



**UNIVERSIDAD DE CIENFUEGOS
"CARLOS RAFAEL RODRÍGUEZ"**



**EVALUACIÓN EN CAMPO DEL CULTIVAR DE PLÁTANO
VIANDA 'INIVIT PV 06-30' (*Musa spp.*, GRUPO AAB)
PROPAGADO POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y
ESCALADO EN LA BIOFÁBRICA DE CIENFUEGOS.**

Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo.

Autor: DAVID MONTANO SOSA.

Tutor: Dr.C. Jorge López Torres.

**Cienfuegos
2012**

“...Lo importante no es hacer bien las cosas extraordinarias, sino hacer las cosas ordinarias extraordinariamente bien...”

Che.

Al Dr. Jorge López Torres por su apoyo y ayuda incondicional en la realización de este trabajo.

A mi hermana que me han inspirado y alentado para cumplir este propósito.

A mis compañeros de trabajo que hicieron posible este trabajo.

A los compañeros de la CCS Ernesto Che Guevara, en especial al campesino Michel Rumbaut Guzmán.

A los numerosos amigos cuya opinión y consejo han influido en este trabajo

A todo el que de una forma u otra ha colaborado.

A todos, muchas gracias.

A mis hijos que son mi mayor alegría.

RESUMEN

La propagación *in vitro* a partir de yemas axilares tiene como limitantes los bajos coeficientes de multiplicación y la necesidad de realizar un elevado número de operaciones manuales. En cambio, el empleo de la embriogénesis somática, permite obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y costo más bajo. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) y en la Biofábrica de Cienfuegos, con el objetivo de evaluar el comportamiento en campo del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' proveniente de la propagación por embriogénesis somática escalada en Biofábrica. La misma se realizó a partir de brotes de yemas axilares y posteriormente se realizó su escalado a la Biofábrica a través de tres subcultivos de propagación y luego su evaluación en condiciones de campo. Como control del experimento en campo se utilizaron materiales propagados por organogénesis, ápices de cormos y plantas provenientes de embriones somáticos a partir de la metodología que utiliza como explante inicial los scalps de multiyemas para inducir el proceso de embriogénesis somática (referencia de INIBAP). Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron la posibilidad de multiplicar el cultivar objeto de estudio por embriogénesis somática, inducida a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares. Su escalada en Biofábrica durante tres subcultivos *in vitro*, aclimatización de las plántulas y estudio en campo de la estabilidad genética de las plantas regeneradas de los embriones somáticos mostraron la factibilidad de su uso.

INDICE		Pág.
1. INTRODUCCIÓN		1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA		5
2.1. Origen, sistemática y botánica.		5
2.2. Razones que justifican la aplicación de la biotecnología en la producción de semillas de los plátanos y bananos.		5
2.3. Generalidades de la embriogénesis somática.		6
2.3.1. Factores relacionados con la embriogénesis somática.		7
2.3.2. Desarrollo de la embriogénesis somática.		8
2.3.2.1. Inducción de la embriogénesis somática.		9
2.3.2.2. Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas.		10
2.3.2.3. Formación y multiplicación de los embriones somáticos.		11
2.3.2.4. Maduración y germinación de los embriones somáticos.		11
2.3.3. Embriogénesis somática en <i>Musa</i> spp.		12
2.4. Variación somaclonal.		13
2.5. Estabilidad genética de las plantas regeneradas por cultivo <i>in vitro</i> .		13

3.	MATERIALES Y MÉTODOS.	15
3.1.	Descripción.	15
3.2.	Procedimientos generales.	16
3.3.	Establecimiento <i>in vitro</i> de los ápices.	17
3.4.	Desarrollo de la embriogénesis somática.	18
3.5.	Escalado en Biofábrica de la propagación por embriogénesis somática.	20
3.6.	Comportamiento en campo de las plantas obtenidas de embriones somáticos.	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1.	Desarrollo de la embriogénesis somática.	24
4.2.	Escalado en Biofábrica de la propagación por embriogénesis somática.	30
4.3.	Comportamiento en campo de las plantas obtenidas de embriones somáticos.	30
5.	CONCLUSIONES	44
6.	RECOMENDACIONES	45
7.	BIBLIOGRAFIA	46

1. INTRODUCCIÓN

El mundo se enfrenta a la más grave crisis alimentaria en mucho tiempo, reflejada en el sostenido encarecimiento de los productos (Chávez, 2008).

Ante esta situación es preciso formular estrategias que faciliten la producción de alimentos que se puedan obtener en el país, dentro de ellas el plátano. La producción de este cultivo en Cuba, contribuye a lograr la estabilidad de productos alimentarios en el mercado, debido a su capacidad de producir durante todos los meses del año, así como por su diversidad de usos (Rodríguez, 2000).

La propagación *in vitro* a partir de yemas axilares se ha generalizado a escala comercial y se mantiene como método más utilizado en esta especie (Ahloowalia *et al.*, 2004). Esta técnica de regeneración de plantas tiene como limitantes principales la necesidad de realizar un elevado número de operaciones manuales y bajos coeficientes de multiplicación, lo cual aumenta considerablemente los costos de producción (Escalona *et al.*, 2003; Savangikar, 2004).

Sin embargo existen otras alternativas de propagación menos utilizadas como la embriogénesis somática, la cual permite obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual hace que este método sea potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Ibaraki y Kurata, 2001). Además de, constituir una herramienta auxiliar para la mejora genética de este cultivo como principal aplicación (Perea, 2001; Escalant y Jain, 2004).

En el caso de los plátanos viandas del grupo AAB que no poseen la inflorescencia masculina persistente, la embriogénesis somática se aplica mediante dos metodologías principales: a partir de scalps de multiyemas (Dheda *et al.*, 1991; Schoofs, 1997) y ápices de brotes de yemas axilares (López *et al.*, 2005).

Motivado por lo anterior, se utilizó el cultivar (cv.) 'INIVIT PV 06-30' para evaluar las metodologías de propagación por embriogénesis somática disponible para los cultivares de plátano vianda y que permitan su escalado parcial en Biofábrica, teniendo en cuenta su uso como una alternativa para la producción de semillas y la satisfacción de las necesidades del mercado.

Tomando en consideración los antecedentes descritos anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: **“Es posible escalar de forma parcial la propagación por embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV 06-30’ (Grupo AAB) a la Biofábrica, como una alternativa para la propagación de plantas, manteniendo la estabilidad genética de las plantas regeneradas en condiciones de campo.**

Para validar la hipótesis anterior se planteó como objetivo general:

Evaluar el comportamiento en campo del cv. de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' proveniente de la propagación por embriogénesis somática escalada en Biofábrica.

Objetivos Específicos:

1. Definir una metodología para la multiplicación del cv. del plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' por embriogénesis somática y su escalado en Biofábrica a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares.
2. Evaluar la estabilidad genética de las plantas regeneradas por embriogénesis somática en la Biofábrica.

Por tanto, el problema científico de la presente investigación, consiste en la necesidad de evaluar el comportamiento en campo del cv. de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' proveniente de la propagación por embriogénesis somática escalada en Biofábrica; para determinar la factibilidad de poder usar el nuevo método de propagación que se quiere introducir en el cultivar objeto de estudio, de relativamente corto tiempo de introducción en la producción.

Novedad científica:

Consiste en el desarrollo de la regeneración de plantas por embriogénesis somática del cv. 'INIVIT PV 06-30' y su escalado en Biofábrica, validado en campo por primera vez a nivel nacional.

Valor práctico:

Los resultados alcanzados posibilitaron contar con otro método de regeneración de plantas para la producción de semillas en el cv. 'INIVIT PV 06-30', lo cual garantizará mayor volumen de plantas producidas, manteniendo una buena estabilidad genética en campo.

Valor teórico:

Los resultados alcanzados contribuyen al conocimiento del desarrollo de la embriogénesis somática en general y en especial en los plátanos. Se demuestra una vez más la importancia del explante inicial para la inducción del proceso embriogénico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origen, sistemática y botánica.

La península Malaya en Asia, se ha considerado como probable centro de origen primario del género *Musa*, tanto de *Musa balbisiana* como de *Musa acuminata*, cuyos cruzamientos dieron lugar a todas las variedades comestibles conocidas en América (Belalcazar, 1991). Su introducción en América, el cronista Oviedo sostiene que el plátano fue llevado desde la Gran Canaria a Santo Domingo por Fray de Berlanga en 1516 y de ahí a Cuba (López, 1999).

Los plátanos y bananos pertenecen al orden *Zingiberales*, familia *Musaceae* y género *Musa*. La familia está formada por dos géneros: *Ensete* y *Musa* (Simmonds y Weatherup, 1990).

El género *Musa* fue clasificado en las secciones *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*, siendo esta última la sección que contiene la mayoría de los bananos y plátanos comestibles (Osuji, 1997).

Además se incluyen también en este sistema de clasificación internacional los híbridos formados entre especies de este género (*Eumusa* x *Australimusa*) (Daniells *et. al.*; 2001).

Los plátanos viandas pertenecientes al grupo AAB, subgrupo Plantain (Daniells *et al.*; 2001) y se originaron en la India, a partir de cruzamientos espontáneos y mutaciones somáticas, dando lugar a un gran número de clones (Robinson, 1996).

2.2. Razones que justifican la aplicación de la biotecnología en la producción de semillas de los plátanos y bananos.

Los plátanos y bananos representan el cuarto cultivo en importancia después del arroz, trigo y maíz, en los países en vías de desarrollo (Escalant y Jain, 2004). En términos de energía, cada gramo proporciona una caloría, considerado como una buena fuente de vitaminas A, B₁, B₂, C y B₆. Todo lo cual hace que sean excelentes candidatos para todas las estrategias de

cultivo de tejidos, debido al gran inconveniente para el intercambio del germoplasma, a través de cormos o hijos, además de, resultar su conservación en condiciones de campo costosa y consumidora de mucho espacio (Krikorian y Scott, 1995).

Todas estas limitantes se hacen más evidentes, debido a los bajos coeficientes de propagación que poseen las especies de este género de importancia económica, que son propagadas por métodos convencionales en campo.

Por otra parte, un número considerado de plagas y enfermedades afectan su cultivo, encareciendo los costos de producción, debido al control de los agentes causantes de los daños; sin embargo, las estrategias de mejoramiento para generar resistencia o tolerancia a las principales plagas y enfermedades, no han tenido éxito todavía en clones de importancia económica (Sági, 2000).

2.3. Generalidades de la embriogénesis somática.

La embriogénesis somática se fundamenta en la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas (totipotencia), propuesta por Haberlandt en 1902, citado por Steward *et al.*, (1958) y Reinert (1958), quienes describieron por primera vez la misma. La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula o grupos de ellas, que no es producto de la fusión de gametos (Merkle *et al.*, 1995).

