

Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”
Facultad de Ciencias Agrarias



TRABAJO DE DIPLOMA

Para Optar por el Título de Ingeniero Agrónomo

TITULO: Optimización de la Fase de proliferación para la micropropagación de banano cv Jonhson (AAA)

Diplomante: Anaily Muñoz Gómez.

Tutor: MsC. Silvio de Jesús Martínez Medina.

MsC. Marilín Fontes Leandro.

Cienfuegos, 2012

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Silvio De Jesús Martínez Medina y Marilyn Fontes Leandro por la paciencia, dedicación, constancia y profesionalidad con que enfrentaron la tutoría de esta tesis, así como por sus valiosas ideas, sugerencias y recomendaciones para la redacción y presentación de la misma.

A mis compañeros de trabajo que me brindaron sus experiencias, opiniones y sugerencias para la concepción de este trabajo.

A mis padres y esposo, fuentes principales de las enormes dosis de amor, paciencia, cariño, estimulación, apoyo moral, comprensión y exigencia que se requirió para llevar este trabajo a feliz término.

A todas las personas que de una u otra manera aportaron al trabajo.

¡GRACIAS DE TODO CORAZÓN!

DEDICATORIA

A los que han cargado el peso fundamental de este trabajo por su constante preocupación y la estimulación implícita en ella, para seguir adelante.

A mi hijo, que está por nacer, para mostrarle el camino que debe recorrer en su formación.

RESUMEN

La propagación de plátanos y bananos (*Musa spp.*) a través de técnicas biotecnológicas ha generado una gran demanda de las Biofábricas, sin embargo es necesario optimizar este proceso de producción para hacerla más eficiente. El trabajo se realizó en la Biofábrica de Cienfuegos con el objetivo de incrementar los coeficientes de multiplicación durante la fase de proliferación para la micropropagación del cultivar de banano Jonhson (AAA), para lo cual se estudiaron diferentes combinaciones hormonales óptimas de reguladores de crecimiento del 6 bencilaminopurina , Ácido Indol Acético y el efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la formación de nuevos brotes axilares. Como material vegetal se utilizaron brotes axilares (1,0 cm. de altura y 0,5 cm. de diámetro del pseudotallo), con dos subcultivos en multiplicación. Se emplearon nueve combinaciones hormonales y siete formas de corte y división de los brotes. Los resultados mostraron que con la adición al medio de cultivo de 4 mg l⁻¹ de 6 BAP sin AIA se incremento el número de brotes por explante en el cultivar Jonson (AAA) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos se logró con el empleo de un corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no dividir transversalmente el pseudotallo, incrementó significativamente el número de brotes por explante. Adicionalmente con este proceder se lograron plantas de mayor altura.

Palabras clave: plátanos, bananos, cultivar, brotes axilares

INDICE

	Pág.
I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	4
2.1 Origen y características de los plátanos y bananos.	4
2.1.1 Descripción del producto.	5
2.1.2 Importancia de los plátanos y bananos.	5
2.2 Situación actual de plátanos y bananos.	6
2.3 Cultivo de tejido.	7
2.3.1 Regeneración por organogénesis en plátanos y bananos.	9
2.4 Fase 0	9
2.4.1 Desinfección del explante inicial.	10
2.4.2 Estado fitosanitario de los ápices.	10
2.5 Fase I	12
2.5.1 Tamaño y seccionado del ápice implantado.	13
2.5.2 Incubación de los explante.	13
2.5.3 Medio de cultivo en establecimiento.	14
2.6 Fase II	15
2.6.1 Empleo de yemas axilares o adventicias.	15
2.6.2 Número de subcultivo.	16
2.6.3 Estado físico de los medios.	17
2.6.4 Proliferación y manejo de los vástagos o brotes.	17
2.6.5 Medio Ambiente.	18
III Materiales y Métodos	21
3.1 Combinaciones hormonales (6BAP-AIA) para la multiplicación del cultivar de <i>Musa Spp</i> Jonhson.	22
3.2 Influencia de las forma de cortar y dividir el pseudotallo sobre el numero de brotes en la fase de proliferación del cultivar de <i>Musa Spp</i> Jonhson.	23
IV Resultados y discusión.	25
4.1 Influencia de diferentes combinaciones hormonales (6BAP-AIA) para la proliferación del cultivar de <i>Musa Spp</i> Jonhson.	25
4.2 Influencia de corte y división del explante en el número de brotes durante la fase de proliferación del cultivar de <i>Musa Spp</i> Jonhson.	28
V Conclusiones.	34
VI Recomendaciones	35
VII Bibliografía	36

I. INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos (*Musa spp.*) se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y son un componente importante en la alimentación de millones de personas. La producción mundial de musáceas fue de 125 049 265 toneladas métricas en el año 2010 y de ellas el 27,46% correspondieron a cultivares de plátano vianda (FAO, 2011).

El plátano (*Musa spp.*) constituye una de las principales especies de plantas cultivadas en muchas regiones del planeta, la cual a adquirido gran interés económico por su importancia en la dieta humana.

La multiplicación vegetativa de esta especie por los métodos tradicionales tiene varios inconvenientes, según López, (1989), se obtiene baja tasa de multiplicación (4-7 hijos) en dependencia del clon, algunos investigadores han intentado solucionar este problema mediante fraccionamiento de cormos (Rodríguez *et al.*, 1981).

La transmisión de plagas y enfermedades a través del material de propagación, constituye otro de los aspectos negativos de estos métodos de propagación. Es por ello que se imponía la necesidad de dar solución a esta problemática, con el objetivo de obtener grandes volúmenes del material de propagación en un corto período de tiempo, libres de plagas y enfermedades. Una de las vías para dar respuesta a esta situación la constituye la micropropagación *in vitro*, la cual se puede definir como una forma de propagación vegetativa empleando las técnicas de cultivo de tejidos desarrollándose bajo condiciones asépticas controladas.

Existe en la provincia de Cienfuegos un programa para desarrollar poblaciones de la variedad de plátano Jonhson, también conocido por Long Bellow en algunos países, que se ha puesto en práctica en todo el lomerío del Macizo de Guamuhaya, ubicado en el Municipio de Cumanayagua.

El plan para el año 2012 es dejar plantadas en la serranía de la Provincia 150 hectáreas. Con estos precedentes, a corto y mediano plazo, la oferta de plátano fruta se hará cada vez más frecuente en las placitas y puntos de

venta de los asentamientos del Plan Turquino, con potencialidades para abastecer otros agromercados del territorio. Este cultivar se caracteriza por su gusto aceptable al paladar y será plantado junto a los cafetales y futuras plantaciones de cacao hoy en fomento. La propagación *in vitro* constituirá el método fundamental para producir las vitroplantas que permitirán dar cumplimiento al objetivo.

En Cuba desde la primera mitad de la década del 80 se iniciaron las investigaciones para establecer la propagación *in vitro* de esta especie la cual es publicada por Pérez *et al.*, (1989). En 1987 esta tecnología cubana había sido escalada industrialmente con la construcción de una Biofabrica en Villa Clara (Pérez *et al.*, 2000). Actualmente existen en el país 13 Biofábricas destinadas a la propagación masiva de plátanos, bananos y otras especies, con una capacidad de producción de 60 000 000 de vitroplántas (Pérez *et al.*; 2000). La provincia de Cienfuegos cuenta con uno de estos centros biotecnológicos con un potencial de producción de 1,5 millones de vitroplantas *in vitro* anuales.

Aunque la micropropagación de plátanos permite obtener grandes volúmenes de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria en un corto período de tiempo sin embargo el banano cv Jonhson (AAA) presenta una baja formación de brotes por explante durante la fase de proliferación (fase II).

“La determinación de las combinaciones de [6benzilaminopurina (6BAP)-Acido Indol Acético (AIA)], así como la forma de cortar y dividir los brotes durante la fase de proliferación permitirán incrementar el número de brotes por explantes en el banano cv Jonhson (AAA)”.

Para dar cumplimiento a la hipótesis planteada se definieron los siguientes objetivos de trabajo:

Objetivo General.

- Incrementar el número de brotes por explante durante la fase II para la micropropagación del banano cv Jonhson (AAA).

Objetivos específicos.

1. Determinar las combinaciones hormonales óptimas de 6BAP y AIA para aumentar el número de brotes por explante en la fase II del banano cv Jonhson (AAA).
2. Definir la forma de cortar y dividir los brotes para incrementar los coeficientes de multiplicación en la fase II banano cv Jonhson (AAA).

II. Revisión Bibliográfica

2.1 Origen y características botánicas de los plátanos y bananos.

Banano nombre común de las especies de género tropical de plantas herbáceas de porte arbóreo que producen un fruto llamado banana o plátano. Las especies de este género son originarias del Sureste Asiático, pero ahora se cultivan mucho en todos los países tropicales por sus frutos, fibras y hojas. El banano es una planta herbácea de gran tamaño, provista de una raíz perenne o rizoma, a partir de la cual se perpetúa por medio de brotes. En el trópico, el tallo es anual: muere cuando madura el fruto y brota de nuevo a partir de las yemas del rizoma. Estos tallos o yemas son el medio normal de propagación y creación de nuevas plantaciones; el desarrollo es tan rápido que el fruto suele estar maduro 10 meses después de la plantación de los brotes según el genotipo. El tallo adulto mide entre 3 y 12 metros de altura y está rematado por una copa de grandes hojas ovaes de hasta 3 metros de longitud caracterizada por un pecíolo y un nervio central fuerte y carnoso. Las flores se disponen en espiral a lo largo de grandes espigas que brotan del centro de la copa foliar; las femeninas ocupan la base de la espiga y las masculinas el ápice. La longitud del fruto oscila entre 10 y 30 cm.; un racimo pesa 11 kg. Por término medio, pero no es raro que algunos superen los 18 kg. Cada tallo fructifica una vez, muere y da lugar a varios brotes, de los que fructifican 2 o 3. (INIBAP, 2004) la parte comestible del plátano contiene por término medio un 75% de agua, un 21% de hidratos de carbono y 1% de grasas, proteínas, fibras y cenizas. Las hojas y tallo tienen abundante fibra que se usan en la fabricación de papel y cuerdas.

