Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

Obtención de yemas adventicias *in vitro* en los cultivares de *Musa* ‘Manzano’ (AAB) y ‘Gros Michel’ (AAA)

Tesis de Diploma

Autor: Alejandro Jiménez Padrón

Santa Clara, 2017

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

Tesis de Diploma

Obtención de yemas adventicias *in vitro* en los cultivares de *Musa* ‘Manzano’ (AAB) y ‘Gros Michel’ (AAA)

Autor: Alejandro Jiménez Padrón

Tutoras: Dr. C. Idalmis Bermúdez Caraballoso

MSc. Mayelín Rodríguez Urquiza

Instituto de Biotecnología Vegetal (IBP) Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. idalmis@ibp.co.cu y mayelin@ibp.co.cu

Santa Clara, 2017

Pensamiento

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado.

Albert Szent Gyorgi

Dedicatoria

A Leandro, por hacerme sentir orgulloso de ser su hermano

A Alberto, quien espero que la vida vuelva a poner en mi camino

Agradecimientos

Nuestro andar por la vida no es más que un largo camino, donde se cruzan disimiles de estos y hacen que la trayectoria sea menos agotadora. Cinco años de universidad parecen poco tiempo, pero a quien los ha vivido, estará de acuerdo que son los más bellos y difíciles, por lo que, antes de decir adiós a esta tierra santa para mí, lo menos que podría hacer sería agradecer a:

Mis tutoras Idalmis, por ayudarme incondicionalmente en la realización de este documento y brindarme innumerables conocimientos necesarios y a Mayelín por ser la mano amiga a lo largo de estos tres años y hacer que las horas en el flujo laminar sean inolvidables.

Todas las “muchachitas” del IBP por colaborar de forma desinteresada en cada experimento realizado.

Los profesores del departamento por hacer de mí el profesional que la vida espera y en especial a Elizabeth por dar el consejo y consuelo necesario en momentos de desesperación.

Mis compañeros de aula sin los cuales estos cinco años no representaran los más importantes de mi vida y a mis niñas del 311 sin ustedes nada hubiese sido igual.

Mis compañeros de cuarto por aguantarme todos estos años y ayudarme cada vez que lo necesité.

Mi amiga y hermana Seila Hernández por ser el diamante en bruto que a lo largo de estos años me permitió ayudar a brillar cada día más. Fuiste, eres y serás uno de los mayores regalos que me ha dado la vida y sin quien creo que no seré capaz de vivir. GRACIAS por brindar el consejo oportuno, el regaño necesario y la compañía indispensable. Espero que nuestros caminos estén ligados por siempre.

Mi amiga incondicional Sheila Brunet sin la cual Trinidad no sería igual. Junto a ti guardo bellos recuerdos de estudios, noches de fiesta y momentos de mucho estrés. Como siempre dijimos lo nuestro supera la confianza llegando a la falta de respeto, de ahí el gran cariño que siempre te tendré y espero que sea recíproco.

Toda mi familia por ser el apoyo necesario en tantos momentos difíciles que nos ha tocado vivir juntos y darle el apoyo a mi madre cuando no he estado presente por convertirme en el universitario que siempre ha soñado.

Mis abuelas Rosa y Berta por estar siempre pendiente de cada una de mis necesidades y ayudarme a aliviar cada dolor con su dulzura.

Mi abuelo Pedro, estés donde estés, sé que cuidas de mí. Hoy no me ves graduado pero no importa siempre supe lo orgulloso que estuviste de mis logros y forma de ser y cada día lucharé por ser el nieto que en disimiles ocasiones alegaste ser igual a ti.

Alberto Tamame Fernández por ser mi mejor amigo desde que tengo uso de razón y llegarse a convertir en el hermano donde nos une algo más fuerte que la sangre, la confianza y la elección. Hoy quisiera que no nos separan fronteras tan cercanas y pudieras oír mis más sinceros agradecimientos, pues por ti hoy me graduó de Biólogo. La vida o lo que sea te puso en mi camino y le estoy súper agradecido a quien haya provocado tal encuentro, pidiéndole solamente que nos vuelva a encontrar. Junto a ti llegue a ser yo verdaderamente pues siempre supiste ver lo mejor de mí.

Leo mi hermano y más que eso mi eterno niño, quien me hace más grande de lo que en realidad soy y por ti, me esfuerzo cada día por asegúrate una Universidad como la que viví y de la que hoy me despido. Nunca sigas mis pasos, ni dejes que nadie te pida hacerlo. Lucha por crear los tuyos propios y que alguien más los siga por admirar lo que has logrado.

Mi padre por hacer que cada día me esfuerce más para poder sentir que está orgulloso de mí y por ser su confianza aunque no lo exprese.

Mi madre quien para mí es ejemplo de esfuerzo, sacrificio y dedicación. No existen palabras para describir lo que por ti siento. Hoy me ves Biólogo después de tantos baches que hemos vivido juntos, pero lo importante es que siempre estuviste, estás y estarás en mi vida. MADRE es una palabra inmensa pues debe anteponer dolor y risa y tú la llevas en el pecho de una forma gigante y con colores brillantes.

Por Siempre Gracias

Resumen

En plátanos y bananos para la formación de yemas adventicias se emplean las citoquininas, pero altas concentraciones pueden tener efectos negativos en la regeneración de plantas. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de diferentes combinaciones de citoquininas en la formación de yemas adventicias en los cultivares de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) y 'Manzano' (AAB). Se estudiaron diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (2,0; 4,0 y 6,0 mg L^{-1}) y de Tidiazuron (0,6; 0,8 y 1,0 mg L^{-1}), y se evaluó su efecto en el número de subcultivo y posterior regeneración de plantas. Como controles se empleó 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP y 2,0 mg L^{-1} de TDZ ampliamente utilizados para estos fines. La combinación de 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ con cuatro subcultivos fue la que logró mayor porcentaje de formación de yemas adventicias, en el cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA). Por otro lado, con 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ y tres subcultivos se logró el mayor porciento de formación de yemas adventicias en el cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB). Con las combinaciones estudiadas en ninguno de los dos cultivares regeneraron plantas fuera de tipo. Por lo antes planteado se seleccionaron estas combinaciones de citoquininas para la obtención de yemas adventicias, ya que se logró disminuir los niveles de 6-BAP y de TDZ que tienen efectos negativos en la posterior regeneración de las plantas.

