en el cultivo de garbanzo, se obtienen 60 unidades SPAD de clorofila,  $3,5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de la tasa de transpiración y  $60 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de conductancia estomática, valores superiores y significativos con relación al control. Mona (2013) al realizar

aplicaciones de este extracto a esta concentración en plantas cohete, obtuvo incrementos de los contenidos de clorofilas *a* (1,55 mg/g peso fresco), *b* (0,69 mg/g peso fresco) y carotenoides (0,88 mg/g peso fresco) con relación al control.

El efecto bioestimulante de las aplicaciones foliares de extracto de hoja de Moringa (3%) en el contenido de clorofilas fue observado por Khan et al. (2020) en plantas de trigo, donde se obtuvo mayores valores con diferencias estadísticas en período de siembra normal y tardía en clorofila *a* (4,5 y 4,0 mg g<sup>-1</sup>) y *b* (0,68 y 0,45 mg g<sup>-1</sup>) con relación al control y demás tratamientos, permitiendo mejorar el rendimiento biológico y económico del cultivo.

El presente estudio permite obtener los mayores contenidos de fenoles solubles (tabla 7) en órganos de vitroplantas de banano al utilizar extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* comparados con el testigo. La utilización de extractos acuosos vegetativos a una concentración de 30% permite incremento de fenoles solubles en hojas (14 días), en pseudotallos y raíces (7 días). La utilización de extractos acuosos foliares en hojas favorece la obtención de mayores valores de fenoles solubles a concentraciones de 60% (7 días), 100% (14 días) y a concentraciones de 30 y 100% (21 días). En los pseudotallos se alcanzaron los mayores valores de fenoles solubles en las concentraciones de 60 y 90% (21 días) y en raíces cuando se utilizó la concentración al 100% (7 días).

Los resultados obtenidos en el presente estudio se corroboran a lo alcanzado por Mona (2013) en plantas cohete al aplicar extracto acuoso floral de *M. oleifera* a una concentración de 3%, quien obtuvo un incremento de 1,33 mg/g peso seco en los contenidos de fenoles soluble con relación al control. Efectos similares a nuestro estudio, fueron obtenidos por Khan et al. (2021) quienes estudian los contenidos de fenoles totales del jugo de bayas de cinco variedades de uvas de mesa, expuestas a una concentración del 3% de extracto de Moringa. Khan et al. (2020) al exponer plantas de trigo a extracto de Moringa a concentración de 3% (solo y combinado) muestran efectos significativos diferentes al control y demás tratamientos donde se alcanzó un contenido fenólico total de 1,8 mg GAE g<sup>-1</sup> en época de siembra temprana,

siendo superado con un valor más alto de 1,9 mg GAE g<sup>-1</sup> en época de siembra tardía.

Este efecto bioestimulante de las aplicaciones foliares de extractos acuosos de *M. oleifera* también se observó en *Stevia* por Sardar et al. (2021) al utilizar una concentración de 20% y 30%, obteniéndose en hojas contenidos máximos de fenoles (45 y 40 mg. g peso fresco) y flavonoides (68 y 60 mg. g peso fresco) con relación al control.

La mayor actividad antioxidante (tabla 8) en órganos de vitroplantas de banano es obtenida al utilizar extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* comparados con el testigo. Las vitroplantas expuestas a extractos vegetativos alcanzaron los mayores valores a la concentración de 30% (21 días en hojas y 7 días en pseudotallos y raíces); sin embargo, en extractos florales los mayores resultados se obtuvieron al 30 % (7 días) y 100% (21 días) en hojas, 60% (7 y 14 días) y 30% (21 días) en pseudotallos y 100% (7, 14 y 21 días) en raíces.

Los incrementos de actividad antioxidante en órganos de banano también son reportados en plantas de garbanzo por Irshad et al. (2022) cuando utilizan extracto *M. oleifera* en estado floral a una concentración del 3% para favorecer su actividad antioxidante y registran los mayores valores estadísticamente significativos de prolina libre en tejidos foliares con relación al control. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mona (2013) en plantas cohete, expuestas a esta concentración de extractos de *M. oleifera* con un incremento de 0,11 mg/g peso seco de ácido ascórbico con relación al control.

Los aumentos de actividades antioxidantes en los órganos de vitroplantas de banano cuando se aplican extractos de *M. oleifera*, son corroborados por Gopalakrishnan et al. (2016) al confirmar la presencia de diferentes aleloquímicos y diversos metabolitos secundarios como ascorbato, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas volátiles y taninos que favorecen la capacidad antioxidante. La importante actividad antioxidante de *M. oleifera* del presente estudio *in vivo* sugiere que el aporte de sus hojas a través de la

nutrición puede proteger a las células en estado normales o bajo estrés contra el daño oxidativo.

Los extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* incrementan la actividad peroxidasa (tabla 9) en hojas de vitroplantas de banano cuando se utilizó extracto vegetativo a una concentración de 60% a los 7 y 14 días, con mayores contenidos de proteína soluble en este último momento. Los extractos florales presentaron mayores contenidos de proteína soluble a concentraciones de 90% (7 y 14 días), 60% y 100 % (21 días).

Al exponer las vitroplantas de banano a extractos vegetativos se presenta en nuestro estudio la mayor actividad enzimática, resultados similares fueron reportados por Yasmeen et al. (2012) y Yasmeen et al. (2013) en plantas de trigo a un alto nivel de salinidad, en relación a actividad antioxidante de hojas, enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa, fenoles solubles totales y contenidos de ascorbato, valores que se incrementaron con la aplicación de la concentración de 30% de extractos acuoso de hojas.

La aplicación de los extractos florales de *M. oleifera* incrementaron los contenidos de proteína solubles en hojas de vitroplantas de banano. Similares resultados fueron obtenidos por El Sheikha et al. (2022) en vainas de habichuela verde, en donde aplicaciones foliares de extractos acuosos de hoja de Moringa a una concentración de 30%, permitieron en dos temporadas de siembra obtener 29,98 y 30,94 g.100 g en peso seco de proteína cruda (diferentes estadísticamente a los demás tratamientos).

Las respuestas enzimáticas en hojas de banano cuando se aplican los extractos florales de *M. oleifera* son limitadas, aunque Irshad et al. (2022) cuando valoró a los 7 días una concentración del 3%, en plantas de garbanzo, alcanzó mayores valores significativos de ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasas en relación al control en época temprana y tardía.

El poder de las enzimas antioxidantes como la peroxidasa en hojas de banano, confirmó el poder de los extractos acuosos de *M. oleifera* en estado vegetativo como secuestrante de radicales libres oxidativos, evidenciados en los contenidos enzimáticos.

## **5. CAPÍTULO III**

**Control eficiente del cultivo *in vitro* de genotipos de banano (Musa AAA)  
clon Williams.**



## 5.1. INTRODUCCIÓN

### **Cultivo *in vitro* de *Musa sp.***

Los cultivos de banano (*Musa sp.*) son originarios del suroeste del continente asiático y son un alimento fundamental en la cesta familiar internacional. Este cultivo tiene un papel determinante en la economía local de los países sudamericanos, siendo Ecuador uno de los principales productores con destino a exportación con más de 164 mil ha (FAOSTAT, 2021).

En las condiciones del Ecuador los sistemas productivos comerciales de musáceas de fruta fresca están establecidos principalmente como monocultivos convencionales en tres provincias del litoral ecuatoriano, como Guayas, Los Ríos y El Oro (92%) y entre otras siete provincias con 8% (Cedeño, 2010).

En banano las variedades del grupo Cavendish se consideran las más comerciales entre 1000 variedades de banano cultivadas en todo el mundo y donde la biotecnología mediante el establecimiento de varios protocolos para la propagación *in vitro*, brinda oportunidad para resolver los diferentes problemas asociados con el cultivo convencional de banano (Justine et al., 2022), así como, variedades en vías de tecnificación donde se destacan a nivel local los genotipos del clon Williams. Estos bananos tienen un tipo de genoma AAA triploide, representando alrededor del 47% de la producción mundial y se caracterizan por ser esencialmente estéril (Naim et al., 2018).

El banano se encuentra dentro de los cultivos menos mejorados genéticamente, producto de sus características específicas, como las constituciones genómicas, heterocigosidad, poliploidía, frutos partenocárpicos que los identifica como un sistema genético complejo, lo cual, condiciona los trabajos de fitomejoramiento encaminados a su mejoramiento (Ganapathi et al., 2021; Ghag & Ganapathi, 2017).

Los genotipos de banano Williams presentan frutas partenocárpicas carnosas sin semillas y son propagados clonalmente a partir de retoños o mediante el cultivo de células y tejidos (Lescot, 2008). En la actualidad el material vegetal

existente en producción se encuentra representado por variantes clonales naturales seleccionadas según características agronómicas deseables (D'Hont et al., 2012).

Las producciones de banano que dependen de los Cavendish (AAA), en especial de genotipos Williams, en el litoral costero de El Oro, que se destinan a exportación como fruta fresca son la principal fuente de empleo y sustento de la población económicamente activa. Los sistemas de producción de tipo convencional en monocultivo son más frecuentes, y se han utilizado por más de cincuenta años, carecen de planes de renovación de plantaciones y el uso de fertilizantes químicos y pesticidas se incrementa cada año. Este modelo de producción aumenta los riesgos de daños por factores bióticos, ante enfermedades presentes en países vecinos de Colombia y Perú; siendo una amenaza los patógenos radiculares como *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) raza tropical 4 (Thangavelu et al., 2021) causada por el hongo ascomiceto; así como, daños en plantas por hongos foliares que provocan afectaciones por sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) desde que se establecieron localmente.

Las plantaciones locales están también siendo amenazadas por el virus del estriado del banano (BSV), siendo el de mayor importancia económica presente en las plantaciones de nuestro país y donde los clones que se cultivan son susceptibles. Este virus ocasiona pérdidas en la productividad del cultivo hasta el 90% y se transmite primordialmente de forma vegetativa al 100 % de la progenie y por medio de insectos como las cochinillas (*Dactylopius coccus*, Costa) que se encuentra comúnmente en las bananeras de nuestra provincia (Mocha-Cuenca, 2020). Entre los demás insectos-plaga que atentan a estas plantaciones se encuentra el picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) reportados por Asang et al. (2022) y nematodos (*Radopholus similis* (Cobb) Thorne) presentes en el 60% de la producción local (Ley & M, 2008), los cuales han ocasionado pérdidas afectando a la producción en un 17% a 80% (García, 2019). La propagación vegetativa *in vitro* del banano es una forma eficiente de realizar clonación y generar un desarrollo vigoroso del cultivo, producto al saneamiento y procesos de regeneración del material vegetal al que se exponen, mediante la utilización

de yemas laterales y apicales de hijos que permiten mejorar calidad y la productividad del cultivo (Guerrero & Arrieta, 2017).

El empleo de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales permite obtener miles de plántulas de similar tamaño, edad, calidad y de elevado potencial genético (Arbeláez et al., 2016). En momentos iniciales para establecer los sistemas de cultivo *in vitro* de banano es frecuente la presencia de microorganismos, oxidación fenólica de tejidos, baja viabilidad y brotación de ápices, requiriendo de pretratamientos a las plantas madres para mejorar el establecimiento de los explantes (Ramírez-Villalobos et al., 2008).

En las condiciones locales el manejo de ápices meristemáticos apicales extraídas de yemas laterales de excelente capacidad de crecimiento y desarrollo, están constituidos por tejidos meristemáticos con próspero crecimiento longitudinal y totipotencia que son oportunos para estos fines (Ortega et al., 2010).

Aunque los bananos se propagan tradicionalmente por retoños o hijuelos, mediante el uso de plantas cultivadas; con el uso de métodos de cultivo de células y tejidos, es posible aislar los diferentes genotipos de banano locales y generar estudios que faciliten protocolos viables; así como, proveer de plántulas sanas a productores en pequeña y gran escala.

Algunas de las alternativas propuestas en los sistemas de cultivo mediante técnicas de micropropagación, es el uso de medio líquido, que posee diversas ventajas sobre el uso de medio gelificado, entre las que se encuentran una mejor interacción (movilidad) entre ingredientes de medios de cultivo y explantes; así como, la reducción de costos debido al consumo de agar y la posibilidad de automatización (Etienne & Berthouly, 2002).

### **Automatización del cultivo *in vitro***

La micropropagación a gran escala mediante técnicas convencionales de cultivo de células y tejidos presenta menos rentabilidad, producto a la gran demanda de mano de obra; así como, por la deficiente automatización (Chu,

1995) y ante esta situación la utilización de biorreactores diseñados bajo principios del sistema de inmersión temporal (SIT) con un sistema de control semiautomático que permite ser rentable (Ziv, 2010).

La atmósfera en los SIT puede renovarse, previniendo trastornos como la asfixia y la hiperhidricidad (Etienne & Berthouly, 2002). El uso de SIT para mejorar la propagación de plantas ha sido reportado para algunas especies de relevancia económica como eucalipto, manzano, teca, pistacho, castaño, yerba mate, sauce y palma datilera (Murch et al., 2004; McAlister et al., 2005; Chakrabarty et al., 2003; Zhu et al., 2005; Quiala et al., 2012; Akdemir et al., 2014; Vidal et al., 2015; Luna et al., 2017; Regueira et al., 2018; Abahmane, 2020).

En banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*), se han reportado algunos intentos de utilizar biorreactores de inmersión temporal (Alvard et al., 1993; Roels et al., 2005; Aragon et al., 2014), con resultados prometedores. La mayoría de plantas establecidas en estos sistemas de cultivo reportan mejor respuesta a medios líquidos que semisólidos. Esto posiciona a estos sistemas con varias ventajas como ahorro de mano de obra, tiempo, fácil ampliación, favorece un mayor crecimiento y multiplicación producto de la aireación forzada; así como, una mayor disponibilidad de nutrientes (Suman, 2017). Producto a estas especificaciones la utilización de sistemas de inmersión temporal o citados como biorreactores de inmersión temporal, se han clasificado en sistemas de aireación-agitación, de filtro giratorio, de fase gaseosa, de tambor rotatorio y accionado por aire (Lee, 2004)

Los sistemas accionados por aire incluyen sistemas con inmersión completa de material vegetal y renovación del medio de cultivo líquido, sistemas de inmersión parcial y con un proceso de renovación de nutrientes líquidos, sistemas con inmersión completa del material vegetal mediante transferencia neumática de medio líquido, sistemas sin renovación del medio, sistema RITA® (Cirad, Francia), sistema de frascos gemelos BIT (Etienne & Berthouly, 2002).

La decisión de utilizar uno de estos sistemas cuando se establece un protocolo eficiente de propagación para distintos genotipos de *Musa* debe tener en cuenta el número de explantes, tiempo y frecuencia de inmersión del explante expuesto al medio líquido, volumen de medio líquido por explante y volumen total del recipiente; así como, la ventilación forzada, como aspecto de mayor influencia, tanto en crecimiento como calidad final de vitroplantas obtenidas (Galan et al., 2018).

Al evaluar estos recipientes se han detectado limitaciones, ya que pueden ser demasiado pequeños o pesados. En el caso de los RITA®, presentan un fondo interior pequeño, que facilita se generen trastornos de los cultivos debido a la alta densidad (Häggman et al., 2007). En la superación de estos problemas se han propuesto los PLANTFORM™ (Welander et al., 2014) y frascos locales como los SIT de unidades gemelas (Escalona et al., 1999) así como, propuestas de prototipo de biorreactor como alternativa para la micropropagación de especies vegetales minimizando los costos en construcción y en la técnica de propagación (Ramírez et al., 2019).

La utilización de recipientes alternativos locales puede ser una solución para establecer esta tecnología en países en desarrollo en los cuales no siempre existe la disponibilidad de recipientes adaptados para estos fines y en los que el costo de producción utilizando técnicas convencionales de cultivo de tejidos es elevado (Gitonga et al., 2011; Suman, 2017).

### **Extractos vegetales en la elicitación del cultivo *in vitro***

Los extractos vegetales son abundantes en biomoléculas que han sido aplicados a medios de cultivo *in vitro* con el interés de fortalecer las células de las vitroplantas. Las señales de estas biomoléculas permiten incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos mediante el cultivo *in vitro* con el empleo de biorreactores, procesos de elicitación y la ingeniería metabólica como las más promisorias para la producción de metabolitos secundarios (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

La utilización de bioestimulantes vegetales ha sido destinada a mejorar la calidad de plantas, al utilizarse como nutriente orgánico, que posibilita reemplazar el uso de nutrientes químicos con sustancias de origen animal y vegetal disponibles localmente; así como, permitir promover la bioeconomía circular (Bhunja et al., 2021). Los extractos de *M. oleifera* juegan un rol fundamental por sus componentes beneficiosos como nutrientes, fitohormonas, metabolitos secundarios, aminoácidos y compuestos bioactivos que mejoran el crecimiento de las plantas (Busani et al., 2011; Karthiga et al., 2022; Yuniati et al., 2022).

La utilización de extractos como bioestimulante en el cultivo de células y tejidos han sido reportados con elicitaciones de *M. oleifera* en suspensiones celulares de chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) (Verde, 2017), en germinación *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* (L.) (Ortiz-Rojas et al., 2017) y crecimiento de brotes de pauchulí (*Pogostemon cablin* L.) (Nihayati et al., 2021).

El uso de fortificantes naturales como el extracto de moringa podría ofrecer una alternativa inductora a las vitroplantas de banano al permitir su bioestimulación en los SIT. El presente estudio permite valorar los efectos beneficiosos de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* sobre el crecimiento de vitroplantas de banano mediante la utilización de sistemas automatizados en condiciones *in vitro* potenciales.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La obtención del material se realizó en dos fases. En la primera fase, en condiciones de campo (sistemas productivos bananeros), durante el deshije de las plantas madre, se seleccionaron hijuelos de tipo espada de 1 a 1,5 m de altura, ubicados a una altitud de 2,2 msnm con temperatura promedio de 28°C y 85 % de humedad relativa,

La selección de plantas élites de banano Williams (figura 18A), se realizó en sistemas productivos en la provincia de El Oro, Ecuador, donde intervinieron especialistas locales en la identificación del clon y descriptores productivos de interés local en especial rendimiento. Para la siembra *in vitro* de genotipos de banano se utilizaron dos tipos de material vegetal, uno proveniente de canteros de 2 m de largo x 1 m de ancho y 0,30 m de altura, con estructura elaboradas de caña guadua (*Guadua angustifolia* Kunth) ubicadas a cielo abierto y constituidos por un sustrato de arena de río y cáscara de arroz (volumen 1:1); y otro proveniente de invernadero donde se utilizaron macetas (tanques plásticos acondicionados de 100 litros) que contenían como sustrato cáscara de arroz (*Oryza sativa* L.).

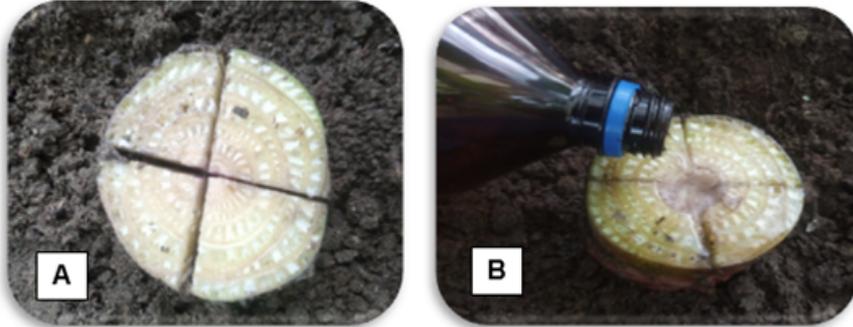
### Condiciones establecidas para el material vegetal donante

En las condiciones ambientales indicadas anteriormente se establecieron hijos de espada de ocho genotipos de Musa AAA cv. Williams, que fueron extraídos de plantaciones de tipo monocultivo para realizar su aislamiento mediante macropropagación. Antes de la siembra estos materiales vegetales fueron mondados y desinfectados por 20 minutos de inmersión en productos certificados orgánicos como DISS SEKTOR 1 ml/L y DISS 4X4 1 ml/L con actividad insecticida y fungicida que fueron adquiridos de la empresa UNGERER del Ecuador.

En los canteros se utilizaron sustratos compuestos por suelo de textura franco arcilloso y cáscara de arroz (1:1). Las plantas se regaron semanalmente y se realizaron controles fitosanitarios con los productos indicados anteriormente. Estas condiciones generaron hijuelos que se utilizaron directamente en el establecimiento *in vitro* o para proveer material vegetal que se cultivó en

invernadero para crear donantes de yemas. Las condiciones de invernadero se diseñaron para mayor control ambiental: los hijuelos provenientes de cantero fueron ubicados en sustratos de cáscara de arroz en macetas de plástico de cien litros de capacidad y se cultivaron bajo luz blanca LED con fotoperiodo de 16 horas luz/8 de oscuridad. Se efectuó monitoreo de la temperatura y humedad relativa durante los siete días de la semana con sensores ambientales. Para obtener una humedad óptima para la especie se determinaron unas condiciones consistentes en riego automatizado por aspersión durante 4 minutos con una frecuencia de 6 riegos por día, que generaron una temperatura y humedad relativa promedio de 27 °C y 80%, respectivamente.

En las condiciones establecidas, los hijuelos de 25 cm de diámetro fueron plantados superficialmente para que las yemas generadas quedarán expuestas. Se realizó el corte en cruz de la yema apical (figura 17A) y se añadió 6-benzylaminopurine (6-BAP) en la cavidad herida del meristemo. A cada corno se añadieron 4 ml de una disolución patrón de 40 mg/L (figura 17B), con la finalidad de estimular la brotación de yemas laterales (Cedeño-García & Soplín-Villacorta, 2016). En estas condiciones se generaron brotes viables sobre el nivel del sustrato, con la finalidad de proporcionar los explantes para el establecimiento *in vitro*.



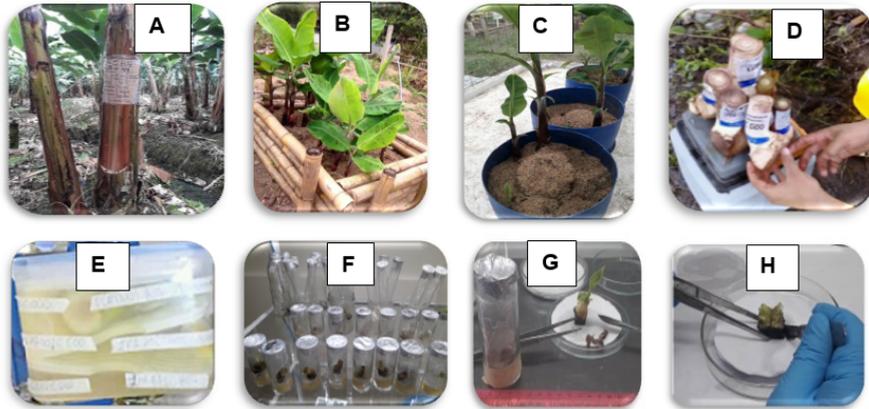
**Figura 17.** Procedimiento Corte en cruz de la yema apical y adición en la cavidad herida del meristemo de 6-benzylaminopurine (6-BAP) para estimular la brotación de yemas laterales en genotipos de banano (*Musa AAA*) cv. Williams cultivado en canteros e invernaderos. **A)** Corte de yema apical, **B)** Adición de 6-BAP en heridas.