La mitad de la producción bananera mundial se concentra en África, y gran parte de ella se consume localmente. Las principales regiones exportadoras son América Central y América del Sur.

Clasificación Científica: El banano pertenece al género *Musa*, de las musáceas (*Musaceae*). Los plátanos maduros también llamados machos, son de la especie *Musa paradisiaca*.

2.1.2 Importancia de los Plátanos y Bananos.

Los plátanos y bananos poseen frutos altamente energéticos, sus carbohidratos son fácilmente asimilados por el organismo. En general estos frutos se componen principalmente de agua, carbohidratos, conteniendo cantidades insignificantes de proteínas y grasas, sin embargo son ricos en vitamina A, B, C, E y minerales, de ahí su alta demanda en alimentación mundial. (López, 1989).

Además de los diferentes órganos del banano poseen mundialmente diferentes usos entre los que podemos citar: medicinal, producción de alcohol y fuente de fibra. (INIBAP, 2001; INIBAP; 2002).

Los agricultores suministran a los mercados mundiales bananos de diversos tipos (bananos para postres, cocción, molturación y plátanos) no soliendo hacer tratamientos químicos para su conservación, por lo que necesitan clones resistentes y en muchos casos no poseen los recursos financieros para poder pagar otro tipo de tecnología que aumente los rendimientos y la resistencia a enfermedades. La Biotecnología pudiera ofrecer nuevas oportunidades para la seguridad alimentaria, el banano es la fuente de mayor importancia como alimento fundamentalmente en países en vía de desarrollo como pudiera ser regulando la maduración, esto podía prolongar la campaña, lo que permitiría poner a disposición del consumo local más frutos y por períodos más largos. (INIBAP, 2004).

2.2 Situación actual de la producción de plátanos y bananos.

La producción actual de plátanos y bananos se estima alrededor de 88 millones de toneladas al año, con un área calculada de siembra de 10 millones de hectáreas según la FAO, (2011) que lo coloca en uno de los alimentos de mayor producción mundial, después del arroz, maíz y trigo (Gómez *et al.*; 2000). Este cultivo forma parte de la dieta alimenticia de más de 400 millones de personas (Lerma *et al.*, 2002). Las regiones de producción de plátano más grandes del mundo son África y América Latina los cuales representan el 74.2% y 22.5% de la producción mundial respectivamente, seguido por Asia

con 3.3%. (Rodríguez y Rodríguez, 2001). Los cultivares más relevantes de *Musa* son infértiles y susceptibles a enfermedades, limitaciones que han propulsado el desarrollo de alternativas biotecnológicas (Proyecto ue-01-ica4-ct-10063) (Noceda *et al.*, 2003).

Hasta diciembre de 1999 se habían plantado en el país más de 10000 ha de los clones híbridos producidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) resistentes a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis*), ello representan el 10.58% del área nacional sembrada con estos clones híbridos, lográndose este objetivo con el empleo de la micropropagación *in vitro* en Biofabricas lo cual cambió la estructura clonal en el país, fundamentalmente basada en bananos de cocción Burro Censa (Pérez *et al.*, 2000).

En Cuba los bananos de cocción (plátanos burros, AAB) y tetraploides introducidos de Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), han ido progresivamente reemplazando las áreas dedicadas al cultivo de plátanos vianda o macho, AAB debido a los bajos rendimientos y la susceptibilidad a las enfermedades de estos cultivos.

La transferencia de nuevos genes en el genoma de las plantas puede resultar en un incremento de la tolerancia a estrés abiótico, protección contra agentes patógenos o plagas, puede mejorar las cualidades fisiológicas o nutricionales y las propiedades de almacenamiento. La introducción y resistencia por las técnicas de transformación genéticas de este cultivo tiene un valor incalculable (Sagi, 2000), limitada en Cuba aún su aplicación en los plátanos viandas por la no existencia de un sistema eficiente de regeneración de plantas a nivel celular. Todos estos obstáculos de los plátanos viandas (machos) que tradicionalmente se cultivan, convierte la obtención de nuevos cultivares en una prioridad urgente.

La producción actual de plátano en Cuba es afectada por dos fenómenos importantes, la sequía y los huracanes, aunque existen otros factores que afectan la producción, como son las plagas y enfermedades, entre las cuales podemos enumerar hogos como la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis*, Morelet), que es una de las enfermedades más importante que ataca la

superficie foliar de los plátanos y bananos, produciendo grandes pérdidas del área fotosintética tanto por la acción del patógeno como de las toxinas difundidas por el mismo, provocando bajos rendimientos en el cultivo (Mourichon *et al.*, 2000; Rodríguez, 2000), los virus como el CMV y BSV y otras bacterianas como *Erwinia* que afectan el cormo y el pseudotallo. Con los clones híbridos FHIA-18 (AAAB), FHIA-01 (AAAB), FHIA-20 (AAAB), FHIA-21 (AAAB), FHIA-22 (AAAB), se atenúa esta situación excepto la de procedencia viral. Existen otros factores que afectan la producción platanera en el país, motivado por desconocimiento, mal manejo del hombre entre las cuales se pueden citar la selección del hijo seguidor, etc. Estos factores provocan que se tenga plátano sembrado en todo el país con el objetivo de obtener altas producciones en grandes extensiones, sin embargo en la actualidad se trabaja en todos los territorios del país por la electrificación de las áreas existentes entre un 20-25% y establecer una tecnología de futuro como nueva concepción en la producción de plátanos fruta y vianda, basada en el uso de altas densidades de siembras con un solo ciclo de cultivo, la cual incrementa los rendimientos dos o tres veces por encima de lo tradicionalmente utilizado hasta el momento, las cuales cumplirían el objetivo de entregar 5 libras mensuales del fruto por habitantes urbanos (Alvares, 2003).

Los clones de plátanos y bananos procedentes de la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas se están extendiendo en diferentes regiones del mundo, como en la India, Asia, los cuales han sido recibidos y proliferados in vitro evaluándose en estas regiones su comportamiento agronómico y resistencia a enfermedades entre ellas la producida por *Mycosphaerella*. (Menon *et al.*, 2004; INIBAP, 2004)

2.3 Cultivo de tejido.

Las técnicas del cultivo de tejidos constituyen una de las aplicaciones prácticas más importantes de las ciencias biotecnológicas para la rápida propagación de las plantas (George y Sherrinton, 1984). La obtención de material de propagación libre de enfermedades fungosas y bacterianas, así

como la conservación e intercambio de germoplasmas constituyen importantes aplicaciones de estas técnicas, (Vuylsteke y de Langhe, 1985).

Los primeros reportes sobre la aplicación de las técnicas del cultivo *in vitro* en bananos se remontan a la década de los años 70 en Taiwán y China. (Ma y Shii, 1972).

El empleo del cultivo de tejidos en el mejoramiento genético se inicia con la inducción de mutaciones por irradiación de yemas que se desarrollaba *in vitro* (De Guzmán *et al.*, 1976-1982).

En Cuba a partir de la primera mitad de la década del 80 se iniciaron los trabajos para la micropropagación *in vitro* de plátanos y bananos, lográndose desarrollar esta tecnología y escalarla industrialmente en 1987 (Pérez *et al.*, 1989).

La mayor parte de la producción de vitroplántas en el mundo está basada en plantas de flores, árboles frutales y en baja proporción en plantas agrícolas, dentro de los cuales los plátanos y bananos constituyen la especie más propagada seguida por la papa. (Orellana *et al.*, 1981)

2.3.1 Regeneración por organogénesis en plátanos y bananos.

Las fases de la micropropagación *in vitro* de plantas son las siguientes:

La fase 0 (fase preparativa) es importante y necesaria para la micropropagación pues se selecciona el material de partida en base a sus características genéticas y fitosanitarias (Debergh y Maene, 1981).

En la fase I (establecimiento) el ápice caulinar es manipulado mediante la composición del medio de cultivo, con el propósito de establecer un renuevo viable.

La fase II (multiplicación, proliferación o ahijamiento) tiene como objetivo la multiplicación de vástagos.

La fase III (elongación, inducción de raíces y crecimientos) debe garantizar la formación completa de la vitroplanta.

La fase IV (endurecimiento, adaptación o aclimatación de las vitroplantas)

2.4 Fase 0

Esta fase persigue garantizar material de partida de alta calidad genética y fitosanitaria, vías que aceleran el desarrollo y eficiencia de la fase I.

La selección y crecimiento de la planta madre en condiciones asépticas influye directamente en la disminución de las contaminaciones principalmente bacterias (Martínez *et al.*, 1995).

Una problemática que se presenta en la micropropagación *in vitro* de esta especie lo constituye las contaminaciones y la oxidación fenólica que se produce en la fase I, pues generalmente la selección del material se hace en campo y bancos de germoplasma y se introducen directamente *in vitro* (Zamora *et al.*, 1989)

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituye un serio problema a nivel mundial en los numerosos laboratorios.

Estos están comúnmente en las plantas *in vitro* pero pueden provocar efectos devastadores en estas (Skirvin *et al.*, 1999)

La oxidación fenólica durante la fase I depende en gran medida del tratamiento que reciban los ápices durante la fase 0, en la cual los ápices pueden ser tratados con antioxidantes para disminuir la fenolización de los mismos en el medio de cultivo. Entre los antioxidantes empleados se reportan la cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico y carbón activado (Sandoval, 1985).

El grado de oxidación fenólica está muy relacionado con el genotipo (Pérez *et al.*, 1989) observaron mayor oxidación fenólica en el clon Burro Censa (ABB) que en los clones del grupo Cavendish (AAA), por lo que se emplea el agua de coco para contrarrestar la oxidación fenólica.