Palabras clave: bananos, yemas adventicias, 6- Bencilaminopurina, Tidiazuron

Abstract

In bananas and plantains for adventitious bud formation cytokinins are used, but high concentrations may have negative effects on plant regeneration. The objective of the present investigation was to determine the effect of different combinations of cytokinins on the formation of adventitious buds in *Musa* 'Gros Michel' (AAA) and 'Manzano' (AAB) cultivars. Different concentrations of 6-Benzylaminopurine (2.0, 4.0 and 6.0 mg L^{-1}) and Thidiazuron (0.6, 0.8 and 1.0 mg L^{-1}) were studied, and their effect on subculture number and subsequent plant regeneration. As controls, 22.5 mg L^{-1} of 6-BAP and 2.0 mg L^{-1} of TDZ were used widely for these purposes. The combination of 2.0 mg L^{-1} of 6-BAP + 1.0 mg L^{-1} of TDZ with four subcultures was the one that achieved the highest percentage of adventitious bud formation in *Musa* cv. 'Gros Michel' (AAA). On the other hand, with 6.0 mg L^{-1} of 6-BAP + 0.8 mg L^{-1} of TDZ and three subcultures the highest percentage of adventitious bud formation was achieved in *Musa* cv. 'Manzano' (AAB). With the combinations studied in neither of the two cultivars regenerated plants out of type. For the previously mentioned, these combinations of cytokinins were selected for the obtaining of adventitious buds, since it was possible to decrease the levels of 6-BAP and TDZ that have negative effects on the later regeneration of the plants.

Keywords: bananas, adventitious buds, 6- Benzylaminopurine, Thidiazuron

Tabla de contenido

1. Introducción 1

2. Revisión Bibliográfica 4

2.1 Características botánicas, taxonomía, origen y evolución del cultivo 4

2.1.1 Descripción botánica de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA) 6

2.2 Importancia de los plátanos y bananos 6

2.3 Situación actual del cultivo 7

2.4 Cultivo de tejidos 8

2.4.1 Regeneración por organogénesis en banano y plátano 10

2.4.2 Regeneración vía embriogénesis somática en bananos y plátanos. 11

2.4.3 Influencia de los reguladores del crecimiento en la forma de regeneración de los explantes *in vitro* 13

3. Materiales y métodos 15

3.1 Determinación del efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* 16

3.2 Efecto del número de subcultivos en la multiplicación y regeneración de las yemas adventicias *in vitro* 18

3.2.1 Multiplicación de las yemas adventicias 18

3.2.2 Estudios histológicos de la formación de las yemas adventicias *in vitro* 19

3.2.3 Regeneración de las yemas adventicias 19

4. Resultados 21

4.1 Efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* 21

4.2 Efecto del número de subcultivos en la multiplicación y regeneración de las yemas adventicias *in vitro* 25

4.2.1 Multiplicación de yemas adventicias 25

4.2.2 Estudios histológicos de la formación de las yemas adventicias *in vitro* 27

4.2.3 Regeneración de yemas adventicias 27

5. Discusión 31

5.1 Efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* 31

5.2 Efecto del número de subcultivos para lograr la multiplicación de las yemas adventicias *in vitro* 33

5.2.1 Multiplicación de yemas adventicias 33

5.2.2 Estudios histológicos de la formación de las yemas adventicias *in vitro* 34

5.2.3 Regeneración de yemas adventicias 34

Análisis de los costos de aplicación del tratamiento 35
6. Conclusiones 37
7. Recomendaciones 38
Referencias bibliográficas

1. Introducción

Los plátanos y bananos, proporcionan alimento de primera necesidad a millones de personas en las zonas tropicales y subtropicales, además de ser de las frutas más ampliamente exportadas que existen (Ngomuo *et al.*, 2014). En 2015 el total de la producción mundial alcanzó las 133,7 millones de toneladas (Lescot, 2015), con un valor en el orden de los 44,1 billones de dólares. Debido a los bajos rendimientos y la susceptibilidad a las enfermedades, principalmente a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet*)* y al Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), se hace necesario la búsqueda de nuevas variedades para su introducción a la producción.

Pérez-Vicente *et al.* (2004), refieren que el primer informe oficial en Cuba sobre la marchitez por *Fusarium* fue en 1910; sin embargo, señalaron que desde el 1915 se informó que los cultivares de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) y el 'Manzano' (AAB) se encontraban severamente afectados. Estos investigadores comentaron la existencia de antecedentes de incidencia de la enfermedad en el cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB) desde finales del siglo XIX. Se calcula en más de 80 000 ha de cultivo del cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) destruidos por la raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* entre 1890 y mediados de la década de los cincuenta del pasado siglo, solo en las grandes empresas exportadoras (Ploetz, 2005).

El mejoramiento genético en el género *Musa*, utilizando métodos tradicionales, se ha visto obstaculizado por varios factores, entre ellos: la baja fertilidad, la esterilidad, los niveles de ploidía y la falta de variabilidad genética que muestran sus especies (Huang *et al.*, 2010), además del tiempo que se necesita para obtener clones mejorados por esta vía.

El empleo de las tecnologías de cultivo de tejidos para los programas de mejoramiento genético constituye una herramienta de gran potencial, pero se hace necesario disponer de un sistema eficiente y repetible de regeneración de plantas (Roux, 2004). El uso de yemas adventicias para estos fines en *Musa* spp. ha sido informado por varios autores (Nahamya, 2000, García *et al.*, 2006, Sadik *et al.*, 2007) ya que la variabilidad puede incrementarse.

De los reguladores del crecimiento vegetal, la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) tiene un marcado efecto en la estimulación del desarrollo de las yemas axilares y adventicias en los cultivos *in vitro* (Abeyaratne y Lathiff, 2002, Buah *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha informado que el tidiazuron (TDZ) es más activo a bajas concentraciones que la citoquinina aminopurina y menos susceptible a las enzimas degradantes presentes en las

plantas (Mok *et al.*, 1987). García *et al.* (2006) con el empleo de TDZ lograron la formación de yemas múltiples en el cultivar de *Musa* ´Grande naine´(AAA). Según Haruki *et al.* (2007) el TDZ, puede ser muy activo en la regulación de la morfogénesis en muchas especies de plantas.

