



UNIVERSIDAD DE CIENFUEGOS
Carlos Rafael Rodríguez

**“Propagación del cultivar de plátano ‘INIVIT PV 06-30’ en
la Biofábrica de Cienfuegos”**

Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Autor: Kenia Cabrera Muñoz

**Tutores: Dr. C. Jorge López Torres
MSc. Marilín Fonte Leandro**

**Cienfuegos
2012**

*A mi abuela como un pequeño reconocimiento a su amor, sacrificio y esperanza,
la semilla que sembró ha germinado en forma de esfuerzo, esmero y superación
personal, que dios la tenga en la gloria.*

A mi hija con todo el amor que se merece.

“... En la ciencia no existen sendas reales, quien intente alcanzar su cima habrá de andar caminos tortuosos...”

Pavlov

A dios que me dio fuerzas y voluntad para culminar mis estudios universitarios.

A mis tutores, el Dr. C. Jorge López Torres, a la MSc. Marilín Fonte Leandro, por su apoyo y dedicación en el trabajo.

A cada uno de los maestros que contribuyeron a la formación intelectual desde los primeros grados hasta los últimos de estudios universitarios.

A mi suegra Teresa Pérez Durán que en todo momento que la necesité estuvo presente para apoyarme con la niña para poder hacer mi carrera.

A mis amistades que de una forma u otra juegan un papel importante en mi vida por el gran apoyo que me dan y que les puedo decir que todo ese sacrificio no fue en vano y con orgullo puedo decir hoy, que he cumplido.

Por último quiero agradecer a mi esposo, por todo el apoyo que supo darme y por constituir fuente constante de inspiración para avanzar en el mundo del conocimiento científico.

A todos, muchas gracias

Resumen

Los plátanos y bananos en Cuba, contribuyen 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. Sin embargo, con la aparición en el país de la enfermedad conocida como "Sigatoka negra", las áreas dedicadas al cultivo de los plátanos tipo vianda (AAB), susceptibles a esta enfermedad, fueron reemplazadas progresivamente por genotipos ABB (plátanos Burros) y por híbridos tetraploides; siendo necesario desarrollar técnicas de cultivo *in vitro*, que permitan aumentar de forma rápida sus poblaciones en campo. Motivado por lo anterior se realizó la investigación con el objetivo de desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* del cultivar 'INIVIT PV 06-30' obtenido por inducción de mutaciones y de recién introducción en la producción con alta demanda de consumo. Los resultados alcanzados posibilitaron el desarrollo de una metodología para la propagación *in vitro* del cultivar estudiado con la utilización del Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) en la fase 0 de la micropropagación. Se logró la reducción del tiempo de establecimiento *in vitro* a partir del corte del explante (ápice meristemático). El medio de cultivo más adecuado para la fase de multiplicación fue el P5. Las evaluaciones realizadas a las plántulas en la fase de aclimatización mostraron la factibilidad de utilizar la metodología desarrollada para el cultivar 'INIVIT PV 06-30'.

Índice

Índice	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Generalidades del cultivo	3
2.1.1. Origen y sistemática	3
2.1.2. Importancia de los plátanos y bananos	3
2.1.3. Principales problemas que afectan la producción de plátanos y bananos	4
2.1.4. Clasificación de los plátanos AAB	5
2.2. Uso del cultivo de tejidos en la propagación de plantas	7
2.2.1. Micropropagación	7
2.2.1.1 Fases de la micropropagación	8
2.2.2. Organogénesis	11
2.2.2.1. Formación de yemas axilares	12
2.2.2.2. Formación de yemas adventicias	13
2.2.3. Propagación <i>in vitro</i> vía embriogénesis somática	13
2.2.4. Variación somaclonal	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Procedimientos generales	16
3.2. Establecimiento <i>in vitro</i>	16
3.2.1. Uso del Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) en la etapa 0 de la micropropagación	16
3.2.2. Influencia del tipo de explante en el establecimiento <i>in vitro</i>	19
3.3. Influencia del medio de cultivo en la multiplicación de los explantes	19
3.4. Respuesta de las plantas obtenidas en la fase de aclimatización	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Establecimiento <i>in vitro</i>	21
4.1.1. Uso del Centro de Reproducción acelerada de Semillas (CRAS) en la etapa 0 de la micropropagación	21
4.1.2. Influencia del tipo de explante en el establecimiento <i>in vitro</i>	23
4.2. Influencia del medio de cultivo en la multiplicación de los explantes	24
4.3. Respuesta de las plantas obtenidas en la fase de aclimatización	28
5. CONCLUSIONES	31
6. RECOMENDACIONES	32
7. BIBLIOGRAFIA	33

1. INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son plantas perennes que pueden cosecharse durante todo el año y se encuentran entre los principales cultivos de los países tropicales y subtropicales de alta presión demográfica (Valmayor, 2008). Además constituyen el alimento básico de cerca de 500 millones de personas de todo el mundo (Zambrano *et al.*, 2007).

En Cuba, su producción 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). Sin embargo, con la aparición en el país en noviembre de 1990 de la enfermedad conocida como "Sigatoka negra", causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Sánchez *et al.*, 2002), las áreas dedicadas al cultivo de los plátanos AAB, susceptibles a esta enfermedad, fueron reemplazadas progresivamente por genotipos ABB (plátanos Burros) y por híbridos tetraploides obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) (Orellana *et al.*, 2002). Todo esto convierte a la obtención de genotipos resistentes o tolerantes a esta enfermedad en una prioridad urgente (Tomekpe *et al.*, 2004), unido al desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro*, que permitan aumentar de forma rápida sus poblaciones en campo (Daniels, 2003).

Las "semillas" utilizadas para las plantaciones son de partes vegetativas como rizomas o hijos, con tamaños y edades variables, lo que se traduce en marcadas diferencias en la época de cosecha y maduración (Santos *et al.*, 2005; Bournnell, 2003). La ineficiencia de los métodos de propagación *in vivo* para suplir la demanda de bananos y plátanos de calidad, genéticamente uniformes y libres de enfermedades, justifica el diseño de metodologías para la propagación *in vitro*, tales como, la propagación masiva, la cual se basa en el uso de citoquininas fundamentalmente, adicionadas a los medios de cultivo (Albarrán *et al.*, 2006). Estos reguladores del crecimiento vegetal promueven el número de propágulos o plantas a obtener en *Musa* spp. durante la etapa de multiplicación (Orellana, 1994). De manera que la propagación *in vitro* a partir de ápices meristemáticos se ha generalizado a escala comercial y se mantiene como el método más utilizado

en esta especie (Ahloowalia *et al.*, 2004), a pesar de que algunos autores señalan que esta técnica de regeneración de plantas tiene como limitantes la necesidad de realizar un elevado número de operaciones manuales y los bajos coeficientes de multiplicación que se obtienen (Savangikar, 2004).

Por otra parte, se dispone de nuevos cultivares obtenidos recientemente mediante la inducción de mutaciones como el 'INIVIT PV 06-30', de buen rendimiento y alta demanda (Ventura, 2010) y no se dispone de los niveles de "semilla" necesarios para aumentar las áreas de plantación del mismo en Cuba. Todo lo cual justifica la realización de este trabajo.

Motivado por lo anterior, se utilizó el cultivar (cv.) 'INIVIT PV 06-30' para desarrollar su propagación *in vitro* como una alternativa para la producción de "semillas".

Tomando en consideración los antecedentes descritos anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: "Es posible desarrollar la propagación del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' (Grupo AAB) a partir de ápices de yemas axilares como una alternativa para la producción de semillas".

Para validar esta hipótesis de trabajo, se propuso el objetivo general y específicos siguientes:

Objetivo general

Desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' en la Biofábrica de Cienfuegos.

Objetivos específicos

1. Utilizar el Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) como una etapa de la fase 0 de la micropropagación.
2. Definir el mejor explante para la fase de establecimiento *in vitro*, en función de disminuir el tiempo de la misma y reducir las pérdidas por muertes y contaminación.
3. Determinar el medio de cultivo para la fase de multiplicación.
4. Evaluar, en la fase de aclimatización, las plantas obtenidas por esta vía de regeneración de plantas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del cultivo

2.1.1. Origen y sistemática

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 (Belalcázar, 1991).