Se reporta que cuando los ápices provienen directamente de campo, la duración de la fase I se prolonga 24 – 25 días después de la implantación con índices de contaminación superiores al 20 %. (Martínez *et al.*, 1992; Orellana *et al.*, 1994)

Esta problemática pudiera ser resuelta si los explantes iniciales provinieran de plántulas donantes cultivadas en condiciones de mayor asepsia. Empleando planta que se desarrollaban en estas condiciones como donantes del explante inicial, se produjo una respuesta más rápida a la proliferación que en los de campo. (Cronauer y Krikorian, 1983; Orellana, 1994).

2.4.1 Desinfección del explante inicial.

Para la desinfección del explante inicial se han empleado comúnmente soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCL) en concentraciones entre 0,5 y 5% (Krikorian y Cronauer, 1984; Jarret *et al.*, 1985; Sandoval, 1985). Las soluciones de hipoclorito de calcio (CaOCL) son tan efectivas como las de sodio (Vuylsteke y De Langhe, 1985; Benerjee *et al.*, 1985). Los tiempos de duración de las desinfecciones oscilan entre 5 y 45 minutos (Cronauer y Krikorian, 1983; Damsco *et al.*, 1984)

La excisión del explante es recomendable realizarla después de la desinfección para eliminar los tejidos que han sido dañados por la solución de hipoclorito.

La aplicación de una doble desinfección con hipoclorito de sodio o calcio, seguido de enjuague con agua destilada y esterilizada por 2 o 3 minutos ha sido empleada por varios investigadores (Sandoval, 1985; Novat *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1989).

2.4.2 Estado fitosanitario de los ápices.

Uno de los objetivos de la fase es lograr la implementación *in vitro* de ápices libres de enfermedades bacterianas y fungosas.

Los hongos y bacterias con el proceso de desinfección y eliminando los tejidos externos del corno y el pseudotallo son liberados de los ápices y meristemas (Arias y Valverde, 1987).

El cultivo de meristemas ha sido utilizado para obtener plantas de banano libre de virus. Combinando tratamientos térmicos con cultivos de meristemas se ha obtenido plantas libres de virus del mosaico amarillo del pepino (CMV) (Gupta, 1986; Solarzana, 2002)

Martínez *et al.*, (2000) utilizando la tecnología de conrainmunoelectroforesis para detectar al hepatitis B en humanos, aplicaron esta técnica para descubrir el CMV en el cultivo del plátano, con resultados satisfactorios y aplicados en la producción de vitroplantas en este cultivo, combinado con la técnica de plantas indicadoras. A pesar de estos resultados el diagnóstico y saneamiento del banano Streak Virus (BSV) en *Musa Spp* en el cual se describe la observación de la microscopia electrónica por técnicas ISEM, utilizando un anticuerpo específico para el Badnavirus, virus estriado del plátano (BSV) ofrecen la posibilidad novedosa y factible la eliminación de este virus en el banano, con un 42% de factibilidad y novedoso para el banano, 95% de saneamiento y 40% de eficiencia muy superior al parecer a la técnica anteriormente mencionada (Hernández *et al.*, 2002).

Existen otros autores que citan la termoterapia o el cultivo de meristemo para eliminar este virus ya sean solas o combinadas (Helliot *et al.*, 2000).

Una problemática de estas técnicas lo constituye la obtención de líneas sanas para el programa nacional para la micropropagación de esta especie, pues para erradicarse este virus completamente con eficiencia se consume gran cantidad de tiempo, esta situación radica en que la demanda de plantas libre de virus en la red nacional de biofábricas requiere una alta sobrevivencia de los explantes con un alta regeneración, una mayor eficiencia en el tratamiento de terapia (Pérez, 1998).

La electroterapia constituye un método para eliminar los virus, la cual ha sido certificada (Bernal, 2000), además ha sido empleada en otros cultivos como la malanga, para la obtención de plantas libres del *Daheen Mosaic Virus (DMV)* en malanga (*Xanthosoma spp* y *Colocacia esculenta*) (Hernández, 2004).

Actualmente se trabaja con equipos y aditamentos para aplicar la electroterapia para diferentes tipos de virus (potyvirus, Luteovirus, Carlavirus, Potexvirus y Cucumivirus) patente 37/ 95 A01 C/08 1524/97. (Hernández *et al.*, 1997; Hernández, 2000), obtuvieron nuevos avances para la erradicación del banano streak virus (BSV) con un establecimiento de un 50 y 80 *in vitro*, un 40-80 de saneamiento y un 13 y un 60% de eficiencia del método.

2.5 Fase I

El objetivo fundamental de esta fase es lograr un cultivo aséptico de ápices de plantas de buenas características genéticas y fitosanitarias, previamente diagnosticadas para lograr confiabilidad durante el proceso tecnológico. La desinfección, el corte y la incubación de los explantes juegan un papel fundamental para lograr este objetivo.

Los explantes en la mayoría de los casos proceden de yemas, brotes jóvenes con hojas rudimentarias, hijos o brotes con hojas uniformes (Vuylsteke, 1989). La micropropagación a partir de ápices caulinares y meristemos ha sido reportada en plátanos y bananos por numerosos autores (Ma y Shii, 1972; Krikorian y Cronauer, 1984; Vuylsteke y De Langhe, 1985; Arias y Valverde, 1987; Pérez *et al.*; 1989) también se ha reportado el empleo de ápices meristemáticos florales como explante inicial. (Krikorian y Cronauer, 1984; Rao *et al.*, 1993)

Los ápices caulinares pueden ser obtenidos de todas las partes de la planta que contengan meristemos. La respuesta al crecimiento y la sobrevivencia del explante no difiere entre los ápices caulinares obtenidos a partir del pseudotallo madre, sus hijos, yemas laterales o hasta brotes muy pequeños (Vuylsteke, y De Langhe, 1985). Están pocos trabajos sobre el efecto en el comportamiento del cultivo en la etapa en que se obtienen los explantes, sin embargo las yemas, brotes pequeños con hijos rudimentarios y pequeños hijos en espada son preferidos como fuentes de explantes por su fácil manipulación y menos daños se le causan a la planta madre. Las yemas de ojos o botones que se encuentran alrededor de la yema apical han sido empleadas como fuente donadora del explante inicial (Damasco *et al.*, 1984; Vuylsteke, y De Langhe, 1985).

La implantación de ápices de plátanos y bananos a partir de plantas lesionadas que crecen *in situ*, cultivadas en invernaderos y canteros tecnificados constituyen una vía para aumentar la eficiencia de los métodos *in vitro* (Orellana, 1994; Martínez, 1995).

2.5.1 Tamaño y seccionado del ápice implantado.

El tamaño final del ápice de plátanos y bananos a implantar depende de si es necesario o no el saneamiento a virus, si se quiere sanear a virosis el tamaño final del ápice meristemático queda reducido entre 0,1 y 1,3 mm, lo cual se puede combinar con tratamientos químicos y térmicos (Pérez *et al.*; 1989). Otros autores recomiendan tamaño entre 3-8 mm con varias hojas primordiales (Damasco *et al.*, 1984; Sandoval; 1985). Estos últimos encontraron como tamaño óptimo del ápice 5 mm, así como que a menor tamaño del explante menor sobrevivencia y menos incremento de la oxidación fenólica.

El anteproyecto de norma técnica para las Biofábricas cubanas orienta dejar el cormo en forma de base cuadrada de 0,5 cm y 0,5 cm de alto del pseudotallo. El explante inicial tiene gran importancia para la fase II, pues de su seccionado depende el número de brotes en el primer subcultivo. (Aragón, 1991; Martínez *et al.*, 1992; Orellana, 1994; Martínez, 1995)

Al respecto Damasco *et al.*; (1984) obtuvieron más brotes al seccionar que al no seccionar el explante inicial. Dore Swamy *et al.*, (1983), reportaron que el cormo apical de 6-8 hojas que lo cubrían desarrollaron brotes más fácilmente por contener más yemas laterales, mientras Ma y Shii, (1972) reportaron lo contrario.

2.5.2 Incubación de los explantes

Las temperaturas e iluminación constituyen las condiciones ambientales más estudiadas y necesarias para la incubación de los ápices durante la iniciación. En la iniciación de los ápices, la intensidad y la calidad de luz, así como el fotoperíodo son de vital importancia. Se reportan fotoperíodos en los rangos de 8-16 horas de luz (Damasco *et al.*, 1984; Vuylsteke y De Langhe, 1985), sin embargo es ampliamente utilizado para el conocimiento proliferativo y la regeneración de plantas de plátano y de bananos fotoperíodos de 12 hasta 16 horas de luz. La mayor cantidad de trabajos de micropropagación se han llevado a cabo bajo condiciones de luz artificial brindada por tubos fluorescentes blancos (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Tanto la luz natural

como la artificial pueden ser empleadas durante el cultivo *in vitro* con excelentes resultados (Pérez *et al.*, 2000)

Generalmente se utilizan rangos de intensidad de la luz de 1500-3000 lux, pero una mayor intensidad de la luz da lugar a una regeneración de plantas más rápidas (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Niveles por encima de 3000-10000 luxes han sido empleados mejorando la sobrevivencia (Murahige, 1974; George y Sherrington, 1984).

Los ápices caulinares implantados en las Biofabricas deben incubarse a temperaturas de 26 a 32 °C, en cámaras de luz natural o artificial con una intensidad luminosa entre 2000 y 5000 lux. (Aragón, 1991).

2.5.3 Medios de cultivo de establecimiento.

La formulación reportada por Murashige –Skoog, (1962), conocida como medio MS o medio basal es la más empleada en la fase I.

Los medios son suplementados por pequeñas dosis de auxinas y citoquininas (Benerjee *et al.*, 1985; Novak *et al.*, 1988).

Durante la iniciación se reportan concentraciones de 6BAP entre 0.2 y 5 mg.l⁻¹ (Ma y Shill, 1972; Krikorian y Cronauer, 1984; Benerjee *et al.*, 1985; Novak *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1989). Concentraciones superiores a 5 mg.l⁻¹ han sido utilizadas, aunque en menor frecuencia (Damasco, 1984).