Los resultados referidos en la literatura especializada sobre plátanos y bananos, indican que la inducción del proceso embriogénico para genotipos que no poseen inflorescencias masculinas persistentes o que degeneran durante su desarrollo, así como por la carencia de suficiente material vegetal por el ataque de patógenos del cultivo, continúa perfeccionándose. El uso de otros reguladores del crecimiento como el TDZ para inducir la formación de yemas adventicias como fuente de explante para la extracción de meristemos proliferantes ("scalps") para iniciar la embriogénesis somática se han desarrollado (Suprasanna *et al.*, 2002, INIBAP, 2003).

López *et al.* (2000) lograron el establecimiento de suspensiones celulares en los cultivares de *Musa* 'Zanzibar' (AAB) y 'Navolean' (AAB) con concentraciones de 6-BAP de 22,5 mg L^{-1} y cuatro subcultivos para lograr la formación de yemas adventicias. Sin embargo, según Sadik *et al.* (2007) el uso de estas altas concentraciones de 6-BAP y TDZ, tiene entre sus desventajas, la variación somaclonal y el decrecimiento de la respuesta embriogénica del explante y su posterior regeneración. En este sentido, hay numerosos informes que muestran las deficiencias del uso de altos niveles de citoquininas que provoca la aparición de plantas fuera de tipo (Martin *et al.*, 2006, Shirani *et al.*, 2009).

Por todo lo antes expuesto se hace necesario estudiar diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y el número de subcultivos en la formación, multiplicación y regeneración de yemas adventicias *in vitro* de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA) para su empleo en los programas de mejoramiento genético.

Hipótesis

Si utilizamos diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento en menos subcultivos entonces se podría lograr la formación, multiplicación y regeneración de yemas adventicias *in vitro* de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA).

Objetivo general

Obtener yemas adventicias *in vitro* en los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA).

Objetivos específicos

1.- Determinar el efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro*.

2.- Determinar el número de subcultivos para lograr la multiplicación y regeneración de yemas adventicias *in vitro*.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Características botánicas, taxonomía, origen y evolución del cultivo

La planta de banano, a menudo denominada erróneamente como un "árbol", es una gran hierba, con suculento tallo (adecuadamente "pseudo tallo") que es un cilindro de pecíolos de las vainas de las hojas, alcanzando una altura de 20 a 25 pies (6-7,5 m) y surge de un rizoma carnoso o cormo (Morton, 1987). Las raíces brotan normalmente en grupos de cuatro en la superficie del cilindro central del cormo y tienen de 5 a 8 mm de espesor (Riopel y Steeves, 1964).

Estas plantas presentan hojas tiernas, suaves, oblongas o elípticas, de numeración de 4 ó 5 a 15 dispuestas en espiral. Ellas se despliegan, cuando la planta crece, a razón de uno por semana en clima cálido, y se extienden hacia arriba y hacia el exterior, alcanzando hasta 9 pies (2,75 m) de largo y 2 pies (60 cm) de ancho (Morton, 1987).

Las flores son ebracteadas y están dispuestas en fascículos biseriados sobre protuberancias nodales, recubierto cada fascículo por una bráctea decidua. Los nodos basales de la inflorescencia tienen flores femeninas y los nodos distales, masculinas; a menudo, uno o más fascículos de flores neutras se encuentran presentes entre las zonas masculinas y femeninas. Las flores masculinas son deciduas y el eje que las sustenta normalmente en la zona distal (raquis) continúa creciendo, mientras los frutos se desarrollan (Morton, 1987).

Las flores femeninas tienen ovarios ínferos triloculares y tricarpelares funcionales, así como estaminodios; las flores masculinas tienen ovarios abortivos y estambres bien desarrollados. El periantio es fuertemente zigomórfico y parcialmente gamotépalo en un tépalo abaxial compuesto de cinco miembros y un tépalo libre (Valmayor, 2008).

A medida que los frutos jóvenes se desarrollan a partir de las flores femeninas, que parecen dedos verdes delgados, que cuando están bien desarrollados en cada grupo se convierten en una "mano" de plátano. Variando el número de "manos" con la especie y variedad (Morton, 1987).

La primera clasificación científica de plátanos y bananos fue realizada por Linneo en 1783, nombrando a todos los bananos como *Musa sapientum* y al grupo de los plátanos como *Musa paradisiaca.*

Según Simpson (2006) la clasificación de *Musa* spp. es la siguiente:

Género: *Musa*

Familia: *Musaceae*

Orden: *Zingiberales*

Subclase: *Zingiberidae*

Clase: *Liliopsida*

División: *Magnoliophyta*

Reino: *Plantae*

Se considera que el género *Musa* se originó en la península Malaya en Asia, como probable centro primario, tanto de *Musa balbisiana* como de *Musa acuminata* (Belalcázar, 1991). La evolución de los cultivares desde especies silvestres y su dispersión desde el Sudeste de Asia ha sido descrito por Vuylsteke *et al.* (1998). A principios del siglo XVI, los navegantes portugueses transportaron a la planta de la costa de África Occidental a América del Sur (Morton, 1987).

Se sabe con certeza que en 1516, Fray Tomás de Berlanga, obispo de Panamá, introdujo las primeras plantas procedentes de Islas Canarias a Santo Domingo y de esta pasó a Cuba (López, 1989).

Los dos factores principales en la evolución de los plátanos y bananos comestibles fueron: el desarrollo de la potencialidad genética de la partenocarpia y al mismo tiempo la esterilidad genética. Por la hibridación entre las especies *Musa acuminata* Colla, y *Musa balbisiana* Colla aparecen los clones diploides, triploides y tetraploides los que aún persisten en gran número en el sudeste de Asia (Simmonds, 1966).

Según (Sandoval y Escoute, 1996) el número básico de cromosomas en el género *Musa* es de 11, determinado durante la década de los treinta y los cuarenta, existiendo tres niveles principales de ploidía natural en el género 2n=2x=22, 2n=3x=33 y 2n=4x=44.

Los bananos cultivados exhiben un marcado grado de esterilidad y en su mayoría son triploides (2n=3x=33); aunque también son cultivados, en menor frecuencia, los cultivares diploides y tetraploides (Vuylsteke *et al.*, 1998). Las mutaciones somáticas acumuladas,

en algunas regiones, han jugado un papel importante en la obtención de gran diversidad fenotípica en grupos relativamente homogéneos de cultivares.