### **Establecimiento y multiplicación *in vitro* de genotipos de banano**

Para realizar los experimentos de cultivo *in vitro* se habilitaron espacios con condiciones especiales de asepsia, como las cámaras de siembra y las cámaras de crecimiento. Los ciclos de cultivo *in vitro* fueron siempre de 21 días. Las condiciones de asepsia fueron controladas con tensioactivos catiónicos del tipo amonios cuaternarios, que se usaron para limpieza tanto de paredes como pisos y espacio aéreo, con evaporaciones de formaldehído a razón de 2 ml/m<sup>3</sup>. El control de temperatura se realizó con aire acondicionado, que permitió mantener los espacios a 25°C ± 1°C, mientras que la iluminación se realizó con luz solar indirecta y lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 60 W (Philips®, Países Bajos), lo que garantiza una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) entre 48,0 y 62,5 μ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> así como fotoperiodos de 16 horas luz y 8 de oscuridad (Galan et al., 2018).

El material vegetal inicial para el cultivo *in vitro* utilizado fue explantes de tipo hijuelos provenientes de canteros (45 unidades) establecidos *in vivo* (figura 18B) en canteros (Pérez et al., 2002) y sus descendientes de gran vigor (22 unidades) fueron seleccionados y se llevaron a macetas en condiciones de invernadero (figura 18C). El protocolo aplicado fue el siguiente:

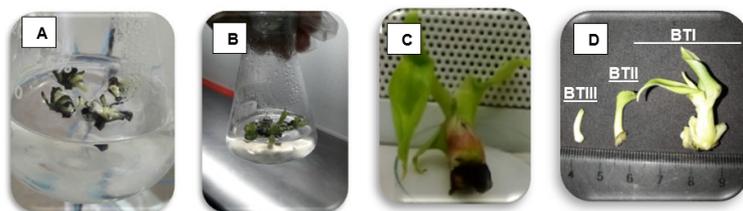
- 1) Los brotes fueron mondados y lavados minuciosamente con agua y detergentes industriales (figura 18D).
- 2) Los pseudotallos se mondaron nuevamente a un tamaño de 4 cm de diámetro y 10 cm de altura, se introdujeron en un recipiente plástico con hipoclorito de sodio (3%) y se agitaron vigorosamente con un equipo comercial a 100 rpm durante 20 min (figura 18E).
- 3) Los explantes se introdujeron en la cabina de flujo laminar y se eliminaron los tejidos afectados por efecto del clorado hasta alcanzar 1,5-2 cm de diámetro x 1,5-2 cm de altura, y se desinfectaron nuevamente con hipoclorito de sodio (3%) durante 20 min (agitación manual).
- 4) Los explantes se lavaron 3 veces con agua estéril.
- 5) Se eliminó el tejido afectado por efecto del clorado nuevamente y los explantes fueron tratados con L- cisteína (100 mg L<sup>-1</sup>) para evitar finalizaciones hasta el momento de la siembra.
- 6) Los explantes se cortaron a un tamaño de 8 mm de diámetro (largo x ancho x alto de tallo) y 10 mm de altura (pseudotallo) y se inocularon en frascos de vidrio (vasos tequileros) de 32,96 mm de diámetro y 81,82 mm de alto sobre soporte en forma de M en papel de filtro (figura 18F) sobre 25 mL de medio líquido MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas que fue elaborado a partir de reactivos de 99% de pureza (MERCK). Se requirió de los reguladores de crecimiento que se añadieron a razón de 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP (Arbeláez et al., 2016) y 0,123 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (Pérez et al., 2002); así como fuente de carbono sacarosa (3%) y el pH se ajustó a 5,8.
- 7) Dos semanas después de la siembra, los explantes se seccionaron a nivel de ápice meristemático de forma horizontal para una primera detección de posibles contaminantes endógenos (figura 18G), y siete días después se realizó un corte meristemático transversalmente (figura 18H), de modo que el ápice se fraccionó en cuatro partes para utilizarse como explante inicial para la fase multiplicación.



**Figura 18.** Establecimiento *in vitro* de genotipos de banano (*Musa AAA*) cv. *Williams* cultivados en condiciones de El Oro. **A)** Plantas madre que crecen en sistemas productivos locales, **B)** Genotipos seleccionados establecidos en canteros experimentales de la UTMACH, **C)** Cultivo de bananos sobre macetas en invernadero, **D)** Explantes para establecimiento *in vitro*, **E)** Paso de preesterilización en un agitador comercial, **F)** Explantes inoculados, **G)** Vitroplanta tres semanas después de la inoculación, **H)** Explante seccionado transversalmente para detectar contaminantes endógenos y eliminación dominancia apical.

Para iniciar el cultivo aséptico se utilizaron explantes de dos orígenes (cantero tecnificado e invernadero), que a 21 días de haber sido establecidos se seccionaron completamente para ser transferidos a medio de multiplicación. Las cuatro fracciones meristemáticas del explante se ubicaron en un mismo recipiente (figura 19A), lo que permitió valorar contaminantes endógenos y viabilidad de meristemas. En el primer ciclo de multiplicación, las yemas meristemáticas generaron respuesta (figura 19B), permitiendo obtener de las fracciones del ápice las vitroplantas constituidas por tallo, pseudotallo y hojas para nuevos ciclos de esta fase. Este proceso se mantuvo en dos ciclos más para obtener vitroplantas caracterizadas como brotes de tipo I (figura 19C), destinadas a nuevas siembras en medio semisólido (MSS) y posteriores siembras en sistemas de inmersión temporal (SIT). En ambos procesos se

mantuvo una clasificación diferenciada de vitroplantas según morfología del brote (figura 19D) en tipos I, II, III (Roels et al., 2005).



**Figura 19.** Multiplicación *in vitro* de genotipos de banano (*Musa AAA*) cv. Williams cultivados en condiciones de El Oro. **A)** Líneas asépticas con explante seccionado transversal completamente en cuatro secciones, para confirmar contaminantes endógenos e inducción yemas laterales, **B)** Respuesta de genotipos a 21 días del primer subcultivo desde explantes con apariencia vigorosa, seleccionados para iniciar cultivos asépticos, **C)** Vitroplantas de tipo I, destinada a siembras en medios semisólidos y líquidos, **D)** Clasificación de Brotes Tipo I (BTI), Brotes Tipo II (BTII), Brotes Tipo III (BTIII).

Para la fase de multiplicación en MSS se utilizaron 50 mL de medio por sección de explante en erlenmeyer de vidrio de 500 mL de volumen total, con 200 mL de medio y 4 explantes por frasco. El medio MSS consistió en MS con agente gelificante a  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Gellan Gum (Caisson Laboratories®), mioinositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sacarosa (3%) a pH 5,8. Como reguladores de crecimiento se utilizaron 6-BAP y ácido indol-3-acético (AIA). En clones correspondientes al genoma AAA, las concentraciones de 6-BAP y AIA varían en dependencia del genotipo. En nuestro caso, que corresponde a este genoma, se recomiendan las concentraciones más bajas, que se establecieron en  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-BAP (Cruz-Rosero et al., 2017) y  $0,65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA (Martínez & Fontes-Leandro, 2009).

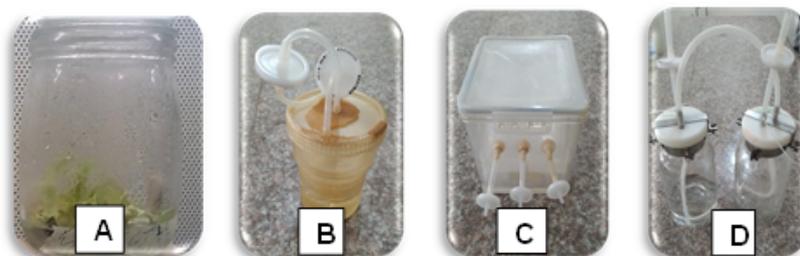
En los siguientes subcultivos de multiplicación en MSS, los explantes utilizados fueron los provenientes de invernadero debido a la mayor calidad y respuesta *in vitro* manifestada y se clasificaron según el diámetro de los brotes de tipo I (diámetro  $>3 \text{ mm}$ ), tipo II (diámetro  $<3 \text{ mm}$ ) y tipo III (pseudotallos sin hojas) (Roels et al., 2005).

Estas agrupaciones permitieron diferenciar las vitroplantas de tipo I para nuevos subcultivos o para establecer los tratamientos en la automatización del cultivo de banano. Para multiplicar estas vitroplantas de tipo I siempre se decapitaron los pseudotallos a 3 mm del tallo verdadero y se realizó un corte vertical en cruz como señal de inhibición en el crecimiento del ápice meristemático, siempre en ciclos de 21 días.

### **Alternativas de sistemas de cultivo *in vitro* en banano**

Para establecer el cultivo automatizado se mantuvieron las condiciones ambientales citadas en el establecimiento y primeros subcultivos. Los experimentos se realizaron con explantes de tipo I provenientes del tercer subcultivo de multiplicación en medio semisólido, siempre decapitados y con cortes en el ápice meristemático. El cambio de MSS en jarras de cristal (figura 20A) a medio líquido en contenedores importados desde el Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (España) y contenedores de cristal locales adaptados como sistemas de doble frasco (SDF), fue uno de los principios que se estableció para valorar la respuesta de las vitroplantas durante las fases automatizadas de multiplicación y enraizamiento, así como el efecto en aclimatación.

Los SIT responden a diferentes principios constructivos, como se muestra en la figura 20B-D. En la figura 4B se observa el sistema RITA® ([www.vitropic.fr](http://www.vitropic.fr)), en la figura 20C se observa el sistema PLANTFORM™ ([www.plantform.se](http://www.plantform.se)) y en la figura 20D el sistema de doble frascos gemelos. Estos sistemas han sido empleados en *Musa acuminata* group AAA (Alvard et al., 1993), en sauce (Regueira et al., 2018) y en piña (Escalona et al., 1999), respectivamente. Este último fue adaptado a SDF de doble contenedor de vidrio de 3 litros diseñado en nuestro laboratorio.



**Figura 20.** *Sistemas convencionales y de Inmersión Temporal en el cultivo in vitro de genotipos de banano (Musa AAA) cv. Williams de la provincia de El Oro. A) Jarras de cristal con medio semisólido, B) sistemas de inmersión temporal RITA®, C) sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, D) sistemas de doble frasco (SDF).*

Los diferentes sistemas fueron programados para 8 ciclos por día y con tiempo de 4 minutos de inmersión (Roels et al., 2005), condición que permitió exponer las vitroplantas a medios de cultivo líquido y renovación de la fase aérea en los contenedores. Los medios de cultivo estuvieron constituidos por el medio MSS descrito en el apartado **Establecimiento y multiplicación in vitro de genotipos de banano** (medios MS para fase multiplicación), pero sin agente gelificante en el caso de los cultivos en SIT y con  $1,9 \text{ gL}^{-1}$  de Gellax® en las jarras. El contenido hormonal utilizado en medios de multiplicación fue de  $0,65 \text{ mg L}^{-1}$  AIA y  $2 \text{ mgL}^{-1}$  6-BAP y en medios de enraizamiento se utilizó  $1,30 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA (Cejas et al., 2011). Los volúmenes de medios siempre respondieron a la relación de 50 mL por explante, como se ha manifestado en otras especies según (Lorenzo et al., 1998), y como se observa en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Número de explantes, volumen de medio de cultivo y capacidad de contenedores de sistemas de cultivo *in vitro* de genotipos de banano

<b>Sistemas</b>	<b>NE</b> (unidades)	<b>VMC</b> (mL)	<b>CC</b> (mL)
<b>MSS</b>	4	200	500
<b>RITA<sup>®</sup></b>	4	200	1000
<b>PLANTFORM</b>	10	500	3500
<b>SDF</b>	20	1000	3000

*MSS, Medio Semisólido; sistemas de inmersión temporal RITA<sup>®</sup>; sistema de inmersión temporal PLANTFORM<sup>™</sup>; SDF, Sistema de doble frasco; NE, Número de explantes; VMC, volumen de medio de cultivo; CC, capacidad de contenedores.*

La automatización de los sistemas para programar los ciclos e inmersiones de las vitroplantas se realizó mediante temporizadores digitales (Woods<sup>®</sup>, E.U.A.) para activar las válvulas solenoides trifásicas que dieron el ingreso de presión positiva de aire, controlado por un manómetro desde un compresor libre de aceite (oil free air compressor, JYK35, 2012). El compresor fue de carga continua de aire con una capacidad de 40 litros. La distribución de aire a los estantes y biorreactores se realizó mediante manguera de polietileno rígido de 3/8" y conectores plásticos regulables. El paso de aire a los sistemas se controló con llaves plásticas locales, que regularon presiones antes de los filtros (HEPA-VENT microfibras 0,3 µm de la empresa General Electric), que garantizan la esterilidad e impidieron el ingreso de agentes contaminantes a los biorreactores.

Las vitroplantas se evaluaron a las 3 semanas de cultivo en los sistemas *in vitro*. Las variables morfológicas evaluadas en brotes de tipo I fueron: (1) Coeficiente multiplicación (CM) que requirió la suma de los brotes tipo I, II y III; (2) Brotes tipo I, II, III (BTI, BTII, BTIII); (3) Longitud pseudotallo (LP); (4) Ancho pseudotallo (AP); (5) Número hojas (NH); (6) Longitud hoja (LH); (7) Ancho hoja (AH); (8) Número raíces (NR); (9) Peso fresco (PF); (10) Peso

seco (PS); (11) Peso de cenizas (PC); (12) Contenido de fenoles solubles (CFS); (13) Actividad antioxidante (ACTA); (14) Actividad Peroxidasa (APX). Siempre que se valoró en experimentos las variables longitudes, pesos frescos y secos, así como ceniza se utilizó calibre digital (Truper®, México), balanza analítica (Yugo®, China) y mufla programable a 600° C por 24 h (Nabertherm®, Alemania).

### **Prototipo de sistema de inmersión temporal local**

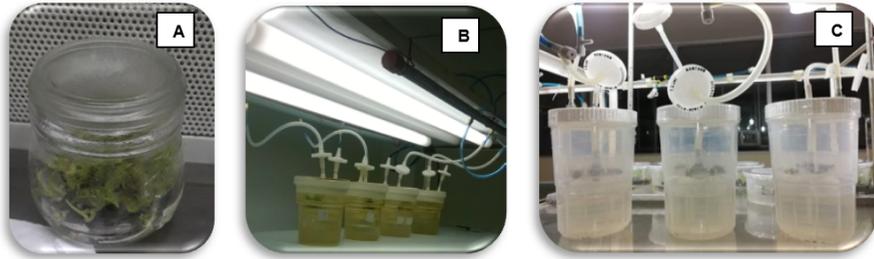
En respuesta a los resultados obtenidos en sistemas RITA® en las diferentes fases de cultivo *in vitro* como multiplicación (Moreno et al., 2018) y enraizamiento (Castillo et al., 2019), se generó un prototipo de sistema de inmersión temporal local (PSITL) como alternativa ante el elevado coste de los sistemas RITA® y el tiempo prolongado para su disponibilidad en el mercado local.

Los PSITL (Figura 21A) se fabricaron a partir de tres contenedores (Figura 21B-C) de polipropileno de uso doméstico, constituidos por: 1) recipiente externo con tapa con capacidad de 1500 mL, 2) recipiente modificado para canasta de capacidad 1000 mL donde se depositaron los explantes de tipo I, 3) recipiente destinado a soporte de canasta modificada de capacidad 500 mL fijado con perno perforado y conductor a canasta de 200 mL que delimita el volumen de medio, 4) juntas tóricas de silicona para pernos, 5) junta tórica de alta presión para hermeticidad de la tapa, 6) manguera para conducción de aire e impulso de medio de cultivo, tapa y pernos conductores (2 unidades) de acero inoxidable (Figura 21D). La tapa requirió de dos perforaciones para ubicar dos pernos como conductores al paso de aire, los recipientes internos el perno conductor de sostén permitió paso de la presión de aire que impulsa el medio de cultivo al recipiente superior. El recipiente superior requirió de perforaciones en su base para que el medio de cultivo descienda por gravedad en transcurso el tiempo, las caras laterales fueron transformadas para fijar con la tapa la estructura e incrementar el paso de luz. El aire de entrada al sistema cuenta con una conexión entre pernos de tapa y de unión a contenedores internos para facilitar las inmersiones de las plantas en medio de cultivo.



**Figura 21.** Propuesta de prototipo de sistema de inmersión temporal local (PSITL). **A)** Sistema (PSITL), **B)** recipiente externo y material para confección de canasta superior, **C)** Recipiente interno compuesto por canasta superior como soporte de plantas fijado con perno a canasta inferior para permitir volumen de medios de cultivo líquido, **D)** Tapa con pernos conductores de entrada y salida de aire.

La valoración de los PSITL en fase de multiplicación se realizó en función de la respuesta a la automatización del cultivo *in vitro* en ciclos de 21 días, se estableció una relación de medio de cultivo por explantes inoculados, espacio aéreo disponible y resistencia de materiales a los procesos de desinfección mediante altas temperaturas. Los PSITL se compararon con formas convencionales y sistemas que mostraron resultados significativos en nuestras condiciones como fueron los RITA® (Figura 22).



**Figura 22.** *Sistemas valorados en fase de multiplicación de genotipos de banano. A) Jarras con medios semi sólidos, B) sistemas de inmersión temporal RITA®, C) Prototipo de sistema de inmersión temporal local (PSITL).*

El proceso de esterilización que se utilizó en los biorreactores y sus filtros fue mediante autoclavado a 121° C, 110 KPa por 20 minutos. Los medios de cultivo de multiplicación fueron esterilizados en relación al volumen de medio en botellas de vidrio autoclavables. Los medios de cultivo y los parámetros de inmersión y renovación de aire fueron los descritos en el apartado **Establecimiento y multiplicación *in vitro* de genotipos de banano** (medios MS para fase multiplicación). La relación del número de explantes y volúmenes de medios de cultivo y capacidad de contenedores se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Condiciones de sistemas *in vitro* convencionales, de inmersión temporal (RITA®) y alternativos (Prototipo Local) en fase de multiplicación de banano

<b>Sistemas</b>	<b>NE</b> (unidades)	<b>VMC</b> (mL)	<b>CF</b> (mL)
<b>MSS</b>	4	200	500
<b>RITA®</b>	4	200	1000
<b>PSITL</b>	9	450	1500

*Medio semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, prototipo de sistema de inmersión temporal local (PSITL), número de explantes (NE), volumen de medio de cultivo (VMC), capacidad de contenedores (CF).*

La valoración de los tres sistemas se realizó con 3 repeticiones con 3 envases cada una. Se seleccionaron 4 muestras de brotes tipo I por sistema y se determinó: (1) Coeficiente multiplicación (CM); (2) Brotes tipo I, II, III (BTI, BTII, BTIII); (3) Longitud del pseudotallo; (4) Longitud del limbo de la hoja 1; (5) Número de raíces por explante (NR); (6) Peso fresco (PF); (7) Peso seco (PS); (8) Peso de ceniza (PC); (9) Contenido de compuestos fenólicos solubles (CFS); (10) Actividad antioxidante (AA).

## Eficiencia de sistema de inmersión temporal RITA® en fase de enraizamiento de banano

Para optimizar la calidad de planta enraizada se compararon 4 condiciones experimentales utilizando medio semisólido y biorreactores RITA®. En concreto se utilizaron 3 frecuencias de inmersión diferentes (3; 6 y 8 inmersiones cada 24) durante los 21 días que duró el ensayo, bajo condiciones homogéneas de tiempo de inmersión (4 min), volumen de medio de cultivo por explante (50 ml) y volumen del contenedor (tabla 12). Los explantes utilizados fueron vitroplantas (brotes tipo I) provenientes de RITA®, y el medio de cultivo consistió en MS con 1,30 mg L<sup>-1</sup> de AIA.

**Tabla 12.** Ciclos de inmersión de biorreactores RITA® en fase de enraizamiento de genotipos de banano

Sistema	IN (ciclos)	TI (minutos)	VME (mL)	VMS (mL)
MSS	*	*	50	200
RITA®	3			
	6	4	50	200
	8			

*Medio semisólido (MSS), Sistema de inmersión temporal RITA®, inmersiones (IN), tiempo de inmersión (TI), volumen de medio de cultivo por explante (VMCE), volumen de medio de cultivo en sistemas (VMS)., \* (permanente).*

Las vitroplantas fueron evaluadas a tres semanas finalizado el enraizamiento (*in vitro*). Para la aclimatación se usó sustrato constituido por compost y suelo franco arcilloso con una relación 1:1. Las plantas fueron nuevamente evaluadas en condiciones *ex vitro* en invernadero a tres semanas en bandejas y tres semanas en fundas plásticas de polietileno de 20 cm de alto y 10 cm de diámetro. Las siguientes variables fueron consideradas para su evaluación: 1) Longitud de pseudotallo (LP); 2) Ancho de pseudotallo (AP); 3) Número de hojas (NH); 4) Longitud de hoja (LH); 5) Ancho de hoja (AH); 6) Número de raíces (NR); 7) Peso fresco (PF) y 8) Peso seco (PS).

### **Fortificante en Sistema de Inmersión Temporal RITA®**

La fortificación de vitroplantas, se realizó mediante elicitación de los medios de cultivo líquidos con extractos de hoja de *M. oleifera* (elicitador), obtenidos a partir de muestras de hojas de plantas en estado de desarrollo, recolectadas en un banco donante local y expuestas por 24 horas a 70 °C en estufa. En el momento de salida de estufa las hojas fueron pulverizadas con mortero y almacenadas a temperatura ambiente, protegidas de la luz hasta el momento de su utilización. En el proceso de extracción, se recogieron muestras de 200 mg de polvo de hoja para constituir extractos etanólicos (al 80%) y acuosos mediante la exposición a calor en baño maría a 50°C por 30 minutos.

Las elicitaciones al medio de cultivo fueron realizadas cuando las vitroplantas de banano fueron expuestas a enraizamiento en sistemas RITA® (tabla 13). Se utilizaron 750µL<sup>-1</sup> de los extractos a razón de 0,75 mg/ml (Verde, 2017). Los controles fueron tratados con el mismo volumen de líquido, pero sin extracto, sólo con etanol o agua. El manejo de las elicitaciones se realizó en cámara de flujo laminar con materiales estériles, para la filtración de extractos se utilizó jeringas de 5ml con filtros MILLEX® Millipore Express® de 0,22µm para garantizar la calidad, esterilidad de extractos y medios de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el descrito en el apartado anterior.

Los explantes utilizados fueron vitroplantas de tipo I, aptas para esta fase de formación de raíces en sistemas RITA®. Se utilizaron 3 réplicas por cada sistema y medios. Todos los explantes tuvieron 8 inmersiones diarias de 4 minutos, y el volumen de medio por biorreactor fue de 200 ml (50 ml por explante).

**Tabla 13.** Tratamientos de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas RITA® y expuestas a extractos de hojas de *M. oleifera*

<b>Medios</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Disolvente del elicitor</b>	<b>Elicitor (mgL<sup>-1</sup>)</b>
<b>MS</b>	control	Agua	0,00
<b>MSE</b>	control	Etanol	
<b>MSEA</b>	elicitor	Agua	0,75
<b>MSEE</b>	elicitor	Etanol	

*Sistemas RITA® con medios MS (MS), con medios MS y etanol 80% (MSE), con medio MS y extracto etanólico de M. oleifera (MSEE), y con medio MS y extracto acuoso de M. oleifera (MSEA). Todos los explantes tuvieron 8 inmersiones diarias de 4 minutos, y el volumen de medio por biorreactor fue de 200 ml (50 ml por explante).*

Las siguientes variables fueron consideradas para valorar las vitroplantas expuestas a diferentes condiciones (ciclos de inmersión y exposición a extractos) los sistemas: (1) Longitud pseudotallo (LP); (2) Ancho pseudotallo (AP); (3) Número hojas (NH); (4) Longitud hoja (LH); (5) Ancho hoja (AH); (6) Número raíces (NR); (7) Longitud de raíz mayor (LRM); (8) Contenido de fenoles solubles totales (CFS); (9) Actividad antioxidante (AA).