Los plátanos y bananos pertenecen al orden *Zingiberales* y a la familia *Musaceae*, la que incluye dos géneros: *Ensete* y *Musa* (Simmonds y Weatherup, 1990).

Dentro del género *Musa* se encuentran clasificadas cuatro secciones (*Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*), además de los híbridos formados entre especies de este género (*Eumusa x Australimusa*) (Daniells *et al.*, 2001). La sección *Eumusa* contiene la mayoría de los bananos y plátanos comestibles y se admite que esta serie de poliploides se derivan de las dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, de donde provienen las designaciones AA (*acuminata*), BB (*balbisiana*), ambas con número cromosómico $2n=22$. Dentro de su evolución genética, un paso importante para el surgimiento de los bananos comestibles fue el desarrollo de la partenocarpia, que unido a la esterilidad de las semillas y la selección realizada por el hombre, dieron origen a los cultivares diploides comestibles de *M. acuminata* (AA). Luego, a partir de los cultivares AA, debido a la restitución cromosómica en su meiosis, surgieron los triploides AAA. Del cruzamiento entre los cultivares AA y AAA, con la especie silvestre *M. balbisiana* (BB), surgieron los híbridos AB, AAB, ABB, AAAB y AABB (Osuji, 1997).

2.1.2. Importancia de los plátanos y bananos

Los usos de los bananos y plátanos han sido celebrados por las personas desde tiempos remotos. En la India al plátano se lo denomina "*kalpatharu*", que significa "*hierba con todos los usos imaginables*". Los plátanos y bananos están considerados dentro de los cultivos de mayor producción mundial (Roux *et al.*,

2008) y sus productos constituyen el cuarto alimento más importante después del arroz, trigo y maíz en valores de toneladas producidas (Afza *et al.*, 1996). Sin embargo, los plátanos han alcanzado mayor importancia como cultivo comercial y de subsistencia en regiones lejanas de su centro de origen primario (Robinson, 1996); específicamente en los países del trópico y subtropical (Afza *et al.*, 1996; Van Duren *et al.*, 1996; Crouch *et al.*, 1998).

En la alimentación, los bananos y plátanos son fuente importante de carbohidratos (35%), proteínas (1,2%) y fibras (6-7%); adicionalmente aportan potasio, magnesio, fósforo, calcio y vitamina A y C (Novak, 1992; Kodym y Zapata, 1999). Además de ser utilizados para brindar sombra a grupos de cultivos, incluyendo el cacao y el café (MusaDoc, 2004).

En Cuba, los bananos y plátanos constituyen un cultivo de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional, debido a su capacidad de producir todos los meses del año, su elevado potencial productivo, arraigado hábito de consumo y diversidad de usos. La producción de plátanos y bananos posee gran significación dentro de la producción de viandas en Cuba, pues representan más del 40% de este indicador anualmente. Actualmente esta producción está basada en varios cultivares pertenecientes a los subgrupos *Cavendish* (AAA), *Plantain* (AAB), Burros (ABB) y tetraploides (AAAA, AAAB, AABB) introducidos de la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) (MINAG, 2007).

2.1.3. Principales problemas que afectan la producción de plátanos y bananos

Pérez (1998) señala que dentro de las principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de bananos y plátanos en Cuba, con pérdidas que oscilan entre el 40-50% de las cosechas, se encuentran: Sigatoka negra y amarilla (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet y *Mycosphaerella musicola* Leach); Mancha por *Cordana musae*; Pudrición de la corona (*Fusarium pallidoros* Eum, *Colletotrichum musae* y *Fusarium* spp); Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* F. sp *cubense* (Foc)); Pudrición acuosa del cormo y necrosis del rizoma (*Erwinia chrysanthemi*); Virus del rayado del banano (BSV, de sus siglas en inglés: *Banana Streak Virus*) y

virus del mosaico del pepino (CMV, de sus siglas en inglés: *Cucumis Mosaic Virus*); nemátodos, Picudo negro (*Cosmopolites sordidus*); Acaro rojo (*Tetranychus tumidus*) y chinches harinosas (*Pseudococcus adonidum*, *Pseudococcus comstocki*).

Las técnicas de manejo integrado son el sistema de soporte de las decisiones para la protección de los cultivos, que se centra en la prevención a largo plazo o supresión de los problemas de plagas con mínimo impacto en la salud de los seres humanos, el medio ambiente y otros organismos que no se desea eliminar. El control de malezas en este cultivo, se basa en la integración de los elementos: preparación de suelo, labores de cultivo, limpia y uso de herbicidas (Pérez, 2009).

Otro de los problemas que afectan la producción de estos cultivos es el efecto de los vientos, lo cual a nivel mundial se estima que ocasiona pérdidas en cosecha del 20 al 30% (Álvarez, 2005).

2.1.4. Clasificación de los plátanos AAB

Este grupo de híbridos triploides se originó en la India, a partir de cruzamientos espontáneos y mutaciones somáticas, dando lugar a un gran número de cultivares (Robinson, 1996). La característica de la inflorescencia es la diferencia morfológica más marcada entre los cultivares de plátano, los cuales están clasificados en cuatro tipos según el grado de degeneración de la inflorescencia: *French*, *French-Horn*, *False Horn* y *Horn* (Simmonds, 1973). En términos de variación cuantitativa, la altura de la planta y número de frutos son los caracteres más discriminantes para agrupar los cultivares del plátano (Swennen y Vuylsteke, 1995).

El plátano *Horn* (AAB) es estéril, por lo que las actividades de mejoramiento del mismo en el programa de la FHIA siempre han sido limitadas por esta razón (Rowe, 2000).

Las características morfológicas del cultivar objeto de estudio (Tabla 1) se resumen a continuación:

Tabla 1. Características morfológicas del cultivar 'INIVIT PV 06-30'

Descriptores	
Altura (m)	2,26
Color del pseudotallo	Verde medio
Número de hijos	3
Desarrollo de los hijos	Entre $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de altura de la madre
Mancha en la base del peciolo	Manchas pequeñas
Color de las manchas	Marrón negruzco
Color de la nervadura por el haz	Verde claro
Color cara dorsal de la hoja bandera	Verde
Canal peciolar hijo III	Estrecho con márgenes erectos
Longitud de la lámina (m)	1,54
Ancho de la lámina (m)	0,74
Longitud del pedúnculo (m)	0,52
Color del pedúnculo	Verde
Pubescencia del pedúnculo	Poco pubescente
Posición del racimo	Ligeramente inclinado
Forma del racimo	Cono truncado
Tipo de raquis	Presente
Comportamiento de las brácteas antes de caer	Salpicado de herrumbre
Pigmentación del pétalo compuesto	Crema
Color de estigma	Verde
Pigmentación del ovario	Muy poco o sin signos visibles
Número de frutos de la mano media	5
Longitud del fruto (cm)	17,0
Forma de los frutos	Curvos
Ápice del fruto	Largamente puntiagudos
Color de la cáscara inmadura	Verde

Tabla 1. (Continuación)

Descriptores	
Color de la cáscara madura	Amarillo
Color de la pulpa antes de la madurez	Marfil
Color de la pulpa a la madurez	Amarillo
Sabor predominante	Astringente (como banano cocido)
Presencia de semillas	No
Posición del raquis	Pendular verticalmente

2.2. Uso del cultivo de tejidos en la propagación de plantas

Desde hace más de 120 años se ha empleado la técnica del cultivo de tejidos. En 1902 Haberlandt postuló el principio de la totipotencia que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* en plantas, ya que toda célula es capaz de regenerar un individuo. El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos, empleando medios nutritivos artificiales (Dixon, 1991; Roca y Mroginski, 1993; Jiménez, 1998a).