Los embriones somáticos asexuales o adventicios, son estructuras bipolares con un eje radical - apical, que no poseen conexión vascular con el tejido materno y deben ser capaces de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret, 1991; Arnold *et al.*, 2002).

El fenómeno de la embriogénesis somática ha sido descrito para un gran número de especies (Tisserat *et al.*, 1979; Krishnaraj y Vasil, 1995). El mismo es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión y a la facilidad con

que puede ser automatizado todo el proceso productivo (Prell, 1991). Además, se obtienen altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, con la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Redenbaugh; 1986).

2.3.1. Factores relacionados con la embriogénesis somática.

Los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material (Gómez, 1998). Dentro de estos se encuentran:

- El genotipo de la planta.
- El tipo y estado fisiológico del explante.
- Los reguladores del crecimiento.
- Las condiciones del cultivo.

Los diferentes genotipos dentro de una misma especie, pueden variar en su capacidad de respuesta embriogénica, tales diferencias genotípicas pueden reflejar la activación o no de los mismos elementos claves necesarios para que se produzca la embriogénesis. (Merkle *et al.*, 1995).

La selección del explante puede ser el factor clave que determina el éxito o no de un protocolo de embriogénesis somática (Krishnaraj y Vasil, 1995).

Vasil (1985), señala que en la mayoría de las monocotiledóneas herbáceas, se utilizan los explantes que contengan células meristemáticas o indiferenciadas. Independientemente del explante que se utiliza, la edad de éste tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*, muy viejos y muy jóvenes no son apropiados. De manera que, el uso de los domos meristemáticos, es ampliamente utilizado con buenos resultados en varias especies de plantas (Krishnaraj y Vasil, 1995).

Según Litz y Jarret (1991), los tejidos vegetales tienen la capacidad para formar callos *in Vitro*, aunque relativamente, pocos explantes tienen la habilidad para producir callos con estructuras embriogénicas. Al variar las condiciones de cultivo, bajo condiciones inusuales (estrés), puede ser factible

abolir o atenuar la adecuada expresión genética y activar las bases para el desarrollo de la embriogénesis somática.

El medio de cultivo más utilizado para la embriogénesis somática es el MS (Murashige y Skoog, 1962) o la modificación de esta formulación (Evans *et al.*, 1981). Wetherell (1984), demostró que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria, exponiéndolos a niveles altos de sacarosa, la misma normalmente se usa en concentraciones de 20; 30 y hasta 120 g.L⁻¹.

Las poliaminas, incorporadas a los cultivos embriogénicos de zanahoria, inhiben el desarrollo de los embriones somáticos y los subcultivos, en cambio, en un medio de cultivo libre de poliaminas, pero que contenga arginina, permiten el desarrollo normal del embrión. (Bradley *et al.*, 1984).

La concentración usual de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), está dentro del rango de 0,11-6,10 mg.L⁻¹ (Evans *et al.*, 1981), aunque se deben usar concentraciones más altas, en caso de que el carbón activado se incorpore al medio de cultivo (Reynolds y Murashige, 1979).

El papel de las citoquininas en el medio de cultivo primario o inductor del embrión es menos claro, aunque normalmente éste incluye una de ellas. Fujimura y Komamine (1980), han sugerido que las citoquininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos. El uso de inhibidores del crecimiento, tales como: el ácido abscísico (ABA), reduce la frecuencia de aparición de anomalías del desarrollo, tales como la formación de policotiledones y la germinación precoz del embrión y contribuye a la maduración y sincronización de los embriones (Ammirato 1973; 1974).

2.3.2. Desarrollo de la embriogénesis somática.

Según Parrott (1993), la embriogénesis somática se desarrolla a través de las fases siguientes:

- Inducción de la embriogénesis somática

- Formación de los embriones somáticos
- Maduración de los embriones somáticos
- Germinación y regeneración de plantas

2.3.2.1. Inducción de la embriogénesis somática.

Las auxinas han resultado ser las más eficientes para la inducción de la embriogénesis somática y dentro de ellas, el 2,4-D. El tipo y concentración necesaria depende de la especie y el explante (*Merkle et al.*, 1995).

El término de células embriogénicas es específico para aquellas células que han completado la transición de un estado somático a uno en el cual no son necesarios más estímulos exógenos aplicados (tales como los reguladores de crecimiento), para producir embriones somáticos (*De Jong et al.*, 1993).

Los tratamientos para la obtención de embriogénesis somática dependen del tipo de células que formen el tejido del explante: células somáticas determinadas pre-embriogénicamente (CsDPE) o células somáticas no embriogénicas (CsNE) (*Merkle et al.*, 1995). En el primer caso (CsDPE), un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de embriones somáticos a partir del tejido del explante. Este proceso es llamado embriogénesis somática directa, donde las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos.

Cuando las células somáticas presentes no son embriogénicas, deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina, durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo y el proceso es llamado embriogénesis somática indirecta. (*Merkle et al.*, 1995). Según Vasil (1988), el callo se encuentra rodeado frecuentemente por un callo no embriogénico friable o semitraslúcido. En otros casos, se observan porciones de callos embriogénicos distribuidos al azar en la superficie del callo no embriogénico.

La parte embriogénica del callo crece de forma más lenta que el callo no embriogénico y puede ser mantenida en cultivo por largos períodos de

tiempo, mediante la selección cuidadosa y el subcultivo de los sectores embriogénicos.

2.3.2.2. Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas.

El establecimiento y multiplicación de un cultivo de células embriogénicas en suspensión, puede lograrse del tejido seleccionado a partir de inóculos, tales como: tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemos apicales, ovarios, fragmentos de cotiledones, embriones cigóticos, tubérculos, filamentos de anteras, fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993), transfiriendo porciones de callos friables o callos con estructuras embriogénicas en estado globular, al medio de cultivo líquido (Gómez, 1998).

Durante esta fase inicial, al dividirse las células, el cultivo queda compuesto por células aisladas, agregados celulares de diversos tamaños, fragmentos residuales del inóculo y reminiscencias de células muertas (Carman, 1990).

El cultivo de una suspensión celular queda establecido después de un período de adaptación en el medio de cultivo líquido, donde se pueden apreciar agregados celulares que se caracterizan por poseer células embriogénicas pequeñas, esféricas, con contenido citoplasmático denso, vacuolas pequeñas, gránulos de almidón y una alta relación núcleo/citoplasma. Según De Vries *et al.* (1988), estas características se consideran como un indicativo de la condición embriogénica de las suspensiones celulares.

Una vez establecida la suspensión celular embriogénica, es indispensable determinar cuál es el momento en que las células han agotado los componentes del medio de cultivo, o al menos algunos de ellos, debido a su crecimiento y metabolismo, para lo cual mediante una curva de crecimiento celular se determinan los intervalos de subcultivo a realizar a medio de cultivo fresco, para que las células continúen sus procesos fisiológicos normales (Gómez, 1998).

2.3.2.3. Formación y multiplicación de los embriones somáticos.

Para inducir la formación de los embriones somáticos, es necesario reducir en el medio de cultivo las concentraciones de auxinas, o usar tipos menos fuertes, e incluso, sin la presencia de estas fitohormonas, especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas.

Uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática es que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkle *et al.*, 1995). Estos procesos de multiplicación han recibido varios términos, como embriogénesis secundaria, recurrente o repetitiva (Gómez, 1998).

2.3.2.4. Maduración y germinación de los embriones somáticos.

La fase de maduración es el período en el desarrollo de los embriones somáticos en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y adquieren tolerancia a la desecación (Parrott, 1993). En esta fase, juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, por lo que es necesaria la adición al mismo de nitratos, amonios, aminoácidos y caseína hidrolizada.

Los niveles de sacarosa (30-60 g.L⁻¹) favorecen la maduración de los embriones somáticos por dos razones, la primera de ellas es que bloquea la germinación precoz de los embriones y la segunda porque resulta ser un excelente proveedor de carbohidratos, que son utilizados para el crecimiento del embrión, la respiración y la acumulación de carbohidratos de reserva (Merkle *et al.*, 1995).

La adición de ABA durante la etapa de maduración del embrión, promueve la acumulación de sustancias de reserva, que seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos y también previene la germinación precoz (Attree *et al.*, 1991; Karkonen, 2000).

La correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en el peso seco de los embriones somáticos, lo que indica una alta calidad en su vigor e influye positivamente en su posterior germinación (Fuji *et al.*, 1990).

La germinación hace referencia al desarrollo de raíces y brotes, mientras la conversión es la supervivencia de estos propágulos en condiciones *ex vitro* (Stuart y Strickland, 1984).

También juegan un papel importante en la germinación, la adición de citoquininas en el medio de cultivo, las cuales contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y proliferación (Rashid, 1988).

2.3.3. Embriogénesis somática en *Musa* spp.

Los primeros ensayos exitosos en la embriogénesis somática de *Musa*, se lograron cuando usaron embriones cigóticos inmaduros, para inducir el proceso embriogénico de cultivares diploides de especies silvestres (Cronauer y Krikorian, 1988; Escalant y Teisson, 1989).

Luego en cultivares de importancia económica (triploides), Novak *et al.*, (1989), obtuvieron suspensiones celulares y su posterior regeneración de plantas a partir de callos con estructuras embriogénicas de explantes de tejidos foliares y del rizoma, aunque con respuesta embriogénica inferior al método mencionado anteriormente. Su uso en genotipos cubanos de constitución genómica ABB, permitió la obtención de 8,0% de callos con estructuras embriogénicas (López *et al.*, 1995).

Por otra parte, Dheda *et al.*, (1991), desarrollaron una metodología a partir de multiyemas (meristemas proliferantes), de las cuales tomaron su parte superior de 4-5 mm de diámetro (scalps) para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas en el cv. "Bluggoe" (ABB), la misma fue mejorada y generalizada a otros genotipos por Schoofs (1997).

También en el mismo año 1991 a partir de inflorescencias masculinas inmaduras, Ma (1991) obtuvo embriogénesis somática, la cual fue ampliamente generalizada por Escalant *et al.*, (1994) para varios cultivares

de *Musa* que presentan durante todo su desarrollo floral la inflorescencia masculina persistente. Gómez *et al.*, (2002), Con el uso de esta metodología y la multiplicación de los embriones somáticos en biorreactores en el cultivar 'FHIA 18', lograron incrementar la producción de los embriones somáticos.

La limitante de este método está dada porque sólo puede utilizarse en genotipos que poseen las inflorescencias masculinas persistentes, presentes en la gran mayoría de los plátanos frutas.