### **Contenido de fenoles solubles**

En las cuantificaciones del contenido de fenoles solubles totales se utilizó como material vegetal las vitroplantas completas de banano Williams, tipo I. Las vitroplantas fueron lavadas con agua destilada, esta actividad permitió retirar residuos de medios de cultivo, para realizar el proceso de extracción

mediante la exposición de las muestras (0,1 gramo) a agua destilada a 100 °C, seguido de una incubación por 30 minutos a temperatura ambiental (Kraujalyté et al., 2015). los demás pasos en extracción y cuantificación de fenoles solubles se realizaron como fueron descritos en el apartado **3.2 (Contenido de fenoles solubles)**.

### **Actividad antioxidante total**

El producto del proceso de extracción de fenoles solubles de vitroplantas de banano Williams fue el material utilizado para la caracterización de la actividad antioxidante total, determinada mediante el procedimiento metodológico descrito en el apartado **3.3 (Actividad antioxidante total)**.

### **Actividad de peroxidasa y contenidos de proteínas solubles**

La cuantificación de la actividad enzimática (peroxidasa) y el contenido de proteínas fueron valoradas en muestras de hojas de plantas *in vitro* tipo I de banano Williams mediante la descripción realizada en el apartado **3.2 (Peroxidasa (PRX))**.

### **Procedimiento estadístico**

La recolección de datos provenientes de las variables de interés como ápices: contaminados por bacterias, fenolizados, inactivos y activos; brotes de tipo I, II y III; coeficiente multiplicación; longitud del pseudotallo; ancho del pseudotallo; número de hojas; longitud de hoja; ancho de hoja; número de raíces (las medias representan el comportamiento de todas las vitroplantas de banano que forman parte de la unidad experimental); peso fresco, peso seco y peso de cenizas; contenido de fenoles solubles; actividad antioxidante, actividad de peroxidasa y contenido de proteínas (las medias representan el valor de una muestra homogénea del conjunto de vitroplantas de banano que forman parte de la unidad experimental) se efectuó en cada tratamiento (para el primer momento que incluye las fases de establecimiento y multiplicación convencional se utilizaron explantes (ápices de banano) de origen de cantero y de invernadero; y para el segundo momento de automatización en las fases de multiplicación y enraizamiento se valoró la calidad de brotes tipo I,

expuestos a diferentes formas de cultivo *in vitro* de tipo convencionales o alternativas de contenedores de sistemas de inmersión temporal (MSS, RITA, PLANTFORM, SDF, PSITL); además de los RITAS valorados en diferentes ciclos de inmersión (3, 6 y 8) y los RITAS con medios de cultivos enriquecidos con extractos etanólicos y acuosos de moringa.

Las muestras fueron repetidas tres veces y la recolección de datos se realizó a los 21 días concluida la fase estudiada.

En las matrices de datos generadas en cada momento experimental (fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación) se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad de datos (mediante el test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (se utilizó el test de Levene). Cuando los datos de las variables dependientes cumplieron estos postulados se realizaron las pruebas paramétricas t de Student para grupos independientes y Análisis de varianza de un factor intergrupos (cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó la prueba de rangos y comparaciones múltiples de Tukey para detectar entre qué tratamientos se presentan diferencias o similitudes); en caso contrario, se utilizaron pruebas no paramétricas; para dos tratamientos realizó la prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes; y para más de dos tratamientos se realizó la prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes.

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente con el paquete estadístico IBM SPSS versión 25 de prueba para Windows y se utilizó una confiabilidad en la estimación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

### 5.3 RESULTADOS

#### Respuesta *in vitro* de genotipos de banano Williams

El establecimiento de material vegetal *in vitro* a partir de yemas laterales, permitió comparar el proceso de extracción de ápices desde canteros (AC) e invernaderos (AI), observándose diferencias significativas ( $p\text{-valor}\leq 0,05$ ) en las variables objeto de estudio (Tabla 14).

La respuesta en los primeros 21 días *in vitro* mostró diferencias entre AC y AI en el porcentaje de explantes que presentaron contaminación bacteriana, siendo superior en ápices procedentes de canteros. En cuanto a la fenolización de yemas apicales, los valores obtenidos son también superiores en AC, que presentan un 4 % más de pérdida de explantes por este motivo. Además, la respuesta de ápices inactivos es mayor en AC (5 % de ápices sin respuesta), mientras que en los ápices obtenidos bajo condiciones controladas no se manifiestan pérdidas. Los ápices procedentes del invernadero mostraron también mejores respuestas durante la etapa de multiplicación, con menos contaminación y mayor porcentaje de ápices activos.

El establecimiento y multiplicación *in vitro* de vitroplantas, a partir de ápices de invernadero propiciaron más ápices activos sanos y competentes con respuesta *in vitro* que permitió la generación de brotes.

**Tabla 14.** Respuesta *in vitro* de ápices de genotipos de banano *Williams*

Fase <i>in vitro</i>	Origen de ápices	Respuesta de explantes (%)			
		CB	Fn	AIN	AAC
Establecimiento	AC	16±0,004a	9±0,008a	5±0,007a	70±0,020b
	AI	9±0,006b	5±0,005b	0±0,000b	86±0,005a
	p-valor	0,008	0,009	0,005	0,009
Multiplicación (MSS)	AC	90±0,13a	0±0,000a	0±0,000a	10±0,04b
	AI	47±0,03b	0±0,000a	0±0,000a	53±0,04a
	p-valor	0,007	1,000	1,000	0,007

*Medios de cultivo semisólido (MSS), ápices de cantero (AC), ápices de invernadero (AI), contaminación bacteriana (CB), fenolización (Fn), ápices inactivos (AIN), ápices activos (AAC). Los valores representan la media ± error estándar a partir de cuatro repeticiones de extracción y siembra de explantes, valorando cinco ápices en cada una para cada variable en establecimiento; así como, 12 ápices formadores clúster en fases de multiplicación. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre origen de ápices por fase del cultivo para un p-valor≤0,05 (según prueba U de Mann-Whitney para grupos independientes).*

Los explantes constituidos por secciones provenientes del ápice meristemático, permitieron la formación de clúster a las tres semanas de la inoculación y estos clústeres estaban conformados por distintos tipos de brotes. La formación de brotes de tipo II, alcanzó valores similares entre AC y AI; aunque los demás tipos de brotes y coeficiente multiplicación mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) según origen de ápices. Los brotes de tipo I generaron diferencias significativas ( $p\text{-valor}=0,031$ ) entre AI y AC en 0,75 unidades, así como, al obtener brotes de tipo III que difirieron ( $p\text{-valor}=0,024$ ) entre AI y AC en 1,17 unidades. El coeficiente de multiplicación presentó diferencia significativa ( $p\text{-valor}=0,001$ ) entre AI y AC en 2,41 unidades por explante (tabla 15).

La oportunidad de obtener material vegetal sano y regenerado permitió la generación de vitroplantas de tipo I competentes, utilizados como explantes para próximos subcultivos en medio semisólido y líquidos con fines de automatización.

**Tabla 15.** Obtención de brotes de banano en fase de multiplicación mediante el manejo de ápices meristemáticos

Origen de Ápices	BROTOS (unidades)			CM (unidades)
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	
<b>AC</b>	0,17±0,31b	0,50±0,15a	1,00±0,25b	1,67±0,26b
<b>AI</b>	0,92±0,11a	1,00±0,37a	2,17±0,41a	4,08±0,34a
p-valor	0,031	0,567	0,024	0,001

Ápices de cantero (**AC**), ápices de invernadero (**AI**), brotes de diámetro > 3 mm (**BROTOS Tipo I**), brotes de diámetro < 3 mm (**BROTOS Tipo II**), brotes con pseudotallos sin hojas (**BROTOS Tipo III**), coeficiente de multiplicación (**CM**). Los valores representan la media ± error estándar considerando tres repeticiones de origen de ápice por cada tipo de brote. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre origen de ápices para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes, con un nivel de confianza 95%).

### **Automatización *in vitro* de genotipos de banano Williams**

La multiplicación de brotes tipo I en diferentes sistemas de cultivo (semisólido y 3 tipos de biorreactores) se analizó a los 21 días. Los valores obtenidos entre sistemas fueron similares en variables como ancho de pseudotallos; aunque se identificaron diferencias significativas ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) entre sistemas en la longitud de pseudotallos (Tabla 7). La longitud de pseudotallos fue similar entre sistemas PLANTFORM™, SDF y RITA®, así como, similitudes entre sistemas RITA® y MSS; aunque se generó diferencias estadísticamente tanto entre sistemas PLANTFORM™ y MSS (0,9 cm), así como, SDF y MSS (0,8 cm). El enraizamiento de vitroplantas fue valorado a 21 días de inoculados los sistemas con brotes de tipo I, estos manifestaron en

las variables evaluadas diferencias significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre los sistemas de cultivo propuestos. Las longitudes de pseudotallos difirieron entre sistemas MSS y SDF (1,7 cm), así como, entre sistemas MSS y RITA® (0,9 cm); pero se identificaron similitudes entre los sistemas convencionales y PLANTFORM™. El ancho de pseudotallo presentó diferencia significativa entre sistemas MSS y los sistemas de inmersión temporal, y donde estos sistemas de medios líquidos obtuvieron valores similares. En 42 días de aclimatación de vitroplantas, los valores de ancho de pseudotallos entre sistemas de cultivo fueron similares, aunque se identificó diferencias significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre sistemas en la longitud de pseudotallos. La longitud de pseudotallos difirió entre sistemas MSS y demás sistemas SDF (2,2 cm), RITA® (1,6 cm) y PLANTFORM™ (1,2 cm), cuando estos tres sistemas no difirieron entre ellos (tabla 16).

En fase de multiplicación, la longitud de este órgano de vitroplantas fue favorecida con la utilización de medios líquidos, con una mayor eficiencia cuando se utilizaron sistema locales y sistemas PLANTFORM™. Las vitroplantas enraizadas, alcanzaron mayor ancho en sistemas MSS y al menos similitudes con sistemas PLANTFORM™ en longitud del órgano. En la aclimatación de vitroplantas el ancho de este órgano presentó similitud entre sistemas valorados, pero en longitud al menos los sistemas PLANTFORM™ se igualaron a sistemas MSS.

**Tabla 16.** Efectos de los sistemas de cultivo en crecimiento de pseudotallos de genotipos de banano *Williams* en las fases de multiplicación, enraizamiento y su influencia en aclimatación

<b>FASES</b>	<b>SISTEMAS</b>	<b>LP (cm)</b>	<b>AP (cm)</b>
<b>Multiplicación</b>	<b>MSS</b>	1,6±0,23b	0,6±0,05a
	<b>RITA®</b>	2,1±0,09ab	0,6±0,02a
	<b>PLANTFORM™</b>	2,5±0,13a	0,7±0,05a
	<b>SDF</b>	2,4±0,22a	0,7±0,06a
	p-valor	0,006	0,272
<b>Enraizamiento</b>	<b>MSS</b>	4,3±0,24a	1,0±0,04a
	<b>RITA®</b>	3,4±0,18bc	0,7±0,05bc
	<b>PLANTFORM™</b>	3,5±0,24ab	0,6±0,03bc
	<b>SDF</b>	2,6±0,13c	0,5±0,03c
	p-valor	0,001	0,001
<b>Aclimatación</b>	<b>MSS</b>	6,2±0,34a	0,9±0,04a
	<b>RITA®</b>	4,6±0,41b	0,8±0,01a
	<b>PLANTFORM™</b>	5,0±0,36ab	0,9±0,04a
	<b>SDF</b>	4,0±0,19b	0,8±0,02a
	p-valor	0,002	0,086

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF). Longitud pseudotallo (LP), ancho pseudotallo (AP). Los valores representan la media ± error estándar a partir de tres repeticiones de sistemas, valorando cuatro brotes de tipo I en cada una para cada variable en fases de multiplicación; así como, 10 vitroplantas en fases de enraizamiento y aclimatación.*

*Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas por fase del cultivo para un p-valor ≤ 0,05 (prueba de Tukey).*

Después de 21 días de finalizada la multiplicación de brotes tipo I, los valores obtenidos entre sistemas fueron similares en variables como número de hojas, longitud y ancho de hoja; aunque se identificaron diferencias numéricas entre sistemas de cultivos que favorecieron a vitroplantas generadas en SIT. El enraizamiento de vitroplantas después de 21 días de inoculados los

sistemas con brotes de tipo I, estos manifestaron en las variables evaluadas diferencias significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre los sistemas de cultivo propuestos. Las vitroplantas mostraron similitudes en el número de hojas obtenidas en sistemas MSS, RITA® y PLANTFORM™, pero se obtuvo diferencias entre sistemas MSS y SDF en 2,10 unidades, así como, entre sistemas RITA® y SDF de 2,30 unidades. Los órganos foliares presentaron comportamiento similar en longitud y ancho de hojas, estos órganos mostraron valores similares en sistemas RITA® y PLANTFORM™, así como, diferentes significativamente a sistemas MSS y SDF. En 42 días de aclimatadas las vitroplantas, los valores de número de hojas entre sistemas de cultivo fueron similares, aunque se identificó diferencias significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre sistemas en longitud y ancho de hojas. El crecimiento en órganos foliares como longitud y ancho de hojas en sistemas MSS, PLANTFORM™ y RITA® presentó valores similares donde estos SIT lograron igualarse a sistemas convencionales, pero difirieron estadísticamente a sistemas SDF (tabla 17).

La calidad de las vitroplantas en multiplicación fue similar entre sistemas de cultivos cuando se valoró el número, longitud y ancho del órgano foliar. Las vitroplantas enraizadas mostraron valores similares entre sistemas MSS, RITA® y PLANTFORM™ en el número de hojas; así como, diferencias significativas de RITA® y PLANTFORM™ con los demás sistemas en longitud y ancho de este órgano. En la aclimatación de las vitroplantas en relación al comportamiento foliar, presentó similitud, en número de hojas entre todos los sistemas; así como, en longitud y ancho de hojas con similitud entre MSS y RITA®, PLANTFORM™.

**Tabla 17.** Efectos de los sistemas de cultivo en crecimiento foliar de genotipos de banano *Williams* en fases de multiplicación, enraizamiento y su influencia en aclimatación

<b>FASES</b>	<b>SISTEMAS</b>	<b>NH</b> (unidades)	<b>LH</b> (cm)	<b>AH</b> (cm)
<b>Multiplicación</b>	<b>MSS</b>	3,14±0,14a	1,7±0,29a	1,1±0,18a
	<b>RITA®</b>	3,85±0,40a	2,2±0,32a	1,4±0,16a
	<b>PLANTFORM™</b>	4,14±0,34a	2,5±0,22a	1,54±0,12a
	<b>SDF</b>	4,00±0,49a	2,6±0,21a	1,6±0,74a
	p-valor	0,248	0,085	0,113
<b>Enraizamiento</b>	<b>MSS</b>	6,70±0,34a	2,2±0,11b	1,3±0,08b
	<b>RITA®</b>	6,90±0,38a	4,1±0,21a	2,0±0,08a
	<b>PLANTFORM™</b>	5,80±0,55ab	4,1±0,27a	2,1±0,12a
	<b>SDF</b>	4,60±0,40b	2,9±0,21b	1,6±0,10b
	p-valor	0,002	0,001	0,001
<b>Aclimatación</b>	<b>MSS</b>	5,50±0,17a	13,9±0,37a	5,9±0,35a
	<b>RITA®</b>	5,00±0,14a	13,2±0,64a	5,7±0,33a
	<b>PLANTFORM™</b>	5,60±0,27a	13,6±0,42a	6,2±0,24a
	<b>SDF</b>	5,30±0,01a	11,0±0,40b	4,6±0,21b
	p-valor	0,236	0,001	0,003

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF). Número hojas (NH), longitud hoja (LH), ancho hoja (AH). Los valores representan la media ± error estándar a partir de tres repeticiones de sistemas, valorando cuatro brotes de tipo I en cada una para cada variable en fases de multiplicación; así como, 10 vitroplantas en fases de enraizamiento, aclimatación. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas por fase del cultivo para un p-valor ≤ 0,05 (prueba de Tukey).*

Durante la fase de multiplicación se produjeron variaciones significativas (p-valor ≤ 0,05) en la biomasa obtenida a los 21 días de cultivo de brotes tipo I

en los diferentes sistemas (Tabla 18). El peso fresco por vitroplanta fue mayor en SDF que en RITA®, con una diferencia de 1,6 g y en SDF que en MSS, con 1,1 g de diferencia. Los brotes cultivados en SDF también mostraron mayor peso seco (0,2 g) que el resto de los sistemas. Sin embargo, la mayor producción de cenizas correspondió a los biorreactores PLANTFORM™.

Durante el enraizamiento de vitroplantas también se observaron diferencias significativas entre los sistemas. Los brotes cultivados en MSS obtuvieron mayor peso fresco que los PLANTFORM™ (1,3 g de diferencia) y SDF (1,8 g de diferencia), pero pesos similares a los obtenidos en RITA® (0,8 g de diferencia). Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo en el peso seco, ya que el único tratamiento que presentó diferencias significativas fueron los biorreactores RITA®, con 0,1 g menos de peso seco que el resto de los sistemas. En cuanto al peso de cenizas, los mayores valores fueron obtenidos por las vitroplantas cultivadas en SDF, mientras que los sistemas MSS y RITA® no presentaron diferencias y los PLANTFORM™ obtuvieron los valores menores. A los 42 días de la aclimatación de las vitroplantas, se observaron diferencias significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre sistemas en el peso fresco, seco y cenizas. Los RITA® produjeron el mayor peso fresco y los SDF el menor, mientras que en el peso seco solo se generaron diferencias significativas entre SDF (con los menores valores) y el resto de los sistemas. Los RITA® produjeron más cenizas, seguidos de los PLANTFORM™, MSS y SDF.

**Tabla 18.** Efectos de los sistemas de cultivo en el peso de genotipos de banano *Williams* en fases de multiplicación, enraizamiento y su influencia en aclimatación

<b>FASES</b>	<b>SISTEMAS</b>	<b>PF</b> (gramos)	<b>PS</b> (gramos)	<b>PC</b> (gramos)
<b>Multiplicación</b>	<b>MSS</b>	1,5±0,12bc	0,1±0,006b	0,008±0,001bc
	<b>RITA®</b>	1,0±0,11c	0,1±0,008b	0,003±0,001c
	<b>PLANTFORM™</b>	1,9±0,24ab	0,1±0,014ab	0,018±0,003a
	<b>SDF</b>	2,6±0,32a	0,3±0,120a	0,012±0,002ab
	p-valor	0,001	0,012	0,001
<b>Enraizamiento</b>	<b>MSS</b>	3,6±0,34a	0,2±0,009a	0,015±0,007bc
	<b>RITA®</b>	2,8±0,15ab	0,1±0,001b	0,015±0,003c
	<b>PLANTFORM™</b>	2,3±0,30bc	0,2±0,02ab	0,040±0,009b
	<b>SDF</b>	1,8±0,12c	0,2±0,01ab	0,192±0,002a
	p-valor	0,001	0,013	0,001
<b>Aclimatación</b>	<b>MSS</b>	13,0±0,20b	0,7±0,02b	0,561±0,02d
	<b>RITA®</b>	14,3±0,22a	0,8±0,01a	0,715±0,001a
	<b>PLANTFORM™</b>	11,9±0,01c	0,8±0,01ab	0,616±0,001b
	<b>SDF</b>	7,6±0,42d	0,6±0,02c	0,424±0,001c
	p-valor	0,001	0,001	0,001

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF). Peso fresco (PF), peso seco (PS), peso cenizas (PC). Los valores representan la media ± error estándar a partir de tres repeticiones de sistemas, valorando cuatro brotes de tipo I en cada una para cada variable en fases de multiplicación, así como 10 vitroplantas en fases de enraizamiento y aclimatación. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas por fase del cultivo para un p-valor ≤ 0,05 (prueba de Tukey).*

El manejo *in vitro* de genotipos de banano Williams mediante sistemas convencionales (figura 23A) y sistemas de inmersión temporal (figura 23B-D) permitió la propagación de los clones establecidos. Durante los 21 de la fase

de multiplicación se obtuvieron clusters (figura 23E-H) que permitieron clasificar los clones en tipos de brotes. La fase de enraizamiento se realizó con brotes de tipo I, obteniéndose a los 21 días vitroplantas idóneas para la siguiente fase (figura 23I-L). Los datos de estas 2 fases y de la fase de aclimatación (42 días) permitieron valorar la influencia de los sistemas de inmersión temporal y cultivo con agar en el cultivo *in vitro*, así como su capacidad de respuesta *ex vitro* (figura 23M-O).



**Figura 23.** Efecto de los sistemas de cultivo en la respuesta *in vitro* y *ex vitro* de genotipos de banana Williams. Fase de multiplicación (21 días): **A)** Sistema con medios de cultivo semisólido. **B)** Sistema de inmersión temporal RITA®. **C)** Sistema de inmersión temporal PLANTFORM™. **D)** Sistemas de doble frasco (SDF). **E)** Clústeres obtenidas en semisólido. **F)** Clústeres obtenidas en RITA®; **G)** Clústeres obtenidas en PLANTFORM™. **H)** Clústeres obtenidas en SDF; vitroplantas en fase de enraizamiento (21 días): **I)** Cultivadas en semisólido. **J)** Cultivadas en RITA®, **K)** Cultivadas en PLANTFORM™. **L)** Cultivadas en SDF; vitroplantas en fase de aclimatación

(42 días). **M)** Originadas en semisólido. **N)** Originadas en RITA®. **Ñ)** Originadas en PLANTFORM™. **O)** Originadas en SDF.

La generación de brotes de tipo I fue similar entre los sistemas valorados, aunque estos sistemas permitieron generar diferentes estadísticas ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) en las demás variables analizadas. Los explantes cultivados en RITA® produjeron más brotes de tipo II y III que en el resto de los sistemas, mientras que los peores resultados se produjeron con el medio semisólido. Los PLANTFORM™ y SDF presentaron valores intermedios que no fueron significativamente diferentes de los RITA® ni del MSS. Lo mismo ocurrió con respecto al coeficiente de multiplicación (Tabla 19).

La utilización de medios líquidos permitió la formación de brotes tipo I de un modo similar a los medios convencionales, pero los sistemas RITA® fueron más eficientes en la generación de brotes tipo II, III y coeficiente de multiplicación.