El uso de auxinas exógenas no siempre es necesaria para la fase de iniciación, pero si estimulan el crecimiento, constituyendo el AIA y el AIB las auxinas más empleadas. Las dosis de AIA oscilan entre 0.1 y 1mg.l⁻¹ en esta fase (Benerjee *et al.*, 1985), mientras que el AIB se utiliza en dosis desde 0.05- 0.15 mg.l⁻¹ (Pérez *et al.*, 1989).

Es poco frecuente suplementar el medio en la fase I con 2.4-D, sin embargo Benerjee *et al.*, (1985) lo utilizaron en concentraciones de 0.25 mg.l⁻¹, sin otra citoquinina.

Como fuentes de carbono en el suplemento de los medios se emplea la sacarosa, las concentraciones más empleadas en esta fase son 2.0% de

sacarosa (Rao *et al.*, 1993; Dores Swamy *et al.*, 1983; Damasco *et al.*, 1984) y el 3% (Pérez *et al.*, 1989).

Durante la fase de iniciación se han utilizado medios sólidos, semi-sólido y líquido. Los medios en estado sólido han sido los empleados por numerosos autores (Ma y Shii, 1972; Damasco *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 1993) y los semi-sólidos (Dores Swamy *et al.*, 1983; Krikorian y Cronauer, 1984; Benerjee *et al.*, 1985). Más reciente resulta el empleo de medios líquidos con un soporte de papel filtro, los que han mostrado ser más adecuados para evitar la fenolización y acelerar el crecimiento de los ápices (Orellana *et al.*, 1991). Este último estado es el normado en el anteproyecto de normas técnicas de las Biofabricas Cubanas (Aragón, 1991). El estado líquido del medio durante la iniciación proporcionó un alto porcentaje de brotes por explantes (Krikorian y Cronauer, 1984).

El agua de coco ha sido empleada en los medios de iniciación como suplemento inorgánico en concentraciones entre 1 y 15% (De Guzmán *et al.*, 1982; Dores Swamy *et al.*, 1983; Damasco *et al.*, 1984).

2.6 Fase II

La producción de grandes volúmenes de propágulos de alta estabilidad genética constituye el objetivo de esta fase. Estos objetivos se pueden obtener por tres vías: Propagación por yemas axilares, por yemas adventicias y embriogénesis somática. La propagación por yemas adventicias se ha usado con frecuencia en plátanos y bananos (Ma y Shii, 1972; Dore Swamy *et al.*, 1983; Damasco *et al.*, 1984).

2.6.1 Empleo de yemas axilares o adventicias.

Las yemas adventicias proporcionan altos coeficientes de multiplicación con respecto a las axilares, sin embargo el riesgo de que un número considerable de estas sean atípicas aumenten.

Empleando yemas adventicias en el clon Zanzíbar (AAB) se encontró una alta frecuencia de variación somaclonal (Martínez *et al.*, 1992). Con el objetivo de obtener altos índices de multiplicación fueron empleadas las yemas

adventicias sin tener en cuenta la variabilidad (Ma y Shii, 1972; Krikorian y Cronauer, 1984).

Los niveles altos de citoquininas estimulan la formación de yemas múltiples (Vuylsteke y De Langhe, 1985). El 6BAP es la citoquinina más ampliamente utilizada y efectiva para la formación de multiyemas. Las concentraciones comúnmente empleadas en la multiplicación de brotes oscilan entre 2-5 mg.l⁻¹. Se han utilizado niveles de hasta 10 mg.l⁻¹ de 6BAP, los cuales en el clon Zanzíbar (AAB) forman yemas múltiples (Martínez *et al.*, 1992). Otros han empleado esta concentración en la formación de multiyemas (Dore Swamy *et al.*, 1983; Damasco *et al.*, 1984).

Las concentraciones por debajo de 10 mg.l⁻¹ disminuyen la formación de brotes (Zamora *et al.*, 1989). Concentraciones de 5 mg.l⁻¹ de 6BAP son consideradas óptimas (Krikorian y Cronauer, 1984 y Jarret *et al.*, 1985). Esta última dosis se considera como la concentración estándar para la inducción de brotes, sin la formación de raíces, con ella empleando medios líquidos se obtienen yemas axilares mientras que en el medio semi-sólido se forman yemas múltiples (Krikorian y Cronauer., 1984). A pesar de obtenerse con las yemas axilares índices de multiplicación más bajos, estas ofrecen mayor estabilidad genética que las yemas adventicias y embriogénesis (Orellana, 1994; Daniels, 1999) cuando estudió el comportamiento en la multiplicación *in vitro* del cultivar FHIA-21 encontró coeficientes de multiplicación estables en los diferentes subcultivos pero con valores inferiores a 2,5.

2.6.2 Influencia de los reguladores del crecimiento en la fase de regeneración de los explantes *in vitro*.

Las auxinas en la fase de proliferación estimulan el crecimiento de los brotes. Dentro de las auxinas las más empleadas en el cultivo *in vitro* de plátanos y bananos lo constituye el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutílico (AIB) en la fase II. Entre las auxinas más usadas está el AIA, la cual se ha empleado en bajas concentraciones entre 0.1 y 1 mg.l⁻¹, también se ha reportado el ANA en concentraciones que oscilan entre 0.1y 1

mg.l⁻¹. Esta ha sido usada como suplemento auxínico en esta fase. (Krikorian y Cronauer, 1984).

Las citoquininas constituyen el regulador de crecimiento esencial para vencer el efecto de dominancia apical y fortalecer la formación de vástagos desde la axila de las hojas. Existen muy pocos medios de cultivo que entre sus componentes no posean una citoquinina (Hu y Whan, 1984).

El 6-Bencilaminopurina (6-BAP) se ha utilizado en diferentes concentraciones siendo reportados entre 5-10 mg.l⁻¹ (Krikorian y Cronauer, 1984; Damasco *et al.*, 1984).

2.6.3 Número de subcultivos.

Para la fase de multiplicación el número de subcultivos se realiza con una periodicidad de 21-30 días (Dores Swamy *et al.*, 1983; Aragón, 1991; Orellana, 1994). La edad de los cultivos *in vitro* está asociada a la variación somaclonal. El número de subcultivos está en dependencia del número de plantas a obtener a partir de un ápice original (Orellana, 1994). Algunos autores recomiendan obtener rangos de 1000-2000 vitroplantas por cada ápice. En Cuba se recomienda obtener 10000 vitroplantas a partir de un ápice.

Con relación a las proporciones de la multiplicación estas van a aumentar con el número de subcultivos, con el tiempo en cultivo (Damasco, 1983; Jarret *et al.*, 1985; Zamora *et al.*, 1989), la multiplicación disminuye en cultivos viejos de cultivares con un genoma B contrario a la diversidad de criterios que existen en este aspecto. El anteproyecto de normas que rige en las Biofabricas estipula realizar 12 subcultivos de multiplicación cada 21 días de forma tal que se obtengan 10 000 vitroplantas a partir de un ápice en crecimiento (Aragón, 1991).

2.6.4 Estado físico de los medios.

El estado físico de los medios constituye un aspecto importante para el cultivo *in vitro*. Desde que se inició el cultivo de tejidos, los medios de cultivo han sido empleados en estado sólido, semi-sólido y líquido. Para lograr el estado sólido se ha utilizado el agar como agente gelificante (Vessey, 1981; Cronauer y

Krikorian, 1983.,Hwang *et al*; 1984; Sandoval, 1985; Novak *et al.*, 1988). Las concentraciones de agar en los medios de cultivo fluctúa entre 4,5 y 8 $g\ l^{-1}$ en dependencia de la calidad del producto, sin embargo teniendo en cuenta lo costoso del mismo se recomienda reducir las dosis de 5-6 $g\ l^{-1}$ que aun le ofrecen firmeza al medio.

El medio semi-sólido es más comúnmente utilizado que los medios líquidos con éxito en los clones gran enano (AAA) y FHIA-03 (AABB) por lo altos coeficientes de multiplicación que aportan y el desarrollo de yemas axilares (Martínez *et al.*, 2000), sin embargo en los últimos tiempos con el objetivo de optimizar las técnicas de los medios en estado líquido.

Los medios líquidos estáticos son considerados superiores a los sólidos en las distintas fases de la micropropagación planteándose la posibilidad de generalizarlos para disminuir en un 30-40% el uso de los medios sólidos y reduciendo las concentraciones de auxinas-citoquininas, estimular la formación de yemas axilares e inhibir las advertencias (Pérez *et al.*, 1989).

La respuesta de los medios líquidos es diferente en los clones de plátanos y bananos. Existen clones que responden negativamente a los medios líquidos (Melvin, 1987).

Otro aspecto negativo que se le señala a los medios líquidos es que disminuye los coeficientes de multiplicación a medida que aumentan los subcultivos, lo cual no se contraresta con el aumento de las concentraciones de 6BAP (García, 1990).

2.6.5 Proliferación y manejo de los vástagos o brotes

Los medios utilizados para la proliferación de los explantes contienen citoquininas los cuales estimulan el desarrollo precoz de las yemas axilares al inhibir la dominancia apical (Hu y Wang, 1984) con esto se estimula la proliferación de vastagos, posibilitándose en un corto periodo la realización de un nuevo subcultivo.

Los subcultivos normalmente se realizan cada 21 días, periodo en el cual el numero de renuevos disponibles para ser subcultivados se multiplicaran como resultado de la activación de las yemas axilares de 2 a 12 veces (Giles, 1985)

En plátanos y bananos se reportan diferentes rangos de multiplicación en dependencia del genotipo, del tipo de explante, de la composición del medio nutritivo y del manejo empleado, utilizando explantes de un ápice meristemático decapitado de un hijo, se obtuvieron de 5-10 brotes adventicios a partir de cada explante después de 6-8 semanas. Hwang *et al.* (1984) lograron en el clon Pelipita un promedio de 9 renuevos en tres semanas por cada mitad de un renuevo original dividido longitudinalmente. En Clobian se reportan la producción masiva de plántulas donde a partir de un brote proveniente de meristemo se inducen en un tubo de ensayo hasta 50 brotes en menos de 15 días (Angarita 1984). Según Damasco (1983), en un periodo de 10 meses y con un subcultivo cada dos meses se puede obtener a partir de un explante inicial, 20 000 plantas de plátanos Saba con una supervivencia del 80 %.