Más reciente, López *et al.*, (2005) desarrollaron una metodología para la embriogénesis somática de cultivares de plátanos viandas que no poseen la inflorescencia masculina durante todo el desarrollo floral de la planta. La misma se basó en el uso de ápices de brotes de yemas axiliares como explante inicial para inducir el proceso embriogénico.

2.4. Variación somaclonal.

El término de variación somaclonal fue introducido por Larkin y Scowcroft, (1981), para describir la variación genética en plantas regeneradas de cualquier tipo de cultivo celular. Según Jain *et al.*, (1998), ésta puede estar condicionada por la ocurrencia de uno o varios factores que actúan de forma simultánea en el cultivo "*in Vitro*". La misma ocurre en plantas regeneradas de tejidos adventicios (Hussey, 1983), mientras que, los cambios epigenéticos pueden también observarse en las plantas de meristemas pre-existentes (De Cleark, 1990).

2.5. Estabilidad genética de las plantas regeneradas por cultivo *in vitro*.

En la estabilidad genética de las plantas procedentes del cultivo *in vitro*, varios factores pueden influir. Dentro de éstos se encuentran: la variabilidad genética del cultivar o genotipo que va a ser propagado, la composición del medio de cultivo, la elección del explante que se utilizará, así como el grado de diferenciación de sus tejidos y el tiempo de permanencia *in vitro* del cultivo (Smith, 1988). Jain *et al.*, (1998), plantearon que los mecanismos de la variación somaclonal no están totalmente claros y probablemente se deben a cambios en el número y estructura de los cromosomas, reordenamientos

cromosómicos, deleciones, transposones, ampliación y mutilación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Los cambios epigenéticos también ocurren frecuentemente y se ha demostrado que este tipo de variación no segrega a la progenie, ni cumple las leyes de la herencia (Pérez, 1987).

Las variaciones somaclonales más observadas en los plátanos y bananos han sido: cambios en altura, color, follaje, morfología del pseudotallo y los órganos reproductivos. Vuylsteke *et al.*, (1991) y Dhed'a *et al.*, (1991), fueron los primeros autores en hacer referencia a la variación somaclonal de las plantas del género *Musa*, regeneradas a partir de suspensiones celulares.

Con el objetivo de estudiar la estabilidad genética de las plantas producidas por cultivo *in vitro*, se han aplicado varias técnicas como: técnicas de huellas genéticas de ADN (Kaemmer *et al.*, 1992); características fenotípicas (Smith y Hamill, 1993; Sandoval *et al.*, 1997); técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (Damasco *et al.*, 1996); marcadores de secuencias de microsatélites (Lagoda *et al.*, 1998); tratamientos con ácido giberélico (Sandoval *et al.*, 1999) y Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) (Herrera, 2000; Engelborghs *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de los avances alcanzados al respecto, ninguno de estos métodos por si solos, sustituyen el estudio en campo de las plantas regeneradas, sino que los complementan.

Los conocimientos desarrollados en el cultivo de los plátanos y el uso de las técnicas de cultivo de tejidos, han permitido la multiplicación de plantas de varios cultivares. Sin embargo, en el caso de la embriogénesis somática, a pesar de que se han descrito varias metodologías para su desarrollo, existe muy poco conocimiento del comportamiento de las poblaciones de embriones en campo en cultivares AAB, lo cual hace que sea necesario continuar el estudio de esta temática.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Descripción.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, provincia de Villa Clara, al cual se hará referencia en lo adelante como Laboratorio de Biotecnología y en la Biofábrica de Cienfuegos, ubicado en Carretera a Palmira Km 4, perteneciente a la UEB Semillas, provincia de Cienfuegos, referida en el texto posterior como Biofábrica.

Se utilizó el cv. de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30', de recién introducción



en la estructura clonal del plátano vianda en Cuba (Figura 1), lo cual hace que sea necesario disponer de nuevas alternativas para su propagación vegetativa como la embriogénesis somática para obtener mayores coeficientes de multiplicación, con relación a la propagación por ápices meristemáticos y tradicional por cormos.

Figura 1. Cultivar 'INIVIT PV 06-30'

Las plantas donantes de explantes utilizadas proceden del Banco de Germoplasma del INIVIT. El mismo pertenece al grupo AAB, subgrupo

Plantain, denominado en Cuba como plátano macho o vianda (López, 1989). La planta alcanza una altura media de 226 cm, y diámetro del pseudotallo de 51,63 cm. Ahijamiento escalonado con una media de tres hijos por planta. El racimo promedia una longitud de 17,0 cm con seis manos y más de 30 plátanos, susceptible a la enfermedad “Sigatoka negra Ventura (2011). Su inflorescencia masculina se caracteriza por poseer escasas flores masculinas en la madurez, tipo Pseudo-horn (González, 2005).”

3.2 Procedimientos generales.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en la autoclave a 121° C y 1,2 kg. cm² de presión, por tiempos que variaron en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según información técnica de la firma SIGMA (1991). La zeatina se esterilizó por filtración a través de filtros (0,22 µm) de acetato de celulosa SARTORIUS.

La cristalería y otros accesorios empleados en la siembra y manipulación de las suspensiones celulares, fueron esterilizadas en estufa a 180° C durante dos horas. En el Laboratorio de Biotecnología el instrumental (pinzas, espátulas y bisturíes), se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar, donde se realizó el manejo de los materiales biológicos (establecimiento, subcultivos y cambios de medios de cultivo) y en la Biofábrica el instrumental anteriormente referido se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v) durante 15 minutos (Agramonte *et al.*, 1993).

Según la fase de desarrollo de la embriogénesis somática, se emplearon tubos de ensayos (50 x 25 mm) con 10 ml, los frascos de cristal (250 ml), con 30 ml y placas Petri (80 x 15 mm) con 15 ml de medio de cultivo los cuales se especifican en cada caso. El pH fue ajustado con NaOH 0,5 N y HCl 0,5 N, antes de la esterilización en autoclave.

Los frascos de cultivo utilizados en el Laboratorio de Biotecnología se colocaron en una cámara de cultivo a una temperatura de $27 \pm 2,0^{\circ}$ C e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62 – 68 μm , o a la oscuridad, lo que se especifica en cada caso. En Biofábrica la incubación se realizó en estantes bajo luz natural y con temperatura de $27 \pm 2^{\circ}$ C.

3.3 Establecimiento *in vitro* de los ápices.

El establecimiento *in vitro* de los explantes utilizados para el desarrollo de la embriogénesis somática y para la multiplicación por organogénesis como control se realizó en el INIVIT a partir de plantas en floración, previamente seleccionadas con buen estado fitosanitario y nutricional. Se seleccionaron hijuelos tipo “espada”, con una altura entre 25 y 30 cm, los cuales fueron llevados a condiciones semicontroladas en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán) , que permitía el paso de una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El riego se realizó por microaspersión mediante el sistema microjet, lo cual garantizó una humedad relativa del 85 – 90%. Transcurridos 45 días, se eliminaron las partes más

externas del cormo y las vainas foliares, hasta obtener secciones con el ápice caulinar de aproximadamente 5 cm de largo y 2,5 cm de diámetro.

Se realizó una primera desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCL) al 3,0% (v/v) durante 20 minutos, seguido por tres lavados con agua desionizada estéril durante cinco minutos cada uno. En cabina de flujo laminar se redujo el tamaño de estas secciones hasta unos 2,0 – 3,0 cm de altura con una base cuadrada de 1,5 cm aproximadamente, seguido de una segunda desinfección por espacio de 10 minutos con NaOCl al 2,5% (v/v) y tres lavados de dos minutos cada uno con agua destilada estéril. Luego se redujo su tamaño hasta obtener un ápice de aproximadamente 0,5 cm². El establecimiento de los mismos se realizó en el medio de cultivo MS (1962) enriquecido con ácido indolacético (AIA) a 0,88 mg.L⁻¹, 6- BAP (1,13 mg.L⁻¹, sacarosa (40 g.L⁻¹), tiamina (1,0 mg.L⁻¹) y pH 5,8 en estado líquido según López (1999), durante 18 días.

3.4 Desarrollo de la embriogénesis somática.

Una vez establecidos *in vitro* los ápices meristemáticos, descrito en el epígrafe anterior 3.3, se desarrolló la embriogénesis somática en el Laboratorio de Biotecnología, con el objetivo de disponer de la cantidad necesaria de embriones somáticos, para la realización de los experimentos, que se relacionan en los epígrafes siguientes.

La metodología objeto de estudio utilizada fue la desarrollada por López (2007) a partir de ápices de brotes de yemas axilares (Tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivos utilizados según la etapa de desarrollo de la embriogénesis somática propuesto por López (2007).

	Medio de Multiplicación P5-0,2	Medio de callo y suspensiones ZZ	Formación de embriones RD1	Maduración de embriones	Germinación de embriones
Fuente	López (2006)	Dheda <i>et al.</i> (2001)	Dheda <i>et al.</i> (2001)	López (2006)	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Macro-Elementos	MS	MS ½	MS ½	MS	MS
Micro-Elementos	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS
Ácido Áscorbico	10	10	10	10	10
Myo-inositol	100	100	100	100	100
AIA	0,17	-	-	2	2
2,4-D	-	1	-	-	-
BAP	2,25	-	-	-	0,5
Zeatina	-	0,22	-	0,22	-
Ancimidol	0,2-0,4	-	-	-	-
Sacarosa	30 000	30 000	30 000	45 000	30 000
Pytagel	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Como control de la misma, para evaluar la estabilidad genética de las plantas regeneradas por embriogénesis somática se utilizó la metodología descrita por Dheda *et al.* (1991) y mejorada por Schoofs (1997) a partir de scalps de multiyemas, también según la Guía Técnica No.8 de INIBAP para

el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano (Strosse *et al.*, 2003).

Posteriormente después de obtenidos los embriones somáticos germinados por ambas metodologías fueron llevados a Biofábrica para su escalado.

3.5 Escalado en Biofábrica de la propagación por embriogénesis somática

Una vez obtenidos los embriones somáticos germinados a partir de los ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial para inducir la embriogénesis somática en el laboratorio de investigación, los mismos fueron llevados a la Biofábrica de Cienfuegos. El objetivo de este experimento fue evaluar durante tres subcultivos el coeficiente de multiplicación de los mismos en comparación con la propagación por organogénesis por ápices meristemáticos (del mismo cultivar objeto de estudio) que se desarrolla en las Biofábricas del país, para lo cual fueron evaluados 60 explantes de cada procedencia.