Para la expresión de la totipotencia celular en los cultivos vegetales *in vitro* existen dos vías, la organogénesis y la embriogénesis. La regeneración de plantas por una u otra vía depende de las características genéticas de las plantas y del manejo del cultivo *in vitro*, que tiene en cuenta la manipulación, los medios de cultivo y otras condiciones ambientales (Tisserat, 1991; Gómez, 1997). Los primeros trabajos sobre la multiplicación *in vitro* de plátanos y bananos se realizaron en la década de 1970 en algunos genotipos AAA (Afza *et al.*, 1996).

2.2.1. Micropropagación

Originalmente la micropropagación se definió como “cualquier” procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica

convencionalmente. La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce puede crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva (Krikorian, 1991; Villalobos, 1991; Pérez, 1997).

Kitto (1997) señaló que la micropropagación es una industria con un excelente futuro, pero su incremento depende del desarrollo de nuevas técnicas para la automatización de los procesos y del mejoramiento de los sistemas de aclimatización de las plantas.

2.2.1.1 Fases de la micropropagación

Según Murashige (1974) citado por Krikorian (1991), debe existir una secuencia de eventos asociados a la multiplicación de plantas mediante la técnica de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

- *Fase 0: Preparativa.* En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y desarrollo posterior de los cultivos. El material inicial debe ser seleccionado por sus características fenotípicas que corresponden con el clon o variedad a propagar. El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo vigoroso y sano. Para disminuir los riesgos de contaminación en la implantación se han utilizado varios procedimientos que incluyen la selección negativa en condiciones de campo o invernadero, la aplicación de desinfectantes o mezclas de fungicidas y bactericidas en el material de plantación (estacas, secciones nodales, yemas, tubérculos, bulbos, rizomas) y su posterior trasplante en sustratos esterilizados y crecimiento en condiciones higiénicas.
- *Fase I: Establecimiento o Iniciación de los cultivos.* El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y viables con los cuales iniciar el proceso de propagación. Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas

adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*. El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que al aumentar el tamaño es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas. Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final (Hu y Wang, 1983). Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y etanol. Los tres primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3% en tiempos de 10 a 20 minutos y el alcohol se usa generalmente al 70% y se emplea en combinación con otros desinfectantes. Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween 20 con el objetivo de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante. Posteriormente se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar restos del mismo.

- *Fase II: Multiplicación.* Es considerada la etapa más importante del proceso donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas. El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos a partir de los brotes establecidos. Para esto se induce la proliferación de brotes los cuales son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medio de cultivo fresco para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseada. Entre los métodos para lograr la multiplicación de propágulos *in vitro*, la proliferación de yemas axilares posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser fácilmente establecida en la mayoría de las especies, esta se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo

para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. El uso de citoquininas es generalizado en los medios de propagación, variando su concentración en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes. No obstante, el papel determinante de las citoquininas en esta fase, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes (Wang y Hu, 1983). Uno de los posibles efectos de las auxinas en la Fase II es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos. El balance auxinas-citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación para aumentar la efectividad del método.

- *Fase III: Enraizamiento.* Su objetivo es preparar las plántulas para su re-establecimiento en condiciones de campo. En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radical que les permite ser trasplantadas a un sustrato en condiciones de vivero o invernadero. El manejo de la concentración de las sales minerales es ampliamente recomendado para estimular el enraizamiento. Referente a la utilización de fitohormonas, en la inducción de enraizamiento no se necesita la adición de citoquininas al medio de cultivo, debido al efecto residual acumulado durante la propagación, por lo que para esta fase comúnmente se utiliza el medio sin hormonas.
- *Fase IV: Aclimatización.* Es la fase final del proceso y su objetivo es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos o invernaderos. El objetivo de esta fase es lograr la sobrevivencia de las plantas. En el proceso normal de micropropagación los brotes y plantas son cultivadas en medios de cultivo con azúcares, vitaminas y otras sustancias orgánicas, lo que determina el desarrollo heterótrofo o mixótrofo de los mismos (nula o baja capacidad fotosintética). Sin embargo, durante la fase de adaptación estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO₂ y luz. Adicionalmente el

ambiente *in vitro* (alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, bajo o nulo intercambio gaseoso en el frasco), condiciona cambios en la morfología de las plantas que influyen en la capacidad de supervivencia y crecimiento como: hojas con anatomía interna mal estructurada, estomas que no cierran normalmente y desarrollo deficiente de la cutícula, lo que hace que las plantas sean más susceptibles al estrés por pérdida de agua y por tanto deben desarrollar nuevas hojas adaptadas a las nuevas condiciones; tallo con menor contenido de tejido de soporte (colénquima y esclerénquima); raíces poco funcionales, ausencia de raíces secundarias, en ocasiones existe una conexión vascular incompleta entre tallo y raíces que impide el transporte eficiente de agua y nutrientes, como resultado de esto prácticamente las plantas deben desarrollar todo el sistema radical nuevo durante la etapa de aclimatización. Teniendo en cuenta estas características de las vitroplantas en un inicio deben cultivarse las plantas en condiciones que se acerquen al ambiente *in vitro*, es decir alta humedad relativa y baja intensidad luminosa y posteriormente debe reducirse gradualmente la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa para que las plantas se desarrollen en un ambiente parecido al de campo abierto con hojas, tallos y raíces adaptados a estas condiciones y completamente funcionales. Otra de las soluciones para reducir la susceptibilidad de las plantas en este período pudiera ser la producción *in vitro* de plántulas con una mayor similitud a la morfología de las plantas aclimatadas, pues se conoce que en la fase III se puede inducir un determinado grado de autotrofia en las plantas o de mayor rusticidad o adaptabilidad al trasplante.

2.2.2. Organogénesis

La organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno (Hu y Wang, 1983). Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. En contraste con la embriogénesis

somática, en la vía organogénica, para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirectamente, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, que favorecen el desarrollo de los brotes y la formación de raíces (Jiménez, 1998b).

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

2.2.2.1. Formación de yemas axilares

Se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados respectivamente (Hu y Wang, 1983). Este método ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se obtienen los menores índices de variación genética (Prakash, 1994; Kitto, 1997).

Los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis, están basados fundamentalmente en la proliferación de brotes axilares a partir de la formación de una plántula, mediante el cultivo aséptico de un ápice o meristemo (Vasil, 1994). Esta técnica constituye la base de la propagación masiva de plátanos y bananos, con actual vigencia en muchos países para propagar y distribuir de forma comercial y a gran escala, plantas libres de enfermedades (Afza *et al.*, 1996).

Los ápices meristemáticos de plátanos y bananos, en dependencia del genotipo o cultivar, presentan diferentes respuestas en la formación de plantas durante el establecimiento *in vitro* y posterior índice de multiplicación en la fase de multiplicación (García y Noa, 1998). Esta fase, tiene como objetivo principal la producción del mayor número posible de propágulos a partir de explantes introducidos *in vitro* (Pérez *et al.*, 1998a).

La proliferación de explantes puede lograrse con la incorporación de citoquininas en el medio de cultivo, la más empleada en la mayoría de las especies es la benzilaminopurina (6-BAP), y es casi exclusiva en la micropropagación de plátanos y bananos (Orellana, 1998).

Pérez *et al.* (1998b) demostraron que la eficiencia del proceso está determinada por la fase de multiplicación y su parámetro fundamental es el coeficiente de multiplicación; que indica que por cada unidad de aumento en el mismo, disminuyen los costos en un 10%. Razones por las cuales los medios de cultivo en estado líquido se han propuesto en muchos casos para sustituir los medios de cultivos semisólidos en plátanos y bananos (Orellana, 1998). Sus principales ventajas incluyen: corto tiempo para manipular los explantes, mayor rapidez de absorción de nutrientes, cambio de la composición del medio de cultivo por simple transferencia y la esterilización puede realizarse por ultra filtración o autoclave (Alvard *et al.*, 1993).

2.2.2.2. Formación de yemas adventicias

Se basa en la formación *de novo* de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejidos no meristemáticos, los cuales se originan de una o un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios de cultivos con concentraciones elevadas de citoquininas (Vulysteke y De Langhe, 1985). Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para su producción (Akita *et al.*, 1994). Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-enraizamiento, adicionalmente tiene el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias (Reuveni *et al.*, 1985).