2.1.1 Descripción botánica de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA)

Las principales características del cultivar 'Manzano' (AAB) son: altura del pseudotallo de tres metros, con aspecto robusto, color verde-amarillo y apariencia brillante, no cerosa. La pigmentación del pseudotallo subyacente es rosa-púrpura, con manchas color marrón-negras y una savia color acuoso. La composición tepal de la flor masculina es color crema, la forma del estilo es curvado en la base y el estigma de color naranja. La fruta presenta una posición curva hacia el tallo, con un número de frutas igual o mayor a 17, posee un tamaño por fruto de 16-20 cm con una forma recta o ligeramente curvada y con un ápice largo apuntado. Las inflorescencias poseen brácteas en forma obtusa y dividida con la cara externa color rojo-púrpura y presencia de muy poca cera (INIBAP, 2001).

El cultivar 'Gros Michel' (AAA) presenta una altura del pseudotallo de tres metros con un aspecto robusto de color verde y una apariencia brillante, no ceroso. La pigmentación del pseudotallo subyacente es rosa-púrpura con manchas color marrón oscuras y una savia acuosa. La flor masculina presenta una composición tepal color básico, crema, la forma del estilo es recta y un estigma de color amarillo brillante. La posición de la fruta es curvada hacia arriba (oblicuamente, en un ángulo de 450°), con un número total de frutas de 13 a 16 y una longitud de cada fruta de 21-25 cm, con una forma recta en la parte distal y el ápice de la fruta es puntiagudo. La inflorescencia posee brácteas puntiagudas, con la cara exterior de la bráctea de color morado-marrón y muy poco o ningún signo visible de cera (INIBAP, 2001).

2.2 Importancia de los plátanos y bananos

El cultivo del banano es uno de los más importantes a nivel mundial, además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituyendo una importante fuente de empleo e ingreso en más de 120 países en desarrollo (Jones y Diekmann, 2000). Aunque son un importante alimento básico en África, Asia y América Latina, solamente el 3% del banano producido es comercializado internacionalmente (Lescot, 2013), lo que indica su importancia para los mercados domésticos y la seguridad alimentaria. En las condiciones de Cuba también son fundamentales para lograr la estabilidad de productos alimenticios

en el mercado, sobre todo entre los meses de junio a noviembre que son desfavorables para los cultivos de producción subterránea (Barranco, 2000).

El plátano es nutricionalmente similar a la papa, fácil de digerir, ampliamente usado en la nutrición de los infantes y como tiene una composición química similar al mucus del revestimiento del estómago, muestra un efecto suavizante en el tratamiento de úlceras gástricas y diarrea. En términos de energía cada gramo proporciona una caloría. Es considerado una buena fuente de vitaminas A, B1, B2 y C, por el alto contenido de vitamina B6 ayuda a aliviar el estrés y la ansiedad. Además, se utiliza para brindar sombra a grupos de cultivos como es el cacao y el café (INIBAP, 2000).

Contiene como promedio, alrededor del 70% de agua y 27% de carbohidratos, grasas 0,3%, proteínas 1,2%; contiene siete de los ocho aminoácidos esenciales para la vida (Álvarez-Acosta, 2011).

Para su uso en la alimentación los plátanos se hierven, se cocinan al vapor, se fríen en tajadas o se asan. En algunas partes de Uganda, las tajadas secas de la fruta verde se almacenan para los tiempos de hambruna. Los higos dulces de banano se preparan en muchas partes de los trópicos secando la fruta madura. En los trópicos se pueden hacer la harina de plátano secando y moliendo frutas verdes o maduras, para elaborar galletas y pasteles. Los plátanos triturados pueden ser congelados para utilizarlos luego en batidos con leche, pasteles y helados (INIBAP, 2004).

Desde el punto de vista medicinal, en África, las cáscaras trituradas de los bananos maduros se utilizan para hacer un cataplasma para heridas, debido a que la parte interior de la cáscara tiene propiedades antisépticas, se le puede aplicar directamente a las heridas o cortadas en un caso de emergencia (INIBAP, 2004).

2.3 Situación actual del cultivo

En Asia y el Pacífico es la fruta más producida en países como Filipinas, Tailandia, Indonesia, y la India, donde el 95% de la producción anual (25 millones de toneladas) se consume o comercializa localmente. Ecuador es el principal exportador mundial de banano (*Musa* AAA Simmonds.), con un área de cultivo cercana a las 220 000 ha, las cuales representan el 10% de la superficie agrícola del país. Alrededor de 55 000 ha están en manos de pequeños productores con plantaciones menores a 30 ha y recursos económicos limitados (PRO-ECUADOR, 2013).

Cuba tiene 179 000 ha de bananas y plátanos (de acuerdo a una encuesta no publicada realizada durante el 2014 por el Centro Nacional de Sanidad Vegetal del MINAGRI) y la

producción de plátanos representa entre el 20 y el 30% del total de todas las viandas, particularmente durante los periodos lluviosos.

Los tres más grandes importadores de bananos del mundo son la Unión Europea, Estados Unidos de América y la Federación Rusa, todos mostraron una dinámica creciente en las importaciones durante el 2013 del 7,0; 7,6 y 5,3%, respectivamente. Producto al fuerte consumo, las importaciones de la Unión Europea alcanzó 4,8 millones de toneladas. Estados Unidos de América también registró un importante record con 4,4 millones de toneladas (FAO, 2015).

2.4 Cultivo de tejidos

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 de cultivo nutritivos artificiales (Roca y Mroginski, 1993). Pudiéndose resolver el problema de las enfermedades emergentes mediante la obtención de semillas de alta calidad (Ali *et al.*, 2011).

Dos rutas diferentes han sido reconocidas para la morfogénesis *in vitro*, la organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática. Cualquiera de las vías dependen del estado de diferenciación del explante inicial, de las características genéticas de las plantas y del manejo del cultivo *in vitro*, desde los medios de cultivo hasta las condiciones ambientales para el desarrollo de las plantas, tejidos o células (Gómez, 1998).

El material de siembra más utilizado en banano es el proveniente de cultivo de tejidos, que garantiza mayor sanidad, homogeneidad, vigor, precocidad y altos rendimientos (Hanumantharaya *et al.*, 2009, Mugo *et al.*, 2013). La obtención de material de siembra por la calidad genética y fitosanitaria vía tradicional, no es la mejor opción para establecer nuevas plantaciones, dada la influencia negativa de plagas y patógenos que se trasmiten por medio de este, lo que reduce su calidad, y repercute en el posterior desempeño del cultivo, mermando significativamente el rendimiento y la rentabilidad del cultivo (Ngo-Samnick, 2011).