El genoma en caso del género *Musa spp* parece influir en el rango y tipo de proliferación (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Estos autores encontraron notables diferencias entre diploides (AA) y triploides (AAA). En los cultivares Cavendish enano y Robusta, ambos de genoma (AAA), el rango de multiplicación fue casi el doble que en el diploide Pisang Lilin.

La proliferación independientemente del estímulo de las citoquininas se produce en cualquier medio de cultivo (García, 2002). Sin embargo en las Biofabricas los índices de proliferación son muy bajos y varían en las diferentes Biofabricas, esta variación al parecer es producto del manejo de los explantes.

2.6.6 Medio Ambiente.

Los explantes en los medios de cultivos son incubados en cuartos o cámaras donde estos van a interactuar con el medio ambiente que los rodea (Debergh y Maene, 1981). Entre los factores ambientales que más influyen en la interacción se encuentran la temperatura y la luz. La temperatura no debe estar por debajo del mínimo de 2°C ni exceder un máximo de 35°C, la temperatura óptima de incubación está en el rango de 26-30°C. Son normales las fluctuaciones entre las temperaturas de día y de noche 32 y 26 °C, cuando

esta es controlada en las cámaras por una unidad de aire acondicionado, lo que satisface los requerimientos del cultivo del género *Musa* (Vuylsteke, 1985).

La luz artificial producida por tubos fluorescentes ha constituido la mayor fuente de iluminación para los cultivos *in vitro*, sin embargo se reporta con éxito el empleo de cámaras de crecimientos con luz natural (Orellana, 1994; Pérez *et al.*, 2000).

Un fotoperíodo de luz de 12 a 16 horas de luz es ampliamente utilizado para el crecimiento proliferativo y la regeneración de plantas de plátanos (Vuylsteke, 1989. Los explantes en multiplicación han sido mantenidos bajo un régimen de 24 horas de luz (Vuylsteke y De Langhe, 1985).

Generalmente se reportan rangos de intensidad de la luz de 1500-3000 lux. Se utiliza la luz artificial con una intensidad de 3000 luxes y la luz solar indirecta con una intensidad entre 2500-3500 luxes con un foto período de 13 horas de luz y 11 de oscuridad (Orellana, 1994).

La formación de yemas adventicias ha sido obtenida reduciendo la temperatura a 15 °C y la intensidad de la luz a 1000 luxes, aun con bajas concentraciones de 6BAP, sin embargo, Vuylsteke y De Langhe, (1985) formaron yemas múltiples a 30 °C \pm 2 °C, con una intensidad luminosa de 3000 luxes y un régimen de 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

III. Materiales y Métodos:

El presente trabajo fue realizado en la Biofábrica de Cienfuegos en el período comprendido entre septiembre del 2011 y marzo del 2012, con el objetivo de incrementar el número de brotes durante la fase de multiplicación para la micropropagación *in vitro* del cultivar de *Musa spa* Jonhson (AAA).

Como material de partida se tomaron brotes de tamaño uniforme con dos subcultivos de multiplicación en un medio con las sales propuestas por Murashige-Skoog (MS) (1962) suplementada con 30g.l^{-1} de sacarosa a pH 5.8 en estado semisólido, gelificado con $3,8\text{ g.l}^{-1}$ de agar-agar SIGMA N° 3. Se utilizaron frascos biotecnológicos de 250ml de capacidad en los cuales se adicionó 30ml de medio de cultivo, empleando para esterilizar vitrofural (G-1), que tiene acción bactericida y fungicida de amplio espectro, en dosis de $0,114\text{g.l}^{-1}$.

Condiciones de incubación

Los experimentos en el laboratorio se ejecutaron bajo las condiciones de luz natural en las cámaras de cultivo donde la densidad de flujo de fotones osciló entre $48 - 62,5\ \mu\text{mol. m}^{-2} .\text{s}^{-1}$ y la duración del día fue de 13 horas a 11 horas, con una temperatura de $24 \pm 0^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 80 %.

Procesamiento estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y se emplearon 10 réplicas en cada experimento con cuatro muestras en cada una de ellas. Los datos fueron procesados estadísticamente, mediante el paquete estadístico SPSS versión 16. Para la comparación de las medias se utilizaron las pruebas no paramétricas *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$ con previa comprobación de la distribución normal y homogeneidad de varianzas.

Fueron desarrollados dos experimentos con vista al perfeccionamiento de las fases II de la micropropagación *in vitro* los cuales se describen a continuación.

3.1. Efecto de diferentes concentraciones de 6BAP y AIA sobre el número de brotes por explante en el banano cv Johnson (AAA).

Esta fase se considera la más importante en el proceso de micropropagación. En la misma ocurre la proliferación de los brotes y si todo se maneja bien las plantas *in vitro* que se obtienen son de mejor calidad fisiológica y genética. Se conoce que las especies y los genotipos dentro de una especie se comportan de diferentes maneras, se pretendió lograr una combinación de 6 BAP y AIA que promueva el desarrollo y producción de brote en le cultivar en el estudio. Se tomaron explantes de tamaño uniforme con 2 subcultivos de multiplicación, los cuales fueron subcultivados en sales básicas propuestas por Ms(1962), con tiamina , 3% de sacarosa a pH5.8 \pm 0.1 y 3.8 g.l⁻¹ de agar agar , dividiendo y cortando los brotes a 1 cm de altura .

Tabla 1: Combinaciones hormonales (6BAP-AIA) evaluadas durante la fase II del banano cv Johnson (AAA).

Tratamiento	Concentración de 6BAP mg.l ⁻¹	Concentración de AIA mg.l ⁻¹
I	3	0
II	3	0,65
III	3	1,3
IV	4	0
V(Control)	4	0,65
VI	4	1.3
VII	2	0
VIII	2	0.65
IX	2	1.3

Las evaluaciones se efectuaron cada 21 días durante dos subcultivos.

- Números de brotes por explantes.
- Altura promedio de los brotes (cm).
- Número de hojas.

Cualitativamente fueron evaluadas la formación de brotes en forma de rosetas con estructuras bulbosas y el grado de fenolización.

3.2 Influencia de la forma de cortar y dividir el pseudotallo sobre el número de brotes en las fases de proliferación del banano cv Jonhson (AAA).

La forma de cortar y dividir los brotes es un factor importante en la micropropagación por lo que en cada cultivar se requiere un profundo estudio. Realizar esta operación bien en muchas ocasiones puede simplificar el medio de cultivo, lo cual influye en una disminución del costo producción de una planta *in vitro*.

Se empleó un medio semisólido de multiplicación las sales MS y la mejor combinación de 6BAP y AIA descrita en el epígrafe 3.1. se evaluaron diferentes formas de cortar y dividir los brotes que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Formas de cortar y dividir los brotes utilizadas para la proliferación del banano cv. Jonhson (AAA).

Tratamientos	Forma de cortar y dividir los brotes
I	Cortar el pseudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y no dividir (Control).
II	Cortar el pseudotallo a 1.0 cm de altura (a partir de la base) y no dividir el pseudotallo.
III	Corte transversal del pseudotallo a 0.5 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del pseudotallo en dos o tres fracciones.
IV	Corte transversal del pseudotallo a 1.0 cm de altura (a partir de la base) y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del pseudotallo en dos o tres fracciones.
V	Separar los brotes, sin cortar ni dividir el pseudotallo.
VI	Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical y no cortar el pseudotallo.
VII	Corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el pseudotallo y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del pseudotallo.

A los 21 días del subcultivo de multiplicación fueron evaluadas las siguientes variables:

- a) Números de brotes por explantes.
- b) Altura promedio de los brotes (cm).
- c) Número de hojas.

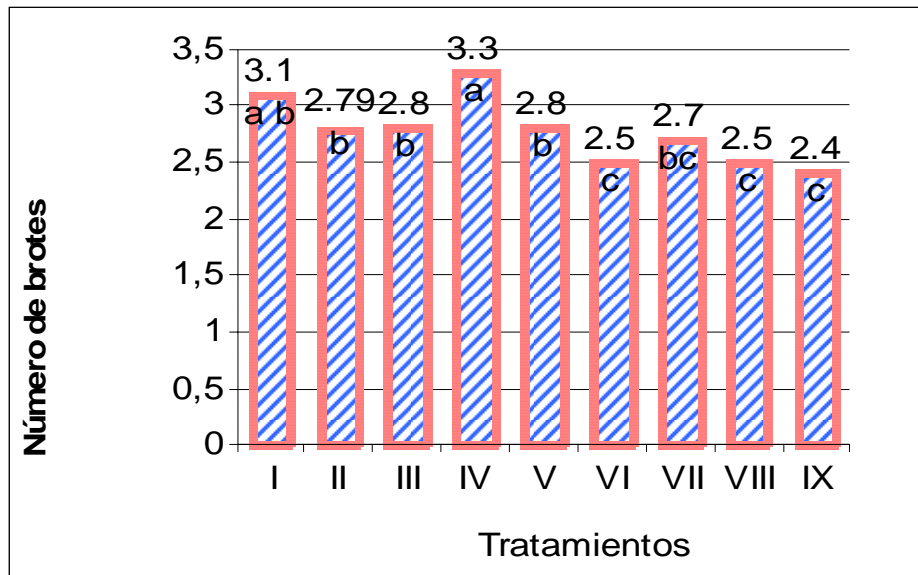
Cualitativamente fueron evaluadas la formación de brotes en forma de rosetas con estructuras bulbosas y el grado de finalización.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Efecto de diferentes combinaciones de 6BAP y AIA sobre la multiplicación del cultivar Jonhson (AAA).