2.2.3. Propagación *in vitro* vía embriogénesis somática

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 (Preil, 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). Sin embargo, la inducción de los embriones somáticos y la regeneración de plantas todavía no son procesos eficientes para muchas plantas.

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). Además, según Sannasgala (1989) y Escalant y Teisson (1989), el embrión somático tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis) y presenta bandas procambiales entre los ápices.

El origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos es una interrogante que surge con frecuencia. Se ha planteado el desarrollo de los embriones somáticos a partir de una sola célula (Steward *et al.*, 1958), pero también se ha hecho referencia a que estos embriones se forman de los agregados de células meristemáticas (Haccius, 1978).

Según Parrott (1993), la embriogénesis somática se desarrolla a través de varias fases: inducción de la embriogénesis somática, formación de los embriones somáticos, maduración de los embriones somáticos, germinación y regeneración de plantas.

2.2.4. 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 plantas regeneradas de meristemas preexistentes (De Cleark, 1990).

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 deban a cambios en el número y estructura de los cromosomas, reordenamientos cromosómicos, deleciones, transposones, amplificación y metilación 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).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en la Biofábrica de Cienfuegos, ubicada en Carretera a Palmira Km 4, perteneciente a la UEB Semillas, provincia de Cienfuegos y el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara durante el período comprendido entre enero del 2010 a febrero del 2012.

3.1. Procedimientos generales

Se empleó como medio de cultivo basal para el desarrollo de los experimentos, las sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementadas con sacarosa (30 g.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹). Según el experimento, se emplearon tubos de ensayos (50 x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo y en las demás etapas de desarrollo de la propagación *in vitro* se utilizaron magentas con 50 ml de medio de cultivo. Se utilizó como gelificante 6,0 g.L⁻¹ de Agar E (BIOCEN). El pH fue ajustado con NaOH 0,5 N y HCl 0,5 N, antes de la esterilización en autoclave.

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 incubación de los materiales durante las diferentes etapas de la investigación se realizó en una cámara de cultivo a una temperatura de 27± 2,0° C e iluminación natural, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62 – 68 μm.

En todos los experimentos se aplicó un diseño completamente aleatorizado por entender homogéneas las condiciones de cultivo dentro de las cámaras y considerar como única fuente de variación los tratamientos.

3.2. Establecimiento *in vitro*

3.2.1. Uso del Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) en la etapa 0 de la micropropagación

Con el objetivo de disponer de la cantidad de material necesaria para el establecimiento *in vitro* del cultivar 'INIVIT PV 06-30', de recién introducción en la

producción (Ventura, 2010), se utilizó el Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) como una etapa para la preparación de los explantes.

El establecimiento *in vitro* de los ápices se realizó a partir de materiales previamente seleccionados con buen estado fitosanitario-nutricional, los cuales fueron llevados a condiciones semicontroladas para la realización de los experimentos.

Se tomaron cinco plántones completos del cultivar objeto de estudio, una vez concluida la cosecha de los mismos y fueron llevados al Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS), según Filipia (1983), el cual consiste en utilizar los cormos de diferentes calibres, yemas e hijos, y fueron desinfectados en una solución de formalina al 2% durante dos o tres minutos.

Posteriormente en dependencia del tamaño de los cormos estos fueron seccionados en fracciones y clasificados por calibres (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes calibre de “semillas” utilizados para la propagación del plátano en los Centro de Reproducción Acelerada de Semillas.

Calibres	Peso (Kg)
A	> 2.72
B	1.81 – 2.72
C	0.9 – 1.80
D	0.5 – 0.9

Las fracciones consistieron en secciones de cormos de no menos de 100 g, los cuales lo constituyeron una parte del rizoma con una yema proveniente de tejidos corticales y un mínimo de cilindro central. La plantación de las mismas (fracciones) se realizó con el corte hacia arriba con una capa de 1 cm de arena sobre las fracciones. Durante las primeras 24 horas el riego se realizó de forma continua y después de forma tal que se mantuviera la humedad sobre el lecho de plantación (similar al control).

Como control del experimento se seleccionaron hijuelos tipo “espada”, con una altura entre 50 y 100 cm con buen estado fitosanitario-nutricional, los cuales fueron llevados a condiciones semicontroladas. Estas condiciones consistieron en

una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), que permitió el paso de una densidad de FFF 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 entre el 85 y 90%.

Transcurridos 60 días en ambos tipos de explante [procedentes de CRAS y selección de hijos en campo (método tradicional)], se eliminaron las partes más externas del corno y las vainas foliares, hasta obtener secciones con el ápice caulinar de aproximadamente 5,0 cm de largo y 2,5 cm de diámetro de ambos tipos de explante.

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 2-3 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 con agua destilada estéril. Después se redujo su tamaño hasta obtener un ápice de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$. El establecimiento de los mismos se realizó en el medio de cultivo basal citado en los procedimientos generales y suplementado con ácido indolacético (AIA) ($0,88 \text{ mg.L}^{-1}$), 6-BAP ($1,13 \text{ mg.L}^{-1}$), y pH 5,8 en estado líquido durante 18 días, según López (1999). Las condiciones de cultivo fueron las anteriormente descritas en los procedimientos generales.

Se evaluó la cantidad de material disponible para su establecimiento *in vitro* a los 60 días de permanencia en la Fase 0 de la micropropagación, el porcentaje de contaminación transcurrido una semana de establecidos *in vitro* los materiales y la fenolización de los mismos a partir de la escala siguiente:

0 Sin fenolizar

2 Mediana fenolización

1 Poca fenolización

3 Abundante fenolización

Para el análisis estadístico se emplearon los modelos Kruskal-Wallis (análisis de varianza por rangos) y Mann-Whitney para la comparación de medias de rango.

Además se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de significación de $p < 0,05$ para determinar el grado de fenolización de los materiales iniciados.

3.2.2. Influencia del tipo de explante en el establecimiento *in vitro*

Con el objetivo de disminuir las pérdidas por muertes y lograr un mejor desarrollo del explante durante la etapa de establecimiento *in vitro* se utilizó un nuevo explante, el cual consistió en un ápice meristemático con diámetro de 0.5-0.8 cm de grosor por 1 cm de largo (como máximo) y de forma rectangular a diferencia del explante que se utilizó como control (tradicionalmente utilizado en biofábricas), que incluye el mismo tamaño pero eliminando las vainas externas de la sección de pseudotallo.

Se realizaron las evaluaciones siguientes: contaminación a los 4 días del establecimiento, aparición de la coloración verde del explante, presencia de la primera hoja abierta y grosor del explante a los 12 días del establecimiento.

Las condiciones de cultivo fueron las anteriormente descritas en los procedimientos generales.

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante prueba de hipótesis para muestras independientes (T-Student), los niveles de significación establecidos fueron: significativo para $p < 0,05$ y altamente significativo para $p < 0,01$.

3.3. Influencia del medio de cultivo en la multiplicación de los explantes

Con el objetivo de aumentar el índice de multiplicación de los explantes en el cultivar 'INIVIT PV 06-30' se estudiaron dos medios de cultivo, ambos con el medio de cultivo basal MS (1962) descrito en los procedimientos generales del epígrafe 3.1. y suplementado con:

1. Medio de cultivo (P5): Ácido ascórbico ($10,0 \text{ mg.L}^{-1}$), AIA ($0,17 \text{ mg.L}^{-1}$), 6-BAP ($2,25 \text{ mg.L}^{-1}$).
2. Medio de cultivo (A4+065): AIA ($0,65 \text{ mg.L}^{-1}$), 6-BAP ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) (Control de la Biofábrica).

A los 21 días de su cultivo, se evaluó el número de yemas axilares y la fenolización de los explantes durante el primer, segundo y tercer subcultivo, según

la escala descrita en el epígrafe 3.2.1. Las condiciones de cultivo fueron las anteriormente descritas en procedimientos generales.