Los primeros informes de la multiplicación *in vitro* de plátanos y bananos se realizaron en la década de 1970 en algunos genotipos AAA. A partir de esta fecha, el número de informes se ha incrementado incluyendo genotipos AA, AAB, ABB y BBB, siendo la principal fuente de explante primario los ápices vegetativos (Afza *et al.*, 1996). Se han establecido técnicas, para el desarrollo de la propagación *in vitro* y la mejora genética,

como la embriogénesis somática (Barranco, 2000), selección *in vitro* (Okole y Schulz, 1997), inducción de mutaciones *in vitro* (Cardona *et al.*, 2000), transformación genética y Biología Molecular (Daniell *et al.*, 2001). Para ello se puede emplear varias técnicas como: cultivo de ápices o meristemos, de callos, de células en suspensión, entre otros.

- **Cultivo de ápices y meristemos**

La técnica de cultivo de meristemos para la obtención de plantas libre de patógenos se fundamenta en el hecho de que la distribución de los microorganismos (virus, bacterias, micoplasmas) en los tejidos de la planta infectada no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo, por lo tanto, las posibilidades de que en las células del meristemo se encuentre menor número de partículas o estén libres de estas son mayores que en los tejidos más diferenciados de la planta (Hernández, 1997).

El término “cultivo de meristemos” ha sido utilizado para designar a fragmentos de tejido en un rango de 0,1 mm hasta 1,0 cm o más. Sin embargo, para el cultivo aséptico y el saneamiento este término implica el aislamiento del domo meristématico más el primer primordio foliar en un rango de 0,1-0,5 mm (Hernández, 1997). A partir de este tamaño se considera cultivo de ápices.

- **Cultivo de callos**

El establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Litz y Jarret, 1991). El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación del callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente desdiferencian ante la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo. En las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizadas, dando origen a una masa amorfa de tejidos (Gómez, 1998).

Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células ya que en general de un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos dependiendo fundamentalmente del balance auxina-citoquinina en el medio de cultivo (Gómez, 1998).

- **Cultivo de células en suspensión**

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de agregados celulares (que van de 2 a 100 células) distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento, siendo esta una de las formas para mantener y propagar las células vegetales. Este sistema de cultivo es un poderoso implemento para llevar a cabo estudios sobre la inducción de la embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo, así como la obtención de diversos productos secundarios; tales como algunos fenoles, antraquinonas, antocianina, nicotina, etc. Además de ser empleadas en el mejoramiento genético, dando esta técnica mayor posibilidad a las células mutadas para expresarse y formar, por consiguiente plantas mejoradas que pueden ser seleccionadas posteriormente por métodos tradicionales o mediante métodos biotecnológicos como es la selección *in vitro* y la transformación genética. También se han utilizado en pruebas de resistencia a enfermedades como es el caso del carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Syd) (Gómez, 1996).

2.4.1 Regeneración por organogénesis en banano y plátano

Desde hace cuatro décadas se emplean las técnicas de cultivo *in vitro* para el saneamiento y la propagación de musáceas. La micropropagación de plátanos y bananos forma parte de la modernización de la agricultura en muchos países y ha contribuido a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementar su productividad (Castro *et al.*, 2002).

La regeneración de plantas mediante el cultivo de ápices meristemáticos (organogénesis) es el método más utilizado para la propagación comercial de *Musa spp.* El primer trabajo fue informado por Ma y Shii (1972) y a partir de este se ha descrito en la literatura científica la regeneración de plantas en diferentes cultivares de plátanos y bananos. Su aplicación comercial se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, la calidad de los explantes y alto costo adicionado a la mano de obra en las fases de multiplicación y enraizamiento (Basil *et al.*, 2007).

Según Ibaraki y Kurata (2001) la embriogénesis somática tiene poderosas ventajas para la propagación *in vitro* de plantas debido al elevado coeficiente de multiplicación de los embriones somáticos.

2.4.2 Regeneración vía embriogénesis somática en bananos y plátanos.

El primer trabajo publicado para la obtención de embriones somáticos en *Musa*, lo realizaron Cronauer y Krikorian (1983), a partir de suspensiones celulares derivadas de ápices cultivados *in vitro* de los cultivares de *Musa* 'Saba' y 'Pelipita' (ABB), quienes lograron estructuras similares a los embriones, sin llegar a la regeneración de plantas por embriogénesis somática típica. Los primeros ensayos exitosos se lograron cuando se usaron embriones cigóticos inmaduros, para inducir el proceso embriogénico de cultivares diploides de *Musa* (Escalant y Teisson, 1989). Desafortunadamente, este tipo de explante solamente está disponible para especies silvestres de *Musa* y no para cultivares de importancia económica, en los cuales la producción de semilla botánica es errática (Dhed'a *et al.*, 1991).

Fuentes de explantes para inducción de callos embriogénicos

La selección del explante podría ser el factor clave que determina el éxito o no de un protocolo de embriogénesis somática (Krishnaraj y Vasil, 1995). Vasil (1985), señaló que en la mayoría de las monocotiledóneas herbáceas se utilizan los explantes que contengan células meristemáticas o indiferenciadas; como las de tejidos foliares o del rizoma en cultivares de bananos diploides o triploides. Independientemente del tipo de explante utilizado, la edad de este tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro*, muy viejos y muy jóvenes no son apropiados. De manera, que los ápices han sido ampliamente utilizados con buenos resultados en varias especies de plantas (Krikorian y Scott, 1995).

Los embriones somáticos pueden ser obtenidos desde varias fuentes de cultivos tales como: hojas jóvenes, hojas inmaduras, inflorescencias, peciolos, entre otros. La reacción del explante para la embriogénesis está determinada por la edad de este, así como la concentración de auxina empleada. Una fuerte correlación ha sido establecida entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el proceso de desdiferenciación y diferenciación *in vitro* (Denchev *et al.*, 1990).