**Tabla 19.** Eficiencia de cuatro sistemas de cultivo en la obtención de brotes en fase de multiplicación de genotipos de banano Williams

Sistemas	BROTOS (unidades)			CM (unidades)
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	
<b>MSS</b>	1,82±0,30a	0,45±0,25b	0,64±0,24b	2,91±0,62b
<b>RITA®</b>	2,36±0,39a	2,27±0,56a	7,36±2,13a	12,00±2,30a
<b>PLANTFORM™</b>	1,64±0,31a	1,18±0,33ab	3,00±1,05ab	5,82±1,15ab
<b>SDF</b>	1,27±0,19a	0,73±0,30ab	2,55±0,82ab	4,55±1,06ab
p-valor	0,122	0,02	0,005	0,002

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SITL). Brotes de diámetro >3 mm (BROTOS Tipo I), brote de diámetros <3 mm (BROTOS Tipo II), brotes con pseudotallos sin hojas (BROTOS Tipo III), coeficiente de multiplicación (CM). Los valores representan la media ± error estándar considerando tres repeticiones de sistemas por cada tipo de brote. Letras diferentes en cada variable, indican*

*diferencias significativas entre sistemas para un  $p$ -valor  $\leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).*

Las vitroplantas expuestas a diversas alternativas de sistemas de cultivo fueron caracterizadas según el contenido de fenoles solubles, capacidad antioxidante y actividad peroxidasa de sus hojas, tallos y pseudotallos en las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación (Tablas 20, 21 y 22).

El efecto de los sistemas de cultivo en el contenido de fenoles solubles (CFS) se muestra en la Tabla 20.

En fase de multiplicación, las hojas de las plantas cultivadas en SDF mostraron más CFS que el resto de los sistemas, pero esta tendencia no se mantuvo en los pseudotallos y en los tallos, donde la mayor acumulación de CFS correspondió a los RITA® y al MSS, respectivamente. Considerando los 3 órganos conjuntamente, los biorreactores RITA® produjeron los brotes con más fenoles.

Durante el proceso de formación de raíces y la aclimatación sucedió algo similar, ya que la acumulación de CFS dependió tanto del sistema de cultivo como del órgano evaluado, aunque tomando todos los órganos conjuntamente los valores más altos correspondieron a los tratamientos con medio líquido.

Tras 42 días de aclimatación los CFS disminuyeron en todos los sistemas y órganos valorados con relación a otras fases. Las hojas y los pseudotallos de las plantas cultivadas en RITA® acumularon más CFS, pero no ocurrió así con los tallos, donde los valores más altos se obtuvieron en los sistemas de medio semisólido.

En la multiplicación y enraizamiento de vitroplantas los sistemas con medio líquido acumularon más CFS que los sistemas convencionales. En fase de aclimatación, los contenidos fenólicos tuvieron un descenso en todos los órganos originados en los diferentes sistemas; pero los sistemas RITA® permitieron obtener mayores contenidos fenólicos en hojas y pseudotallos.

**Tabla 20.** Efecto de los sistemas de cultivo en el contenido de fenoles solubles en órganos de banano *Williams* durante la multiplicación y enraizamiento *in vitro* y su posterior aclimatación.

FASES	SISTEMAS	CFS (mg GAE/ g PF)		
		Hojas	Pseudotallo	Tallo
Multiplicación	MSS	1,91±0,02ab	0,61±0,01c	1,50±0,02a
	RITA®	1,97±0,02ab	2,16±0,07a	1,08±0,02ab
	PLANTFORM™	1,49±0,03b	1,47±0,02ab	0,49±0,01b
	SDF	2,98±0,04a	0,66±0,01bc	0,47±0,01b
	p-valor	0,000	0,000	0,000
Enraizamiento	MSS	1,12±0,02b	0,60±0,02b	2,44±0,13bc
	RITA®	3,85±0,06a	0,19±0,06b	2,77±0,04ab
	PLANTFORM™	2,80±0,01ab	0,84±0,01ab	3,45±0,02a
	SDF	3,95±0,04a	1,08±0,04a	1,75±0,03c
	p-valor	0,000	0,000	0,000
Aclimatación	MSS	0,18±0,002b	0,01±0,001b	0,09±0,005a
	RITA®	0,31±0,01a	0,05±0,001a	0,03±0,005c
	PLANTFORM™	0,28±0,001ab	0,01±0,004b	0,07±0,001a b
	SDF	0,11±0,001b	0,01±0,003ab	0,05±0,001b c
	p-valor	0,000	0,003	0,000

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF), contenido de fenoles solubles (CFS), equivalentes ácido gálico (GAE), peso seco (PS). Los valores representan la media ± error estándar a partir de 3 repeticiones de sistemas, valorando 3 brotes de tipo I (multiplicación) o vitroplanta (enraizamiento y aclimatación) en cada una para cada variable. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas por fase del cultivo para un p-valor ≤ 0,05 (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).*

La actividad antioxidante (AA) de las vitroplantas cultivadas en diferentes sistemas de cultivo se muestra en la Tabla 21. En la multiplicación de vitroplantas, la AA en hojas fue mayor en los sistemas RITA® y SDF, seguidos

por los PLANTFORM™® y MSS. En los pseudotallos, sin embargo, la mayor actividad antioxidante se registró en los PLANTFORM™ y la menor en el MSS, mientras que en los tallos el mayor valor correspondió a los RITA y el menor a los SDF. Durante el enraizamiento de las vitroplantas, las hojas de RITA® y SDF presentaron los mayores valores de AA. Los SDF también mostraron altos valores en los pseudotallos y en los tallos, sin diferencias significativas con los procedentes de RITA®, que obtuvieron los mayores valores en estos órganos al igual que había ocurrido con los fenoles solubles, la AA obtenida a 42 días de aclimatación fue muy inferior a la de las fases anteriores. Los sistemas con medio líquido produjeron más AA en hojas, tallos y pseudotallos.

**Tabla 21.** Efecto del sistema de cultivo durante las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* en la actividad antioxidante (AA) de diferentes órganos de banano *Williams* en dichas fases y durante la aclimatación.

FASES	SISTEMAS	AA ( $\mu\text{molTE/g PF}$ )		
		Hojas	Pseudotallo	Tallo
Multiplicación	MSS	194,12 $\pm$ 0,65b	107,70 $\pm$ 0,51c	130,52 $\pm$ 7,82ab
	RITA®	280,01 $\pm$ 8,43a	177,45 $\pm$ 2,44ab	161,71 $\pm$ 1,97a
	PLANTFORM™	232,32 $\pm$ 6,46ab	213,62 $\pm$ 1,00a	94,04 $\pm$ 4,60bc
	SDF	257,15 $\pm$ 2,17a	130,05 $\pm$ 1,41bc	72,38 $\pm$ 2,01c
	p-valor	0,000	0,000	0,000
Enraizamiento	MSS	174,89 $\pm$ 1,65bc	92,64 $\pm$ 2,32ab	205,03 $\pm$ 1,39b
	RITA®	288,71 $\pm$ 1,23a	52,86 $\pm$ 2,84c	250,00 $\pm$ 5,26a
	PLANTFORM™	239,58 $\pm$ 1,31ab	69,10 $\pm$ 2,00bc	235,10 $\pm$ 1,81a
	SDF	286,19 $\pm$ 0,56a	152,61 $\pm$ 0,60a	231,15 $\pm$ 2,01ab
	p-valor	0,000	0,000	0,001
Aclimatación	MSS	9,76 $\pm$ 0,74c	11,06 $\pm$ 0,36a	9,18 $\pm$ 0,36b
	RITA®	18,33 $\pm$ 1,62ab	13,27 $\pm$ 0,37a	16,70 $\pm$ 0,75a
	PLANTFORM™	13,06 $\pm$ 1,22bc	13,38 $\pm$ 1,06a	12,93 $\pm$ 0,99ab
	SDF	13,56 $\pm$ 0,69bc	13,09 $\pm$ 0,17a	16,70 $\pm$ 0,20a
	p-valor	0,003	0,057	0,000

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF), actividad antioxidante (AA), equivalentes trolox (TE), peso seco (PS). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar a partir de 3 repeticiones. Las muestras corresponden a órganos de brotes de tipo I en la multiplicación y de vitroplantas durante el enraizamiento y la aclimatación. Letras diferentes en cada variable indican diferencias significativas entre sistemas para cada fase del cultivo para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).*

Los cuatro sistemas de cultivo *in vitro* evaluados influyeron sobre la actividad peroxidasa mostrada por las hojas de las vitroplantas de banano (Tabla 22). En la fase de multiplicación, la actividad específica de peroxidasa fue significativamente superior en PLANTFORM™, seguido por SDF, RITA® y

MSS. En la fase de enraizamiento la actividad específica de la peroxidasa de las vitroplantas mostró diferencias estadísticas ( $p$ -valor=0,004) entre sistemas SDF (con el mayor valor) y MSS (con la menor actividad), mientras que los SDF, PLANTFORM™ y RITA® presentaron valores similares y pequeñas diferencias no significativas. Las vitroplantas establecidas en condiciones de aclimatación sólo presentaron diferencias significativas en este parámetro entre PLANTFORM™ y RITA® (Tabla 22).

**Tabla 22.** Efecto del sistema de cultivo durante las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* en la actividad peroxidasa de hojas de banano *Williams* en dichas fases y durante la aclimatación.

FASES	SISTEMAS	APX (nkat/g PF)	PT ( $\mu$ gprot/ml)	AEPX (nakt/ $\mu$ gproteína)
Multiplicación	MSS	2,43 $\pm$ 0,06d	4,63 $\pm$ 0,06b	0,53 $\pm$ 0,03d
	RITA®	8,07 $\pm$ 0,10c	4,62 $\pm$ 0,09b	1,75 $\pm$ 0,04c
	PLANTFORM™	32,46 $\pm$ 0,02a	4,72 $\pm$ 0,06a	6,88 $\pm$ 0,08a
	SDF	27,92 $\pm$ 0,08b	4,73 $\pm$ 0,06a	5,91 $\pm$ 0,09b
	p-valor	0,000	0,000	0,000
Enraizamiento	MSS	0,75 $\pm$ 0,06b	4,64 $\pm$ 0,01ab	0,16 $\pm$ 0,01b
	RITA®	16,83 $\pm$ 0,05ab	4,83 $\pm$ 0,04ab	3,49 $\pm$ 0,02ab
	PLANTFORM™	20,62 $\pm$ 0,07ab	4,63 $\pm$ 0,01b	4,46 $\pm$ 0,01ab
	SDF	25,13 $\pm$ 0,06a	4,84 $\pm$ 0,04a	5,20 $\pm$ 0,04a
	p-valor	0,003	0,009	0,002
Aclimatación	MSS	14,19 $\pm$ 0,06ab	4,68 $\pm$ 0,06ab	3,03 $\pm$ 0,06ab
	RITA®	8,94 $\pm$ 0,07b	4,73 $\pm$ 0,06a	1,89 $\pm$ 0,05b
	PLANTFORM™	14,37 $\pm$ 0,06a	4,66 $\pm$ 0,01b	3,08 $\pm$ 0,06a
	SDF	10,56 $\pm$ 0,06ab	4,68 $\pm$ 0,06ab	2,26 $\pm$ 0,07ab
	p-valor	0,002	0,005	0,003

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF). Actividad peroxidasa (APX), peso fresco (PF), proteínas totales (PT), actividad específica peroxidasa (AEPX). La actividad enzimática se expresa en nano katal (nkat), siendo un katal la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un mol de sustrato por segundo. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las muestras corresponden a hojas de brotes de tipo I en la multiplicación y de vitroplantas durante el enraizamiento y la aclimatación. Letras diferentes en cada variable*

indican diferencias significativas entre sistemas para cada fase del cultivo para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  en multiplicación (prueba Duncan), enraizamiento y aclimatación (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).

El efecto del sistema de cultivo sobre el número de raíces y su contenido en fenoles y antioxidantes se presenta en la Tabla 23. A los 21 de la inducción la formación de raíces ocurrió en todos los sistemas de cultivo, lo que permitió generar un órgano competente y necesario para transitar de un ambiente controlado a los ambientes externos que exponen a las vitroplantas a desórdenes fisiológicos. Los sistemas RITA® produjeron mayor formación de compuestos fenólicos, así como obtener una actividad antioxidante similar a sistemas convencionales, lo cual favorece una mejor respuesta de las vitroplantas a los nuevos ambientes externos.

**Tabla 23.** Efecto del sistema de cultivo en el número de raíces y su contenido de fenoles y antioxidantes de vitroplantas de banano *Williams*.

FASE	SISTEMAS	NR (unidades)	CFS (mg GAE/ g PF)	AA ( $\mu$ TE/ g PF)
Enraizamiento	MSS	16,20 $\pm$ 1,67a	1,60 $\pm$ 0,03b	186,75 $\pm$ 5,25a
	RITA®	11,40 $\pm$ 1,29a	1,98 $\pm$ 0,02a	192,48 $\pm$ 1,34a
	PLANTFORM™	12,60 $\pm$ 1,80a	1,23 $\pm$ 0,02c	125,13 $\pm$ 0,44b
	SDF	11,10 $\pm$ 0,55a	0,75 $\pm$ 0,01d	96,19 $\pm$ 3,46c
	p-valor	0,057	0,001	0,001

Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal PLANTFORM™, sistema de doble frasco (SDF). Número de raíces (NR), contenido de fenoles solubles (CFS) y Actividad antioxidante (AA) en raíces de vitroplantas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las muestras consistieron en raíces formadas en 4 brotes de tipo I para cada sistema. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba de Tukey).

### Efectos de los sistemas PSITL en multiplicación

Para comparar los prototipos locales de inmersión temporal (PSITL) con el medio semisólido (MSS) y los biorreactores comerciales RITA® durante la fase de multiplicación se utilizaron como explantes brotes de tipo I. Tras 21 días de cultivo se obtuvieron diferencias significativas en la mayor parte de los parámetros evaluados (Tabla 24). La longitud de los pseudotallos fue estadísticamente superior en PSITL ( $p > 0,001$ ) y el menor valor correspondió a MSS. En cambio, el mayor número de raíces se obtuvo en RITA®, mientras que en PSITL no se generaron raíces durante la etapa de multiplicación. El mayor peso fresco se obtuvo con MSS seguido de PSITL ( $p=0,007$ ), mientras que el mayor peso de cenizas se obtuvo con PSITL seguido de MSS ( $p < 0,001$ ). En cambio, en otros parámetros como diámetro de pseudotallo, longitud de hoja, ancho de hoja y peso fresco no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo.

Los sistemas PSITL propuestos a nivel local fueron una alternativa para la generación de vitroplantas de calidad, en las que se observa mayor vigor (figura 8 A-D), una adecuada formación de pseudotallos, y la ausencia de raíces como aspecto característico de esta fase de cultivo (multiplicación).

**Tabla 24.** Efecto del sistema de cultivo (convencional, RITA® y prototipo local de inmersión temporal) en el crecimiento de genotipos de banano Williams durante la fase de multiplicación

SISTEMAS	LP (cm)	AP (cm)	NH (unidades)	LH (cm)	AH (cm)	NR (unidades)	PF (gramos)	PS (gramos)	PC (gramos)
MSS	1,7±2,29b	0,6±0,33a	3,27±0,14a	1,9±2,68a	1,3±1,45a	1,09±0,31ab	1,6±0,1028a	0,07±0,005a	0,008±0,0010b
RITA®	2,1±0,80b	0,7±0,17a	4,00±0,23a	2,6±2,63a	1,6±1,46a	4,81±0,94a	1,0±0,0917b	0,06±0,006a	0,003±0,0005b
PSITL	2,9±1,43a	0,7±0,52a	3,82±0,26a	2,9±2,59a	1,5±1,30a	0,00±0,00b	1,2±0,0264ab	0,08±0,004a	0,069±0,0036a
p-valor	0,000	0,309	0,072	0,055	0,367	0,001	0,007	0,052	0,000

*Sistema con medio de cultivo semisólido (MSS), sistema de inmersión temporal RITA®, sistema de inmersión temporal de prototipo local (PSITL). Longitud de pseudotallo (LP), ancho de pseudotallo (AP), número de hojas (NH), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), peso fresco (PF), peso seco (PS), peso de cenizas (PC). Los valores representan la media ± error estándar a partir de tres repeticiones valorando cuatro brotes de tipo I en cada una para*

cada variable. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).

Además de las diferencias expuestas en la tabla anterior, el sistema de cultivo influyó significativamente en el tipo de brotes formados y en el coeficiente de multiplicación obtenido (Tabla 25). Los biorreactores RITA® produjeron más brotes de tipo I, y tipo III, mientras que los PSITL produjeron más brotes tipo II que el resto de los sistemas. El mayor coeficiente de multiplicación se obtuvo con RITA® y PSITL, mientras que en MSS fue significativamente menor. Por tanto, los mejores resultados durante la fase de multiplicación se obtuvieron con los dos sistemas de inmersión temporal.

**Tabla 25.** Efecto del sistema de cultivo (convencional, RITA® y prototipo local de inmersión temporal) en el tipo de brotes obtenidos en fase de multiplicación de genotipos de banano Williams

SISTEMAS	BROTOS (unidades)			CM (unidades)
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	
<b>MSS</b>	1,81±0,30ab	0,45±0,25b	0,63±0,24b	2,90±0,62b
<b>RITA®</b>	2,36±0,39a	2,27±0,56a	7,36±2,13a	12,00±2,31a
<b>PSITL</b>	1,09±0,28b	2,90±0,48a	4,81±0,74a	8,81±0,69a
p-valor	0,044	0,002	0,000	0,000

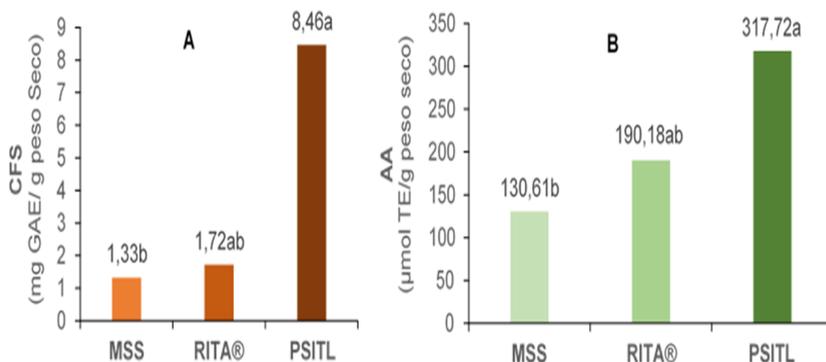
Sistema con medio de cultivo semisólido (**MSS**), sistema de inmersión temporal RITA® (**RITA®**), sistema de inmersión temporal de prototipo local (**PSITL**). Brotes de diámetro  $> 3$  mm (**BROTOS Tipo I**), brotes de diámetro  $< 3$  mm (**BROTOS Tipo II**), brotes con pseudotallos sin hojas (**BROTOS Tipo III**), coeficiente de multiplicación (**CM**). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar considerando tres repeticiones por cada tipo de brote. Letras diferentes en cada variable, indican diferencias significativas entre sistemas para un  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).

El mayor vigor y calidad de planta obtenida en los sistemas de inmersión temporal (RITA® y prototipos locales) frente a sistemas convencionales (MSS) puede observarse en la figura 24 A-G.



**Figura 24.** Aspecto de los brotes obtenidos a las 3 semanas de su multiplicación en distintos sistemas de cultivo (medio semisólido e inmersión temporal comercial o local). Los brotes cultivados en medio líquido se sometieron a 8 inmersiones diarias de 4 minutos de duración. A) Sistema en medio de cultivo semisólido (MSS), B) Sistema de inmersión temporal RITA®, C) Sistema de inmersión temporal de prototipo local (PSITL), D) Calidad de vitroplantas obtenidas en Sistemas PSITL, E) Vitroplantas obtenidas en sistemas MS, F) Vitroplantas obtenidas en Sistema RITA®, G) Vitroplantas obtenidas en Sistema PSITL.

El siguiente paso del estudio consistió en evaluar el contenido de compuestos fenólicos solubles (CFS) y la actividad antioxidante (AA) en los diferentes sistemas, para lo cual se utilizaron extractos de vitroplantas obtenidos tras 21 días de cultivo (Figura 24 E-G). En ambos casos (CFS y AA) se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Figura 25). Los mayores valores de CFS fueron obtenidos en PSITL, mientras que entre RITA® y MSS no se observaron diferencias significativas (Figura 25 A). En la AA se observó una situación similar (Figura 25 B), aunque en este caso las diferencias entre PSITL y RITA® fueron menores.



**Figura 25.** Efecto del sistema de cultivo *in vitro* en la producción de fenoles y actividad antioxidante de vitroplantas de banano multiplicadas en sistemas convencionales y sistemas de inmersión temporal. **A)** Contenido de fenoles solubles (CFS), **B)** Actividad antioxidante (AA). Sistemas de cultivo en semisólido (MSS), sistemas de inmersión temporal RITA®, sistemas de inmersión temporal en prototipo local (PSITL). Los valores representan la media, con  $\pm$  error estándar total para CFS: 0,79 y AA: 20,18. Las muestras fueron tomadas de 3 réplicas y 3 brotes tipo I para generar nueve caracterizaciones de cada variable por cada sistema, a 21 días de ser multiplicadas. Medias con letras diferentes por variable, indican diferencias significativas entre sistemas de cultivo para  $p$ -valor  $\leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).

### **Eficiencia de Sistema RITA® durante el enraizamiento y respuesta durante la aclimatación de genotipos de banano Williams**

En los resultados mostrados hasta ahora se observó que los biorreactores RITA® produjeron vitroplantas de mayor calidad que el resto de los sistemas, por lo que se decidió optimizar las condiciones para el enraizamiento en estos sistemas. El medio de enraizamiento consistió en MS con  $1,30 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA. Los tratamientos consistieron en medio semisólido y diferentes ciclos de inmersión (3, 6 y 8 ciclos) en los biorreactores, y se evaluaron según la capacidad de enraizamiento de las vitroplantas, así como sobre la calidad de las plantas enraizadas (Tabla 26). Excepto en la variable número de hojas ( $p$ =

0,074) se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los casos (Tabla 26), así como un comportamiento morfológico distinto (figura 26 D-F). Los sistemas de inmersión temporal generaron hojas más grandes y raíces más largas que en medio semisólido, pero pseudotallos más estrechos que el MSS. En general el tratamiento de 3 inmersiones por día fue el menos favorable dentro de los RITA®, como puede observarse en el caso de la longitud del brote, el número de raíces y el peso fresco.

Las vitroplantas de banano respondieron de forma positiva al enraizamiento tanto en el sistema de medio semisólido como en los biorreactores RITA®. Se ha observado que el medio líquido y la renovación gaseosa son un factor favorable para el desarrollo de los brotes, especialmente en lo referente a órganos foliares (longitud y ancho de hojas), radicales (longitud de raíz mayor). También se ha observado que aumentar el número de inmersiones puede igualar o mejorar la calidad de las vitroplantas, consiguiendo que el sistema de inmersión temporal sea más eficiente que el medio semisólido.