Se conoce que las especies y los genotipos dentro de una especie se comportan de diferentes maneras *in vitro*. El balance hormonal entre citoquinina y auxinas es un factor muy importante en el proceso de propagación. El efecto de diferentes combinaciones de 6 BAP y AIA sobre el número de brotes por explantes muestran los valores más altos cuando se multiplican en las variantes I y IV que con 3 y 4 mg.l⁻¹ de 6BAP en ausencia de AIA respectivamente. Estos tratamientos mostraron valores significativamente superiores a las demás combinaciones incluyendo el control (Fig. 1) En este análisis de la interacción de la combinación de diferentes dosis de 6 BAP y AIA esta última no influyó en el coeficiente de multiplicación. El 6 BAP influyó significativamente en el número de brotes por explantes. De forma general los tratamientos en los que el 6BAP no se combina con AIA mostraron los mejores resultados y se aprecia que la mayor dosis de 6 BAP (4 mg.l⁻¹) muestran el mayor número de brotes por explantes.

Se conoce que el 6 BAP promueve la división celular y estimula la formación de brotes axilares y de yemas adventicias. Las bajas concentraciones de 6 BAP favorecen la proliferación de brotes axilares. Como ha sido descrito por varios autores, las citoquininas adicionadas al medio de cultivo pueden influir en la formación y diferenciación de yemas axilares. El 6 BAP es una citoquinina que en dosis entre 3 y 4 mg.l⁻¹ para el cv Jonhson (AAA) son óptimas para producir estímulo en el proceso de división celular y por tanto en la formación de yemas axilares.



Medias con letras diferentes difieren según la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$.

Figura 1. Efecto de diferentes combinaciones de 6 BAP y AIA sobre el número de brotes en la multiplicación *in vitro* del banano cv Jonhson (AAA)

En todos los tratamientos evaluados se observó que la altura de los brotes no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos II, III, VI, IX donde se emplea el 6BAP combinados AIA. Sin embargo estos incrementaron su altura con respecto al resto de los tratamientos (Tabla 1). Se conoce que la presencia de auxina en el medio de cultivo conduce a un incremento de la auxina endógena a nivel celular, lo cual induce y promueve el proceso de elongación celular. La respuesta de los brotes al incremento de la altura pudiera estar por la adición de AIA en estas combinaciones de 6BAP y AIA que producen un equilibrio endógeno entre estas dos hormonas. El incremento de AIA endógeno puede disminuir la brotación y estimular la altura de las plantas *in vitro* (Martínez, 1995). Este efecto es muy importante sobre todo en el último subcultivo de multiplicación porque el incremento la altura de las plantas *in vitro* permiten que una mayor cantidad de ellas sean subcultivados en medio de cultivo en estado líquido.

En cuanto al número de hojas no se presentaron diferencias significativas entre las diferentes combinaciones de 6BAP y AIA estudiadas. Se incrementó el total de plantas que presentan más de cuatro hojas por brotes que garantizan la calidad de las plantas *in vitro*.

Tabla 1: Efecto de diferentes combinaciones (6BAP-AIA) sobre la altura y número de hojas de los brotes durante la multiplicación del cultivar Jonhson (AAA).

Tratamiento	Altura de brotes(x)		No. De hojas (x)	
	Medias	Rango de medias	Medias	Rango de medias
I	2,95	31,50 b	4,93	62,95 a
II	4,01	65,35 a	4,59	45,45 a
III	4,00	63,10 a	4,84	56,30 a
IV	3,35	41,55 b	5,08	61,85 a
V(control)	2,95	31,50 b	4,87	47,95 a
VI	4,50	72,30 a	5,09	55,60 a
VII	2,76	24,70 bc	3,88	24,06 a
VIII	2,55	16,80 c	3,95	23,70 a
IX	3,55	47,10 a	4,18	31,70 a

Medias con letras diferentes difieren según la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$.

En la literatura científica existen pocas referencias sobre la propagación *in vitro* del banano Jonhson (AAA). Sin embargo en cuanto a las concentraciones de 6 BAP estos resultados coinciden con los de Martínez *et al.* (2009), quien la multiplicación del cultivar Gran enano (AAA) que pertenece al mismo grupo genómico del cultivar en estudio, logró incrementar el número de brotes al emplear 4 mg.l^{-1} de 6 BAP solo diferenciando el medio de cultivo en que combino el 6BAP con 0.65 mg.l^{-1}

de AIA. Otros como Orellana (1994) obtuvo el mayor número de brotes en el cultivar Gran enano combinando 3 mg.l^{-1} de 6BAP y 0.65 mg.l^{-1} de AIA. Benergee y De Langhe, (1985) refieren que la respuesta de los explantes en la multiplicación está influenciada por la concentración hormonal utilizada en el medio de cultivo. En estas condiciones el plátano se comporta como genotipo dependiente.

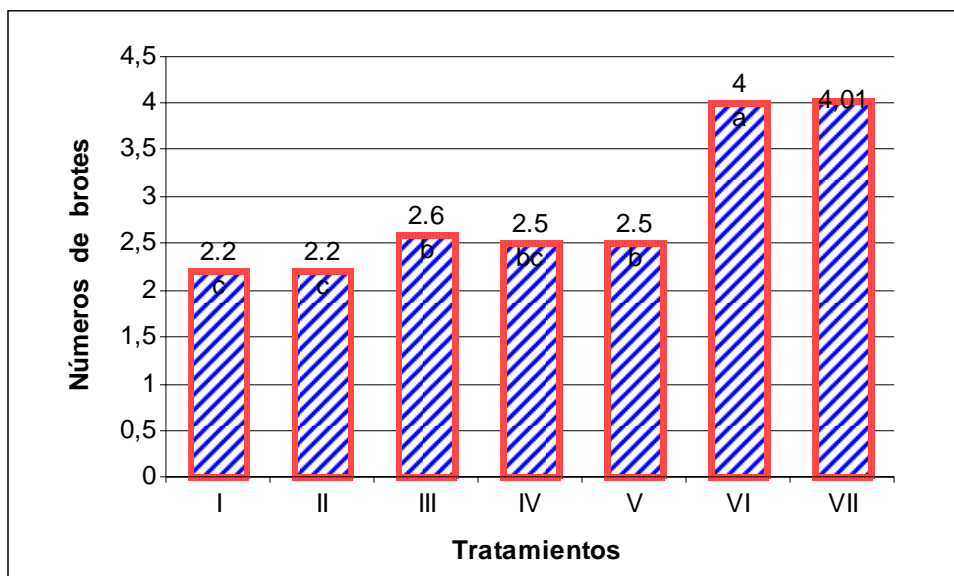
Desde el punto de vista cualitativo no se observaron brotes con entrenudos cortos y en consecuencia poca distancia entre una hoja y otra, así como pseudotallo con mayor diámetro debido a la emergencia de hojas cerca de un mismo punto (plantas en forma de rosetas) y no hubo presencia de fenoles en el medio de cultivo alrededor del explante.

La disminución de las concentraciones de 6 BAP reduce la posibilidad de formación de plantas en forma de rosetas. Estos resultados coinciden con los de García (2002), quien encontró que al disminuir las concentraciones de 6 BAP hasta 2 mg.l^{-1} fue disminuyendo paulatinamente la formación de este tipo de crecimiento en los explantes.

4.2. Efecto del tipo de corte sobre la multiplicación de los brotes axilares durante la fase de proliferación del cultivar Jonhson (AAA).

La forma de cortar y dividir los explantes en la fase de multiplicación, influyó sobre el número de brotes por explante. Los tratamientos en los que se realizaba un corte longitudinal al centro del micro-cormo hasta el domo apical y sin cortar transversalmente el pseudotallo (VI y VII), incrementaron significativamente el número de brotes por explante, sin diferencias entre ellos (fig. 2).

Los resultados en estos dos tratamientos son significativamente superiores al resto de los tratamientos, incluyendo el I (Cortar el pseudotallo a 0.5 cm de altura a partir de la base y no dividir) que constituye el control que actualmente se emplea en la Biofábrica para este cultivar.



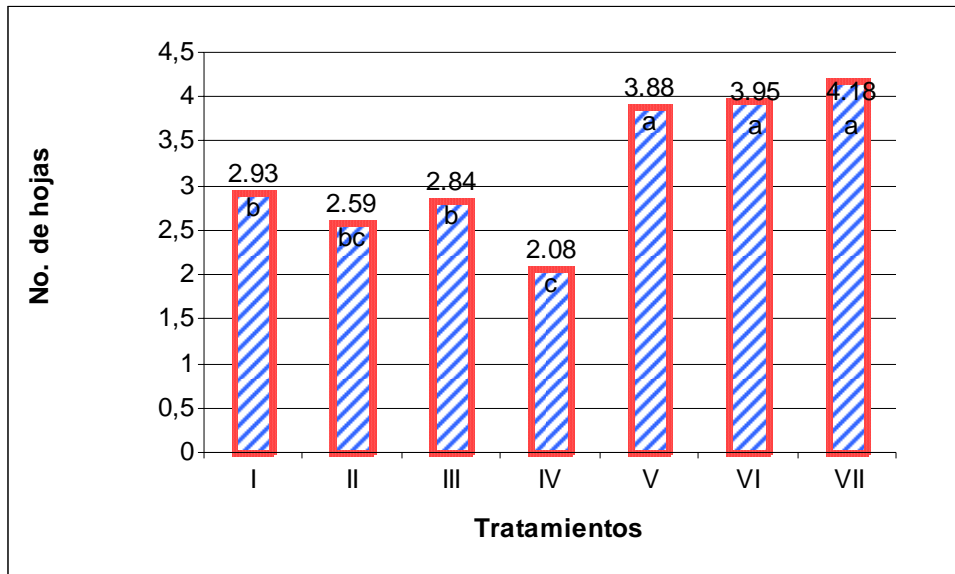
Medias con letras diferentes difieren según la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$.

Figura 2. Efecto de la forma de corte y división del pseudotallo sobre el número de brotes en la multiplicación *in vitro* del cultivar de *Musa* spp. Johnson (AAA).