Se evaluó el coeficiente de multiplicación durante tres subcultivos de los embriones producidos a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares. En el caso de los embriones somáticos procedentes del explante inicial de scalp de multiyemas no se subcultivaron en la Biofábrica, solo se utilizó como control del experimento de campo. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de hipótesis para muestras independientes (T-Student), los niveles de significación establecidos fueron: significativo para $p < 0,05$ y altamente significativo para $p < 0,01$.

3.6 Comportamiento en campo de las plantas obtenidas de embriones somáticos.

Los embriones somáticos multiplicados en la Biofábrica y obtenidos partir de ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial para inducir el proceso embriogénico, se llevaron a condiciones ambientales *ex vitro* conjuntamente con embriones somáticos producidos a partir de la metodología de los scaps meristemáticos de multiyemas (estos últimos como control de la embriogénesis en plátano vianda). Además fueron incluidos también como control plantas provenientes de la propagación por organogénesis (ápices meristemáticos), ampliamente utilizada en la propagación *in vitro* y yemas de cormos proveniente de la propagación convencional en campo.

La fase de aclimatización se desarrolla según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999) en condiciones semicontroladas en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), que logra una reducción de la intensidad luminosa del 70%.

El riego se realiza por microaspersión mediante sistema Microjet con una frecuencia de seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno. Se garantiza una humedad relativa del 85- 90%.

Las plántulas procedentes de los embriones somáticos de ambas metodologías y de la propagación por organogénesis permanecieron en la Fase de aclimatización 60 días.

Para la fase de vivero de las yemas procedentes de cormos (utilizadas como control) fueron plantadas en bolsas de polietileno, con un sustrato compuesto por el 60% de suelo y el 40% de humus de lombriz.

Posteriormente se transfieren a campo 1 000 plantas de cada tratamiento con el objetivo de evaluar la variabilidad fenotípica que se podría producir en campo por las metodologías de propagación estudiadas.

La plantación se realizó en la CCS: Ernesto Che Guevara ubicada en carretera a Arriete km 1 Municipio Palmira Provincia Cienfuegos en un suelo pardo sialítico cálcico carbonatado, según la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba (Hernández *et al.*, 1999). La distancia de plantación utilizada fue de 3,60 x 1,20 m según Rodríguez *et al.* (2002)

Las demás atenciones culturales se llevaron a cabo según lo recomendado por el Instructivo Técnico para el cultivo del plátano (MINAGRI, 2007).

La frecuencia de variantes fenotípicas (%) con respecto a las plantas normales, se evaluó a los seis meses de la plantación para ambos ciclos en campo y en el momento de la cosecha cuando se evaluaron los principales componentes del rendimiento, según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997), tales como:

Variaciones fenotípicas observadas a los seis meses y momento de la cosecha:

- ◆ Hojas Variegadas

- ◆ Cambio de coloración en el pseudotallo.
- ◆ Plantas con pseudotallo fino y cambio en el racimo
- ◆ Regresión del racimo de pseudo Horn a French

Variables vegetativas en el momento de la cosecha

- ◆ Altura de la planta, medida desde la base hasta la inserción en forma de V de las últimas hojas emitidas (m).
- ◆ Diámetro del pseudotallo, medido a un metro de la base de la planta (cm).

Variables de producción en el momento de la cosecha:

- ◆ Peso del racimo (kg).
- ◆ Número de manos del racimo.
- ◆ Número de dedos por racimos

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza, complementado con un MANOVA para el conjunto de ellos. Para la comparación múltiple de medias se aplicó Dunnett's C cuando no se encontró homogeneidad de varianza y cuando ocurrió lo contrario se aplicó la prueba de SNK paramétrico, con un nivel de significación de $p < 0,05$, lo cual se especifica en cada tabla de los resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Desarrollo de la embriogénesis somática.

Al inocular los ápices de brotes de yemas axilares durante 14 semanas en el medio de cultivo ZZ de consistencia semisólida (Schoofs, 1997) se logró un 25% de formación de callos con estructuras embriogénicas (Figura 2). Los mismos se caracterizaron por estar formados de estructuras meristemáticas de color amarillo (callo nodular), con y sin formación de embriones somáticos en la superficie de las estructuras referidas anteriormente, hasta la obtención de una masa de embriones somáticos similares a los descritos por Dheda *et al.* (1991) Schoofs (1997), Barranco (2001), Cabrera *et al.* (2002) y López *et al.*, (2005).

Luego, a partir de los embriones somáticos globulares obtenidos de los callos se logró el establecimiento de tres suspensiones celulares embriogénicas (de seis Erlenmeyers de 25 mL) inoculadas en el medio de cultivo ZZ de consistencia líquida) a los 30 días de cultivo. La suspensión con el número de agregados embriogénicos de $27,8 \times 10^4$ y de sedimentación rápida, se utilizó para continuar el desarrollo todo el trabajo experimental.

Según Schoofs *et al.* (1999), no todo complejo embriogénico dará una buena suspensión celular y señalan a su vez, que la tasa exitosa para los complejos derivados de las multiyemas es uno de dos o uno de cinco, lo cual confirma los resultados del presente trabajo.

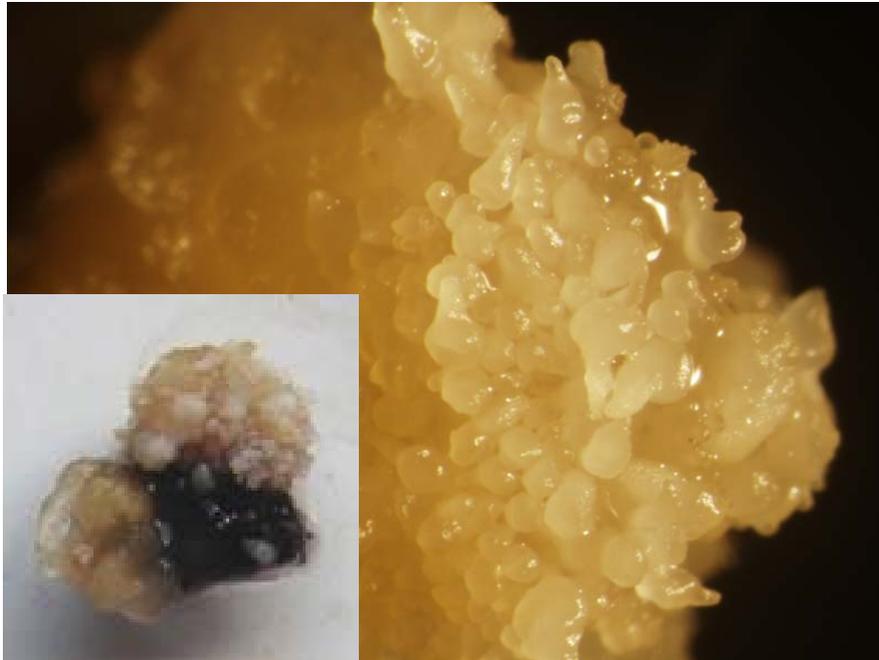


Figura 2. Callos con estructuras embriogénicas formadas en el medio de cultivo ZZ con $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de 2,4 – D a las 14 semanas de cultivo a partir de ápices de brotes de yemas axilares en el cv. ‘INIVIT PV 06-30’.

Durante esta primera etapa de la embriogénesis somática se pudo apreciar el desarrollo de agregados celulares, a medida que se realizaron los subcultivos la cantidad de células aisladas y parenquimatosas disminuyeron a valores casi nulos, lográndose suspensiones celulares homogéneas (medio de cultivo ZZ líquido) a los 30 días de cultivo. Las mismas se caracterizaron por poseer células embriogénicas aisladas y en forma de agregados celulares, constituidos por células embriogénicas pequeñas y esféricas (Figura 3). La multiplicación celular posterior incrementó la biomasa celular

de 1,5 a 2 mL de volumen de células total, mostrándose una fase de crecimiento exponencial, bien definida y continua que propició duplicar el volumen celular cada 15 días de cultivo.

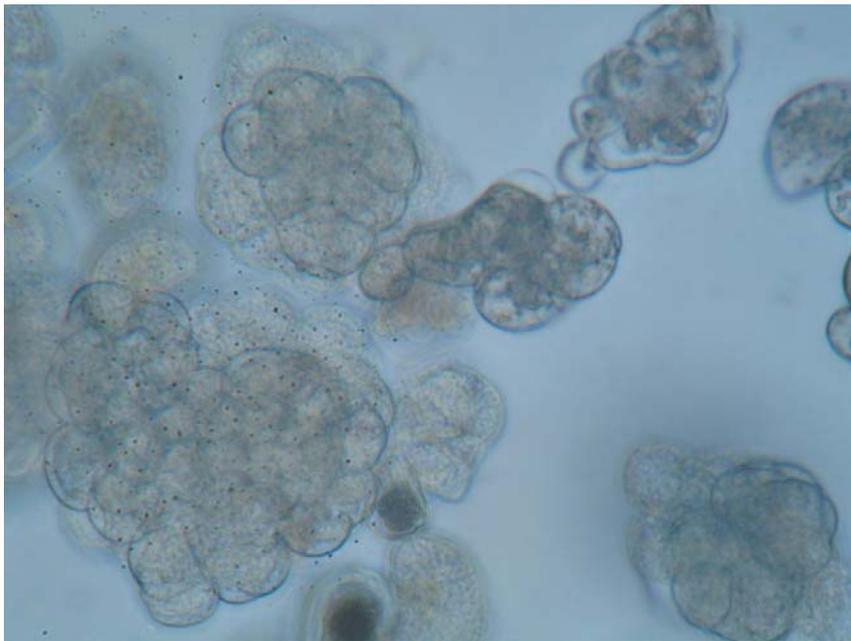


Figura 3. Agregados celulares embriogénicos durante la fase de multiplicación celular de las suspensiones celulares embriogénicas obtenidas a partir de embriones somáticos de callos con estructuras embriogénicas, cv. 'INIVIT PV 06-30'.