**Tabla 26.** Efecto del sistema de cultivo y del número de inmersiones en biorreactores RITA® en el enraizamiento de genotipos de banano *Williams*

Sistemas	IN (ciclos)	LP (cm)	AP (cm)	NH (unidades)	LH (cm)	AH (cm)	NR (unidades)	LRM (cm)	PF (gramos)	PS (gramos)
MSS	0	3,8±0,30a	0,9±0,05a	7,20±0,48a	2,1±0,21b	1,3±0,10b	18,20±2,47 a	2,3±0,14c	2,82±0,001 a	0,18±0,005 a
	3	2,4±0,19b	0,4±0,04b	6,00±0,44a	3,0±0,28a	1,7±0,13a	9,00±1,14 b	6,3±0,19b	1,76±0,007 d	0,18±0,005 a
RITA®	6	3,3±0,30a	0,5±0,05b	5,80±0,37a	3,3±0,32a	1,9±0,17a	19,20±2,08 a	6,7±0,79b	2,37±0,001 c	0,15±0,004 b
	8	3,1±0,23ab	0,6±0,07b	5,60±0,40a	3,7±0,19a	1,8±0,09a	15,00±1,30 a	13,0±1,5a	2,75±0,039 b	0,18±0,089 a
p-valor		0,010	0,001	0,074	0,004	0,012	0,005	0,001	0,001	0,001

*Sistemas de medios de cultivo semisólido (MSS), sistemas de inmersión temporal (RITA®). Inmersiones (IN), longitud de pseudotallo (LP), ancho de pseudotallo (AP), número de hoja (NH), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíz mayor (LRM), peso fresco (PF), peso seco (PS). Los valores representan la media ± error estándar a partir de 3 repeticiones con 4 brotes tipo I cada una para cada variable. Letras diferentes en cada variable, indican diferencia significativa entre sistemas/ciclos de inmersión para  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba de Duncan).*

Las vitroplantas originadas en diferentes sistemas y ciclos de inmersión (figura 26A-B), fueron llevadas al invernadero para aclimatación. Durante los primeros 14 días se ubicaron en microtúnel (figura 26H), tras lo cual pasaron a bandejas durante 7 días (figura 26I) y a fundas de polipropileno durante otras 3 semanas. Las vitroplantas se evaluaron a los 21 días, al terminar la etapa de bandejas (figura 26J), así como a los 42 días, tras otras 3 semanas en fundas de polipropileno (figura 26K).

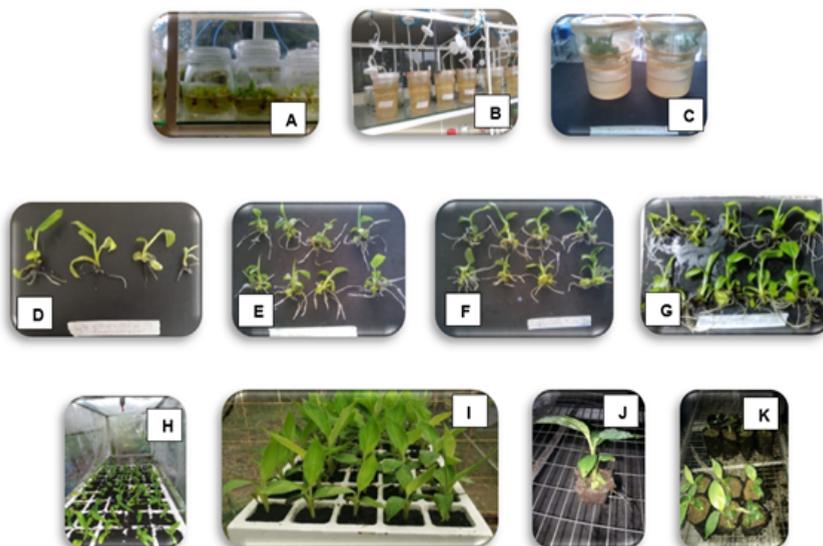
Los resultados, que se presentan en la Tabla 27, muestran que el sistema de cultivo y los ciclos de inmersión no tuvieron un efecto significativo en el número de hojas a los 21 ni 42 días de aclimatación ( $p = 0,144$  y  $0,076$ , respectivamente) pero sí en las demás variables ( $p < 0,05$ ). En las primeras semanas en condiciones *ex vitro* se obtuvo el 100% de supervivencia, siendo el área foliar un factor esencial en estos resultados, con valores mayores en el tratamiento con medio líquido con 6 ciclos de inmersión. En salida de vivero (42 días) los sistemas con medios líquidos a 8 ciclos de inmersión mostraron una mayor calidad de vitroplantas en lo que se refiere a longitud y ancho del pseudotallo, así como valores similares al sistema convencional en el desarrollo foliar (Tabla 27, Figura 26 G).

**Tabla 27.** Respuesta *ex vitro* de genotipos de banano *Williams* generadas en medio semisólido o mediante sistemas de inmersión temporal RITA® con 3, 6 y 8 inmersiones diarias.

Aclimatación (días)	Sistemas	IN (ciclos)	LP (cm)	AP (cm)	NH (unidades)	LH (cm)	AH (cm)
21	MSS	0	3,2±2,69b	0,66±0,02ab	3,70±0,21a	6,5±0,46a	2,7±0,18b
		3	5,7±0,18a	0,60±0,02b	3,50±0,17a	1,6±0,03b	2,7±0,03b
	RITA®	6	3,1±0,25b	0,72±0,02a	3,70±0,15a	6,9±0,27a	3,2±0,03a
		8	3,6±0,19b	0,63±0,01ab	4,00±0,01a	5,2±0,67a	2,8±0,13b
	p-valor		0,000	0,011	0,144	0,000	0,001
42	MSS	0	4,8±0,37bc	0,70±0,05b	4,60±0,27a	12,2±0,93ab	5,6±0,59a
		3	5,3±0,01ab	0,70±0,01b	4,40±0,16a	8,2±0,12b	2,8±0,08b
	RITA®	6	3,5±0,30c	0,74±0,02b	4,60±0,16a	9,4±0,27b	3,8±0,05a b
		8	5,9±0,02a	0,82±0,01a	5,00±0,12a	13,3±0,63a	5,7±0,03a
	p-valor		0,001	0,007	0,076	0,001	0,001

Sistemas de medios de cultivo semisólido (*MSS*), sistemas de inmersión temporal (*RITA*®). Inmersiones por día (*IN*), longitud de pseudotallo (*LP*), ancho de pseudotallo (*AP*), número de hoja (*NH*), longitud de hoja (*LH*), ancho de hoja (*AH*). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar a partir de 3 repeticiones con 4 brotes tipo I cada una para cada variable. Letras diferentes en cada variable, indican diferencia significativa entre sistemas/ciclos de inmersión para  $p \leq 0,05$  (prueba de Duncan) y en número hojas (*NH*) mediante prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes.

Las vitroplantas generadas en sistemas de inmersión temporal mostraron una mayor longitud del sistema radicular *in vitro* (figura 26E-G) y *ex vitro*, siempre con mayor vigor de vitroplantas cuando se utilizó el máximo ciclo de inmersión (figura 26 G-K).



**Figura 26.** Efecto del sistema de cultivo y del ciclo de inmersiones en biorreactores *RITA*® en el enraizamiento y respuesta *ex vitro* de genotipos de banana Williams. El enraizamiento tuvo lugar durante 3 semanas en *MSS* o biorreactores con 4 minutos de inmersión 3, 6 o 8 veces al día. **A)** Sistemas de medios de cultivo semisólido (*MSS*), **B)** Sistemas de inmersión temporal *RITA*®, **C)** Sistemas de inmersión temporal *RITA*® con vitroplantas enraizadas, **D)** Vitroplantas obtenidas en *MSS*, **E-G)** Vitroplantas obtenidas en

RITA® con 3 (E), 6 (F) y 8 (G) ciclos de inmersiones, H) Microtúnel de endurecimiento, I) Vitroplantas de 3 semanas en bandeja, J) Calidad de vitroplantas de 3 semanas para trasplante a funda, K) Vitroplantas (42 días de aclimatación) en funda de polipropileno.

### **Fortificación de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas RITA® con extractos de *Moringa oleifera***

Con el objetivo de incrementar la eficiencia del cultivo de vitroplantas de banano en biorreactores se añadieron extractos acuosos (MSEA) y etanólicos (MSEE) de *Moringa* a los medios de cultivo de enraizamiento (MS con 1,30 mg L<sup>-1</sup> de AIA). Para evaluar el efecto del disolvente se utilizaron controles a los que se añadieron los mismos volúmenes de agua (MS) y etanol (MSE) pero no extractos vegetales. Estos medios se utilizaron en biorreactores RITA® con 8 inmersiones diarias de 4 minutos, y los resultados se evaluaron a las 3 semanas de ser inoculados con brotes de tipo I (Tabla 28).

Los tratamientos de fortificación generaron vitroplantas enraizadas similares en cuanto a longitud del pseudotallo, número de raíces, número y longitud de hojas, aunque se observaron diferencias significativas ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) en las demás variables. El ancho de pseudotallo aumentó con el extracto acuoso y el control con etanol (Tabla 28), pero fue similar al extracto etanólico (MSEE). El ancho de hojas y la longitud de las raíces aumentaron significativamente ( $p=0,001$  para ambas variables) en los sistemas expuestos a extractos acuosos. Los resultados obtenidos con los tratamientos MSE y MSEE indican que el etanol puede ser un factor que condiciona la calidad de las raíces (Tabla 28).

Por tanto, los sistemas con extractos acuosos de *M. oleifera* fueron eficientes en la fortificación del crecimiento de órganos, así como en la calidad de las vitroplantas. La incorporación de etanol en medios de cultivo limitó el crecimiento de la longitud de raíces y la actividad de extractos e influyó negativamente en el aspecto de las vitroplantas, como se puede observar en la Figura 27. Cuando se usó el medio MS control el área foliar fue de color verde tenue uniforme (figura 27A), con medios MSE el área y limbos foliares mostraron tonalidades amarillas y endurecidas (figura 27B), con MSEE las primeras hojas y limbos estaban ennegrecidas y el área foliar tenía color

verde oscuro (figura 27C), mientras que con medios MSEA el área foliar tenía color verde brillante y uniforme (figura 27D). El crecimiento de raíces fue menor en sistemas con presencia de etanol en medio de cultivo (figura 27 F-G), mientras que con extracto acuoso de *M. oleifera* las raíces fueron más largas.

**Tabla 28.** Efecto fortificante de extractos de hojas de *M. oleifera* en el crecimiento de vitroplantas de banano enraizadas en biorreactores RITA®

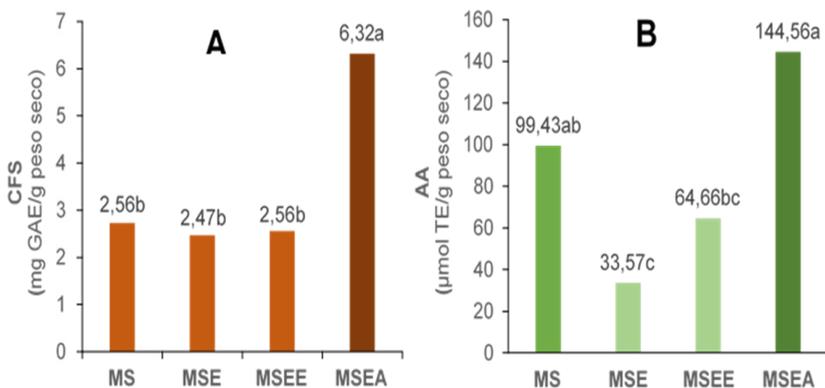
<b>Medios</b>	<b>LP</b> (cm)	<b>AP</b> (cm)	<b>NH</b> (unidades)	<b>LH</b> (cm)	<b>AH</b> (cm)	<b>NR</b> (unidades)	<b>LRM</b> (cm)
<b>MS</b>	0,7±0,10a	0,5±0,03b	4,00±0,32a	4,1±0,48a	1,7±0,21b	6,20±0,37a	3,6±0,47b
<b>MSE</b>	0,9±0,08a	0,8±0,06a	3,60±0,24a	3,6±0,26a	1,4±0,12b	4,20±1,32a	0,7±0,15c
<b>MSEE</b>	1,1±0,14a	0,5±0,07b	4,00±0,32a	4,7±0,39a	1,6±0,15b	4,80±1,16a	1,5±0,20c
<b>MSEA</b>	1,2±0,18a	0,8±0,02a	3,80±0,20a	4,9±0,32a	3,3±0,23a	6,80±0,49a	6,1±0,44a
p-valor	0,150	0,001	0,695	0,071	0,001	0,211	0,001

*Sistemas RITA® con medios MS (MS), MS y etanol 80% (MSE), MS y extracto etanólico de hojas de M. oleifera (MSEE), MS y extracto acuoso de hojas de M. oleifera (MSEA). Longitud del pseudotallo (LP), ancho del pseudotallo (AP), número de hojas (NH), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíz mayor (LRM). Los valores representan la media ± error estándar a partir de 3 repeticiones con 4 brotes de tipo I para cada variable por sistema. Medias con letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas entre sistemas/medios para p-valor≤0,05 (prueba de Duncan).*



**Figura 27.** Efecto de los extractos de hojas de *M. oleifera* en el aspecto de genotipos de banana enraizados en sistemas de inmersión temporal RITA®. Sistemas en enraizamiento (3 semanas), frecuencias de exposición de vitroplantas a medios de cultivo con inmersiones de 8 ciclos y 4 minutos de exposición. **A)** RITA® y medios **MS**, **B)** RITA® y medios MS más etanol 80% (MSE), **C)** RITA® y medio MS más extracto etanólico de *M. oleifera* (MSEE), **D)** RITA® y medio MS más extracto acuoso de *M. oleifera* (MSEA), **E-H)** Aspecto de las vitroplantas cultivadas en MS (**E**), MSE (**F**), MSEE (**G**) y MSEA (**H**)

Los tratamientos de fortificación con extractos de Moringa también tuvieron un efecto significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles de compuestos fenólicos solubles y en la actividad antioxidante (Figura 28). El contenido en compuestos fenólicos mostrado por las vitroplantas fue muy superior en los medios enriquecidos con extracto acuoso de *M. oleifera* (figura 28A). La actividad antioxidante también fue superior en ese tratamiento, aunque sin diferencias estadísticas entre vitroplantas tratadas con MSEA y MS ni entre plantas tratadas con MSE y MSEE (figura 27D, figura 28 B), lo cual evidencia el efecto limitante en la calidad de las vitroplantas de la adición de etanol a los medios de cultivo (figura 27F). (figura 28B).



**Figura 28.** Efecto de los extractos de hojas de *M. oleifera* en el contenido de fenoles solubles y actividad antioxidantes de vitroplantas de banano enraizadas en sistemas de inmersión temporal RITA®. **A)** Contenido de fenoles solubles (CFS), **B)** Actividad antioxidante (AA). RITA® y medios MS, RITA® y medios MS más etanol 80% (MSE), RITA® y medio MS más extracto etanólico de *M. oleifera* (MSEE), RITA® y medio MS más extracto acuoso de *M. oleifera* (MSEA). Los valores representan la media, con  $\pm$  error estándar total para CFS: 0,28 y AA: 7,03. Las muestras fueron tomadas de 3 réplicas de sistemas y 3 brotes tipo I para generar 9 caracterizaciones de cada variable por sistema, a 21 días de enraizamiento en sistemas programados a inmersiones de 8 ciclos y 4 minutos de exposición al medio de cultivo. Medias con letras diferentes por variable, indican diferencias significativas entre sistemas de cultivo para  $p\text{-valor} \leq 0,05$  (prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes).

## 5.4. DISCUSIÓN

### **Asepsia y estados iniciales *in vitro* en banano Williams**

Según reportes de Ortega et al. (2011) el establecimiento de genotipos de banano Williams en zonas tropicales donde las condiciones de temperatura y alta pluviosidad brindan un ambiente ideal para la proliferación microbiana. Sin embargo, a nivel local la existencia de plantaciones carentes de planes de renovación, exigen el aislamiento del material vegetal para la micropropagación *in vitro*. En el presente estudio se obtienen diferencias significativas entre ápices originados en canteros al aire libre e invernaderos, en este último se obtuvieron los mejores resultados, lo cual revela que, mediante el aislamiento del material vegetal, se minimizan las pérdidas de ápices por bacterias, fenalizaciones y ápices inactivos; además, se obtiene una mayor actividad de ápices *in vitro* (tabla 5).

El protocolo propuesto en la investigación incorpora un dispositivo comercial de agitación mecánica durante el primer paso de esterilización de explantes fuera de la cabina de flujo laminar; que favorece la interacción del explante con el cloro comercial utilizado. La contaminación de los medios de cultivo es un problema considerable, causado por microorganismos presentes en las células vegetales y pudiera eliminarse mediante la desinfección externa propiciando tejidos sanos, jóvenes, vigorosos.

El aislamiento de hijuelos en áreas de aclimatación permitió reducir la contaminación bacteriana cuando utilizamos ápices meristemáticos procedentes de invernadero (9,0%), habiéndose reportado en esta especie un 69% de contaminación de bacterias cuando se utilizan ápices extraídos de campo y son expuestos a hipoclorito de sodio con una concentración del 3% durante 15 minutos de exposición (Arbeláez et al., 2016). Los cambios en concentración y tiempos de exposición en estas condiciones se reportan en ápices que presentan un 25,5% de contaminación con bacterias cuando se utiliza hipoclorito de sodio al 5% con un tiempo de inmersión de 5 minutos (Franco et al., 2020) así como, un 39,09% de ápices contaminados en esta fase, con esta concentración de hipoclorito de sodio y tiempo (Lezcano et al.,

2016). En nuestros resultados las contaminaciones de bacterias y hongos se reducen al utilizar explantes originados en invernadero, y son más eficientes que los reportados por Pereira et al. (2015), donde la asepsia de ápices de banana cultivar Thap maeo (subgrupo AAB) extraídos desde condiciones de campo requirió que los explantes fueran sumergidos en una solución al 2% de cloro activo durante 20 minutos de exposición. Los mejores resultados de estos autores consistieron en la contaminación del 18% de bacterias y 12 % de hongos, mientras que en nuestro caso la contaminación bacteriana se redujo a la mitad (9%).

El tamaño de retoños y humedad del ambiente pueden incidir en la efectividad del control de contaminantes; la utilización de pequeños hijuelos y menor humedad permite obtener material vegetal con menos contaminación bacteriana, como se ha reportado en establecimientos realizados en estación seca con mayor efectividad que en estación lluviosa (Waman et al., 2015). La utilización de material vegetal aislado y en especial ápices de invernadero, muestran resultados similares a los menores porcentajes de contaminación y oxidación en ápices originados en condiciones in vivo reportados en esta especie, concretamente el trabajo de Medina et al. (2015), donde los brotes se trataron con hipoclorito de sodio al 3% en un tiempo de exposición de 20 minutos. El manejo del explante y su desinfección han sido fundamentales para el aislamiento, y la concentración del desinfectante puede ser determinante para su éxito (Lezcano et al., 2016).

Los resultados obtenidos en ápices activos a partir de canteros a cielo abierto son inferiores a los reportados por Rios et al. (2013) en plátano 'Cambur manzano' (Musa sp. AAB) con 80,38% de ápices viables cuando fueron protegidos bajo malla sarán de polietileno en condiciones de vivero; así como, al ser extraídos de condiciones de campo que alcanzaron el 76% ápices viables a partir de plantas madre sin síntomas de patógenos (Ancasi-Espejo et al., 2016). El presente estudio logró superar estos valores cuando los ápices provenían de condiciones habilitadas en invernadero; incrementándose en un 16% de ápices activos.

Las fenolizaciones en establecimiento disminuyen en un 4,0% en ápices provenientes de invernaderos, donde el material vegetal fue expuesto a ciclos de 16 horas luz (natural y artificial) y 8 de oscuridad, valores óptimos de humedad relativa y temperatura controlados mediante la aplicación de agua mediante riegos intermitentes; así como, aislamiento a factores externos que favorecen la respuesta in vitro. Estas fenolizaciones manifestadas en ápices oxidados presentan ennegrecimiento producto de enzimas óxido reductoras que se liberan durante el proceso de obtención de los explantes en el corte del tejido (Medina et al., 2015).

Durante la multiplicación de vitroplantas de banano se manifiestan contaminaciones de bacterias después de expuesto el área meristemática a la generación de brotes; condición que limita a los genotipos de banano Williams in vitro. El grado de esta contaminación es también menor cuando el origen de los ápices proviene del invernadero. La presencia de bacterias en esta fase es producto de varios factores, como la asociación del explante con el medio de cultivo, las condiciones de la introducción y el origen del material vegetal, así como cualidades óptimas del material vegetal utilizado como explante (Roca & Mroginski, 1991). En el desarrollo del presente estudio se obtuvieron valores significativos de contaminaciones bacterianas propiciadas por la alta variabilidad de las condiciones climáticas, sin embargo, Cedeño-García & Soplín-Villacorta (2016) manifiestan que estas contaminaciones son propiciadas y dependientes de alta humedad relativa y temperatura, así como relacionadas con el deficiente estado sanitario y susceptibilidad de las plantaciones de la región.

En esta fase el control ambiental desde condiciones de invernadero permite obtener ápices libres de fenolización, sin ápices inactivos en condiciones in vitro, con ápices más totipotentes que facilitan el incremento de ápices activos capaces de generar mayor número brotes.

Los ápices activos seccionados en cuatro, establecidos en sistemas convencionales, permiten generar una respuesta *in vitro* significativa entre los AI y AC, con generaciones de brotes tipo I y III; así como, CM siempre superiores cuando se controlan variables ambientales (tabla 6). La segmentación del explante en cuatro partes durante el primer subcultivo facilita la máxima proliferación de brotes cuando se utilizan ápices de invernadero que presentan desde su origen una actividad totipotente dominante, estos resultados de segmentación del ápice coinciden con los reportados en banano de seda de genoma AAB (Waman et al., 2015).

La generación de brotes confirma, para ambos orígenes de ápices, el control hormonal ejercido cuando se emplean 2 mg/L de BAP, como se reporta en banano FHIA-01 de genoma AAAB (Aguilar et al., 2002); así como, para banano variedad Orito (*Musa acuminata* AA) expuesto a la menor concentración (2 mg/L BAP) y AIA 0,43 mg/L que generaron la mayor cantidad de brotes (1,31) con una longitud promedio de 8,57 cm (Cruz-Rosero et al., 2016). Resultados superiores fueron obtenidos en vitroplantas *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo con 5,7 de coeficiente de multiplicación utilizando el 50% menos de BAP, aunque se requirió del doble de tiempo, o sea, ocho semanas en esta fase (Medina et al., 2015).

En reportes realizados por Ramírez-Villalobos et al. (2008) cuando se utilizaron similares genotipos, con el incremento de 2,5 mg/L de BAP se indujo el mayor número de brotes por explante (2,19 unidades) a los 35 días, aunque siempre inferiores a los reportados en nuestro estudio.

### **Automatización en la producción de genotipos de banano Williams**

La demanda de técnicas eficientes en la propagación *in vitro* es analizada de forma detallada por los protocolos existentes, con éxito en diferentes genotipos de banano, así como en la comprensión crucial de factores asociados en la transferencia de las vitroplantas desde fases de multiplicación hasta el final de la fase de aclimatación. En nuestro estudio los genotipos de banano son expuestos a sistemas de cultivo automatizados en fases *in vitro*

(multiplicación y enraizamiento); y en condiciones *ex vitro* se comprueba su respuesta a la aclimatación.

En la fase de multiplicación de genotipos de banano se ha podido observar la mayor calidad de vitroplantas provenientes de sistemas de inmersión temporal (SIT) con respecto al medio semisólido convencional (MSS). Los SIT manifiestan mayor capacidad al generar mayores valores en longitud de pseudotallos, peso fresco, peso seco, peso de cenizas, número de brotes, coeficiente de multiplicación, fenoles solubles y actividad antioxidante (tablas 7, 8 y 9). Este comportamiento puede generar un mayor crecimiento de vitroplantas de *Musa* sp. cultivadas en inmersión temporal fueron reportados en el cultivar de banano 'Grande Naine' (Alvard et al., 1993) y en plátano (Aragón et al., 2014; Cejas et al., 2011; Escalona et al., 2007; Roels et al., 2005). Este mejor crecimiento se debe al contacto intermitente del medio de cultivo líquido con la superficie del explante que permite un máximo crecimiento de las plántulas tras los ciclos de inmersión; Ontaneda et al., (2020) consideran la frecuencia, el tiempo de inmersión y la densidad del inóculo como los tres parámetros principales y determinantes para el empleo de SIT en la propagación masiva de plantas.