En las figuras 3 y 4 se muestra la influencia de manejo en el seccionado sobre la altura y el número de hojas de los brotes en la multiplicación del cultivar Johnson (AAA). En ambos parámetros V, VI y VII muestran resultados significativamente superiores al resto de los tratamientos. Estos resultados hacen suponer que al mantener el tamaño del microcormo y explantarse completo del brote, este mantiene la disponibilidad de almidones de reserva, los cuales son utilizados en el crecimiento y desarrollo de los brotes. Estos resultados pueden explicarse porque en ambos tratamientos el corte longitudinal al centro del micro-cormo hasta el domo apical rompe la dominancia apical. Al romper la dominancia apical el equilibrio (6BAP-AIA) favorecen al primero lo cual estimula la formación de yemas axilares. A pesar de no existir diferencias significativas en la práctica es más fácil y productivo el tratamiento VII (Fig. 5).

Se produce un incremento de las alturas y el número de hojas con la forma de corte y división de los brotes, mostrando que los tratamientos V, VI y VII donde el tamaño del micro-cormo y el sistema foliar de las plantas *in vitro* se mantienen, la altura y el número de hojas de los brotes fue

significativamente superior, con respecto al resto de los tratamientos. Las sustancias de reserva en estas estructuras deben influir en la respuesta biológica de los brotes.



Medias con letras diferentes difieren según la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$.

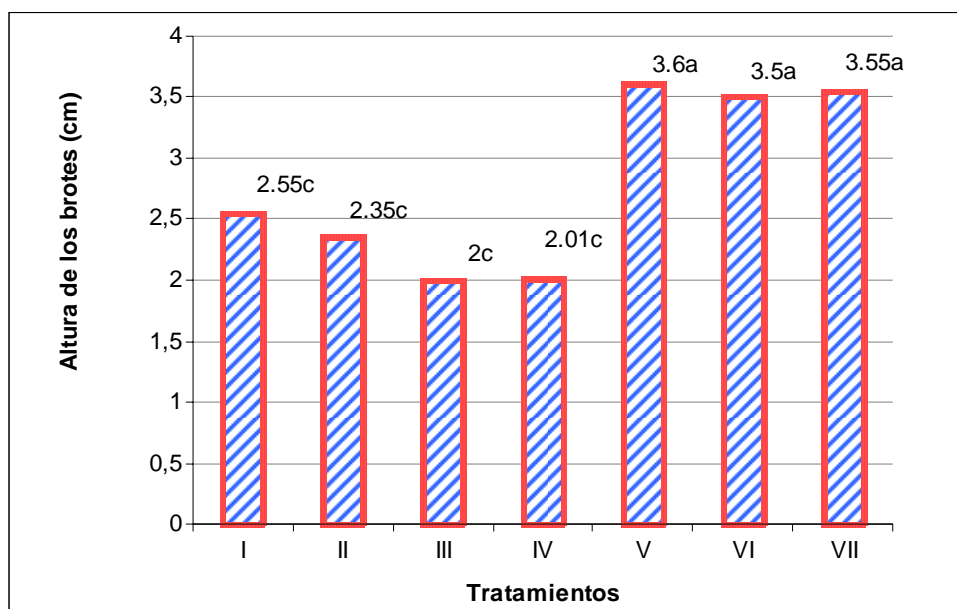
Figura 3. Influencia de manejo en el seccionado sobre el número de hojas de los brotes en la multiplicación del cultivar Jonhson (AAA).

No se observó en ninguno de los tratamientos evaluados mortalidad de los explantes, ni brotes fuera de tipo. El crecimiento en forma de roseta no se presentó en los tratamientos V, VI y VII en lo que las plantas no son sometidas a excesivos cortes. Se conoce que ello varía en dependencia de la forma en que sean divididos los brotes (García *et al.*, 2002). En los tratamientos III y IV en los cuales se corta transversalmente del pseudotallo y se dividen los brotes de más 0.5 cm de diámetro del pseudotallo en dos o tres fracciones no se presentó este tipo de crecimiento en los brotes. Estas formas de dividir los brotes no son recomendadas porque estimulan la formación de yemas adventicias que pueden incrementar la variabilidad somaclonal (Pérez *et al.*, 1998). García *et al.* (2002) comprobaron que existen formas de dividir los brotes que favorecen la presencia del crecimiento en forma de roseta en el cultivar 'FHIA-20', lo cual disminuye cuando no se corta transversalmente

el pseudotallo y se dejan los brotes de más de 1 cm de altura unidos en grupo de dos brotes o unidos a la planta madre.

Según Pérez *et al.* (1998) la técnica del corte longitudinal al microcormo hasta el domo apical favorece la eliminación del efecto de dominancia que ejerce la yema apical sobre las yemas laterales, que pueden estar a veces ocultas entre los bordes basales laterales de la vaina, en su hoja correspondiente o más frecuentemente expuestas y opuestas a las axilas. Las yemas que dan origen a los brotes o hijuelos se derivan de las laterales por desarrollo simpodial. De esta forma el balance hormonal auxinas- citoquininas endógenas en los tejidos de los brotes favorece a las últimas, la cual estimula la formación de brotes axilares (Sandoval 1989).

Los resultados de la presente investigación en el incremento del número de brotes durante la propagación *in vitro* de este cultivar es importante debido a que por cada unidad que aumente este indicador, los costos de producción en una Biofábrica pueden disminuir en un rango entre 0-10%, al aumentar la capacidad de incubación en cámara, la productividad de las operarias y disminuir el consumo de agar (Pérez *et al.*, 1998).



Medias con letras diferentes difieren según la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$.

Figura 4. Influencia de manejo en el seccionado sobre la altura de los brotes en la multiplicación del banano cv Jonhson (AAA) a los 21 días de cultivo.

Existen pocas referencias en la literatura científica sobre la forma de cortar y dividir los brotes, sin embargo Martínez *et al.* (2009) emplearon un manejo muy similar a los del presente trabajo en los cultivares Gran enano (AAA), FHIA-03 (AABB) y FHIA-18 (AAAB) respectivamente y lograron incrementar los coeficientes de multiplicación en más de tres brotes en todos los cultivares y elevaron los porcentajes de plantas subcultivadas a medios de enraizamiento líquido. Con el corte al microcormo se estimula la formación de yemas laterales o axilares y se incrementan en un 10% el número de brotes por explantes (García, 1990) La cantidades de citoquininas empleada en la variante que mayor número de brotes mostró (4mg.l^{-1}) unido al manejo empleado facilitan la diferenciación de los brotes en plantas, al parecer existe una influencia del genotipo en la formación de plantas en forma de rosetas, pues el hecho de que con solo disminuir las concentraciones de citoquininas no se formen, es una muestra de esta hipótesis (Figura 6). Además estas formas de cortar y dividir los brotes reducen la presencia de pigmentos de color oscuro en el medio de cultivo. La forma de corte durante la fase de multiplicación del clon híbrido FHIA- 21 (AAAB) unido a la reducción de la citoquinina (2mg.l^{-1} de 6 BAP) trajo como resultado un mayor número de brotes diferenciados en plantas (García, 2002).

Con las forma de cotar y dividir la planta *in vitro* no se observo fenoles en el medio de cultivo, lo cual da la posibilidad de emplear los manejos de mejores resultados en este estudio.

El corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el pseudotallo y división de los brotes de más 0.5 cm de diámetro del pseudotallo produce un incremento del número de brotes por explante, altura de la planta y número de hojas (Fig. 6).



Figura 6. Plantas *in vitro* del cv Jonhson (AAA) obtenidas con el tratamiento VII a los 21 días del subcultivo.

V. Conclusiones.

1- La adición al medio de cultivo de 4 mg l^{-1} de 6 BAP sin AIA incrementa el número de brotes por explantes en el cultivar Jonhson (AAA).

2- El corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar transversalmente el pseudotallo y dividir y cortar los brotes de más de 0,5 cm de diámetro, incrementa el número de brote por explantes siendo mas fácil de aplicar en la Biofábrica.

VI. Recomendaciones.

1- Adicionar al medio de cultivo de proliferación 4 mg/l-1 de 6 BAP sin AIA durante la fase de multiplicación *in vitro* de cultivar Jonhson.

2- Emplear un corte longitudinal al micro-cormo hasta el domo apical, no cortar el pseudotallo y división de los brotes de más de 0,5 cm de diámetro de pseudotallo, en el seccionado de los brotes durante la fase de proliferación del cultivar Jonhson AAA.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Agramonte, D. (1998). Propagación y mejoras genéticas de plantas por biotecnología, 193-206.
- Álvarez, J. (2003). Tecnología de Futuro: Una nueva concepción en la producción de plátano fruta y viandas en Cuba.
- Angarita, A. (1984). Cultivo de tejidos vegetales in vitro. *Ciencia y Tecnología, Vol.2 No.3*, 6-10.
- Aragón, N. (1991). Anteproyecto de Norma para la producción de vitroplantas de plátanos y bananos. Informes final de investigación. *UCLV*.
- Beneriee, N. et. al. (1995). Meristem. T. P. Culture of Musa. Histo morphological studies of shoot bud proliferation. *L.A. Withers and P. G. Alderson, Butter Worths, Plant tissue culture and its Agricultural Applications*, 139-147.
- Camasco, O. et. al. (1984). Tissue culture of banana". "15th Scientific meeting of the Philippines", 21.
- Castañeda, N. (2000). Vitrofurial: Esterilizante químico en la producción de vitroplantas, 4.
- Cronaurer, S.S. Krikorian, A. (1983). Somatic embryos from culture tissues of triploid plantains (Musa ABB). *Plant Cell. Rep*, 2, 289-291.
- Damasco, O. P. (1983). In vitro Culture of Saba banana (Musa balbiciana cv Saba (BBB). *Biotechnology international Rev University of the Philippines*, 21.
- Daniels, D. (1999). Micro propagación del Clon de Plátano Híbrido FHIA-21 (AAAB) y sus Somaclones. *Biotecnología Vegetal*, 2.
- De Guzmán, E. V. et. al. (1982). Production of Mutations by Irradiation of in vitro cultured tissues of coconut and banana and their mass propagations by the tissues culture technique. *Induced Mutations in vegetatively propagated plants II. IAEA, VIENNA*, 113-138.
- Debergh, P.; Maene. L. J. (1981). Scheme for commercial propagation of Ornamental plant by tissue culture. *Scientia Horticulture*, 14, 335-345.
- Dore Swany, R. et. al. (1983). Tissue propagations of banana. *Scientia Horticulture*, 18, 247-253.
- FAO. (2008). *FAOSTAT*. Retrieved from <http://faostat.fao.org/faostat>.