La formación de los embriones somáticos (Figura 4) se observó a los 45 días a partir de las suspensiones celulares (de dos a tres gotas de suspensión) inoculadas al 12% de Volumen de Células Sedimentadas en el medio de cultivo RD1 (Schoofs, 1997), obteniéndose la cantidad de 1200 embriones

somáticos por muestras inoculadas y colocadas a madurar posteriormente. Luego los embriones somáticos colocados a madurar durante un mes en el medio de cultivo de maduración MS suplementado con $0,22 \text{ mg/L}^{-1}$ zeatina según López (2007), maduraron el 48%, lo que represento 1200 embriones maduros (48%), los cuales mostraron una invaginación de forma circular con el centro opaco y la presencia de una zona meristemática densa, similares a las descritas por Dhed'a *et al.* (1991) (Figura 5), los cuales evolucionaron asimétricamente formando un domo apical con primordios de hojas y una

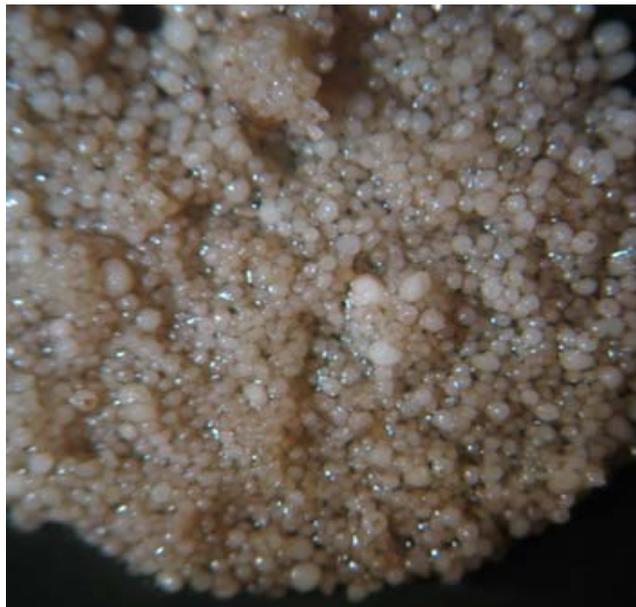


Figura 4. Embriones somáticos formados del cv. 'INIVIT PV 06-30' a los 45 días de su cultivo.

región de corona por donde se desarrollaron las raíces iniciales, característico de especies monocotiledóneas (Natesh y Rau, 1984), lo cual posibilito la germinación de los embriones somáticos (Figura 5) en el medio

de cultivo de Germinación de embriones constituido por 2 mg/L^{-1} de AIA y $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$ de BAP según Gómez *et al.* (2000), lo cual represento un 85% de embriones germinados (1020 embriones germinados).

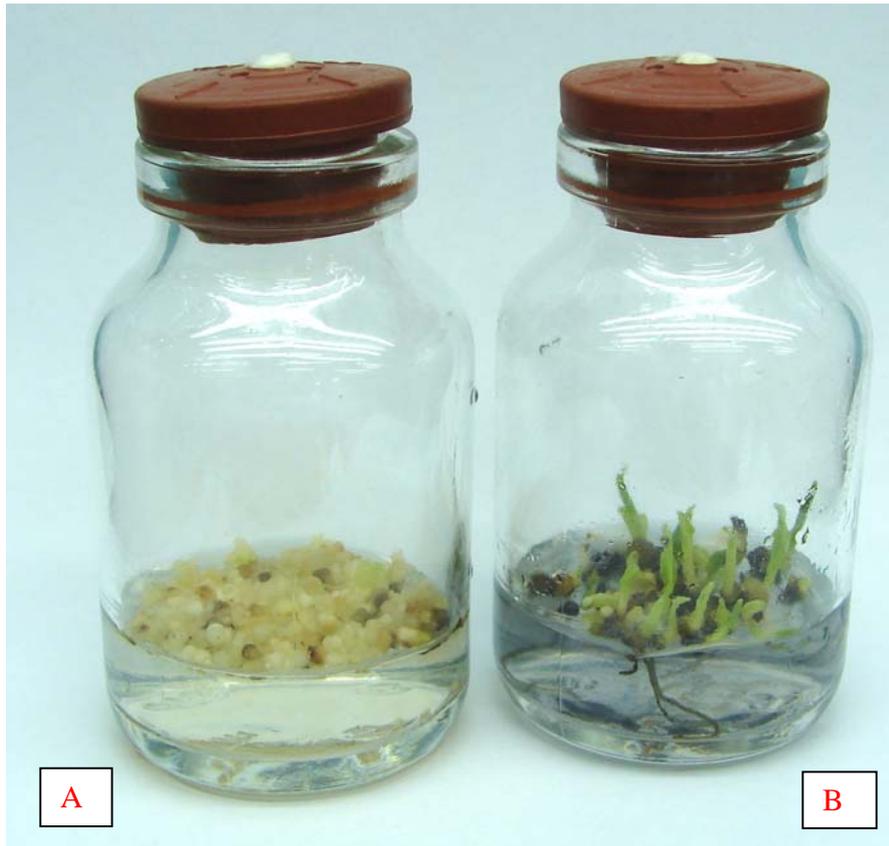


Figura 5. Embriones somáticos maduros (A) y germinados (B) del cv. 'INIVIT PV 0630' a los 30 días de su cultivo en cada etapa.

Los resultados de la investigación en esta primera etapa desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología y resumidos en la Tabla 2 en el cultivar objeto de estudio, permitieron llevar a la Biofábrica los embriones somáticos producidos para continuar su escalado para la producción de “semillas”.

Tabla 2. Resultados alcanzados por la metodología desarrollada para la regeneración de plantas por embriogénesis somática en el cv. 'INIVIT PV 06-30'.

Etapas de Desarrollo	Resultado	Duración (meses)
Obtención del explante	Ápices de brotes de yemas axilares	3
Inducción de la embriogénesis somática	Callos con estructuras embriogénicas (25%)	3
Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas	Suspensión establecida con $27,8 \times 10^4$ agregados embriogénicos con sedimentación rápida	1
Multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas	Incremento de la biomasa celular de 2mL de volumen de células sedimentadas por Erlenmeyer	4 (cada 15 días)
Formación de embriones somáticos	2500 embriones en dos o tres gotas de suspensión celular	45 días
Maduración de los embriones somáticos	1200 embriones maduros (48%)	1
Germinación de los embriones	1020 embriones germinados (85%)	1

4.2 Escalado en Biofábrica de la propagación por embriogénesis somática

Luego de realizado tres subcultivos en al Biofábrica se detectaron diferencias desde el punto de vista estadístico en cada uno de los subcultivos.

Como se puede apreciar en la Tabla 3 en cada subcultivo evaluado los embriones somáticos alcanzaron mayor coeficiente de multiplicación siendo el mayor coeficiente en este tipo de explante 3,44 brotes.

Tabla 3. Coeficiente de multiplicación obtenido en la Biofábrica durante tres subcultivos en el cv. 'INIVIT PV 06-30'.

Tratamientos	Subcultivos realizados		
	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
Organogénesis	2,50	2,80	2,40
Embriones	3,44	3,44	3,16
T-Student	-3,59*	-8,59**	-3,63*

4.3 Comportamiento en campo de las plantas obtenidas de embriones somáticos.

Al evaluar las características de las plantas provenientes de los embriones somáticos, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, se observó que el porcentaje de supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatización fue superior al 96,0% en los tres tipos de materiales evaluados (embriones somáticos procedentes de scalps de multiyemas como explante inicial 96,0%, embriones somáticos de ápices de brotes de yemas axilares como explante inicial 97,0% y control de organogénesis 97,0%).

Transcurridos 60 días en esta fase y previo a su transplante a campo, al evaluar la variación somaclonal correspondiente a manchas irregulares de las hojas (hojas variegadas), fue de 0,3% en las plantas obtenidas por

embriones somáticos del explante inicial de yemas axilares como explante inicial y del 0,8% en las plantas derivadas de los embriones somáticos a partir de scalps de multiyemas como explante inicial.

En el caso de las plantas utilizadas como control, se observó el 0,6% de la variación anterior. Este tipo de variante somaclonal fue descrita por Reuveni e Israeli (1990) como “*axilares mosaic-like*” y señalaron que la misma representó el 10,0% de todas las variaciones.

Schoofs *et al.* (1998), con el uso de scalps de multiyemas como explante inicial para la inducción de la embriogénesis somática, observaron a nivel de fase de aclimatización 1,8% de plantas fuera de tipo del cultivar ‘William’ (AAA, Cavendish”)

Cote *et al.* (2000), durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cultivar ‘Gran Enano’ (AAA), observaron hojas variegadas, que ocuparon del 0,5–1,3% de la población y señalaron, además, que cuando estas plantas fueron llevadas a campo, desapareció este cambio morfológico, quizás debido a cambios epigenéticos que ocurrieron.

López *et al.*, (2004) y López (2007), al utilizar el cultivar Navolean observo la variación somaclonal correspondiente a hojas variegadas (0,4%), en las plantas obtenidas por embriones somáticos de yemas axilares como explante inicial y organogénesis durante la Fase de Aclimatización, las cuales desaparecieron durante su estudio en campo.

Otros tipos de variantes somaclonales no fueron observadas en las plantas objeto de estudio, sin embargo, Sandoval *et al.* (1997), afirmó que en esta fase solamente se puede detectar alrededor de un 60,0% de variantes somaclonales, o sea, que no quiere decir que no hayan estado presentes, lo que hace necesario continuar las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar su ciclo de desarrollo.

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en campo, las observaciones fenotípicas que se realizaron (seis meses de la plantación y momento de la cosecha) permitieron determinar otros cambios morfológicos entre las plantas regeneradas por embriogénesis somática y los controles utilizados (propagación por ápices meristemáticos y yemas de cormos).

La frecuencia total de variación somaclonal en las plantas procedentes de embriones somáticos del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares fue de 1,4% y de 16,5%, en las plantas regeneradas de embriones somáticos de scalps de multiyemas como explante inicial (Tabla 4). La variante somaclonal de plantas con pseudotallos finos y racimos deformados con solo dos o a tres manos fue la que mayor porcentaje alcanzó (16,5%), en las plantas regeneradas de los embriones somáticos que se produjeron del explante inicial de scalps de multiyemas. En el caso de los controles utilizados, las variaciones estuvieron presentes de 0,9% (yemas de cormos) a 1,2% (organogénesis). Una muestra de las variaciones somaclonales observadas se puede observar en la Figura 6.

Tabla 4. Variantes fenotípicas observadas en las plantas obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y yemas de cormos durante el primer ciclo vegetativo en campo del cv. 'INIVIT PV 06-30'.

Tipo de variante	Embriogénesis somática (%)			
	A BY	Scalps	Organogénesis (%)	Cormos (%)
Hojas Variegadas.	0,7	1,5	0,9	0,0
Cambios de coloración pseudotallo	0,2	1	0,6	0,0
Plantas con pseudotallo fino y cambio en el racimo.	0,2	12	0,0	0,0
Regresión del racimo de pseudo Horn a French	0,3	2	0,2	0,9
Cambios totales	1,4	16,5	1,2	0,9

Leyenda: ABY, Ápices de brotes de yemas axilares, Scalps, Scalps de Multiyemas;



Figura 6. Variaciones fenotípicas observadas en el racimo (racimo horizontal de pocas manos (izquierda) y racimo tipo Hembra (Derecha)) durante el primer ciclo del cultivo en el campo del cv. 'INIVIT PV 06-30' regenerado por organogénesis y embriogénesis somática.