El comportamiento de los sistemas de doble frasco (SDF) en nuestros resultados durante la fase de multiplicación de banano (mayores valores de longitud de pseudotallos (LP), peso fresco (PF), peso seco (PS), peso de cenizas (PC) y actividad antioxidante (AA) en hojas respecto a MSS), fueron similares a los reportados por Daungban et al. (2017) quienes indican que en *Musa* (grupo AAA) 'Kluai Hom Thong' utilizando matraces gemelos de 700 ml con medio líquido suministrado en 2 minutos de inmersión cada 6 ciclos, generaron vitroplantas de mayor calidad al ser comparados con los sistemas MSS, que presentaron menos brotes nuevos por contenedor y un mayor porcentaje de brotes de tamaño pequeño.

Resultados similares a nuestro estudio, en cuanto a la calidad de plantas en fase de multiplicación (mayor PC y AA de PLANTFORM™ en relación con MSS), fueron obtenidos por Abahmane (2020) en palma aceitera (*Phoenix dactylifera* L.) cuando utilizaron SIT de tipo PLANTFORM™ obteniéndose un

mayor peso fresco y número de brotes en comparación con MSS; mientras en este último sistema de cultivo se obtuvo mayor longitud de brotes.

En las condiciones de clonación del material vegetal, los brotes de tipo I presentan valores superiores de compuestos fenólicos solubles (CFS) en pseudotallos en sistemas RITA® (tabla 10) cuando se obtuvo la menor actividad de la peroxidasa en hojas (tabla 12). Estas mejoras en calidad de brotes se confirman con la AA de estos órganos siempre que se utilizan los SIT, esta actividad fue superior en hojas generadas en sistemas RITA® y SDF; así como, en la formación de pseudotallos cuando se utiliza PLANTFORM™ y en tallos con sistemas RITA® (tabla 11). Estos resultados son corroborados por Ayoola et al. (2016). en *Musa sapientum* al valorar los extractos de hojas de vitroplantas en fase de multiplicación, las cuales proporcionan más cantidad de fenoles, flavonoides y mayor actividad de eliminación de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Los resultados obtenidos en compuestos antioxidante en la multiplicación de los genotipos de banano, muestran un comportamiento variado según el órgano analizado y donde se destaca los sistemas RITA®; similares resultados son reportados en plantas de *Rumex nepalensis* Spreng por Bhattacharyya et al. (2017) cuando mencionan que la metodología de regeneración, la parte de la planta y el sistema de solventes influyen en los niveles de varios metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, alcaloides y taninos; que permiten una actividad antioxidante variada y una mayor tasa de multiplicación que garantizan la eficacia del protocolo de micropropagación diseñado.

La generación de brotes es un factor esencial en esta fase *in vitro*, en nuestros resultados los SIT alcanzan similar generación de brotes tipo I y valores significativos siempre que se generaron brotes tipo II, III que permiten mayor coeficiente de multiplicación desde sistemas RITA® (tabla 13), siendo el genotipo de banano uno de los factores claves que influyen en el coeficiente de multiplicación de brotes (Justine et al., 2022).

La calidad de los genotipos de banano al finalizar la fase de enraizamiento confirmó una mayor respuesta en los SIT (PLANTFORM™ y RITA®) en el crecimiento de longitud y ancho de las hojas, para obtener mayores valores de CFS en raíces cuando todos los sistemas se igualaron en número de raíces. Los sistemas RITA® y SDF manifestaron mayores valores del CFS en estas hojas; así como, la mayor AA en tallos, cuando el sistema SDF generó la mayor actividad de PRX en hojas de las vitroplantas.

En el tiempo de salida de aclimatación los genotipos de banano provenientes de sistemas RITA® muestran mayor respuesta en peso (fresco, seco y ceniza), en contenido de fenoles solubles (hojas y pseudotallos), en AA (hojas y tallos); así como, el menor valor de actividad PRX en hojas.

En relación a la producción metabólica de antioxidantes se obtuvo una disminución de la producción de CFS y AA en fases *ex vitro* comparadas a las *in vitro*; similares resultados son reportados por Ayoola et al. (2016) donde el cultivo *in vitro* en fase de multiplicación de nueve accesiones de *Musa* spp. compuesto por banano, plátano y *Musa sapientum* muestran una producción de metabolitos antioxidantes en condiciones *in vitro* mayores que las plantas de campo; siendo los contenidos de fenólicos y flavonoides del tejido vegetal *in vitro* acumulados por el estrés de las condiciones de cultivo, irradiación fotónica, temperatura y humedad relativa.

La respuesta de las vitroplantas de banano cuando se transfieren a condiciones *ex vitro* permiten obtener los mayores CFS en hojas y pseudotallos en las vitroplantas generadas desde RITA®; siendo reportado este comportamiento por Arencibia et al. (2008) durante la adaptación de la caña de azúcar a las condiciones naturales, las vitroplantas micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal presentan los niveles más altos de fenoles, mayor número de raíces funcionales, una alta tasa de crecimiento y una capacidad temprana para ser colonizadas por endófitos naturales.

Los resultados de las fases valoradas en el presente protocolo confirman la obtención de material vegetal fortalecido con la automatización *in vitro* al ratificar su viabilidad frente a sistemas convencionales y mayor eficiencia y

eficacia entre las diferentes alternativas de SIT; así como, la efectividad de los sistemas RITA® en la salida *ex vitro*, al permitir generar genotipos de banano con la mayor calidad desde el protocolo micropropagación propuesto (figura 6).

### **Alternativa de Prototipo PSITL en multiplicación de genotipos de banano Williams**

Los resultados de sistemas alternativos a los comerciales, es decir, los prototipos locales de inmersión temporal (PSITL) desarrollados en el presente estudio, confirman la eficacia en la micropropagación de genotipos de vitroplantas de banano con materiales locales, debido a que los valores obtenidos en las variables estudiadas igualan o superan a los sistemas convencionales o RITA®. La utilidad de estos materiales representa una nueva oportunidad de innovación de los SIT, siendo recomendado por Ramírez et al. (2019) la utilización de materiales locales en procesos de automatización e incorporados en varios de sus elementos de manera intrínseca, permitiendo el incremento de la eficiencia en sus operaciones.

El comportamiento morfológico de las vitroplantas de banano provenientes del PSITL corroboran una calidad similar con los demás tratamientos en relación con el ancho de pseudotallo, número y longitud de hoja, ancho de hoja y peso seco para confirmar su viabilidad; siendo un SIT más eficiente al generar las mayores longitudes de pseudotallo (2,9 cm) y peso de cenizas (0,069 g). El PSITL permitió en esta fase la ausencia de raíces en vitroplantas de banano a los 21 días de multiplicadas, condición que favorece el mejor crecimiento de los demás órganos (Tabla 15). Ante estas respuestas *in vitro* Roels et al. (2005) señalaron en sus resultados la superioridad morfológica de vitroplantas de plátano CEMSA ¾ AAB, obtenidas en esta fase mediante uso de SIT elaborados con frascos de vidrio en comparación con MSS a los 28 días de cultivo, además indicaron la utilidad de obtención de brotes tipo I para dar inicio a ciclos sucesivos de multiplicación en SIT. En nuestro estudio estos procesos de crecimiento requirieron 21 días. La utilización de PSITL con relación al material de sus contenedores este puede incidir en una mejor recepción y paso de luz para ser aprovechada por las vitroplantas, en este

aspecto Dutta & Agarwal (2017) mencionan que tanto la intensidad como la calidad espectral de la luz, ejerce efectos significativos en la diferenciación celular, el crecimiento y metabolismo secundario *in vitro*; además, los atributos espectrales y diferentes tipos de fotorreceptores son factores esenciales que gobiernan la morfogénesis en plantas para lograr el éxito de regeneración de plantas *in vitro* dependientes de un espectro de luz óptimo y la eficiencia de los fotones de las fuentes de luz, generando mayor contenido de fotosintatos en la célula vegetal.

Nuestros resultados morfogénéticos obtenidos a los 21 días permitieron en PSITL ser superiores a los demás sistemas cuando se valora la longitud del pseudotallo (2,9 unidades) y coeficiente de multiplicación (8,81 unidades); sin embargo, lo reportado por Bello-Bello et al. (2019) revela mayor longitud de pseudotallo (3,8 cm), coeficiente de multiplicación más bajo (7,30 unidades) y mejor pigmentación foliar al multiplicar explantes de banano (*Musa* AAA cv. Grand Naine) en SIT SETIS™ que requirieron 28 días y presentaron raíces en brotes; así como, indican que la fabricación de los contenedores con polipropileno y policarbonato favorecen una mayor actividad fotosintética producto a mejores condiciones de disponibilidad de luz, además las renovaciones permanentes de la fase gaseosa en las inmersiones programadas favorecen el cierre estomático, evitan la acumulación de etileno y mantienen niveles óptimos de CO<sub>2</sub>.

La utilización de contenedores de polipropileno (PSITL) en la multiplicación de nuestras vitroplantas de banano, permitieron generar una mayor respuesta al no emitir raíces en esta fase, mayor conversión en cenizas, mayor número de brotes tipo II, III y coeficiente de multiplicación en sistemas automatizados (Tabla 16). Donde el sistema PSITL propuesto en nuestro estudio reporta ser eficiente en la multiplicación, al permitir inocular un mayor número de explantes (9) al tener mayor diámetro en cesta y altura del contenedor en comparación con RITA® (4) y MSS (4), que generan un número similar de brotes tipo I. En esta fase el coeficiente de multiplicación obtenido en nuestro estudio se favorece con el manejo de vitroplantas en RITA® aunque valores similares estadísticamente son obtenidos en PSITL; estos resultados presentan un comportamiento superior a los declarados por Giménez &

Colmenares (2004) en genotipos de vitroplantas de banano Williams al utilizar prototipos de SIT constituido por frascos de vidrio, programados con inmersión de 6 ciclos y 2 minutos de exposición de las vitroplantas al medio de cultivo durante 40 días de cultivo; sin embargo, los valores del coeficiente de multiplicación fue 50% menor a lo obtenido en nuestro estudio (12,0 unidades) al utilizar sistemas RITA® (6,6 unidades), con valores similares estadísticamente al compararlos al prototipo de cristal con 5,8 unidades.

En nuestro estudio el manejo de SIT y en especial los PSITL favorecieron el vigor de las vitroplantas de banano (Figura 7). Similares resultados fueron obtenidos por Arencibia et al. (2008) al declarar la más alta tasa de crecimiento, mayor pigmentación de clorofila y vigor fisiológico, que evidenciaron como indicador de metabolismo fotomixotrófico del tejido vegetal en vitroplantas de *Saccharum officinarum* spp. cv. Badila en SIT catalogados como idóneos. Acompañado a estos efectos el comportamiento de los PSITL limitan la presencia de raíces en vitroplantas de banano en nuestro estudio, condición que pueden estar relacionados con lo señalado por Bidabadi & Jain (2020) al indicar que estos eventos que ocurren durante el proceso de regeneración de las plantas controladas están dadas por el estrés de factores abióticos como temperatura ambiental y concentración salina que limitan el crecimiento radical; así como, a las señales relacionadas con las fitohormonas, que en nuestro caso responden a la relación de citoquininas y auxinas recomendadas.

El presente estudio confirma que el PSITL permite una correcta disposición del medio de cultivo y la fase gaseosa al interior del contenedor (debido al mayor volumen de la fase gaseosa por el explante con respecto a los demás sistemas), que permite promover mayor eficiencia fotomixotrófica en las vitroplantas, evidenciado en los contenidos de peso de cenizas y generación de brotes, en comparación a los sistemas RITA® y MSS.

Las vitroplantas de banano a los 21 días de multiplicación muestran los mayores contenidos fenólicos solubles siempre que se utilizan los PSITL (Figura 8 A). Estos resultados son confirmados por Szopa et al. (2019) en biorreactores alternativos como biorreactor de tipo cónico (BTC) y biorreactor

de rociado de nutrientes (BRN) que permiten identificar en microbrotes de *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, siete ácidos fenólicos: clorogénico, gálico, p-hidroxibenzoico, protocatéquico, siríngico, salicílico y vanílico, y tres flavonoides: kaempferol, quercetina y rutósido donde la mayor cantidad total de ácidos fenólicos fue de 46,68 mg 100 g<sup>-1</sup> peso seco en BTC y con un contenido total más alto de flavonoides (29,02 mg 100 g<sup>-1</sup> peso seco) en los microbrotes en BRN a los 30 días comparados a los sistemas RITA® y PLANTFORM.

Los contenidos de fenoles de nuestras vitroplantas de banano son favorecidos al utilizar los PSITL, la producción *in vitro* de compuestos fenólicos ha sido reportada por Ayoola et al. (2016) en *Musa sapientum* en fase de multiplicación, obteniendo contenidos de CFT de 21,81 mg EAG g<sup>-1</sup> MS en hojas de brotes de 42 días; así como, contenidos de flavonoides totales con mayor protagonismo sobre la actividad antioxidante del tejido vegetal. Según Arencibia et al. (2008) en esta fase los metabolitos fenólicos mediante la vía de los fenilpropanoides podrían actuar como moléculas elicitoras en la formación de otras vías bioquímicas obtenidas en la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en SIT.

La actividad antioxidante obtenida en nuestros brotes tipo I de *Musa* cv. Williams difirieron entre los sistemas (Figura 8 B), permitiendo mayores valores de esta actividad a las vitroplantas obtenidas en PSITL; así como, ser consecuentes a los valores de CFS obtenidos. Un comportamiento similar es obtenido por China et al. (2011) al declarar en condiciones *in vitro* el efecto protector del extracto de flor de *Musa paradisiaca* cultivar Kacha contra el daño del ADN inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permitiendo obtener mayores cantidades de polifenoles (11,94 mg de ácido gálico equivalente/g de peso seco), flavonoides (0,174 g de quercetina equivalente/g de polifenol) y actividad antioxidante de total de 0,051 mg/mL de actividad de eliminación de radicales DPPH.

El resultado obtenido en PSITL, donde las vitroplantas de banano presentan una alta actividad antioxidante, se corresponde a lo sostenido por Arencibia et al. (2008) quienes señalan que al mantener motivadas la producción de antioxidantes desde el momento de realizada la herida en el tejido al inicio de

la siembra *in vitro* se desencadena la acumulación y oxidación de compuestos fenólicos, a la vez que se incrementa la actividad de la enzima fenilalanina amonio-licasa (PAL), esencial en la síntesis de compuestos fenólicos acumulados que son oxidados por polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (PRXs). A nivel celular Faltin et al. (2010) manifiestan que la enzima glutatión peroxidasa (PHGPx) juega un rol fundamental en la diferenciación de brotes *in vitro*, mediante la regulación de los niveles de especies reactivas al oxígeno (ERO), lo que permite la desdiferenciación-diferenciación celular inicial y formación de clústers (presentes en vitroplantas de banano), evidenciada en la relación intrínseca entre señales de estrés y la generación de brotes meristemáticos. Esta condición es reportada por Choudhary et al. (2020) que indican que el radical superóxido y peróxido ( $O_2$  y  $H_2O_2$ ) actúan de forma antagónica en el mantenimiento y diferenciación de los ápices meristemáticos, mientras que la excesiva producción de ERO produce daño genético y muerte celular.

Las vitroplantas de banano originadas desde PSITL muestran un fortalecimiento de contenidos de fenoles, antioxidantes y calidad en su vigor como plantas verdaderas que corresponden a lo reportado por Rath et al. (2019), cuando analizan el protocolo de vitroplantas de *Nyactanthes arbor-tristis* L. a partir de explantes de segmentos nodales al generar una estabilidad genética *in vitro* de las vitroplantas regeneradas y confirmadas por marcador de polimorfismo, seguido de evaluaciones comparativas de los metabolitos bioactivos (ácido ursólico, renyolona, arbortristósido-A y nictantósido); así como, por fitoquímicos ricos en antioxidantes y actividades de eliminación de radicales que permiten confirmar plantas verdaderas a su tipo. En nuestro estudio los sistemas PSITL confirman el efecto generado en el estado fitoquímico de las vitroplantas a partir de los resultados obtenidos en el peso de cenizas y de biomoléculas (contenidos de fenoles y actividad antioxidante) para confirmar la obtención de vitroplantas de banano verdaderas al ser comparadas con los demás sistemas.

## **Eficiencia y fortificación de genotipos de banano Williams enraizadas sistemas RITA®**

Las vitroplantas de banano Williams enraizadas en sistemas semisólido y sistemas RITA® con diferentes ciclos de inmersión confirman la formación y crecimiento de órganos de forma convencional y en medio líquido. Los sistemas de medios líquidos al incrementar las inmersiones (3, 6 y 8 ciclos) permiten una mayor interacción del medio de cultivo con el explante y mayores cambios del medio gaseoso, generándose una mejor calidad de plantas. Los medios de cultivo líquidos son un factor favorable para el crecimiento de hojas (longitud y ancho a 3, 6 y 8 inmersiones) y longitud de la raíz mayor (8 inmersiones); así como, una mayor eficiencia (gasto de agua por peso seco formado) en la conversión de pesos por plantas con 3 y 8 inmersiones, superando las desventajas del medio semisólido (tabla 17).

En las vitroplantas de banano en condiciones de aclimatación y transcurridos 21 días en bandejas se obtuvieron los mayores valores de longitud de pseudotallos (inmersiones de 3 ciclos) y ancho de hojas (inmersiones de 6 ciclos); sin embargo, las inmersiones de 3 ciclos limitaron el crecimiento del ancho de pseudotallos y longitud de hojas. Transcurridos 42 días en fundas las vitroplantas de banano, originadas con inmersiones de 8 ciclos, manifestaron mayores longitudes y anchos tanto de pseudotallos como de hojas (tabla 18).

Las vitroplantas de banano obtenidas en inmersiones de 8 ciclos mostraron mayor vigor a la salida *in vitro*, de bandejas y de fundas, comparados a los demás sistemas o ciclos de inmersión valorados (figura 9). Las vitroplantas en condiciones de aclimatación presentaron 100% de supervivencias.

La utilización de extractos acuosos de *M. oleifera* en el medio de cultivo permite obtener vitroplantas de banano con mayor ancho de pseudotallos y hojas, así como valores superiores en longitud de la raíz mayor. Se apreció que la presencia de etanol al 80% en el medio de cultivo ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento en longitud de las raíces mayores de las vitroplantas (tabla 19).

La respuesta a la bio-estimulación con la utilización de extractos acuosos de hojas de *M. oleifera* en nuestras vitroplantas de banano, son corroborados por Ortiz-Rojas et al. (2017) en la respuesta *in vitro* de semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh sembradas en medio MS con diluciones de 0,1 mL, 1,5 mL y 2,0 mL de extractos etanólicos (80%) de *M. oleifera* y comparadas al control se confirmó la estimulación de la germinación a los 6 días; esta condición favorece la formación de la raíz principal y raíces laterales.

La bio-estimulación en el crecimiento de órganos de vitroplantas de banano en nuestro estudio, con sistemas RITA® expuesto a extractos acuosos de *M. oleifera*, es corroborado por Nihayati et al. (2021) quienes al adicionar extracto de hoja moringa al medio semi sólido a 40 g/L, como regularizador de crecimiento natural o puede ser un alternativa a la hormona zeatina a 1,5 ppm para obtener la misma calidad del pachulí en crecimiento de brotes de explantes. La relación con la respuesta a los extractos de moringa y el control hormonal ha sido reportada en estudios de germinación y supervivencia de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), caupí (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) y maní (*Arachis hypogea* L.) expuestas a extracto acuoso de moringa en proporción de 1:10 (p/v), donde se indica la presencia de una cantidad de zeatina en el extracto de hoja de moringa a concentraciones que pueden ser una alternativa orgánica para el control hormonal en la célula vegetal (Phiri, 2010).

Las vitroplantas a los 21 días de enraizadas presentan mayor vigor (color verde brillante en hojas) y abundancia de pelos absorbentes en raíces cuando se utilizó el extracto acuoso de *M. oleifera*; sin embargo, el extracto etanólico generó un color verde oscuro opaco en hojas que superaron la vigorosidad de vitroplantas con o sin etanol en medio de cultivo (figura 9). Los resultados obtenidos en sistemas RITA®, donde los elicitados con extracto acuoso de *M. oleifera* permiten obtener los valores mayores de fenoles solubles y actividad antioxidantes (figura 11) que evidencian mayor vitalidad foliar en vitroplantas de banano Williams. Resultados semejantes se obtienen al utilizar extracto metanólico de *M. oleifera* en suspensiones celulares en el cultivo de chile, permitiendo a las 72 horas de elicitación un incremento significativo en el contenido de fenoles (Verde, 2017).

En cuanto a la actividad antioxidante obtenida por la influencia de los extractos acuosos de *M. oleifera* en las vitroplantas de banano, las diferencias obtenidas pudieron estar motivadas por el aporte del extracto al contener una amplia especificación de antioxidantes como fenoles, flavonoides,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y enzimas antioxidantes (Abdalla, 2013). Muhammad et al. (2013) revelaron compuestos bioactivos de kaempferol y quercetina en el extracto metanólico crudo de hojas moringa e identificaron el Vicenin-2 en la fracción acuosa bioactiva, que puede acelerar la cicatrización de heridas *in vitro*.

Los resultados obtenidos en vitroplantas de banano elicidadas con extractos acuosos de *M. oleifera* pueden estar motivados por contenidos variables de fenoles y actividades antioxidantes, que fueron confirmados por Mustafa et al. (2021) cuando caracterizaron extractos metanólicos de callos de hoja *M. oleifera* obtenidos a partir del cultivo en suspensión, los cuales revelaron concentraciones variables de nueve componentes principales (seis flavonoides y tres ácidos fenólicos).



## 6. CONCLUSIONES

### Capítulo 1

1. El análisis elemental de órganos de *Moringa oleifera* en estado floral indica que las hojas son fuente de nitrógeno mientras que las semillas pueden ser consideradas una fuente de carbono, hidrógeno y azufre.
2. Se ha observado que el contenido en fenoles solubles y la actividad antioxidante de *Moringa* es superior en las hojas, con independencia del método de extracción utilizado y el estado de desarrollo, obteniéndose con el extracto metanólico resultados superiores frente al extracto acuoso.
3. Se ha estudiado la actividad peroxidasa total y específica, en diferentes órganos de la planta y en diferentes fases del desarrollo, observándose unos valores relativamente superiores en las hojas pertenecientes al estado arbóreo. Con objeto de establecer la localización subcelular de la enzima peroxidasa en hojas de *M. oleifera*, hemos utilizado la técnica de infiltración al vacío y el fraccionamiento subcelular, en diferentes estados de desarrollo. Los resultados obtenidos muestran una diferente localización a lo largo del proceso, obteniendo los mayores valores en estados florales y especialmente en estado arbóreo.