El procesamiento de los datos se realizó mediante la una prueba de hipótesis para muestras independientes (T-Student), significación: significativo para $p < 0,05$ y altamente significativo para $p < 0,01$.

Una vez concluido los experimentos de multiplicación se transfirió el material al medio basal descrito en el epígrafe de procedimientos generales y suplementado con $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, para su enraizamiento.

3.4. Respuesta de las plantas obtenidas en la fase de aclimatización

Con el objetivo de lograr la aclimatización de las plántulas producidas que fueron multiplicadas en ambos medios de cultivo estudiados en el epígrafe anterior 3.3. y luego enraizadas, se evaluó la supervivencia y desarrollo en condiciones ambientales *ex vitro* de las mismas. Esta fase se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999) en condiciones semicontroladas en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), que permitió el paso de una densidad de FFF de $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El riego se realizó mediante sistema *microjet* con una frecuencia de seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno.

Para el trasplante se plantaron 500 plántulas con una altura de 4-5 cm y de dos a tres hojas de cada procedencia, en bolsas de polietileno de 900cc de capacidad. El porcentaje de supervivencia se evaluó a los cinco días de plantadas y a los 60 días antes de transferirlas a campo; se evaluaron 60 plantas de cada procedencia. Las principales variables fenotípicas evaluadas, (Sandoval *et al.*, 1997), fueron: altura de la planta (cm), largo del pecíolo de la hoja dos (cm), largo de la hoja dos (cm), ancho de la hoja dos (cm), distancia entre las hojas dos y tres (cm) y variaciones fenotípicas observadas en toda la población tales como cambio de coloración en las hojas, pseudotallo y hojas deformadas.

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante la una prueba de hipótesis para muestras independientes (T-Student), los niveles de significación establecidos fueron: significativo para $p < 0,05$ y altamente significativo para $p < 0,01$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Establecimiento *in vitro*

4.1.1. Uso del Centro de Reproducción acelerada de Semillas (CRAS) en la etapa 0 de la micropropagación

Transcurrido 60 días de multiplicados de los materiales en el CRAS, se observó que todos los calibres evaluados produjeron los explantes óptimos para su establecimiento *in vitro*, los cuales difirieron significativamente en el número de “semillas” adecuados para su establecimiento *in vitro* (Tabla 3).

Tabla 3. Cantidad de brotes desarrollados en el CRAS con óptimas condiciones para su establecimiento *in vitro* en el cultivar ‘INIVIT PV 06-30’.

Calibres	Cantidad de brotes	Media de Rango
A	9,72	49,73a
B	7,36	38,91b
C	5,00	28,36c
D	2,45	17,00d
Hijos (control)	1,00	6,00e

KW= 52,00**

A medida que fue disminuyendo el peso de la fracción utilizada, lo cual se corresponde con el calibre empleado desde A hasta D, disminuyo la cantidad de “semillas”, todo lo cual se corresponde con los resultados obtenidos por Filipia (1983).

El uso de este método de propagación (CRAS), previo al establecimiento *in vitro* de los materiales, produce un incremento inicial de materiales para su iniciación, superior al uso de los hijos que son seleccionados en campo.

Luego al evaluar su comportamiento durante su establecimiento *in vitro* se comprobó que tanto los materiales iniciados a partir de hijos como los procedentes del CRAS tuvieron un comportamiento similar sin diferencias significativas entre

ellos en la fenolización de los mismos (fenolización media) según la escala empleada (Tabla 4).

Tabla 4. Fenolización de los explantes iniciados a partir de dos fuentes donantes (CRAS y selección de hijos) en el cultivar 'INIVIT PV 06-30'.

Procedencia del material	Fenolización
CRAS	2
Hijos seleccionados	2

U de Mann Whitney= 112,5 n.s. para $p < 0,005$

Escala para la fenolización:

0 Sin fenolización

1 Poca fenolización

2 Mediana fenolización

3 Abundante fenolización

Por otra parte la contaminación inicial fue del 5% en los materiales procedentes del CRAS y 12% en los hijos seleccionados como material inicial para el establecimiento *in vitro*. Probablemente los resultados obtenidos anteriormente pudieran estar relacionados con el saneamiento que se le realiza al material multiplicado por CRAS y que el nuevo brote inicia su desarrollo bajo condiciones controladas.

Los resultados alcanzados en este experimento demostraron la factibilidad de usar el método de propagación por CRAS como una alternativa para garantizar la entrada de material a la Biofábrica por tratarse de un material más saneado con un incremento inicial de "semillas" antes de entrar en el flujo productivo de la Biofábrica. Además de garantizar porcentajes de contaminación por debajo de los límites establecidos durante el establecimiento *in vitro*.

4.1.2. Influencia del tipo de explante en el establecimiento *in vitro*

Al estudiar el nuevo explante utilizado (basado en su modo de preparación) (Figura 1) para el establecimiento *in vitro*, se pudo apreciar que referente a la presencia de contaminantes del explante en ambos casos, solo se presentó un 5%. Luego al evaluar algunos indicadores de su desarrollo (Tabla 5) como la coloración verde, la misma se produjo a los cuatro días en el nuevo explante con diferencias significativas del explante utilizado tradicionalmente. De forma similar también se comportó con diferencias significativas la presencia de la primera hoja abierta a los 6,36 días en el nuevo explante utilizado y a los 13,8 días en el control de la Biofábrica.

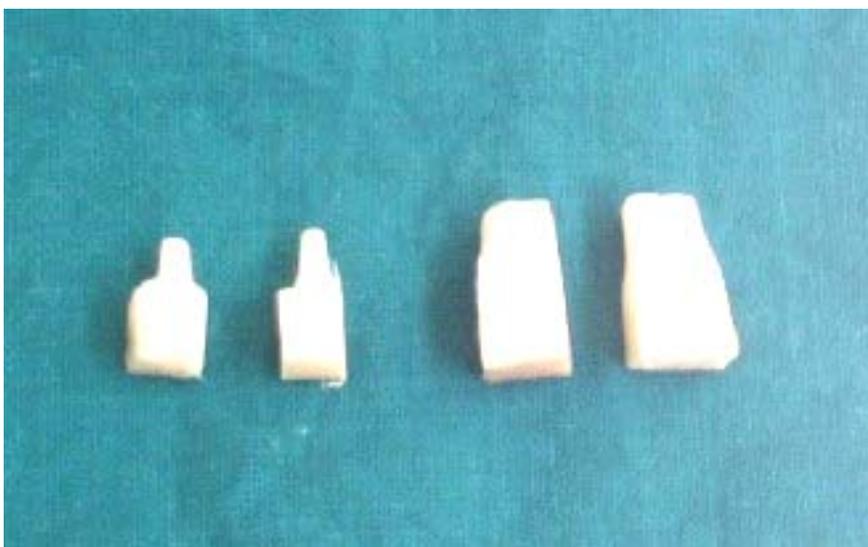
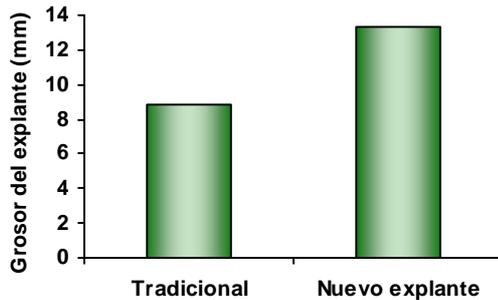


Figura 1. Explante utilizado para el establecimiento *in vitro* del cultivar 'INIVIT PV 06-30'. Izquierda Control Biofábrica y derecha nuevo explante.

Tabla 5. Expresión del desarrollo del explante en función de su coloración y primera hoja abierta.

Tipo de explante	Coloración verde (días)	Primera hoja abierta (días)
Tradicional	7	13,8
Nuevo explante	4	6,36
T	9,03**	23,97**

De forma similar cuando se evaluó el grosor del explante como un indicador vinculado al coeficiente de multiplicación en la fase de establecimiento también el mismo fue mejor en el nuevo explante estudiado (Figura 2) con diferencias significativas con el control de la Biofábrica.



$$T = 9,05^{**}$$

Figura 2. Expresión del desarrollo del explante en función del grosor a los 12 días de establecidos *in vitro*.