López (2007), al estudiar la metodología de los ápices de brotes de yemas axilares en el cultivar 'Navolean' obtuvieron 1,1% de variación total y 0,5% con relación al control de plantas micropropagadas que utilizaron. Al parecer, el incremento de las variaciones que se encontraron cuando se utiliza la metodología de los (scalps de multiyemas) pudo estar influido por el uso de este tipo de explante.

Según Scowcroft (1984), el uso de las yemas adventicias produce mayor inestabilidad genética que cuando es utilizada la yema axilar en la multiplicación de plantas.

Al respecto, Dhed'a *et al.* (1991), al utilizar los scalps de multiyemas para el desarrollo de suspensiones celulares en el cultivar 'Bluggoe' (ABB), observaron entre 5,0 v 10% de embriones somáticos anormales.

Schoofs *et al.* (1999), señalaron como un caso extremo de plantas fuera de tipo, el número excesivamente alto (597/600) de la variante somaclonal denominada hojas largas y estrechas, en las plantas que se obtuvieron del cultivar 'Williams' (AAA "Cavendish"), a partir de suspensiones celulares embriogénicas que se derivan de scalps de multiyemas.

Otros autores como Grapin (1995), señalaron de un 16 – 22,1% de variantes somaclonales, a partir de suspensiones celulares de inflorescencias masculinas en el cultivar 'French Sombra' (AAB). Shchukin *et al.* (1998), obtuvieron valores entre 1,6 – 7,9% de variantes somaclonales en el cultivar 'Gran Enano' (AAA), cuando emplearon este mismo sistema de regeneración de plantas. Gómez *et al.* (2006), obtuvieron un total de 0,13% de variación fenotípica de plantas provenientes de embriones somáticos en el cultivar 'FHIA -18'.

Probablemente, las variaciones observadas estuvieron relacionadas con la fase de preparación extensa de subcultivos, en medio de cultivo P4 con alta concentración de 6-BAP (22,5 mg.L⁻¹), para obtener los explantes de multiyemas. Este tratamiento, aplicado al cultivar 'Nakitengwa' (AAAB), no sólo generó plantas aneuploides anormales procedentes de las suspensiones, sino también de un testigo en medio de cultivo P4.

Relacionado con el empleo de altas concentraciones de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo, Sahijram *et al.*, (2003), afirmaron que, los reguladores del crecimiento y en especial el 6- BAP, deben ser utilizados

en cantidades mínimas necesarias, para disminuir la aparición de variaciones somaclonales en los programas de propagación in vitro.

Otros autores como, Reuveni *et al.* (1986) consideraron que la utilización de este explante (multiyemas) para la inducción de la embriogénesis somática presentó el inconveniente de constituir una fuente de variación genética, debido al origen de su formación.

Según Vuylsteke y De Langhe (1985), la formación de multiyemas o yemas adventicias puede estar asociada a la formación “de novo” de yemas, a partir de meristemas pre-existentes o tejido no meristemático, los cuales se originaron de una o de un grupo de células, cuando se cultivaron los explantes en medios de cultivo con concentraciones elevadas de citoquininas. Referente a lo anterior, Banerjee *et al.* (1986), demostraron el origen adventicio en *Musa spp* de brotes similares a los que se obtuvieron en el medio de cultivo P4, los cuales fueron caracterizados como estructuras semejantes a yemas.

López *et al.*, (2005) en el cultivar ‘Navolean’ observaron, que del total de variantes somaclonales de plantas regeneradas de embriones somáticos, durante el primer ciclo de evaluación en campo, sólo se observó en el segundo ciclo de cultivo la regresión al plátano tipo French, en las plantas obtenidas de las suspensiones celulares embriogénicas de scalps de multiyemas como explante inicial y representó el 8,6% de las plantas evaluadas. Al respecto, Vuylsteke (2001), señaló que, este tipo de variante

somaclonal de inflorescencia, se mantuvo estable en los plátanos viandas, lo cual sugiere que esta variación fue de origen genético.

Por el contrario, las variaciones con hojas variegadas o con limbos deformados tienden a retroceder en su segundo ciclo de cultivo y hasta en el primero (Israeli *et al.*, 1995).

El enanismo se presenta, como una de las variaciones más comunes en banano (Reuveni *et al.*, 1986; Stover, 1987); sin embargo, en esta investigación no se observó esta variación. También Vuylsteke *et al.*, (1988), obtuvieron un total de variación de 6,0% en el cultivar 'Agbagba' (AAB), sin la presencia del enanismo entre las variaciones detectadas.

Según Stover (1987), las plantas de bananos con menos del 5,0% de plantas fuera de tipo, son consideradas comercialmente aceptables.

El análisis estadístico realizado a las características vegetativas y del racimo, arrojó una significación de la T – de Hotelling menor que 0,05, lo que demostró que hay diferencias en los resultados que se obtuvieron integralmente, en el conjunto de variables que se analizaron con respecto a la procedencia de las plantas. Las tablas que se presentan a continuación, se elaboraron atendiendo a los criterios de rangos de las pruebas aplicadas para cada una de las variables, las cuales no todas tuvieron el mismo nivel de significación en cada análisis univariado correspondiente.

Las plantas procedentes de embriones somáticos, mostraron hábitos de crecimiento similares a las plantas que se obtuvieron de los ápices meristemáticos (organogénesis). Difieron significativamente las plantas

provenientes del cultivo *in vitro*, de las plantas que se obtuvieron a partir de yemas de cormos (Tabla 5)

Tabla 5. Comportamiento de las características vegetativas de las plantas del cv. 'INIVIT PV 06-30' obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y procedentes de yemas de cormos en condiciones de campo durante su primer ciclo.

Tratamientos	Altura de la planta (m)	Diámetro del pseudotallo (cm)
ES ABY	2,50a	50,71a
ES SM	2,45a	50,30a
Organogénesis	2,46a	50,67a
Yemas de cormos	2,10b	49,10b
ES \pm	0.06*	0.19*
	DC	SNK

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett C (DC) y Student-Newman-Keuls (SNK) según se indica.

Leyenda: ES, embriogénesis somática; S M Scalps de Multiyemas; ABY, Ápices de brotes de yemas axilares.

Con relación a la altura de la planta que se obtuvo *in vitro* se mantiene entre 2,50 y 2,45 m, a diferencia de las plantas procedentes de yemas de cormos, que solo alcanzaron una altura de 2,10 m, significativamente menor, que el resto de las plantas que se evaluaron. También, en las plantas procedentes de yemas de cormos, se obtuvieron los resultados más bajos, para los casos del diámetro del pseudotallo (49,10).

Este incremento de las variables que se evaluaron a favor del cultivo de tejido, puede estar relacionado con el rejuvenecimiento fisiológico que se produce *in vitro*, al perder el tejido la señal que poseía de la planta madre, siendo esta pérdida más rápida a medida que el explante sea más pequeño, esto se manifiesta con un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas (Pérez, 1998).

Gómez *et al.* (2006), obtuvieron características similares en la altura de la planta y el diámetro del pseudotallo de embriones somáticos, propagados en un biorreactor (cv. 'FHIA- 18') con relación a las plantas propagadas por ápices.

Al evaluar las características del racimo (Tabla 6), peso del racimo como componente principal del rendimiento, se observó que las plantas procedentes de los embriones somáticos de ápices de brotes de yemas axilares tuvieron el mismo comportamiento que las plantas propagadas por organogénesis sin diferencias significativas entre ellas (18,84 y 15,51 kg por planta respectivamente).

Luego le siguió en orden decreciente las plantas provenientes de yemas de cormos (12,07 kg) y por último las plantas provenientes de los embriones somáticos del explante inicial de multiyemas, todos con diferencia significativa.

Para el caso de las manos por racimo también tuvieron el mismo comportamiento las plantas procedentes de los embriones somáticos de ápices de brotes de yemas axilares, las plantas propagadas por

organogénesis y las procedentes de yemas de cormos sin diferencias significativas entre ellas. El menor comportamiento se observó en los embriones somáticos del explante inicial de multiyemas que no alcanzo 6 manos por racimo (5,1).

Cuando se contaron los dedos por racimo se observó un comportamiento similar al peso del racimo, o sea se pudo comprobar que las plantas procedentes de los embriones somáticos de ápices de brotes de yemas axilares tuvieron el mismo comportamiento que las plantas propagadas por organogénesis sin diferencias significativas entre ellas (41,17 y 42,21 dedos por planta respectivamente), seguido por las plantas provenientes de yemas de cormos con 33,42 dedos y las plantas provenientes de los embriones somáticos del explante inicial de multiyemas (25,69 dedos), todos con diferencias significativa. Resultados similares también fueron obtenidos al evaluar la longitud del dedo central de la segunda mano (datos no mostrados).

Como se pudo observar en la evaluación de los principales componentes del rendimiento en el racimo, se pudo ver que los resultados mas desfavorables correspondieron a las plantas regeneradas de los embriones somáticos del explante inicial de multiyemas.

Tabla 6. Características del racimo de las plantas del cv. 'INIVIT PV 06-30' obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y yemas de cormos en condiciones de campo durante su primer ciclo.

Tratamientos	Peso racimo (Kg)	Número de manos	Número de dedos	
ES	ABY	18,84a	6,54a	41,17a
	SM	8,89c	5,11b	25,69c
Organogénesis	19,51a	6,37a	42,21a	
Yemas de cormos	12,07b	6,29a	33,42b	
ES ±	0.21*	0.08*	0.54*	

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Dunnett C (DC).

Leyenda: ES, embriogénesis somática; S M Scapls de Multiyemas; ABY, Ápices de brotes de yemas axilares.

Los resultados alcanzados en esta investigación indicaron que el tipo de explante utilizado en el proceso de inducción de la embriogénesis somática no solo tuvo una influencia directa con la presencia de variantes somaclonales relacionadas con la morfología de la planta, sino en los componentes del rendimiento, según se pudo apreciar durante las evaluaciones de campo en el cultivar objeto de estudio. El uso del explante de ápices de brotes de yemas axilares propició la mayor estabilidad genética de las plantas regeneradas.

Todas las variables que se evaluaron en las plantas regeneradas de suspensiones celulares embriogénicas, que se obtuvieron a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares, se encontraron en los

rangos normales de los caracteres agromorfológicos descritos para este cultivar por González (2005).

Los resultados obtenidos en la presente investigación corroboraron la posibilidad de poder multiplicar por embriogénesis somática, a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares el cultivar objeto de estudio y su escalado en Biofábrica, mediante la multiplicación vía yemas axilares de los embriones durante tres subcultivos, sin afectar la estabilidad genética de las plantas regeneradas, por estar dentro del rango permisible de variantes somaclonales admitidas para la propagación en laboratorios comerciales.