### Capítulo 2

1. Se ha observado que a las tres semanas de la aplicación de extractos acuosos de hojas de plantas de *M. oleifera* en estado vegetativo y floral se obtienen efectos positivos en el desarrollo de vitroplantas de banano. Aunque los valores óptimos de crecimiento de hojas y pseudotallos, contenido de pigmentos fotosintéticos, protección de la membrana celular, contenido de fenoles solubles y actividad antioxidante se alcanzaron con diferentes concentraciones de extractos dependiendo del estado de desarrollo de la planta de origen, es posible obtener resultados positivos con extractos a partir de diluciones del

- 30%, que se corresponden con una concentración de hoja de moringa de 0,06 mg/mL.
2. En variables como número y tamaño de hojas, diámetro y altura de pseudotallos, peso fresco, contenido de fenoles solubles y actividad antioxidante los mejores resultados a las tres semanas de la aplicación se obtuvieron con extractos al 30% procedentes de plantas en estado vegetativo, y con extractos entre 30 y 100% de plantas en estado floral. La mejor protección contra la fuga de electrolitos en membranas celulares de hojas de banano se alcanzó con extractos de hojas de moringa en estado floral a concentración de 30%. Este extracto presentó también los segundos mejores valores en contenido en clorofilas a y b, inmediatamente detrás y muy similares a los producidos por el extracto floral a concentración 100% (0,2 mg de hoja de moringa por mL).
  3. La aplicación de extractos de moringa de estado vegetativo o floral no produjo ningún incremento estadísticamente significativo en la actividad peroxidasa específica en hojas de banano a las tres semanas de su aplicación.

### Capítulo 3

1. Ha sido posible establecer protocolos eficientes para el cultivo *in vitro* de genotipos de banano Williams existente en la provincia de El Oro, tanto en sistemas convencionales con medios gelificados como con medio líquido en biorreactores de inmersión temporal comerciales y construidos en nuestros laboratorios. El material de partida generado en condiciones controladas (invernadero) ha sido decisivo para disminuir la contaminación y la fenolización, aumentando la reactividad en la fase de establecimiento de cultivos asépticos y la capacidad de multiplicación durante la fase de proliferación.
2. El uso de sistemas de inmersión temporal aumenta la eficiencia de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de cultivos de banano en comparación con el cultivo tradicional. El tipo de biorreactor y la frecuencia de inmersiones son factores relevantes para la optimización

de la propagación. Los biorreactores construidos en nuestro laboratorio son prototipos eficientes tanto en el caso de doble frasco (SDF) como de único frasco (PSTIL), con la ventaja adicional de que el uso de materiales locales reduce los costes de producción y la dependencia del transporte intercontinental. Durante la fase de proliferación, el prototipo de único frasco genera brotes más largos, más biomasa, mayor contenido de fenoles solubles y actividad antioxidante que los biorreactores comerciales RITA® y el medio semisólido convencional. Este prototipo, una vez optimizado, supone una alternativa viable para futuras investigaciones en todas las fases del cultivo *in vitro* de este y otros materiales vegetales.

3. La adición de extractos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* al medio de cultivo durante el enraizamiento en sistemas RITA® incrementó el tamaño de hojas y raíces de las vitroplantas de banano, así como su contenido de fenoles solubles y actividad antioxidante, lo que puede interpretarse como indicador de la actividad fortificante de este material.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abahmane, L. (2020). A comparative study between temporary immersion system and semi-solid cultures on shoot multiplication and plantlets production of two Moroccan date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties *in vitro*. In *Notulae Scientia Biologicae*, 12 (2), 277 – 288. <https://doi.org/10.15835/nsb12210610>
2. Abdalla, M. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *Sativa*) plants. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 5 (3), 42 – 49.
3. Abo-El-Kheer, E., Gad, S., & Abido, W. (2019). The Integrate Effect of Seed Soaking in Aqueous Plant Extracts and Ascorbic Acid on Germination and Seedling Characters of Rice Grains under Salinity Stress. *Journal of Plant Production*, 10 (7), 11 – 514.
4. Afzal, I., Hussain, B., Basra, S., & Rehman, H. (2012). Priming with moringa leaf extract reduces imbibitional chilling injury in spring maize. In *Seed Science and Technology*, 40 (2), 271 – 276. <https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.2.13>
5. Afzal, S., Nawaz, M., Qadir, I., Gul, S., Yasin, G., & Ahmad, I. (2020). Variability in leaf mineral composition of *Moringa oleifera* in irrigated plains of Pakistan. *South African Journal of Botany: Official Journal of the South African Association of Botanists = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde: Amptelike Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges*, 129, 442 – 447.
6. Agunbiade, O., Famutimi, O., Kadiri, F., Kolapo, O., & Adewale, I. (2021). Studies on peroxidase from Lam leaves. *Heliyon*, 7(1).
7. Ajila, J., Aguilar, M., Romero, H., & Campoverde, J. (2023). Análisis de la producción y comercialización de banano en la provincia de El Oro en el periodo 2018-2022. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 7494 – 7507.

8. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Fractionation of Cells. *In Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
9. Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), 623 – 627.
10. Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *In Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32 (1), 55 – 60. <https://doi.org/10.1007/bf00040116>
11. Ancasi-Espejo, R., Montero-Tonconi, J., Ferreira-Castedo, N., & Muñoz-Guzmán, I. (2016). Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* Lam). *In Journal of the Selva Andina Research Society*, 7 (2) 104 – 11. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2016.070200104>
12. Aragón, C., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *In Biologia plantarum*, 58 (1), 29 – 38. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
13. Arbeláez, L., Montoya, J., & Saavedra, S. (2016). Evaluación de protocolos para el establecimiento y desinfección *in vitro* de meristemas de plátano *Musa* spp. *Vitae Scholasticae*, 23 (1), S391.
14. Arencibia, A., Bernal, A., Yang, L., Cortegaza, L., & Carmona, E. (2008). New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 175 (4), 487 – 496.
15. Asang, S., Sánchez, G., Sacoto, C., Morán, E., & Barzallo, A. (2022). Eficacia de trampas etológicas para el control de

- Cosmopolites sordidus* en banano (*Musa* spp) en la Hacienda Mechita del Cantón Pueblo Viejo en Ecuador. In *Revista Tecnológica - ESPOL*, 34 (4), 69 – 79. <https://doi.org/10.37815/rte.v34n4.976>
16. Ayoola, I., Gueye, B., Sonibare, M., & Abberton, M. (2016). Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of field and *in vitro* grown *Musa* L. species. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11 (2), 488 – 499.
  17. Bakr, B., Sadak, M., Abd El-Raz, T., & El, M. (2021). Moringa leaves extract and zeatin for maximizing yield and quality traits of two flax cultivars. In *Asian Journal of Plant Sciences*, 20 (4), 620 – 630. <https://doi.org/10.3923/ajps.2021.620.63>
  18. Barceló, A., & Aznar-Asensio, G. (2002). Basic peroxidases in cell walls of plants belonging to the Asteraceae family. *Journal of Plant Physiology*, 159 (4), 339 – 345.
  19. Barceló, A., Muñoz, R., & Sabater, F. (1988). Lupin peroxidases. III: Subcellular location of membrane-bound acidic isoperoxidases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 26 (5), 575 – 583.
  20. Basra, S., Iftikhar, M., & Afzal, I. (2011a). Potential of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract as priming agent for hybrid maize seeds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13 (6), 1006 – 1010.
  21. Basra, S., Iftikhar, M., & Afzal, I. (2011b). Potential of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract as priming agent for hybrid maize seeds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(6), 1006 – 1010.
  22. Bello-Bello, J., Cruz-Cruz, C., & Pérez-Guerra, J. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55 (3), 313 – 320. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09973-7>
  23. Benítez, Z. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 25 (2).

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002006000200010&sc  
ript=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002006000200010&sc<br/>ript=sci_arttext&tlng=en)

24. Bernal Pita da Veiga, M. (1993). Estudio del polimorfismo isoenzimático en el pimiento de Padrón, *Capsicum annum* L. var. *annuum*, a lo largo del desarrollo [Universidad de Coruña]. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/5579>
25. Bhattacharyya, P. Kumaria, S. Bose, B. Paul, P. Tandon, P. (2017). Evaluation of genetic stability and analysis of phytomedicinal potential in micropropagated plants of *Rumex nepalensis* – A medicinally important source of pharmaceutical biomolecules. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 80 – 91.
26. Bhunia, S., Bhowmik, A., Mallick, R., & Mukherjee, J. (2021). Agronomic Efficiency of Animal-Derived Organic Fertilizers and Their Effects on Biology and Fertility of Soil: A Review. *Agronomy*, 11(5), 823.
27. Bidabadi, S., & Jain, S. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of *In Vitro* Plant Regeneration. *Plants*, 9 (6). <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
28. Bozinou, E., Karageorgou, I., Batra, G., Dourtoglou, V., & Lalas, S. (2019). Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of *Moringa oleifera* Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques. *In Beverages*, 5 (1). <https://doi.org/10.3390/beverages5010008>
29. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 – 254.
30. Brito, T., Ferreira, M., & Fai, A. (2022). Utilization of Agricultural By-products: Bioactive Properties and Technological Applications. *Food Reviews International*, 38(6), 1305 – 1329.
31. Busani, M., Masika, J., Arnold, H., & Voster, M. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *In African Journal of Biotechnology*, 10 (60), 12925 – 12933. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1599>

32. Cabrera-Carrión, J., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrión, J., García, P., & de Astudillo, L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*, 29 (1), 53–60.
33. Cabrera, J. L., Jaramillo, C., Dutan, F., Cun, J., Garcia, P., & Rojas, A. (2017). Variation of alkaloid, phenol, flavonoid, and tanin content in *Moringa oleifera* Lam. as a function of plant age and height. *Bioagro*, 29(1), 53 – 60.
34. Camejo, D., Rodríguez, P., Morales, M., Dell'Amico, J., Torrecillas, A., & Alarcón, J. (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. In *Journal of Plant Physiology*, 162 (3), 281 – 289. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.07.014>
35. Carpio, W., Pincay, R., & Piguave, W. (2022). Economía circular como estrategia para el desarrollo sostenible en Ecuador. 6, 635 –645.
36. Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36 (1). [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152019000100091&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152019000100091&script=sci_arttext)
37. Castillo, F., Da Veig, M. de L., González, N., & Herrera, A. (2019). Efectos antioxidantes de *Moringa oleifera* LAM en vitroplantas de banano clon Williams enraizadas en sistemas de inmersión temporal RITA. *Revista Científica Agroecosistemas*, 7(3), 57 – 63.
38. Cedeño, G. (2010). Banano, plátano y otras musáceas. INIAP. <https://www.iniap.gob.ec/banano-platano-y-otras-musaceas/>
39. Cedeño-García, G., & Soplín-Villacorta, H. (2016). Aplicación de biorreguladores para la macropropagación de banano cv. Williams en cámara térmica. *Agronomía*. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212016000200397](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212016000200397)
40. Cedeño, R., & Gallardo, K. (2022). Análisis económico del banano en el Ecuador para determinar el crecimiento productivo en el

- periodo 2017-2022. In *Revista Científica Multidisciplinaria Investigación*, 3 (5), 79–91. <https://doi.org/10.56519/rci.v3i5.60>
41. Cejas, I., Capote, I., Aragón, C., & Escalona, M. (2011). Optimización del protocolo de propagación del plátano cv. CEMSA ¾ en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Agrociencia*. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S2301-15482011000100002&script=sci\\_arttext&lng=en](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S2301-15482011000100002&script=sci_arttext&lng=en)
  42. Chaverri, J., & Rodríguez, N. C. (2018). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *En Educación Química*, 17, (2), 164. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2006.2.66056>
  43. Chen, Y., Feng, J., Qu, Y., Zhang, J., Zhang, L., Liang, D., Yang, Y., & Huang, J. (2022). Genome-wide identification and functional analysis of class III peroxidases in. *PeerJ*, 10, e13635.
  44. China, R., Dutta, S., Sen, S., Chakrabarti, R., Bhowmik, D., Ghosh, S., & Dhar, P. (2011). *In vitro* Antioxidant Activity of Different Cultivars of Banana Flower (*Musa paradiscus* L.) Extracts Available in India. In *Journal of Food Science*, 76 (9), 1292 – 1299. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02395.x>
  45. Choudhary, A., Kumar, A., & Kaur, N. (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 42(1), 33 – 43.
  46. Christian, P., Irene, F., Lukas, & Huber, A. (1999). Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 89 – 102.
  47. Chu, I. (1995). Economic analysis of automated micropropagation. In *Automation and environmental control in plant tissue culture* (19 – 27). [https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_2)
  48. Coello, K., Cando, R., & Intriago, E. (2017). Diseño de la valoración proteica de hojas y semillas de *Moringa oleifera*, durante su desarrollo vegetativo y almacenamiento [Espol]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/41538>
  49. Cruz-Rosero, N., Canchignia-Martínez, H., Morante-Carriel, J., Nieto-Rodríguez, E., Cruz-Rosero, E., & Cabrera-Casanova, D.

- (2017). *In vitro* propagation of the Orito banana cultivar (*Musa acuminata* AA). *Biotechnología Aplicada: Revista de La Sociedad Ibero-latinoamericana Para Investigaciones Sobre Interferon Y Biotechnología En Salud*, 33(4), 4201 – 4204.
50. Daungban, S., Pumisitapon, P., Topoonyanont, N., & Poonnoy, P. (2017). Effects of Explants Division by Cutting, Concentrations of TDZ and Number of Sub-culture Cycles on Propagation of “*Kluai Hom Thong*” Banana in a Temporary Immersion Bioreactor System. *Thai Journal of Science and Technology*, 6(1), 89 – 99.
51. Dhongade, H., Paikra, B., & Gidwani, B. (2017). Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. *In Journal of Pharmacopuncture*, 20 (3), 194–200. <https://doi.org/10.3831/kpi.2017.20.022>
52. D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J.-M., Baurens, F., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengellé, J., Rodier-Goud, M., & Wincker, P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488 (7410), 213 – 217.
53. Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., & Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *In Plant Science*, 161 (1), 179 – 188. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(01\)00410-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(01)00410-1)
54. Dutta, G., & Agarwal, A. (2017). Artificial Lighting System for Plant Growth and Development: Chronological Advancement, Working Principles, and Comparative Assessment. *Light Emitting Diodes for Agriculture*, 1 – 25.
55. Elemike, E., Uzoh, I., Onwudiwe, D., & Babalola, O. (2019). The Role of Nanotechnology in the Fortification of Plant Nutrients and Improvement of Crop Production. *In Applied Sciences*, 9 (3), 499. <https://doi.org/10.3390/app9030499>
56. El Sheikh, A., Allam, A., Taha, M., & Varzakas, T. (2022). How Does the Addition of Biostimulants Affect the Growth, Yield, and

- Quality Parameters of the Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)? How Is This Reflected in Its Nutritional Value? NATO Advanced Science Institutes Series E: Applied Sciences, 12(2), 776.
57. Escalona, M., Aragón, C., Capote, I., Pina, D., Cejas, I., Rodríguez, R., Cañal, M., Sandoval, J., Roels, S., Debergh, P., Desjardins, Y., & González-Olmedo, J. (2007). Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (tib) on micropropagated plantlets. In *Acta Horticulturae*, (748), 95 – 101. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2007.748.9>
  58. Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., & Borroto, C. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743 – 748.
  59. Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215 – 231.
  60. Falcomer, A., Riquette, R., de Lima, B., Ginani, V., & Zandonadi, R. (2019). Health Benefits of Green Banana Consumption: A Systematic Review. *Nutrients*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/nu11061222>
  61. Faltin, Z., Holland, D., Velcheva, M., Tzapovetsky, M., Roeckel-Drevet, P., Handa, A., Abu-Abied, M., Friedman-Einat, M., Eshdat, Y., & Perl, A. (2010). Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for *in vitro* plant differentiation. *Plant & Cell Physiology*, 51(7), 1151 – 1162.
  62. FAOSTAT. (2023). Retrieved March 6, 2023, from <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
  63. FAOSTAT. (2021). Cultivos Y Productos de Ganadería. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
  64. Farooq, B., Koul, B., Mahant, D., & Yadav, D. (2021). Phytochemical Analyses, Antioxidant and Anticancer Activities of Ethanolic Leaf Extracts of *Moringa oleifera* Lam. Varieties. In *Plants*, 10, (11), 2348. <https://doi.org/10.3390/plants10112348>

65. Ferrer, M., Calderón, A., Muñoz, R., & Ros Barceló, A. (1990). 4-Methoxy- $\alpha$ -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. In *Phytochemical Analysis*, 1 (2), 63–69. <https://doi.org/10.1002/pca.2800010203>
66. Fitriana, W., Ersam, T., Shimizu, K., & Fatmawati, S. (2018). Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(3), 297.
67. Förster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Arndt, N., Schmidt, R., & Mewis, I. (2015). Ecotype Variability in Growth and Secondary Metabolite Profile in *Moringa oleifera*: Impact of Sulfur and Water Availability. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (11), 2852 – 2861. <https://doi.org/10.1021/jf506174v>
68. Franco, Y., Cataldi, C., Ovejero, N., & Lezcano, M. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano *Musa* spp. *CEDAMAZ*, 10(2), 47 – 50.
69. Galan, V., Rangel, A., Lopez, J., Hernandez, J., Perez, B., Sandoval, J., & Rocha, H. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Revista Brasileira de fruticultura*, 40(4). <https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>
70. Ganapathi, T., Negi, S., Tak, H., & Bapat, V. (2021). Transgenic Banana: Current Status, Opportunities and Challenges. In *Genetically Modified Crops* (111–128). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5932-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5932-7_5)
71. Garces, A., & Leonel, C. (2022). Impacto del alto costo de los fertilizantes en la agricultura ecuatoriana [Babahoyo: UTB, 2022]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/13239>
72. García, R. (2017). Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de “*Moringa oleifera*” de diferente origen geográfico [universidad de A Coruña]. [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19625/Garc%C3%A1DaHern%C3%A1dez\\_Rafael\\_TFG\\_2017.pdf?sequence=2](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19625/Garc%C3%A1DaHern%C3%A1dez_Rafael_TFG_2017.pdf?sequence=2)

73. García, V. (2019). Efecto del Fluopyram (Verango) en el control de *Radopholus similis* en el cultivo de banano. In *Alternativas* 20, (2). <https://doi.org/10.23878/alternativas.v20i2.306>
74. Garza-Alonso, C., González-García, Y., Cadenas-Pliego, G., Olivares-Sáenz, E., Trejo-Téllez, L., & Benavides-Mendoza, A. (2021). Seed priming with ZnO nanoparticles promotes early growth and bioactive compounds of *Moringa oleifera*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(4), 12546 – 12546.
75. Ghag, S., & Ganapathi, T. (2017). Genetically modified bananas: To mitigate food security concerns. In *Scientia Horticulturae* (214), 91 –98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.023>
76. Giménez, C., & Colmenares, M. (2004). Sistemas prototipos para la micropropagación por inmersión temporal. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia*, 21(1), 1–7.
77. Gitonga, N., Ombori, O., Murithi, K., & Ngugi, M. (2011). Low technology tissue culture materials for initiation and multiplication of banana plants. In *African Crop Science Journal* 18, (4). <https://doi.org/10.4314/acsj.v18i4.68653>
78. González-Pérez, B., Rivas-Castillo, A., Valdez-Calderón, A., & Gayosso-Morales, M. A. (2021). Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38 (1), 4.
79. Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. In *Food Science and Human Wellness*, 5 (2), 49 – 56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>
80. Guerrero, E., & Arrieta, J. (2017). Revisión del establecimiento de protocolo de propagación con diferentes hormonas en plantas de la especie *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. *Vía innova*, 6 (1), 70 –79.
81. Guo, Yan, Zhang, Yi, & Huang. (2022). Kiwifruit (*Actinidia chinensis* “Hongyang”) cytosolic ascorbate peroxidases (AcAPX1 and AcAPX2) enhance salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Agriculture*, 21 (4), 1058 – 1070.

82. Häggman, H., Sutela, S., & Welander, M. (2007). Micropropagation of *Betula Pendula* Roth including Genetically modified Material. In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 153 –162 [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_15)
83. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant & Cell Physiology*, 42 (5), 462 – 468.
84. Hussain, F., & Ikram, F. (2020). Antioxidant and Antidiabetic Potential of Saponin Fraction Isolated from *Moringa oleifera* Leaves. In *Biological Sciences - PJSIR*, 63 (2), 86 – 92. <https://doi.org/10.52763/pjsir.biol.sci.63.2.2020.86.92>
85. Iqbal, S., & Bhangar, M. I. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 19 (6), 544 – 551.
86. Irshad, S., Matloob, A., Iqbal, S., Ibrar, D., Hasnain, Z., Khan, S., Rashid, N., Nawaz, M., Ikram, R., Wahid, M., Al-Hashimi, A., Elshikh, S., & Diao, Z. (2022). Foliar application of potassium and moringa leaf extract improves growth, physiology and productivity of kabuli chickpea grown under varying sowing regimes. *PloS One*, 17(2): e0273537. <https://doi.org/10.1371/journal>.
87. Isitua, C., Lozano, M., Jaramillo, C., & Dutan, F. (2015). Phytochemical and nutritional properties of dried leaf powder of *Moringa oleifera* Lam from Machala El Oro province of Ecuador. *Asian J. Plant Sci. Res*, 5 (2), 8 – 16.
88. Jaswanthi, N., Krishna, M., Sahitya, U., & Suneetha, P. (2019). Apoplast proteomic analysis reveals drought stress-responsive protein datasets in *chilli* (L.). *Data in Brief*, 25, 104041.
89. Jovanović, V., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III Peroxidases: Functions, Localization and Redox Regulation of Isoenzymes. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 269 – 300.