Los resultados alcanzados en relación con el nuevo explante utilizado demostraron la calidad del mismo al evaluar los caracteres cuantitativos y cualitativos que más se relacionan con el desarrollo del explante en la fase de establecimiento *in vitro*. Sin embargo, a pesar que se tiene como indicador para realizar los subcultivos la presencia de la primera hoja abierta en la Biofábrica, parece ser que la realización de estos subcultivos (tiempo de realización) está más vinculada con el grosor del explante y el color verde. Por otra parte, en el establecimiento por esta vía se incurre en menor tiempo de trabajo al no ser necesario el excesivo número de labores para eliminar las capas de pseudotallos que envuelven la yema, lo que trae consigo también que se produzcan menos muertes por concepto de daños al explante durante su preparación.

4.2. Influencia del medio de cultivo en la multiplicación de los explantes

Durante la multiplicación de los explantes (Figura 3) en el primer subcultivo no se encontraron diferencias significativas, aunque numéricamente fue superior el

medio P5. Luego en el segundo y tercer subcultivo las diferencias fueron significativas demostrando la superioridad del medio de cultivo P5 con relación al índice de multiplicación de los explantes (Figura 4). De forma general se observó que este último medio de cultivo (P5) propició un incremento mayor de explantes que el medio control utilizado en la Biofábrica el cual fue incrementando a medida que aumentan los subcultivos.

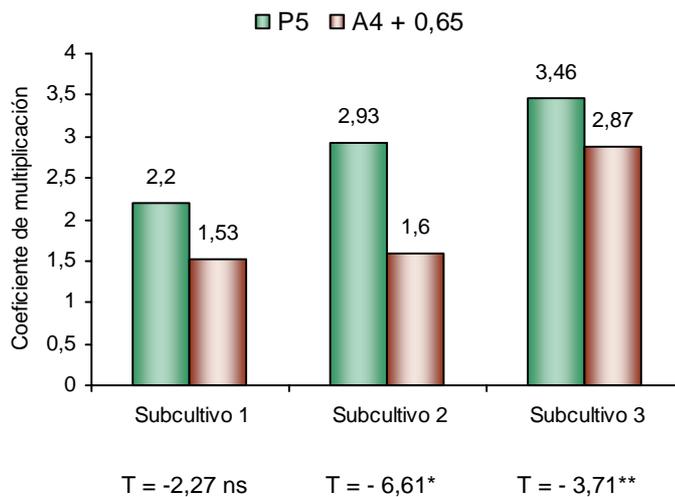


Figura 3. Influencia del medio de cultivo en la multiplicación de los explantes en el cultivar 'INIVIT PV 06-30'.

Las citoquininas estimulan la división celular, el crecimiento y rompen la latencia de las yemas axilares (Marassi, 2004), por lo que es necesario estudiar el balance más adecuado para cada genotipo estudiado y tipo de citoquinina.

Según Canchignia *et al.* (2008), al micropropagar el cultivar de plátano vianda 'Maqueño' (AAB), la mejor respuesta en la multiplicación se obtuvo cuando utilizó 5 mg.L^{-1} de BAP y $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA con un valor promedio de 2,5 brotes. Estos resultados difieren de los alcanzados en la presente investigación donde a la concentración de 4 mg.L^{-1} de BAP se obtienen los índices de multiplicación más bajos comparados con el medio de cultivo P5, que contiene $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.



Figura 4. Multiplicación *in vitro* del cultivar 'INIVIT PV 06-30' en el medio de cultivo P5.

La 6-Benzilaminopurina (6-BAP) es en general la citoquinina más efectiva en la inducción de yemas axilares. No obstante el papel determinante de las citoquininas en esta fase en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. (Hu y Wang, 1983) Uno de los posibles efectos de las auxinas en la Fase II es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos.

El balance auxinas-citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación para aumentar la efectividad del método. (Krikorian, 1991)

Otro de los factores que afecta el buen desarrollo del explante es la fenolización que se presenta durante la propagación de los materiales.

Como se puede observar en la Tabla 6 la utilización del medio de cultivo P5 propició el menor grado de oxidación del explante, (fenolización mediana) probablemente influenciado por la adición al medio de cultivo de ácido ascórbico el

cual actúa como antioxidante con buenos resultados en la propagación *in vitro* del plátano.

Roca y Mroginski (1991), señalaron que el carbón activado se ha usado, para superar problemas específicos de oxidación, los cuales se asocian con el cultivo de tejidos en musáceas. En este sentido, el trabajo presentado por Cajacuri (2007), indica que en el plátano *Musa* AAB cv. 'Hartón' se presenta oxidación entre ligeramente oxidado y moderadamente oxidado para todos los ciclos evaluados de multiplicación *in vitro*. El mismo autor continua señalando que todos los explantes presentaron oxidación desde su iniciación hasta la fase de aclimatización; en general los explantes mostraron una oxidación que promedió entre moderadamente oxidado para *Musa* AAB cv. Hartón con un porcentaje de muerte a causa de necrosis del 20%; y oxidado con 65% de muerte en explantes necróticos para el Hartón "Doble Tallo"; lo que indica una producción superior de fenoloxidasas en los explantes correspondientes al clon Hartón "Doble Tallo" con respecto al Hartón normal.

Tabla 6. Fenolización de los explantes en los medios de cultivo de multiplicación P5 y A4 + 0,65 en el cultivar 'INIVIT PV 06-30'.

Medio de cultivo utilizado	Fenolización
Medio P5	2 a
Medio A4 + 0,65 (Control)	3 b

U de Mann Whitney = 22,5**

Leyenda:

- 0 Sin fenolización
- 1 Poca fenolización
- 2 Mediana fenolización
- 3 Abundante fenolización

Según Uzcátegui *et al.* (2010) el grado de oxidación y porcentaje de mortalidad a causa de necrosis en explantes *in vitro* de plátano 'Hartón Doble Tallo', indica una tasa de producción de fenoloxidasas superior al de los explantes de plátano *Musa* AAB cv. 'Hartón'.

4.3. Respuesta de las plantas obtenidas en la fase de aclimatización

Al evaluar las plantas multiplicadas en los dos medios de cultivo utilizados, se observó que en ambas procedencias el porcentaje de supervivencia de las plántulas fue superior al 95,0% (98,2% medio de cultivo P5 y 97,5% medio de cultivo A4 control). Transcurridos 60 días en esta fase y previo a su trasplante a campo, ninguna de las variables medidas tuvo diferencia estadística significativa (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación entre las plantas obtenidas de la multiplicación en los medios de cultivo P5 y A4+0,65 a los 60 días en la fase de aclimatización del cultivar 'INIVIT PV 06-30'.

Medio de cultivo	Largo del pecíolo (cm)	Ancho de la hoja 2 (cm)	Largo de la hoja 2 (cm)	Distancia entre las hojas 2 y 3 (cm)	Altura de la planta (cm)
P5	4,56	9,33	25,56	1,63	39,13
A4 + 0,65	4,68	9,20	25,14	1,70	39,20
T	-0,71ns	0,48ns	0,87ns	-0,75ns	-0,073ns

Con relación a la variación somaclonal correspondiente a manchas irregulares de las hojas (hojas variegadas), fue de 1,0% en las plantas multiplicadas en el medio de cultivo A4 y de 0,6% en el medio de cultivo P5.

Este tipo de variante somaclonal (Figura 4) fue descrita por Reuveni e Israeli (1990) como “*axilares mosaic-like*” y señalan que la misma representa el 10,0% de todas las variaciones.



Figura 4. Variante somaclonal observada durante la fase de aclimatización del cultivar 'INIVIT PV 06-30'.

Côte *et al.* (2000), durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cv. '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 ocurridos.