De manera que se logró establecer una metodología para la propagación del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' (*Musa* spp, grupo AAB), por embriogénesis somática a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares, desarrollada en un laboratorio de investigaciones y su escalado en Biofábrica mediante tres subcultivos de multiplicación, como se muestra en la Figura 7.

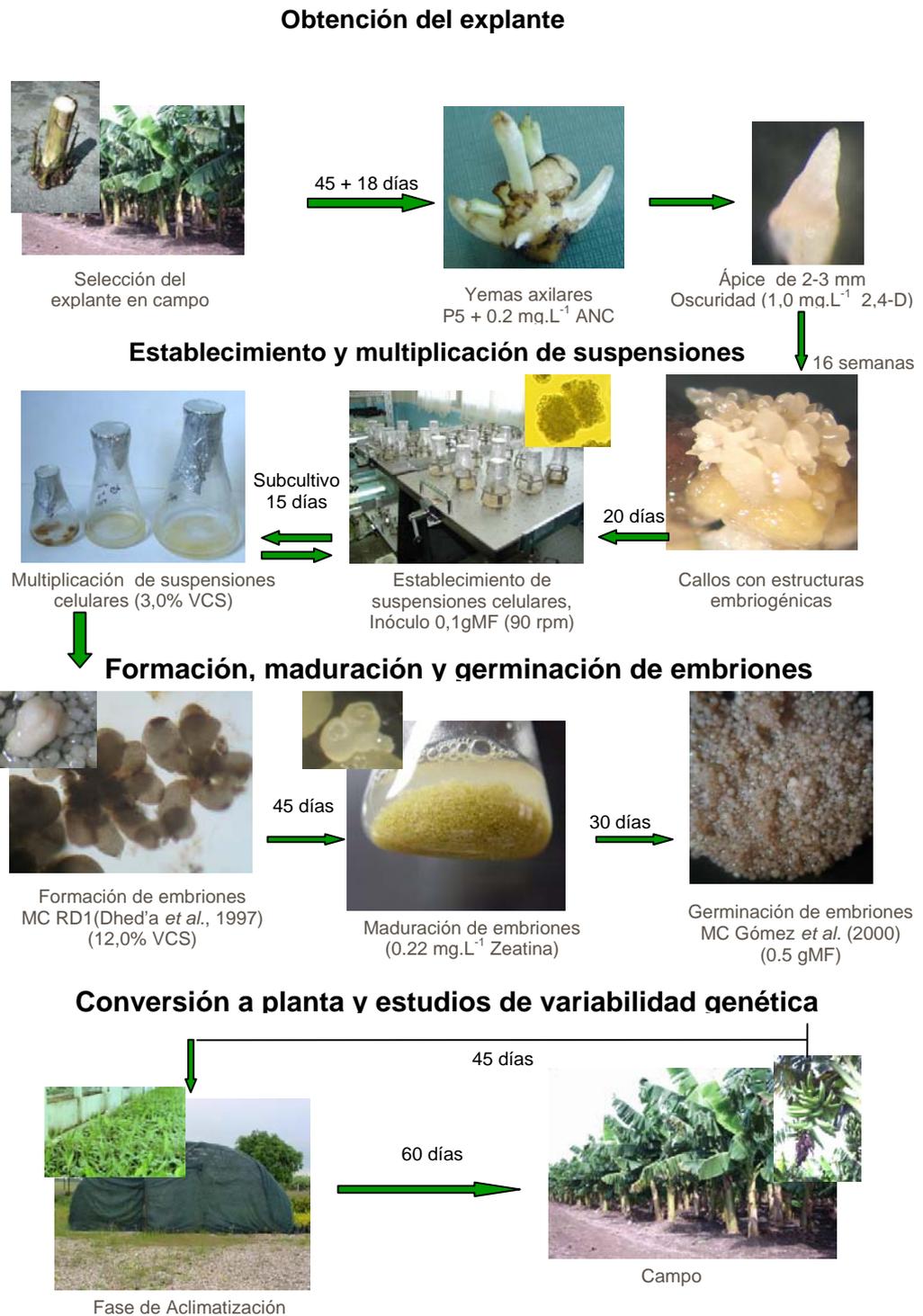


Figura 7. Esquema de trabajo para la propagación por embriogénesis somática y su escaldo en Biofábrica del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30'.

5. CONCLUSIONES

1. Se logró la multiplicación a nivel de Biofábrica de los embriones somáticos durante tres subcultivos, sin afectarse el coeficiente de multiplicación del cultivar mediante la propagación convencional *in vitro*.
2. Las plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos procedentes del explante inicial de ápices de brotes de yema axilares resultan ser más estables genéticamente en campo que las plantas regeneradas de los embriones somáticos procedentes del explante de scalps de multiyemas como control del proceso.
3. Se estableció una metodología para la multiplicación del cv 'INIVIT PV 06 - 30' a través de la embriogénesis somática y su escalado en Biofábrica.

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear la metodología desarrollada para la multiplicación del cv de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' por embriogénesis somática con su escalado en Biofábrica.
2. Profundizar en el estudio de los procesos de histodiferenciación de los embriones somáticos para lograr en condiciones de la Biofábrica el desarrollo completo de los embriones somáticos hasta la conversión en plantas sin la necesidad de multiplicación de los mismos.
3. Evaluar el comportamiento de la metodología desarrollada en otros cultivos de interés para la propagación masiva en el país.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Agramonte D. Pérez, J. Pérez M, & Pérez A. 1993. Empleo de hipoclorito de sodio (NaClO) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola 2:88-89.
- Ahloowalia BS, Prakash J, Savangikar VA & Savangikar C. 2004. Plant tissue culture. Proceedings of low cost options for tissue culture technology in developing countries. FAO/IAEA Vienna, Austria 26-30 August 2002. pp 3-10.
- Ammirato PV. 1973. Some effects of abscisic acid on the development of embryos from caraway cells in suspension culture. Amer. J. Bot. 60: 22-23.
- Ammirato PV. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). Bot. Gaz. 135: 328-337.
- Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J & Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233-249.
- Attree SM, Moore D, Sawhney VK & Fowke LC. 1991. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. Annals of Botany 68: 519-525.
- Banerjee N, Vuylsteke D & De Langhe EA. 1986. Meristem tip culture of *Musa*: histomorphological studies of shoot bud proliferation. En: Plant

- Tissue Culture and its Agricultural Application. Withers LA & Anderson PG (eds) UK: Butterworth Scientific Ltd. pp 139-147.
- Barranco LA. 2001. Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. 'FHIA-18') empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba; 107p.
- Bradley PM, El-fiki F & Giles KL. 1984. Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. Plant Sci. Lett 34: 397-401.
- Belalcázar S. 1991. El cultivo del Plátano en el trópico. ICA. Cali, Colombia. 145p.
- Cabrera M, López J, Gómez R, Montano N, Reyes M, Reynaldo D, Ventura JC, Santos A, García M, Basail M & Espinosa E. 2002. Multiplicación, Histodiferenciación y regeneración de Suspensiones Celulares Embriogénicas en plátano 'Navolean' (AAB). Biotecnología Vegetal 2: 115-117.
- Carman JG. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behaviour. In Vitro Plant Cell. Dev. Biol. 26: 746-750.
- Chávez H. 2008. Alerta Chávez sobre crisis alimentaria mundial. Periódico Granma, 21 de enero.
- Côte F, Folliot M, Domergue R & Dubois C. 2000. Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). Euphytica 112: 245-251.

- Cronauer S & Krikorian AD. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seed diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports*. 7: 23-25.
- Damasco O, Graham G, Henry R, Adkins S, Smith M & Godwin D. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports* 16: 118-123.
- Daniells J, Jenny Ch, Karamura D & Tomekpe K. 2001. *Musaloge: a catalogue of Musa germoplasma. Diversity in the genus Musa*. Amaud E & Sharrock S (eds). INIBAP Montpellier, France. 209p.
- De Cleark G. 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Botanic* 39: 129-144.
- De Jong A, Schmidt ED & De Vries SC. 1993. Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 22: 367-377.
- De Vries S, Booij H, Cordewener J, Van Angelen F, De Jong A, Van Kammen A, Lo Schiavo F, Schellekens G, Sterk P & Terzi M. 1988. Carrot somatic embryogenesis suspends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosilated extracellular proteins. *Genes and Development* 2: 462-476.
- Dennis J, Trigiano N & Conger V. 1993. Liquid suspension culture production of Orchard grass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. En: Redenbaugh K (ed). *Synseeds applications of*

- synthetic seeds to crop improvement, Calgene Inc. Daris, California, pp 351-365.
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D & De Langhe E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Engelborghs I, Sági L & Swennen R. 2004. Early detection of dwarf off-types in banana (*Musa* spp) using AFLP, TE-AFLP and MSAP analysis. En: Jain SM y Swennen R (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, pp 331–339.
- Escalant JV & Teisson C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7: 665-668.
- Escalant JV, Teisson C & Côte F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181-186.
- Escalant JV & Jain SM. 2004. Banana improvement with cellular and molecular biology, and induced mutations: Future and perspectives. En: Jain SM y Swennen R (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, pp 359-367.
- Escalona M, Cejas I, González J, Capote I, Roels S, Cañal MJ, Rodríguez R, Sandoval J & Debergh P. 2003. The effect of meta-topolin on plantain

- propagation using a temporary immersion bioreactor. *Infomusa* (12)2: 28-30.
- Evans D, Sharp W & Flick C. 1981. Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe TA (ed). In *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, pp 45-113.
- Fuji J, Slade D, Olsen R, Ruzin S & Redenbaugh K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science* 72: 93-97.
- Fujimura T & Komamine A. 1980. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol* 99: 1-8.
- Gómez R. 1998. Cultivo de Células y Tejidos. En: Pérez JN (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. IBP, Santa Clara, pp 25-44.
- Gómez R, De Feria M, Posada LP, Gilliard T, Bernal FM, Reyes MV, Chávez MM & Quijál EM. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA 18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26.
- Gómez R, Barranco LA, Chong B, Daniels D, Reyes M & De Feria M. 2006. Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. *Euphytica* (uncorrect proof).
- Gómez R, Gilliard T, Barranco LA & Reyes M. 2000. Embriogénesis somática

- en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido 'FHIA 18' (AAAB). Infomusa 9(1): 12-16.
- González L. 2005. Caracterización de la variabilidad genética en genotipos tipo vianda de *Musa* spp. Tesis presentada en opción al título académico de Magister Scientiae en Agricultura Sostenible. UCLV, Santa Clara, Cuba. 96p.
- Grapin A. 1995. Régénération par embryogénèse somatique en milieu liquide et transformation génétique par biolistique de bananiers di-et triploides. Ph.D. thesis, Montpellier, France. 90p.
- Hernández A, Pérez JM, Bosh D, Rivero L & Camacho E. 1999. Nueva versión de clasificación de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura, Ciudad de La Habana, Cuba. 64 p.
- Herrera V. 2000. Análisis del polimorfismo de DNA en plantas micropropagadas a partir de hijuelo e inflorescencia de *Musa* AAA cv. 'Enano Gigante', mediante la técnica de AFLP. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas. CICY. Yucatán México. 64p.
- Hussey G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. En: Mantell SH y Smith H (eds). Plant Biotechnology, Cambridge University press, Cambridge, pp 111-138.
- Ibaraki Y & Kurata K. 2001. Automation of somatic embryo production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 179–199.