90. Justine, A., Kaur, N. & Pati, P. (2022). Biotechnological interventions in banana: current knowledge and future prospects. *Heliyon*, 8 (11), e11636.
91. Kanchani, A., & Harris, K. (2019). Effect of foliar application of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract with recommended fertilizer on growth and yield of okra (*Abelmoschus esculentus*). *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences*, 13 (2), 38 – 54.
92. Karthiga, D. Chozhavendhan, S. Gandhiraj, V. Aniskumar, M. (2022). The effects of *Moringa oleifera* leaf extract as an organic bio-stimulant for the growth of various plants: Review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102446.
93. Khan, I., Shahzad, B., Sajid, A., Munawar Hussain, A., Muhammad, A., & Raheel, H. (2020). Post-Bloom Applied Moringa Leaf Extract Improves Growth, Productivity and Quality of Early-Season Maturing Grapes (*Vitis vinifera*). *International Journal Of Agriculture & Biology*, 24, 1217 – 1225.
94. Khan, S., Basra, S., Nawaz, M., Hussain, I., & Foidl, N. (2020). Combined application of moringa leaf extract and chemical growth-promoters enhances the plant growth and productivity of wheat crop (*Triticum aestivum* L.). *South African Journal of Botany: Official Journal of the South African Association of Botanists = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde: Amptelike Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges*, 129, 74 – 81.
95. Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M., Pervin, F., Absar, N., & Rosma, A. (2012). Purification and characterization of peroxidase from *Moringa Oleifera* l. leaves. *BioResources*, 7(3), 3237 – 3251.
96. Kraujalytė, V., Venskutonis, P., Pukalskas, A., Česonienė, L., & Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. In *Food Chemistry*, (88), 583 – 590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.031>
97. Kumar, S., Bhattacharya, A., Tiwari, P., & Sahu, P. (2018). A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of

- Moringa oleifera*. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 10 (4), 181.
98. Kusvuran, S. (2021). Microalgae (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) alleviates drought stress of broccoli plants by improving nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidative defense system. *Horticultural Plant Journal*, 7 (3), 221 – 231.
99. Kwon, Y., & Youn, K. (2014). Antioxidant activity and physiological properties of *Moringa (Moringa oleifera* Lam.) leaves extracts with different solvents. *Korean Journal of Food Preservation*, 21 (6), 831 – 837.
100. Lafuente, M., T. Lafuente, M., Belver, A., Guye, M., & Saltveit, M. (1991). Effect of Temperature Conditioning on *Chilling Injury* of *Cucumber Cotyledons*. In *Plant Physiology*, 95 (2), 443 – 449. <https://doi.org/10.1104/pp.95.2.443>
101. Lee, J. (2004). Plant Cell Culture and Its Applications. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, 931 – 933. <https://doi.org/10.1081/e-epcs-120010552>
102. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (6), 12791 – 12835.
103. Lescot, T. (2008). The genetic diversity of banana in figures. <https://agritrop.cirad.fr/544316>
104. Ley, F. & M. (2008). Principales tecnologías generadas para el manejo del cultivo de banano, plátano y otras musáceas. INIAP, archivo histórico.
105. Lezcano, M., Benítez, B., Garay, C., & Segnana, L. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. In *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18 (2), 140 – 154. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
106. Lichtenthaler, H., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS

- Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, (1), 431 – 438. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
107. Li, Z., McClure, J., & Hagerman, A. (1989). Soluble and Bound Apoplastic Activity for Peroxidase,  $\beta$ -d-Glucosidase, Malate Dehydrogenase, and Nonspecific Arylesterase, in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Primary Leaves. In *Plant Physiology*, 90 (1), 185 - 190. <https://doi.org/10.1104/pp.90.1.185>
108. Lorenzo, J., González, B., Escalona, M., Teisson, C., & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54 (3), 197 – 200. <https://doi.org/10.1023/a:1006168700556>
109. Lühje, S., & Martinez, T. (2018). Membrane-Bound Class III Peroxidases: Unexpected Enzymes with Exciting Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102876>
110. Lyons, G., Gondwe, C., Banuelos, G., Mendoza, C., Haug, A., Christophersen, O., & Ebert, A. (2017). Drumstick tree (*Moringa oleifera*) leaves as a source of dietary selenium, sulphur and pro-vitamin A. In *Acta Horticulturae*, (1158), 287 – 292. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2017.1158.32>
111. Mahmood, K., Mugal, T., & Haq, I. (2010). *Moringa oleifera*: A natural gift-a review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2 (11), 775 – 781.
112. Martínez-Rubio, R., Acebes, J., Encina, A., & Kärkönen, A. (2018). Class III peroxidases in cellulose deficient cultured maize cells during cell wall remodeling. *Physiologia Plantarum*, 164 (1), 45 – 55.
113. Martínez, S., & Fontes-Leandro, M. (2009). Efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátanos y bananos. *Biotecnología*, 9 (3), 183 – 188.
114. Ma, Z., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., & Muhammad, S. (2020). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. *South*

- African Journal of Botany*: Official Journal of the South African Association of Botanists = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde: Amptelike Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges, 129, 40 – 46.
115. Medina, J., Woiciechowski, A., Guimarães, L., Karp, S., & Soccol, C. (2017). 10 - Peroxidases. In A. Pandey, S. Negi, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 217 – 232.
116. Medina, M., Medina, C., & Medina, L. (2015). Propagación *in vitro* de *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo de meristemos apicales. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 5 (1), 47.
117. Mocha-Cuenca, B. (2020). Diagnóstico de la presencia de Badnavirus en las plantaciones bananeras de la Provincia de El Oro. In *ciencia UNEMI*, 13 (32), 100 – 108. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol13iss32.2020pp100-108>
- p
118. Mona, A. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. sativa) plants. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 5 (3), 42 – 49.
119. Moreno, A., Bernal, Á., Ugarte, F., Lima, K., Coig, M., Sánchez, C., Aldrey, A., & Vidal, N. (2018). Use of liquid medium and biofortificants for improving micropropagation and acclimation of Musa AAA cv. Williams. Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges. [https://www.researchgate.net/profile/Juan\\_Luis\\_Lorenzo/publication/327744968\\_Improvement\\_of\\_micropropagation\\_by\\_micrografting\\_in\\_vitro\\_cultured\\_mature\\_scions\\_of\\_Castanea\\_sativa\\_Mill\\_on\\_physiologically\\_juvenile\\_rootstocks\\_of\\_the\\_same\\_genotype/links/5cbe01964585156cd7ab4f9b/Improvement-of-micropropagation-by-micrografting-in-vitro-cultured-mature-scions-of-Castanea-sativa-Mi](https://www.researchgate.net/profile/Juan_Luis_Lorenzo/publication/327744968_Improvement_of_micropropagation_by_micrografting_in_vitro_cultured_mature_scions_of_Castanea_sativa_Mill_on_physiologically_juvenile_rootstocks_of_the_same_genotype/links/5cbe01964585156cd7ab4f9b/Improvement-of-micropropagation-by-micrografting-in-vitro-cultured-mature-scions-of-Castanea-sativa-Mi)

ll-on-physiologically-juvenile-rootstocks-of-the-same-genotype.pdf#  
page=154

120. Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P., & Muchenje, V. (2012). Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. In *Meat Science*, 91 (4), 441 – 447. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.029>
121. Muhammad, A., Pauzi, N., Arulselvan, P., Abas, F., & Fakurazi, S. (2013). In Vitro Wound Healing Potential and Identification of Bioactive Compounds from *Moringa oleifera* Lam. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/974580>
122. Muhammad, H., Asmawi, M., & Khan, N. (2016). A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (10), 896 – 902.
123. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. In *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473 – 497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
124. Mustafa, R., El-Naggar, E., Svajdlenka, E., Omran, G., ELFiky, F., & El-Hawiet, A. (2021). Enhancement of phenolic content, antioxidant and cytotoxic activities of leaf and seed by suspension culture. *Natural Product Research*, 35 (23), 5233 – 5237.
125. Naim, F., Dugdale, B., Kleidon, J., Brinin, A., Shand, K., Waterhouse, P., & Dale, J. (2018). Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Research*, 27 (5), 451 – 460.
126. Nawaz, F., Majeed, S., Ahmad, K., Aqib, M., Shehzad, M., Aurangzaib, M., & Shahbaz, M. (2019). Reactive Sulfur Species-Key Regulators of Abiotic Stress Tolerance in Plants. In *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, 685 – 713. <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch30>

127. Nihayati, E., & Najah, M. (2021). Comparative assessment of The Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract (MLE) and Zeatin on *in vitro* Regeneration Response of *Pogostemon cablin* Bud Explants. In *AIMS Agriculture and Food*, 6 (1), 308 – 320. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021019>
128. Nogales, S. (2019). Actualidad de *Moringa oleifera* en terapéutica [Universidad Complutense]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/SANDRA%20HELEN O%20NOGALES.pdf>
129. Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E., & Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. In *Industrial Crops and Products*, 83, 166 - 176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.032>
130. Nouman, W., Siddiqui, M., & Basra, S. (2012). *Moringa oleifera* leaf extract: An innovative priming tool for rangeland grasses. In *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. <https://doi.org/10.3906/tar-1009-1261>
131. O'Leary, B., Rico, A., McCraw, S., Fones, H., & Preston, G. (2014). The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 94. <https://doi.org/10.3791/52113>
132. Onsa, G., Bin Saari, N., Selamat, J., & Bakar, J. (2004). Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*, 85 (3), 365 – 376.
133. Ontaneda, A., Herrera, A., & Batista, R. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3 (2), 173 – 182.
134. Ortega, D., Tamayo, A., Calderón, J., Galván, R., & Others. (2011). Aseptic establishment in the *in vitro* micropropagation of banana Williams (AAA, subgroup cavendish). *Tierra Tropical: Sostenibilidad, Ambiente Y Sociedad*, 7 (2), 205 – 220.

135. Ortega, N., Korneva, S., Ruiz, O., Santos, E., & Peralta, E. (2010). Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de banano y plátano (*Musa* spp.) a partir de “meristemas apicales” y “scalps” <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10971>
136. Ortiz-Rojas, L., Suárez-Botello, J., & Chaves-Bedoya, G. (2017). Respuesta en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana* al extracto foliar de *Moringa oleifera*. In *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11 (1), 193 – 199. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.6131>
137. Oyewusi, T., & Osunbitan, J. (2021). Effect of compost extract processing parameters on the growth and yield parameters of *Amaranthus* and *Celosia* Vegetables. *Environmental Challenges*, 5, 100302.
138. Pereira, G., Boliani, A., & Correa, L. (2015). Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira “*Thap maeo*” (sub grupo AAB) submetidos a concentrações de cloro ativo. *Comunicata Scientiae*, 6 (4), 412.
139. Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11 (4). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255>
140. Pérez, P., García, L., Bermúdez, I., Veitía, N., & Romero, C. (2002). Manejo de hijos y ápices de cultivares de *Musa* spp. para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis subcultivos *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 2 (2). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/138>
141. Perrey, R., Hauser, M., & Wink, M. (1989). Cellular and Subcellular Localization of Peroxidase Isoenzymes in Plants and Cell Suspension Cultures from *Lupinus polyphyllus*. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 44 (11), 931 – 936.
142. Phiri, C. (2010). Influence of *Moringa oleifera* leaf extracts on germination and early seedling development of major cereals. In

- Agriculture and Biology Journal of North America*, 1 (5), 774 – 777.  
<https://doi.org/10.5251/abjna.2010.1.5.774.777>
143. Qwele, K., Muchenje, V., Oyedemi S., Moyo, B., & Masika, P. (2013). Effect of dietary mixtures of moringa (*Moringa oleifera*) leaves, broiler finisher and crushed maize on anti-oxidative potential and physico-chemical characteristics of breast meat from broilers. In *African Journal of Biotechnology*, 12 (3), 290 – 298.  
<https://doi.org/10.5897/ajb12.115>
144. Rady, M., & Mohamed, G. (2015). Modulation of salt stress effects on the growth, physio-chemical attributes and yields of *Phaseolus vulgaris* L. plants by the combined application of salicylic acid and *Moringa oleifera* leaf extract. In *Scientia Horticulturae*, 193, 105 – 113.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.003>
145. Rady, M., Varma C., & Howladar, S. (2013). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings overcome NaCl stress as a result of presoaking in *Moringa oleifera* leaf extract. *Scientia Horticulturae*, 162, 63 – 70.
146. Ramírez, C., Ostoa, G., De la Vega, J., & Juárez, I. (2019). Propuesta de diseño y automatización de biorreactor para sistemas de inmersión temporal / Bioreactor Design and Automation Proposal for Temporary Immersion Systems. In *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 8(15), 72 – 88.  
<https://doi.org/10.23913/ciba.v8i15.88>
147. Ramírez, R., Vargas, J., Luna, C., & Ramírez, L. (2021). Nutritional Characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves for Forage Use. In *Acta Scientific Veterinary Sciences*, 93 – 100. <https://doi.org/10.31080/asvs.2021.03.0261>
148. Ramírez-Villalobos, M., Lindorf, H., & de García, E. (2008). Cambios morfoanatómicos en los ápices del vástago y de la raíz del banano Williams (AAA, *Musa* sp.) bajo distintas concentraciones de N6-benciladenina. In *The Journal of*

- Agriculture of the University of Puerto Rico*, 92 (12), 53 - 72.  
<https://doi.org/10.46429/jaupr.v92i1-2.2621>
149. Rathmell, W., & Sequeira, L. (1974). Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiology*, 53 (2), 317 – 318.
150. Rath, S., Seth, S., Mishra, S., Yadav, P., Gupta, A., & Panigrahi, J. (2019). Correction to: Genetic homogeneity assessment of *in vitro* regenerated plantlets of *Nyctanthes arbortristis* L. and comparative evaluation of bioactive metabolites and antioxidant activity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55 (6), 733 – 733.
151. Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B., Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C., & Vidal, N. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 32 (1), 61 – 71.
152. Reyes, Á. (2016). Caracterización de la Germinación y Estudios Citológicos de *Moringa oleifera* Lam [Ingeniero Agrónomo en Producción]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
153. Ridzuan, N., Abdullah, N., Vun, Y., & Supramaniam, C. (2020). Micropropagation and defence enzymes assessment of *Moringa oleifera* L. plantlets using nodal segments as explant. *South African Journal of Botany: Official Journal of the South African Association of Botanists = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde: Amptelike Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges*, 129, 56 – 61.
154. Rios, G., Añez, N., Ramírez, M., Bracho, B., Araujo, D., Suárez, H., & Nava, J. (2013). Cultivo *in vitro* de yemas, tratadas con benciladenina, provenientes de cormos enteros o seccionados de plátano cambur manzano. *Bioagro*, 25 (2), 13 – 142.
155. Robert, G., Melchiorre, M., Racca, R., Trippi, V., & Lascano, H. (2009). Apoplastic superoxide level in wheat protoplast under photooxidative stress is regulated by chloroplast redox signals: Effects on the antioxidant system. *Plant Science*, 177 (3), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.001>

156. Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J., & Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82 (1), 57 – 66.
157. Roy, S., Asaduzzaman, M., & Pramanik, M. & Prodhan, A. (2006). Effect of banana plant extracts on germination and seedling growth of some vegetable crops. *Bangladesh Journal of Crop Science*, 17 (1), 235 – 242.
158. Rubio, L. (2020). Comparativa nutricional del cultivo de *Moringa oleifera* en España. *Ciencia Y Tecnología*, 13 (2). <https://doi.org/10.18779/cyt.v13i2.388>
159. Sadak, M., Abdalla, A., Elhamid, E., & Ezzo, M. I. (2020). Role of melatonin in improving growth, yield quantity and quality of *Moringa oleifera* L. plant under drought stress. *Bulletin of the National Salmon Resources Center*, 44 (1). <https://doi.org/10.1186/s42269-020-0275-7>
160. Sahodaran, N., & Ray, J. (2018). Heavy metal contamination in "chemicalized" green revolution banana fields in southern India. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25 (27), 26874 – 26886.
161. Sainz, R., Lombo, F., & Mayo, J. (2012). Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers*, 4 (2), 442 – 474.
162. Sakr, M., Ibrahim, H., Alwadyb, A., & Makarm, A. (2021). Growth, yield and biochemical constituents as well as post-harvest quality of water-stressed broccoli (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*) as affected by certain biomodulators. *Scientia Horticulturae*, 275, 109605.
163. Santos, A., Argolo, A., Paiva, P., & Coelho, L. (2012). Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Tissue Extracts. In *Phytotherapy Research*, 26 (9), 1366 - 1370. <https://doi.org/10.1002/ptr.4591>
164. Sardar, H., Nisar, A., Anjum, M., Naz, S., Ejaz, S., Ali, S., Javed, M. S., & Ahmad, R. (2021). Foliar spray of moringa leaf

- extract improves growth and concentration of pigment, minerals and stevioside in stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*). In *Industrial Crops and Products*, 166, 113485. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113485>
165. Shanahan, J., Edwards, I., Quick, J., & Fenwick, J. (1990). Membrane Thermostability and Heat Tolerance of Spring Wheat. In *Crop Science*, 30 (2), 247. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183x003000020001x>
166. Shank, L., Riyathong, T., Lee, V., & Dheeranupattana, S. (2013). Peroxidase activity in native and callus culture of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2 (3), 163 – 167.
167. Shigeto, J., & Tsutsumi, Y. (2016). Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *The New Phytologist*, 209 (4), 1395 - 1402.
168. Singh, A., Rana, H., Tshabalala, T., Kumar, R., Gupta, A., Ndhala, A., & Pandey, A. (2020). Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview. *South African Journal of Botany: Official Journal of the South African Association of Botanists = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde: Amptelike Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges*, 129, 209 – 220.
169. Sreelatha, S., & Padma, P. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* Lam leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64 (4), 303 – 311.
170. Suman, S. (2017). Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch*, 17 (1), 1 – 26.
171. Suphachai, C. (2014). Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. In *Journal of Medicinal Plants Research*, 8 (7), 318 - 325. <https://doi.org/10.5897/jmpr2013.5353>
172. Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Bednarz, M., Jafarnik, K., Luczkiewicz, M., & Ekiert, H. (2019). Bioreactor type affects the accumulation of phenolic acids and flavonoids in microshoot

- cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139 (1), 199 – 206.
173. Tawfik, M., Mohamed, M., Sadak, M., & Thaloonth, A. (2021). Iron oxide nanoparticles effect on growth, physiological traits and nutritional contents of *Moringa oleifera* grown in saline environment. *Bulletin of the National Research Centre*, 45 (1), 1 – 9.
174. Teixeira, E., Carvalho, M., Neves, V., Silva, M., & Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. In *Food Chemistry*, 147, 51 – 54). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>
175. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (6-7), 669 – 675.
176. Thangavelu, R., Saraswathi, M., Uma, S., Loganathan, M., Backiyarani, S., Durai, P., Raj, E., Marimuthu, N., Kannan, G., & Swennen, R. (2021). Identification of sources resistant to a virulent *Fusarium* wilt strain (VCG 0124) infecting Cavendish bananas. *Scientific Reports*, 11(1), 3183.
177. Tripathi, L., Ntui, V., & Tripathi, J. (2020). CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 118 –126.
178. Turhan, E., Karni, L., Aktas, H., Deventurero, G., Chang, D., Bar-Tal, A., & Aloni, B. (2006). Apoplastic anti-oxidants in pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit and their relationship to blossom-end rot. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81 (4), 661 – 667.
179. Ugarte-Barco, F., Lima, K., Bernal, M., Moreno, A. (2018). Estudios preliminares del efecto fortificante de extractos de *Moringa Oleifera* Lam. en vitroplantas del clon Williams en aclimatación. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6 (2), 47 – 55.

180. Umamaheswari, A., Prabu, S., & Puratchikody, A. (2019). Phytopharmacological potential of the natural gift *Moringa oleifera* Lam and its therapeutic application: An overview. In *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12 (11), 485. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.271288>
181. Vaquero-Raya, E., & Molero-Richard, X. (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? In *Gastroenterología y Hepatología*, 28 (8), 473–484. <https://doi.org/10.1157/13078997>
182. Velázquez-Zavala, M., Peón-Escalante, I., Zepeda-Bautista, R., Jiménez-Arellanes, M. (2016). *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.): usos potenciales en la agricultura, industria y medicina. In *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12 (2), 95–116. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018>
183. Vélez, J. (2017). *Moringa oleifera* (árbol de rábano picante). Compendio de Especies Invasoras. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34868#toDistributionMaps>
184. Verde, L. (2017). Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de “*Moringa oleifera*.” <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/19620>
185. Verma, A., Vijayakumar, M., Mathela, C., & Rao, C. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47 (9), 2196 – 2201.
186. Waman, A., Bohra, P., Sathyanarayana, B., Umesha, K., Mukunda, G., Ashok, T., & Gowda, B. (2015). Optimization of Factors Affecting *In vitro* Establishment, *Ex vitro* Rooting and Hardening for Commercial Scale Multiplication of Silk Banana (*Musa AAB*). *Erwerbs-Obstbau*, 57 (3), 153 –164.
187. Welander, M., Persson, J., Asp, H., & Zhu, L. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. In *Scientia Horticulturae*, 179, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.035>

188. Welinder, K. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2 (3), 388–393.
189. Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 381–407.
190. Xavier, A., & Villavicencio, C. (2018). Impacto en las importaciones de fertilizantes en el Ecuador: caso Emda Cia Ltda [Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Administrativas]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/35695>
191. Yasmeen, A., Basra, S., Ahmad, R., & Wahid, A. (2012). Performance of Late Sown Wheat in Response to Foliar Application of *Moringa oleifera* Lam. Leaf Extract. In *Chilean journal of agricultural research*, 72 (1), 92 – 97. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392012000100015>
192. Yasmeen, A., Basra, S., Wahid, A., Nouman, W., & Rehman, H. (2013). Exploring the potential of *Moringa oleifera* leaf extract (MLE) as a seed priming agent in improving wheat performance. In *Turkish Journal of Botany*. <https://doi.org/10.3906/bot-1205-19>
193. Yuniati, N., Kusumiyati, K., Mubarak, S., & Nurhadi, B. (2022). The Role of Moringa Leaf Extract as a Plant Biostimulant in Improving the Quality of Agricultural Products. *Plants*, 11 (17). <https://doi.org/10.3390/plants11172186>
194. Ziv, M. (2010). Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. In *Horticultural Reviews*, 1–30. <https://doi.org/10.1002/9780470650776.ch1>

**Estudio sobre el efecto como fortificante de extractos de diferentes partes de la planta *Moringa oleifera* en el crecimiento y desarrollo de plantas de banano (*Musa AAA*) var. Williams obtenidas *in vitro*.**



**Autor: Alexander Moreno Herrera**

**Tesis doctoral UDC / 2023**

**Directora: María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga**

**VIDAL GONZALEZ NIEVES** Firmado digitalmente por VIDAL  
GONZALEZ NIEVES PILAR - DNI  
PILAR - DNI 36065814C 36065814C  
Fecha: 2023.05.05 11:12:48 +02'00'

**Directora: Nieves del Pilar Vidal González**

**Programa de doctorado en Biotecnología Avanzada**



<b>Código Seguro De Verificación</b>	fmdMXgMxiFraKyOmb68/5w==	<b>Estado</b>	<b>Data e hora</b>
<b>Asinado Por</b>	María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga	Asinado	05/05/2023 11
<b>Observacións</b>		<b>Páxina</b>	1/1
<b>Uri De Verificación</b>	<a href="https://sede.udc.gal/services/validation/fmdMXgMxiFraKyOmb68/5w==">https://sede.udc.gal/services/validation/fmdMXgMxiFraKyOmb68/5w==</a>		
<b>Normativa</b>	Este informe ten o carácter de copia electrónica auténtica con validez e eficacia administrativa de ORIGINAL (art. 27 Lei 39/2015).		





UNIVERSIDADE DA CORUÑA



LA DRA. MARÍA DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA, CATEDRÁTICA DE FISIOLoxÍA VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLoxÍA DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA Y LA DRA. NIEVES PILAR VIDAL GONZÁLEZ, CIENTÍFICA TITULAR EN LA MISIÓN BIOLÓGICA DE GALICIA SEDE SANTIAGO DE COMPOSTELA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada "Estudio sobre el efecto como fortificante de extractos de diferentes partes de la planta *Moringa oleifera* en el crecimiento y desarrollo de plantas de banano (*Musa AAA*) var. *Williams* obtenidas in vitro" presentada por el ingeniero agrónomo ALEXANDER MORENO HERRERA ha sido realizada en el Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (Machala, Ecuador) bajo nuestra dirección, y dentro del programa de doctorado de Biotecnología Avanzada y cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Biotecnología Avanzada.

Y para que así conste firmamos la presente certificación en A Coruña y Santiago de Compostela a 28 de abril del 2023

**VIDAL  
GONZALEZ  
NIEVES PILAR -  
DNI 36065814C** Firmado digitalmente  
por VIDAL GONZALEZ  
NIEVES PILAR - DNI  
36065814C  
Fecha: 2023.04.28  
12:45:23 +02'00'

Fdo.: Mª de los Angeles Bernal Pita da Veiga

Fdo.: Nieves Pilar Vidal González

Código Seguro De Verificación	cgyzaW0aM4vv/IJZF1lg--		Estado	Data e hora
Asinado Por	María de los Angeles Bernal Pita Da Veiga		Asinado	28/04/2023 12:58:13
Observacións			Páxina	1/1
Url De Verificación	<a href="https://sede.udc.gal/services/validation/cgyzaW0aM4vv/IJZF1lg--">https://sede.udc.gal/services/validation/cgyzaW0aM4vv/IJZF1lg--</a>			
Normativa	Este informe ten o carácter de copia electrónica auténtica con validez e eficacia administrativa de ORIGINAL (art. 27 Lei 39/2015).			