López (2007) al utilizar el cultivar de plátano vianda 'Navolean' encontró que la variación somaclonal correspondiente a manchas irregulares de las hojas (hojas variegadas), fue de 0,4% en las plantas obtenidas por embriones somáticos de yemas axilares como explante inicial y organogénesis. En el caso de las plantas derivadas de los embriones somáticos a partir de multiyemas como explante inicial, se observó 0,5% de la variación anterior.

Otros tipos de variantes somaclonales no fueron observadas en las plantas objeto de estudio, sin embargo, Sandoval *et al.* (1997), afirmaron 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.

Canchignia y Ramos (2004) señalaron que el uso de las técnicas de cultivo de tejidos en la micropropagación clonal *in vitro* de musáceas, ha permitido la producción masiva de plantas sanas, libres de hongos, nemátodos, bacterias y además la multiplicación rápida de genotipo de gran importancia económica en áreas relativamente pequeñas, permitiendo tener poblaciones uniformes con alto rendimiento por hectárea, lo cual demuestra la factibilidad de continuar los estudios realizados hasta la etapa de campo.

Los resultados alcanzados en la presente investigación permitieron el desarrollo de una metodología para la propagación del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' a partir de los explantes tomados de la propagación en CRAS e iniciados con un tamaño de 0,5 cm en forma de rectángulo sin eliminar el pseudotallo. Posteriormente el uso del medio de cultivo P5 favoreció su multiplicación y posterior transferencia a la fase de aclimatización.

5. CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología para la propagación *in vitro* del cv. de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' en la Biofábrica de Cienfuegos a partir de un nuevo explante para el establecimiento *in vitro*.
2. El uso del Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) posibilitó incrementar los volúmenes de explantes para la etapa inicial del proceso de micropropagación.
3. Se definió el mejor medio de cultivo para la multiplicación de cultivar objeto de estudio incrementándose el índice de multiplicación y reducción de la fenolización.
4. Se logró más del 95,0% de supervivencia de las plántulas obtenidas con bajos porcentajes de variación somaclonal correspondiente a hojas variegadas.

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear la metodología desarrollada para la propagación *in vitro* del cultivar de plátano 'INIVIT PV 06-30 y evaluar el comportamiento de la metodología en otros cultivares de interés para la propagación masiva.
2. Profundizar en el estudio de complementar los métodos de propagación *in vitro* con otras alternativas tradicionales o semitradicionales de producción de semillas.
3. Evaluar en condiciones de campo la estabilidad genética de las plantas obtenidas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Afza R, Van Duren M, & Morpurgo R, Novak F. (1996). *Banana Tissue Culture and Its Prospective Use in the Developing Countries*. New Delhi. Calcuta, India: Oxford y IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- 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.
- Akita, M, Shigeokka, T, Kooizumi, Y, & Kawamura, M. (1994). *Mass propagation of shoots of stevia rebaudiana using a large scala bioreactor*. Plant Cell Reports.
- Albarrán J, González O, Torrealba, M, Salazar, E, & Trujillo, I. (2006). *Propagación masiva de plantas de banano mediante cultivo de ápices caulinares utilizando sistema de biorreactores*. Barquisimeto, Venezuela: Congreso Nacional de Fruticultura.
- Alvard, D, Cote, F, & Teisson, C. (1993). *Comparison of methods of liquids médium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants*. Plant Cell Tissue and Organ Culture.
- Álvarez, J.M. (2005). Anuario estadístico de plátanos y bananos en Cuba, 10.
- Arnold, S, Sabala, I, Bozhkov, P, Dyachok, J, & Filonova, L. (2002). *Developmental pathways of somatic embryogenesis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.
- Belalcázar, S. (1991). *El cultivo del Plátano en el trópico*. Cali, Colombia: ICA.
- Bournnell, C. (2003). *El poder de los genes alimenta una revolución agrícola en África*. Montpellier, Francia: INIBAP.
- Cajacuri, M. (2007). *Evaluación morfológica e histológica del proceso de formación de yemas múltiples de Musa (AAB) cv. Plátano Hartón* (Trabajo de Grado). Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.

Bibliografía

- Canchignia, H. F, Sigcha, L. E, Toaquiiza J. P, Ramos, L. E, Saucedo, S. G, Carranza, M. S, & Cevallos, O. F. (2008). *Alternativas para la Propagación in vitro de Plátano Variedad Maqueño (Musa balbisiana AAB)* (Vols. 1-43). Ciencia y Tecnología.
- Colectivo de Autores. (2005). *Analysis of expressed sequence tags from Musa acuminata ssp. Burmannicoides var. Calcutta 4 (AA) leaves submitted to temperature stresses* (Vols. 1-110). Theor Appl Genet.
- Colectivo de Autores. (2008). *role of mutation techniques and genomics for banana and plantain (Musa spp) major staple crops in the tropics* (Vols. 1-12). Vienna, Austria: FAO-IAEA Internacional Symposium on Induced Mutations in Plants.
- Côte, F, Folliot, M, Domergue, R, & Dubois, C. (2000). *Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (Musa AAA, cv. Grand Naine)*. Euphytica.
- Crouch, J, Vuylsteke, H, & Ortiz, R. (1998). *Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (Musa spp)*. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture.
- 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* (Vols. 1-118). Plant Cell Reports.
- Daniels, D. (2003). *Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA 21' (Musa spp. AAAB)* (Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas). UCLV. IBP, Santa Clara, Cuba.
- Daniells, J, Jenny, Ch, Karamura, D, & Tomekpe, K. (2001). *Musaloge: a catalogue of Musa germoplasma. Diversity in the genus Musa*. France: Amaud E & Sharrock S (eds). INIBAP Montpellier.
- De Clark, G. (1990). *How to measure somaclonal variation*. Acta Botanic.

Bibliografía

- 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.
- Dixon, R. A. (1991). *Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures*. En: *Plant cell culture a practical approach*. Washington, EEUU: Dixon R.A. IRL PRESS.
- 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*. EEUU: Science Publishers, Inc. Enfield, NH.
- Escalant, J. V, & Teisson, C. (1989). *Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species Musa acuminata and Musa balbisiana*. EEUU: Plant Cell Reports.
- Filipia B, Roza. (1983). *Propagación intensiva del cultivo del plátano* (Vol. 1). Ciencia y Técnica de la Agricultura. Viandas Tropicales.
- García, L, & Noa, J. (1998). *Obtención de plantas libres de patógenos*. En: *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Gómez, R. K. (1997). *Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas*. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Haccius, B. (1978). *Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus culture*. Phytomorphology.
- Herrera, V. (2000). *ánalisis 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.

Bibliografía

- Hu, C. V., & Wang, J. P. (1983). *Meristem, shoot tip and bud culture*. Nueva York, EEUU: Macmillan Publishing.
- Hussey, G. (1983). *In vitro propagation of horticultural and agricultural crops*. EEUU: Cambridge University Press.
- Jain, S, Brar, D. S, & Ahloowalia, B. S. (1998). *Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. Somaclonal variation and induced mutations crop improvement*. Great Britain: Kluwer Academic Publishers.
- Jiménez, E. (1998). *Cultivo de ápices y meristemos. En: Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, GEO.
- Jiménez, E, & Ferial, M. (1998). *Empleo de Biorreactores para la Propagación Masiva. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas.
- Kaemmer, D, Afza, R, Weising, K, Kahl, G, & Novak, F. (1992). *Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana* (Vol. 10). Bio. Technology.
- Kitto, J. M. (1997). *Commercial Micropropagation* (Vols. 1-32). HorScience.
- Kodym, A, & Zapata, F. (1999). *Natural light as alternative light source for the in vitro culture of banana (Musa acuminata cv. 'Grande Naine', AAA)* (Vols. 1-55). Plant Cell Tissue and Organ Culture.
- Krikorian, A. (1991). *Rapid multiplication of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture* (Vols. 1-19). Hort Science.
- Krishnaraj, S, & Vasil, I. K. (1995). *Somatic embryogenesis in herbaceous monocots*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Lagoda, P, Noyer, J, Dambier, D, Baurens, F, Grapin, A, & Lanaud, C. (1998). *Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae* (Vols. 1-7). Molecular Ecology.