- **Inflorescencias inmaduras masculinas**

A partir de inflorescencias masculinas inmaduras, Ma (1991) obtuvo embriogénesis somática, la cual fue generalizada por Escalant *et al.* (1994). Estos últimos autores, a través del uso del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) tipo RITA, lograron aumentar el

porcentaje de los embriones somáticos germinados; mientras que Côte *et al.* (1996) y Grapin *et al.* (1996), obtuvieron suspensiones celulares con adecuadas tasas de regeneración, al utilizarse este mismo tipo de explante Gómez *et al.* (2002), mejoraron esta metodología a través de la multiplicación de los embriones somáticos en biorreactores en el cv. de *Musa* 'FHIA-18' (AAAB), donde obtuvieron 89,3% de germinación de los embriones somáticos en un mes de cultivo. La limitante de este método está dada porque sólo puede utilizarse en genotipos que poseen las inflorescencias masculinas persistentes, presentes en la gran mayoría de los plátanos frutas. Para minimizar este problema, Grapin *et al.* (2000), utilizaron inflorescencias femeninas inmaduras, de los cuales obtuvieron embriogénesis somática. Aunque los autores anteriores señalaron que la utilización de este tipo de explante permite generalizar su uso a todos los genotipos de *Musa* spp, López (1999), sólo obtuvo 2,0% de respuesta embriogénica al emplearlo, en el cv. de *Musa* 'Navolean' (ABB). Los resultados alcanzados indicaron que no es factible su generalización, producto de las limitaciones prácticas que posee; primero hay que decapitar la planta antes de la cosecha del fruto y segundo, por los bajos porcentajes que se obtienen de formación de callos con estructuras embriogénicas.

- **Yemas axilares**

Según Ziv *et al.* (1998), el uso de ancimidol (ANC) en el medio de cultivo de multiplicación, permite un incremento significativo del número de brotes axilares, fundamentalmente porque inhibe la biosíntesis de giberelinas y con ello reprime el crecimiento y dominancia de la yema apical, lo cual favorece o estimula a la brotación de yemas axilares. Lorenzo *et al.* (1998) también señalan, que esto sucede debido a que todos los nutrientes del medio de cultivo son aprovechados para la formación de nuevos brotes y no para la elongación de tallos y hojas.

Albany (2001), señaló que la adición de 2,5 mg L^{-1} de ANC en el medio de cultivo durante la multiplicación en el SIT de cv. de *Musa* 'Gran Enano' (AAA), redujo el tamaño de los brotes, con un aumento en el número de brotes/explante.

Dhed'a *et al.* (1991), desarrollaron una metodología a partir de yemas adventicias, de las cuales extrajo los meristemos proliferantes *in vitro* ("scalps") parte superior de 4-5 mm de diámetro para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas en el cv. de *Musa* 'Bluggoe' (ABB), la misma fue mejorada y generalizada a otros genotipos por

Schoofs (1997). Sin embargo, cuando se utilizó la metodología anterior en cultivares donde se incrementa la presencia del genoma de *Acuminata* (A), fue necesario realizar múltiples subcultivos (5-14 meses), con altas concentraciones de 6-BAP, para obtener los scalps como fuente de explante para establecer las suspensiones celulares embriogénicas (Strosse *et al.*, 2004).

2.4.3 Influencia de los reguladores del crecimiento en la forma de regeneración de los explantes *in vitro*

Una relación baja auxina/citocinina favorece la formación de brotes vegetativos (caulogénesis), mientras que una relación contraria, favorable a las auxinas, inducirá la formación de raíces (rizogénesis). Esta teoría fue propuesta por Skoog (1957), y en la actualidad, es la más aceptada para explicar el control hormonal de la organogénesis (Ying-Hua *et al.*, 2011).

El papel fundamental que ejercen las citoquininas sintéticas (6-BAP, benciladenina, TDZ, kinetina, zeatina, etc.), es romper la dominancia apical gobernada por las auxinas, liberando así las yemas o meristemos laterales de la dormancia. Por lo tanto, el incremento de las citoquininas da inicio a un sinnúmero de eventos en cadena que conllevan a una mayor actividad celular de los meristemos, incrementando la tasa de división celular que da origen a la regeneración de nuevos puntos meristemáticos, ya sea por organogénesis directa (yemas adventicias) o vía organogénesis indirecta (callos) (Müller y Leyser, 2011). Por otra parte, se ha reportado mayor formación de puntos meristemáticos, yemas adventicias y callos en explantes de banano y plátano, con adición de citoquininas sintéticas (Dharaneeswara *et al.*, 2014); pues existe una influencia de las concentraciones de citoquininas en el desarrollo de los explantes debido a que aumentan los niveles de citoquininas endógenas (Peres y Kerbauy, 1999), las cuales se encuentran en una alta concentración sobre todo en la zona basal del explante (Zaffari *et al.*, 2000).

Existen pruebas de la formación de novo de yemas adventicias en la superficie de tejidos de cormo mantenidos en un medio con alto contenido de citoquininas (Novak *et al.*, 1990). Este fenómeno puede deberse a un efecto de habituación de los tejidos al crecimiento en medios de cultivos ricos en citoquininas (Daniels, 1999) y al parecer estos tejidos comienzan también a producir sus propias citoquininas en estas condiciones (Zaffari *et al.*, 2000). Lo anteriormente expuesto se evidencia en el estudio realizado por Cedeño-García *et al.* (2016) que independientemente de la concentración de 6-BAP utilizada, su influencia sobre la mayor tasa de multiplicación con respecto al tratamiento control, quizás

estuvo en función del contenido endógeno de citoquininas que alcanzaron los cormos tratados con 6-BAP, lo cual resultó en un balance hormonal favorable a la citocinina. Aunque existen especies que pueden ser establecidas sin citoquininas, al parecer porque hay suficiente cantidad endógena de este regulador del crecimiento en los explantes (Jiménez, 1998).

Las auxinas exógenas no promueven la formación de brotes, sin embargo, el crecimiento del cultivo *in vitro* puede ser mejorado por su presencia. Durante la fase de implantación de yemas y meristemos es necesaria la presencia de auxinas exógenas debido a que estos explantes no producen (o retienen) suficientes auxinas endógenas para el crecimiento de los renuevos (Ramírez, 1995).

Según Cedeño-García *et al.* (2016) los probables síntomas de anormalidad encontrados en callos y plántulas, se deban a la alta concentración de 6-BAP,considerando por anormalidades a síntomas de hiperhidricidad (hojas y tallos gruesos y quebradizos), que es muy frecuente en cultivo *in vitro* de banano; síntomas de necrosis en callos, amarillamiento y decoloración en las hojas; callos y plántulas con forma de roseta y plántulas con tallos y hojas retorcidas y lanceoladas, lo cual ha sido reportado en banano y plátano micropropagado (Bairu *et al.*, 2008). Otra factor que influye en la formación de plántulas anormales, es el efecto de variaciones genéticas (variación somaclonal) donde se ha empleado altas concentraciones de citoquininas (Vasane *et al.*, 2009, Bibadabi *et al.*, 2010).