- García, L. (2002). Empleo del medio de cultivo líquido en la micro propagación del plátano (*Musa sp.*), 27.
- García, L. et. al. (2002). Alternativas para la propagación in vitro del cultivar Híbrido FHIA-21. *INFOMUSA*, 11(1), 35-37.
- George, E. F.; Sherrigton, P. D. (1984). Plant propagation by tissue culture hand book and directory of commercial laboratory. *Exegeties ltd. Basingstoke; England*, 709.
- Gilñes, K. L. (1985). Micropropagations in a growing world the concept of micropropagation. *World crops*, 3, 16.
- Gómez, R. et. al. (2000). Embriogénesis Somática en medios líquidos, maduración y aumento de la maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). *INFOMUSA*, 9(1), 12-16.
- Gupta, P. (1986). Eradication of mosaic. Disease and repada clonal multiplication of banana and plantains trough meristem tip. *Culture. Plant cell tissue organ culture. Holanda*, 33-39.
- Helliot, B. et. al. (2000). Development of in vitro of virus from Musa. 4to Internacional Symposium in vitro. *Culture and Horticultural Breeding Tampere techniques for elimination, Finland*, 2-7.
- Hernández, L. (2004). El cultivo del Anthurium. *Cultivos Tropicales*, 25(4), 41-51.
- Hernández, R. (n.d.). Metodología para el diagnóstico molecular y alternativa eficiente para el saneamiento Al Dasheen Mosaic Virus (DMV) en malanga (*Xanthosoma spp* y colocasia esculenta). *CETAS Universidad de Cienfuegos*. Retrieved from E-mail- santaclara57@yahoo.es ricardoh@fca.ucf.edu.cu.
- Hernández, R. et. al. (n.d.). Diagnóstico y Saneamiento de Banana Streak Virus (BSV) en musa spp. *CETAS: Universidad de Cienfuegos*. Retrieved from E-mail: [phytopat@ fsagx.ac.be](mailto:phytopat@fsagx.ac.be).
- Hernández, R., (1997). Obtención de plantas libres de patógenos. Curso teórico práctico de Propagación Masiva de Plantas, 31-43.
- Hwang, S. Hu. (1984). Meristem, shoot tip and bud cultures. *Ed. Sharp, Handbook of plant cell culture*, 176-227.

- Hwang, S.; Kao, W. H. (1984). Somaclonal Variacion "in vitro" of banana and Its application for screening for resistance to fusarium wilt. *Perales. Delante, E. A. ACIAR proceeding*, (21), 187.
- INIBAP. (2001). Muchos usos del banana. Retrieved from <http://www.inibap.org/nep>.
- INIBAP. (2012a). The Dobal Musa Genomies Consortiun. A strategy for the global Musa Genomies Consortiun. *Report of a meeting held in Arlington, USA*, International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. Retrieved from <http://www.Inibap.org>.
- INIBAP. (2012b). Clonación de híbridos en busca del banano perfecto. Retrieved from <http://www.monografia.com>.
- INIBAP. (2012). Los bananos vuelven a casa en Asia. *Annual Report.*, Network for the improvement of banana and plantain, mom France, 66.
- INIBAP. (n.d.). . Retrieved from <http://www.inibap.org/nep>.
- Jiménez. (1998). Generalidades del cultivo in vitro. *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*, 22.
- Krikorian, A. D. Cronauer, S. S. (n.d.). Banana. *Handbook of plant cell cultured. New York*, 2, 327-348.
- Lerma, S. L. et al. (2000). Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo in vitro e inducción de mutaciones en plátanos (Musa ssp). *Centro Agrícola*, 19, 93-96.
- Lerma, S. L. et al. (2002). Tasa de multiplicación y potencial de regeneración de embriogénesis somática de una suspensión celular de banano (musa AAACv. Gran Enano. *et al.*, 11(1), 38-44.
- López, N. (n.d.). El Plátano. In *El Plátano* (1989° ed., pp. 5-6). Pueblo y Educación. La Habana. Cuba.
- Ma, S. S.; Shii, C. T. (2006). in vitro formation of adventitious buds in banana shout a pex following decapitation. *Horticulture Science*, 18(1), 135-142.
- Martínez, S. et al. (2000). Perfeccionamiento de la tecnología para la micro propagación in vitro de los clones de bananos y plátanos Gran enano (AAA) y FHIA-03 (AAAB) libres de CMV mediante la contra inmunoelectroforesis. *Ponencia al XIII Forum Nacional de Ciencias y Técnica. MINAGRI.*, 80.

- Martínez, S. et al. (2009). Efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación in vitro de tres cultivares de plátanos y bananos. *Biotecnología Vegetal*, 9(3), 183-190.
- Martínez, S. et. al. (1995). Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación in vitro de plátanos y bananos (*Musa* sp). *UCLV*.
- Melvin, D. (1987). Somaclonal variation in banana. A Case Study with Fusarium Wilt ". In *Banana and plantain Breeding Strategies*. ACIAR Proceeding, 21, 140-150.
- Menon, R. et al. (2004). Evaluation of improved hybrids in Yerala, India. 1st International Congress on *Musa* Harnessing research to improve livelihoods 6-9 July, Penang Malaysia.
- Merkle, S.A. (2004). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis (Chapter 5). *TA Thorpe. In vitro Embryogenesis in Plant. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands*, 155-204.
- Ministro de Agricultura. (2004). Sistema de Control de Calidad para la Micropropagación in vitro de Plátanos y Bananos. *Grupo Empresarial de Cultivos Varios*, 20.
- Ministro de la Agricultura. (n.d.). Instructivo técnico para el micro propagación de plátanos y bananos. *Grupo Empresarial de Cultivos Varios.*, 23.
- Mourichon,X. et. al. (2000). Host Pathogen Interaction. Chapterz. Fungal diseases of the foliage. *Biotecnología Vegetal.*, CAB International, 2(2), 115-117.
- Murashige, T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation though tissue culture ann. *Rev. Plant Physiology.*, 25, 135-166.
- Noceda, C. et. al. (2003). Hacia la certificación molecular y epigenéticas de micro plantas de *musa* spp producidas en sistemas de inmersión temporal BIT. Retrieved from [http://www. Sefv.org/www.sefv.org/](http://www.Sefv.org/www.sefv.org/).
- Novat, F. et. al. (1998). Mutagénesis in vitro para el mejoramiento del banano y el plátano (*Musa* ssp). *Informe mensual UPEB. Panamá City*, 36.
- Orellana, P. et al. (2008). Elementos básicos para la planificación de la producción in vitro en Biofábricas. *VIII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal*, 17.

- Orellana, P. et. al. (1991). Empleo de medios líquidos en la micro propagación del plátano. *ACEVIN. Boletín Científico*, 3, 28-29.
- Orellana, P. et. al. (2008). Tecnología para la micro propagación in vitro de clones de *Musa ssp.* *Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV*, 104.
- Pérez, J. et. al. (1989a). Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biotecnología Vegetal.*, 3-12.
- Pérez, J. et. al. (1989b). Informe final de investigaciones, departamento de Biotecnología. *Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV*, 5.
- Pérez, J. et. al. (1998). Aumento de la eficiencia en la micro propagación. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*, 179-190.
- Rao, P. S. et. al. (1993). Encapsulation of Somatic embryos for Artificial seed Production in vitro, *20*, 256.
- Reinert, J. (1958). Unter Suchgen über dic / morphogenese und jewebwkulturen. *Ber. DTSCH. Bet. Ges.*
- Rodríguez, J. L.; Rodríguez, A. (2001). Aspectos Socio económicos del Cultivo del Plátano en Colombia. *INFOMUSA*, 10(1), 4-9.
- Rodríguez, M.; Rodríguez, A. (1981). Propagación Masiva de la Platanera Canaria por Cultivo in Vitro. *IV Reunión Nacional. EF*, 317-318.
- Rodríguez, S. (2000). Evaluación y Recomendaciones de clones resistentes o tolerantes a factores adversos a la producción. INIBAP Annual Report 2000. *Biotecnología Vegetal*, 2(2), 107-109.
- Sági, L. (2000). Genetic Engineering of banana for Disease Resistance. Future possibilities. En junes, D. (ed). *Diseases of Banana. Abaca and Enset. Biotecnología Vegetal*, 2, 465-515.
- Sandoval, J. (1989). Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa AAA*). *CORBANA*, 24, 43-59.
- Sandoval, J.; et. al. (1991). Micro propagación de Plátanos y Bananos en el CATIE (CATIE). *Informe Técnico*, (186), 29.
- Skirvin, S; et. al. (1999). Workshop. On Micro propagation establishment of contaminant free perennial plants. *Biotecnología Vegetal*, 2(2), 278-280.

- Skoog, F, M. T. (1962). A revised Medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Solarzana, S. (2012). El diario de hoy. Retrieved from <http://www.elsalvador.com>.
- Steward, F.: et. al. (1958). Growth and organized development of culture cells. *American journal of Botany*, 45.
- Valverde, G. Arias, O. (1987). Perforance Somaclonal Variation of in vitro propagated banana plant. *Abst. International Congress of plant tissue culture tropical species (Colombia)*, 77-78.
- Vessey , J. G. (1958). Meristem culture of banana. *Turrialba.*, 31(2), 162-163.
- Vuylsteke, D.; De Langhe, E. (1981). Posibility of in vitro propagation of banana and plantain. . *Tropical Agricultura*, 62(4), 323-328.
- Zamora, A. (1989). Growth and yield of Micro propagate and sucker- derived banana plants. Muse spp. Cu. Lakatan, Bongulan and Saba. *The Philippine Agriculturist*, 72(4), 458-465.
- Zamora, A. et. al. (n.d.). Determinación del tamaño del explante para la propagación in vitro en medio de cultivos de Musa spp. Turrialba. *Universidad de Costa Rica*, 50.