Bibliografía

- Larkin, P, & Scowcroft, W. (1981). *Somaclonal variation: A novel source of genetic variability from cell cultures for improvement* (Vols. 1-60). Theoretical Applied Genetic.
- Litz, R. E, & Jarret, R. L. (1991). *Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis*. Cali, Colombia: CIAT.
- López, J. (2007). *Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean'* (Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas). Universidad de Ciego de Avila, Centro de Bioplasmas. Ciego de Avila, Cuba.
- Marassi, M. A. (2004). Hormonas Vegetales. Retrieved from <http://www.biología.edu.ar/plantas/hormonas>
- MINAG. (2007). *Instructivo Técnico del Plátano*. Cuba: Centro de información y documentación agropecuaria. Dirección Nacional de Cultivos Varios.
- Murashige, T, & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures* (Vols. 1-15). *Physiol Plant*.
- MusaDOC. (2004). *International Network for the Improvement of Banana and Plantain*. Montpellier, Francia.
- Novak, F. (1992). *Bananas and Plantains*. Oxon, UK: CAB International. Wallingford.
- Orellana, P. (1994). *Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de Musa* (Resumen de Tesis Doctoral). Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Orellana, P. (1998). *Introducción a la Propagación Masiva. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (Instituto de Biotecnología de las Plantas). Universidad Central de Las Villas, Santa Clara. Cuba.
- Orellana, P, Bermúdez, I, García, L, & Veitía, N. (2002). *Evaluation of the agronomic characteristics of plantain hybrids* (Vols. 1-11). Infomusa.

Bibliografía

- Osuji, J. O. (1997). *Multivariate pattern of quantitative tract variation in triploid banana and plantain cultivars* (Vols. 1-71). Scientia Horticulturae.
- Parrott, W. (1993). *Cell-culture Techniques: Cell Culture, In Vitro Selection, and Somaclonal Variation*. San José, Costa Rica: Reunión INIBAP.
- Pérez, J. (1998a). *Introducción a la mejora de plantas. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. GEO.
- Pérez, J. (1998b). *Mutagénesis in vitro. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. GEO.
- Pérez, J. N. (1987). *Die nutzung der in vitro kultur und die induction von mutationen bei de zuchtung von zuckerrohr* (Thesis Dr. Habil). Universidad de Leipzig, RFA.
- Pérez, J. N. (1998). *Variación somaclonal. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, Cuba: IBP.
- Pérez, J. N, 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.
- Pérez, L. (2009). *Control de la Sigatoka negra del banano y del plátano: Seminario Nacional sobre desarrollo de plátanos y bananos en Cuba*. Ciego de Ávila.
- Prakash, J. R. (1994). *Plant Biotechnology*, Wageningen Agricultural University.
- Preil, W. (1991). *Application of bioreactors in plant propagation. Debergh PC. Micropropagation. Technology and Applications*. London: Kluwer Academic Publishers.
- Redenbaugh, K. (1986). *Analogs of Botanic seeds*. United States Patent.
- Reuveni, O, Israelí, Y, Pegan, H, & Esthdat, Y. (1985). *Genetic variability in Banan plants multiplied vía in vitro Culture. IBPGR*.
- Robinson, J. (1996). *Bananas and plantains. Crop production sciencie in horticulture series*. Cambridge, UK: CAB International, University Press.

Bibliografía

- Roca, W. Mroginski. (1991). *Micropropagación de Plátanos y Bananos. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (Vols. 1-22). CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Roca, W. Mroginski. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- 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*. INIVIT, Programa Nacional Científico.
- Rowe, P. (2000). *Programa de Banano y Plátano. Informe Técnico*. FHIA.
- Sánchez, R, Pino, J. A, Vallin, C, Pérez, M. E, Iznaga, Y, & Malpartida, F. (2002). *Effects of the natural fungicide F20 on black Sigatoka disease (Mycosphaerella fijiensis Morelet) on plantain (AAB) and banana (AAA)* (Vols. 1-11). Infomusa.
- Sandoval, J, A, Côte, & Doumas, P. (1999). *Reconocimiento in vitro de variantes somaclonales de porte alto en banano (cv. 'Gran Enano', Musa AAA)* (Vols. 1-24). CORBANA.
- Sandoval, J. A, Pérez, L, & Côte, F. (1997). *Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (Musa AAA cv. 'Gran Enano')* (Vols. 1-22). CORBANA.
- Sannasgala, K. (1989). *In vitro somatic embryogenesis in Musa spp* (Thesis Ph.D. K.U. Leuven). Belgium.
- Savangikar, V. A. (2004). *Role of low cost options in tissue culture. Proceedings of low cost options for tissue culture technology in developing countries*. Vienna, Austria: FAO/IAEA.
- SIGMA. (1991). *Catalogue Sigma Chemical Company*. EEUU.
- Simmonds, N. W. (1973). *Clasificación de los cultivares del plátano*. Madrid, España: BLUME.

Bibliografía

- Simmonds, N. W., & Weatherup, S.T. C. (1990). *Numerical taxonomic of cultivated bananas* (Vols. 1-67). Trinidad: Tropical Agriculture.
- Smith, M. (1988). *A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas* (Vols. 1-43). Fruits.
- Smith, M., & Hamill, S. (1993). *Banana tissue culture. Banana industry protection board of Queensland. Annual report 1993-1994.*
- Steward, F. C, Mapes, M. O, & Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*, 45, 693-704.
- Swennen, R., & Vuylsteke, D. (1995). *Phenotypic diversity and patterns of variation in West and Central African plantains (Musa spp., AAB grupo Musaceae)* (Vols. 1-49). Economic Botany.
- Tisserat, B. (1991). *Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. En: Plant Cell culture a practical approach.* Washington, EEUU: Dixon R.A. IRL PRESS.
- Tisserat, B, Esan, E, & Murashige, T. (1979). *Somatic embryogenesis in angiosperms* (Vols. 1-1). Hort. Rev.
- Tomekpe, K, Jenny, C, & Escalant, J. V. (2004). *Análisis de las estrategias de mejoramiento convencional de Musa* (Vols. 1-13). InfoMusa.
- Uzcátegui, J. P, Hernández, Y, Osorio, D, & Rivas, M. (2010). *Evaluación del comportamiento in vitro de ápices de plátano Musa AAB cv. 'Hartón' y 'Hartón Doble Tallo'* (Vols. 1-3). Producción Agropecuaria/ Biotecnología.
- Valmayor, R. V. (2008). *Banana cultivar names. Musa × paradisiaca.* Wikipedia.
- Van Duren, M, Morpurgo, R, Doleze, J, & Afza, R. (1996). *Indution and verification of autotetraploids in diploid banana (Musa acuminata) by in vitro techniques* (Vols. 1-88). Euphytica.
- Vasil, I. K. (1994). *Automation in plant propagation* (Vols. 1-39). Plant Cell Tissue and Organ Culture.

Bibliografía

- Ventura, J. C. (2010). *Empleo de la mutagénesis in vitro para la obtención de mutantes de porte bajo en Musa spp. cultivar 'Zanzíbar' (AAB)* (Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Biotecnología Vegetal). Universidad Central de Las Villas.
- Villalobos, V. M. (1991). *Micropropagación, metodología y resultados*. Cultivos de Tejidos.
- Vuylsteke, D. R., & De Langhe, E. (1985). *Feasibility of in vitro propagation of banana and plantains* (Vols. 1-62). Trinidad: Tropical Agriculture.
- Vuylsteke, D. R., Swennen, R., & Langhe, E. (1991). *Somaclonal variation in plantains (Musa spp. AAB group) derived from shoot-tip culture* (Vols. 1-46). Fruits.
- Zambrano, A. Y, Martínez, G, Gutiérrez, Z, Manzanilla, E, Villarda, L. V, & Demey, J. R. (2007). *Marcador RAPD asociado a la resistencia a Fusarium oxysporum en Musa* (Vols. 1-011). Caracas, Venezuela: Asociación Interciencia.