Estudios recientes demuestran que los mejores resultados en la obtención de yemas adventicias se obtuvieron al combinar más de una citoquinina (Cedeño-García *et al.*, 2016). Estos autores combinaron 6-BAP y TDZ, similares a los referidos por Pereira *et al.* (2001) quienes obtuvieron mayor número de brotes por explante y menor tiempo de brotación al combinar dichas hormonas en el cv. de *Musa* 'Maça' (AAB) de banano. Así mismo, Langford *et al.* (2012) y Msogoya y Mwakisitu (2014) refieren un efecto significativo del 6-BAP y TDZ a bajas concentraciones, sobre la brotación y número de brotes por explante en cultivares de banano y plátano.

3. Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), adscrito a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), Santa Clara, (Cuba), en el período desde enero de 2016 hasta mayo de 2017.

Material vegetal

Se utilizaron ápices de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA), obtenidos de hijos tipo espada con un tamaño aproximado de 50 a 100 cm de altura que fueron establecidos *in vitro* de acuerdo a la metodología propuesta por Orellana (1994).

Procedimientos generales

Los medios de cultivo utilizados se especifican posteriormente en la descripción de cada experimento. El pH de los diferentes medios de cultivo fue ajustado a 5,8 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N) antes de la esterilización en autoclave, a una temperatura de 121 °C y 1,2 kg cm^{-2} de presión, durante 20 minutos. Como agente gelificante de los diferentes medios de cultivo se empleó Gelrite 2,0 g L^{-1}. Fueron empleados frascos de vidrio de 250 mL de volumen total con 30 mL de medio de cultivo cada uno.

El instrumental (bisturíes y pinzas) se desinfectó en un esterilizador eléctrico alemán modelo DENT-EQ que estuvo dentro de la cabina de flujo laminar horizontal todo el tiempo, donde se realizó toda la manipulación del material vegetal en condiciones de esterilidad. Los platos metálicos para el trabajo, fueron esterilizados en la estufa a 180 °C durante 2 horas.

Condiciones de incubación.

Todo el material vegetal se incubó en el laboratorio entre los meses de Octubre de 2016 hasta Abril de 2017, en condiciones de luz solar en cámaras de cultivo, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 48,0-62,5 µ mol. m^{-2}. s^{-1}, y con un fotoperíodo en dependencia de la época del año. En el período de invierno de Octubre-Febrero con una duración máxima y mínima del período luminoso de 13h y 34 minutos y 10h y 41 minutos. En el caso del verano de Marzo-Septiembre el fotoperíodo fue de 16/8h luz/oscuridad. Con una temperatura de 27±2ºC.

Análisis estadísticos.

El diseño experimental empleado fue totalmente aleatorizado, todos los experimentos se repitieron dos veces. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows versión 21,0 del 2012. Para el análisis de la normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro Wilk, para la comparación entre las medias se aplicó la alternativa no paramétrica del Análisis de Varianzas, la prueba de Kruskal-Wallis o Tukey y para la comparación entre parejas de grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En todos los experimentos se utilizaron cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno. En todos los casos las diferencias se establecieron para $p<0,05$.

3.1 Determinación del efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro*

Con el objetivo de estudiar la influencia de la combinación de las citoquininas 6-BAP y TDZ en la inducción de yemas adventicias, se colocaron brotes provenientes del medio de cultivo de establecimiento *in vitro*, según metodología propuesta por Orellana (1994), en el medio de cultivo de multiplicación compuesto por: Sales MS 4,3 g L^{-1}, vitaminas MS 10 mL L^{-1}, AIA 0,2 mg L^{-1}, Ácido Ascórbico 10 mg L^{-1}, Sacarosa 30 g L^{-1} y Gelrite 2,0 g L^{-1}. Se evaluaron nueve combinaciones de 6-BAP y TDZ, basadas en los criterios emitidos por García *et al*., (2006) y Sadik *et al*., (2007) en la formación de yemas adventicias. Además dos controles, uno solamente con 6-BAP (López *et al.*, 2000) y otro con TDZ (Sadik *et al.*, 2007). Siendo estos los medios de cultivo usualmente empleados en la formación de yemas adventicias *in vitro* en bananos y plátanos. Las concentraciones de las citoquininas de los 11 tratamientos aparecen en la Tabla I.

Tabla I. Concentraciones de las citoquininas empleadas en el medio de cultivo para la formación de las yemas adventicias *in vitro* en los cvs. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) y 'Manzano' (AAB)

Tratamientos	Concentración citoquininas (mg L^{-1})	
	6-BAP	TDZ
1	2,0	0,6
2	4,0	0,6
3	6,0	0,6
4	2,0	0,8
5	4,0	0,8
6	6,0	0,8
7	2,0	1,0
8	4,0	1,0
9	6,0	1,0
10 (Control)	22,5	-
11 (Control)	-	2,0

A los 30 días de cultivo se evaluó el número de yemas adventicias y brotes por explantes. Así como el porcentaje de formación de yemas adventicias y brotes por cada tratamiento.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows versión 21,0 del 2012. Para el análisis de la normalidad de las variables, número de yemas adventicias y el número de brotes por explante, se utilizó la prueba de Shapiro Wilk, para la comparación entre las medias se aplicó la alternativa no paramétrica del Análisis de Varianzas, la prueba de Kruskal-Wallis y para la comparación entre parejas de grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En todos los experimentos se utilizaron cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno. En todos los casos las diferencias se establecieron para $p<0,05$.

En el presente trabajo se denominaron yemas adventicias a estructuras bulbosas blancas de 2 a 5 mm de diámetro ocasionalmente rodeadas por primordios de hojas verdes. Esas pequeñas estructuras se desarrollan hacia dos o diez diminutos meristemos dispersos sobre la superficie del explante (INIBAP, 1996) (Fig. 1).

Figura 1: Yemas adventicias en *Musa*

3.2 Efecto del número de subcultivos en la multiplicación y regeneración de las yemas adventicias *in vitro*

3.2.1 Multiplicación de las yemas adventicias

Con el objetivo de estudiar la influencia del número de subcultivos en la multiplicación de las yemas adventicias se colocaron las estructuras formadas en el experimento anterior, en los medios de cultivos que contenían las combinaciones de citoquininas que estimularon el desarrollo de dichas estructuras.