- Israeli Y, Lahav E & Reuveni O. 1995. *In vitro* culture of bananas. En: Gowen S (eds) Bananas and Plantains. London, pp 147-178.
- Jain S, Brar DS & Ahloowalia BS. 1998. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. En: Jain S, Brar DS y Ahloowalia BS (eds). Somaclonal variation and induced mutations crop improvement, Kluwer Academic Publishers. Great Britain, pp 15-32.
- Kaemmer D, Afza R, Weising K, Kahl G & Novak F. 1992. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 10: 1030-1035.
- Kärkönen A. 2000. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 205–214.
- Krikorian AD & Scott ME. 1995. Somatic embryogenesis in bananas and plantain (*Musa* Clones and Species). En: Bajaj YP (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Protoplasts and Genetic Engineering VI*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Vol. 31 pp 183-195.
- Krishnaraj S & Vasil IK. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: Thorpe TA (ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, pp 417– 470.
- Lagoda P, Noyer J, Dambier D, Baurens F, Grapin A & Lanaud C. 1998. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the *Musaceae*. *Molecular Ecology* 7: 657-666

- Larkin P & Scowcroft W. 1981. Somaclonal variation: A novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. *Theoretical Applied Genetic* 60: 197-214.
- Litz RE & Jarret RL. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, WM y Mroginski LA (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Cali pp 143-172.
- López J. 1999. Genetic improvement of *Musa* spp. by *in vitro* mutational plant breeding. *Infomusa* 8: 2 - *PROMUSA XV*.
- López M. 1989. *El plátano*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 210p.
- López J, Ventura JC, Medero V, García M, Cabrera M & Montano N. 1995. Embriogénesis somática en clones de plátano de los grupos ABB y AAA en *Musa* spp. *Avances de la Biotecnología Moderna*. CIGB. La Habana, Cuba. 3: 25-26.
- López J, Strosse H, Ventura J, Sánchez R, Rodríguez S, Swennen R, Panis B & Afza R. 2004. Field evaluation of potencial mutants obtained after gamma irradiation of banana and plantain (*Musa* spp) shoot-tip and embryogenic cell cultures. En: Jain SM y Swennen R (eds). *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA. pp 87-96.
- López J, Gómez R, Rayas A, Montano N, Reinaldo D, Trujillo R, Cabrera M, Santos A, Ventura J, Medero V, García M, Basail M, Albert J & Toledo

- H. 2005 Nuevo método para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cv. 'Navolean' (AAB). *Biología Vegetal* 5(1): 55-59.
- López J, Gómez R, Toledo H, Chong B, Montano N, Rayas A, Reinaldo D, Cabrera M, Santos A, Ventura J, Medero V, García M, Basail M. 2005. Estudio en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir del explante de yemas brotadas en el cultivar 'Navolean' (AAB). *Biología Vegetal* 5(1): 60-64.
- López J. 2007. Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' (*Musa* spp., Grupo AAB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. Ciego de Avila, Cuba; 100p.
- Ma SS. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. *Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops*. Department of Horticulture, National Taiwan University, pp 181-188.
- Merkle S, Parrott W & Flinn B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed) *In vitro* Embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. pp 155-203.
- Ministerio de la Agricultura (MINAGRI). 2007. Instructivo Técnico del Plátano. La Habana, Cuba, CIDA. 13p.

- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- Natesh S & Rau MA. 1984. The embryo. En: Johri, BM (ed). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; pp 377-344.
- Novak FJ, Afza R, Duren MV, Perea-Dallos M, Conger BV & Tang X. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*. 7: 154-159.
- Osuji JO. 1997. Multivariate pattern of quantitative tract variation in triploid banana and plantain cultivars. *Scientia Horticulturae*. 71: 197-202.
- Parrott W. 1993. Cell-culture Techniques: Cell Culture, In Vitro Selection, and Somaclonal Variation. En: *Proceeding Biotechnology applications for banana and plantain improvement*. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica). Montpellier, pp 183-191.
- Perea M. 2001. La biotecnología como soporte en el mejoramiento de las Musáceas. En: Perea M. (ed). *Biotecnología Agrícola. Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Bogotá, pp 139-149.
- Pérez JN. 1987. Die nutzung der in vitro kultur und die induction von mutationen bei de zuchtung von zuckerrohr (*Saccharum* sp.). Thesis Dr. Habil Universidad de Leipzig, RFA. 138 p.

- Pérez JN. 1998. Variación somaclonal. En: Pérez JN (ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, IBP, Santa Clara, pp 105-121.
- Pérez JN, Agramonte D, Jiménez F & Ramírez D. 1999. Informe Final del Proyecto "Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar" IBP, Santa Clara, Cuba; 82p.
- Preil W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. En: Debergh PC, Zimmermann H (eds). Micropropagation. Technology and Applications. Kluwer Academic Publishers, London, pp 425-445.
- Rashid A. 1988. Cell Physiology and Genetics of higher plants. Vol. I. CRC Press. INC. Boca Raton, Florida. 169p.
- Redenbaugh K. 1986. Analogs of Botanic seeds. United States Patent; 4,562,568.
- Reinert J. 1958. Über die konholle der morphogeneses und die induktion von adventivembryomen und gewebeulturen aus kastofel. *Planta* 58: 318-33.
- Reuveni O, Israeli Y, Eshadat Y & Degany H. 1986. Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. IBPGR Final Report. 36p.
- Reuveni O & Israeli Y. 1990. Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. *Acta Horticulturae* 257: 307-313.

- Reynolds JF & Murashige T. 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In vitro* 5: 383-387.
- Robinson J. 1996. Bananas and plantains. Crop production science in horticulture series. CAB International, University press, Cambridge, UK 238p.
- Rodríguez S. 2000. Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final Proyecto 00200091, INIVIT, Programa Nacional Científico. 96p.
- Rodríguez S, Rodríguez A, Gálvez JR & Ventura JC. 2002. Una nueva alternativa para la producción de plátano vianda (Grupo AAB) en Cuba. Plegable 6p.
- Sagi L. 2000. Genetic Engineering of Banana for Disease Resistance- Future possibilities. En: Jones D. (ed). Diseases of banana, Abaca and Ensete. pp. 465 – 515.
- Sahijram L, Soneji JR & Bollamma KT. 2003. Somaclonal variation in micropropagated banana an analysis. En: Chandra R y Mishra M. (eds). Comprehensive micropropagation of Horticultural Crops. IBDC. Kakori, Lucknow, India. pp 221-236.
- Sandoval JA, Côte F & Dumas P. 1997. Reconocimiento *in vitro* de variantes somaclonales de porte alto en banano (cv. 'Gran Enano', *Musa* AAA). Respuesta con GA₃. CORBANA 24(51): 11-20.

- Savangikar VA. 2004. Role of low cost options in tissue culture. Proceedings of low cost options for tissue culture technology in developing countries. FAO/IAEA Vienna, Austria 26-30 August 2002. pp 11-15.
- Scowcroft WR. 1984. Genetic Variability in Tissue Culture: Impact on Germplasm Conservation and Utilization. IBPGR Report AGPG: IBPGR/84/152. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 41 pp.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph.D. K. Leuven, Belgium. 257p.
- Schoofs H, Panis B, Strosse H, Mayo A, López J, Roux N, Dolezel J & Swennen R. 1999. Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. Infomusa. 9(2): 3-6.
- Shchukin A, Ben-Bassat D & Israeli Y. 1998. Somaclonal variation and horticultural performance of Grand Nain bananas multiplied via somatic embryogenesis or shoot-tip culture. Abstracts in IX International Congress on plant tissue and cell culture. Jerusalem, Israel.
- SIGMA. 1991. Catalogue Sigma Chemical Company. USA.
- Simmonds NW & Weatherup STC. 1990. Numerical taxonomic of cultivated bananas. Tropical Agriculture, Trinidad. 67: 90-92.
- Smith M. 1988. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. Fruits. 43(4): 219-223.

- Smith M & Hamill S. 1993. Banana tissue culture. Banana industry protection board of Queensland. Annual report 1993-1994. pp 27-29.
- Steward FC, Mapes MO & Smith J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. American Journal of Botany. 45: 693-704.
- Stover RH. 1987. Somaclonal variation in Grand Naine and Saba bananas in the nursery and field. En: Persley GJ & De Langhe E (eds) Bananas and plantain breeding strategies. Aciar Proceedings. Australia. 187p.
- Strosse H, Domergue R, Panis B, Escalant JV & Côte F. 2003. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. Vézina y Picq (eds). Technical Guidelines 8, INIBAP, Montpellier, France. 36p.
- Stuart DA & Strickland SG. 1984. Embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa*. The role of aminoacid additions to the regeneration medium. Plant Science Lett. 34: 74-81.
- Tisserat B, Esan E & Murashige T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1: 1-78.
- Vasil IK. 1985. Somatic embryogenesis and its consequences in the gramineae. En: Henke RR, Hughes KW, Constantin MP y Hollander A (eds). Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Plenum, New York, pp 31 - 48.
- Vasil IK. 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. Biotechnology 6: 397-402.

- Ventura J. 2011. INIVIT PV 06-30, nuevo clon de platano vianda de porte bajo en Cuba. Boletin electronico INIVIT Año 1 No 2.
- Vuylsteke DR & De Langhe, E. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of banana and plantains. Tropical Agriculture (Trinidad). 62:323-328.
- Vuylsteke DR, Swennen R & Wilson GF, de Langhe, E. 1988. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa* spp. Cultivar AAB) Scientia Horticulturae. 36: 79-88.
- Vuylsteke DR, Swennen R & de Langhe, E. 1991. Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp. AAB group) derived from shoot-tip culture. Fruits. 46(4): 429-439.
- Vuylsteke DR. 2001. Strategies for utilization of genetic variation in plantain improvement. Thesis Ph.D. K.Leuven, Belgium. 80p.
- Wetherell DF. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 3: 221-227.