Los subcultivos se realizaron cada 30 días, evaluándose el número de yemas adventicias y el número de brotes por explante. Se realizaron hasta cuatro subcultivos para alcanzar los objetivos propuestos en cada cultivar. Las condiciones de cultivo fueron similares al experimento anterior.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows versión 21,0 del 2012. Para el análisis de la normalidad de las variables, número de yemas adventicias y el número de brotes por explante, se utilizó la prueba de Shapiro Wilk, para la comparación entre las medias se aplicó la alternativa no paramétrica del Análisis de Varianzas, la prueba de Tukey y para la comparación entre parejas de grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En todos los experimentos se utilizaron cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno. En todos los casos las diferencias se establecieron para $p<0,05$.

3.2.2 Estudios histológicos de la formación de las yemas adventicias *in vitro*

Con el objetivo de caracterizar el origen de las yemas adventicias desarrolladas en los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA), se realizaron cortes histológicos en cinco explantes, de cada variedad, provenientes del medio de cultivo de multiplicación suplementado con la mejor combinación de citoquininas y subcultivo seleccionado.

Las yemas adventicias se colocaron durante 24 horas en una solución de fijación que contenía formaldehído al 37% (v/v), ácido acético glacial al 100% (v/v) y alcohol etílico al 70% (v/v), en una proporción 1:1:18. La deshidratación progresiva de las muestras se realizó en soluciones de etanol de graduación creciente comenzando con etanol al 70% (v/v) hasta llegar al etanol absoluto y la inclusión se realizó en bloques de parafina (Kraus y Arduin, 1997). Se realizaron cortes de 10 µm en un micrótomo rotatorio Heidelberg HM 320 (Alemania) y posteriormente la tinción se realizó con safranina 0,1% (p/v) para el examen general del tejido (Jensen, 1962).

Las muestras fueron observadas con un microscopio Olympus SZX7 (Japón) con un objetivo 40X y fotografiadas con una cámara Canon (Power Shot A 630, Japón). Se determinó los tipos de células presentes en las yemas adventicias.

3.2.3 Regeneración de las yemas adventicias

El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto del número de subcultivos sobre la regeneración de las yemas adventicias de las mejores combinaciones de reguladores del crecimiento obtenidos del experimento anterior. Se colocaron dichas estructuras de ambos cultivares, en un medio de cultivo de regeneración libre de reguladores del crecimiento, que contenía: Sales MS 4,3 g L^{-1}, Tiamina 1,0 mg L^{-1} y Sacarosa 20 g L^{-1} (García *et al.*, 2006).

Se utilizaron cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno. A los 30 días de cultivo se evaluó el número de brotes regenerados por yema adventicia, altura del brote (cm), el número de hojas emitidas/brote, así como el porcentaje de plantas fuera de tipo por cada tratamiento. Las condiciones de cultivo fueron similares al experimento anterior.

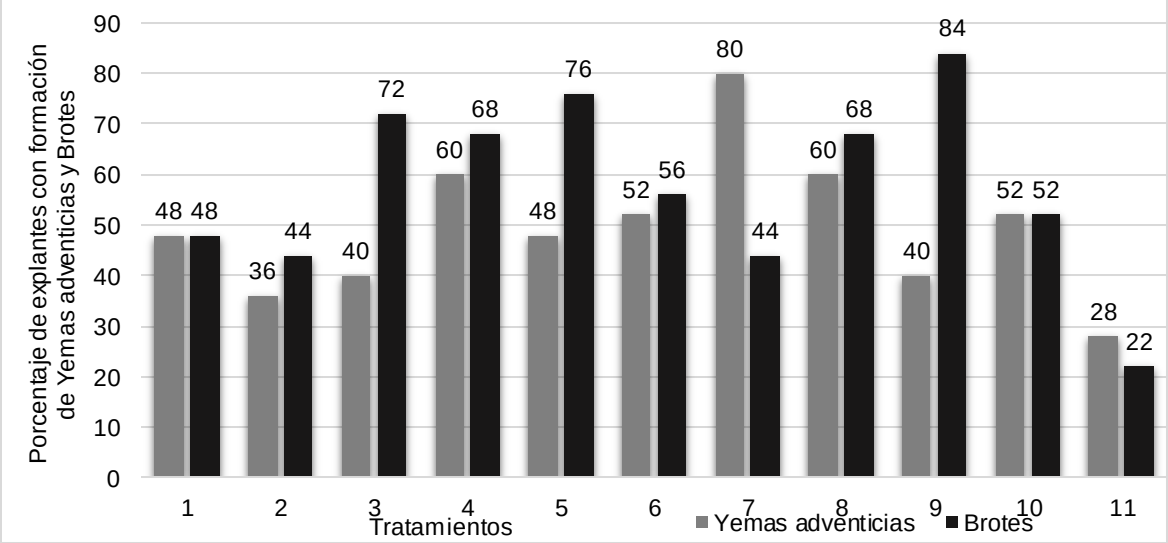
Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows versión 21,0 del 2012. Para el análisis de la normalidad de las variables, número de botes regenerados por yema adventicia, tamaño del brote y número de hojas emitidas por brote, se utilizó la prueba de Shapiro Wilk, para la comparación entre las medias se aplicó la

alternativa no paramétrica del Análisis de Varianzas, la prueba de Kruskal-Wallis y para la comparación entre parejas de grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En todos los experimentos se utilizaron cinco frascos de cultivo con cinco explantes cada uno. En todos los casos las diferencias se establecieron para $p<0,05$.

4. Resultados

4.1 Efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro*

Al analizar el porcentaje de explantes que formaron yemas adventicias se pudo apreciar que en todas las combinaciones de las citoquininas estudiadas (6-BAP y TDZ) se observó formación de las mismas a los 60 días de cultivo (segundo subcultivo) (Fig. 2 y 4). En el tratamiento siete, en el cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) donde se empleó 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ, se obtuvo el mayor porcentaje, con el 80% de los explantes con formación de yemas adventicias, resultados muy superiores a los alcanzados por los controles y demás combinaciones estudiadas y solamente un 44% de formación de brotes por explante (Fig. 2).



Tratamientos: 1) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 2) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 3) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 4) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 5) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 6) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 7) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 8) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 9) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 10) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Figura 2. Porcentaje de explantes que formaron yemas adventicias y brotes *in vitro* de banano cv. 'Gros Michel' (AAA) a los 60 días de cultivo

Al evaluar el número de yemas adventicias/explante, se pudo apreciar que los mejores resultados, en el cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA), se alcanzaron en el tratamiento siete con 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ, con diferencias estadísticas con los

controles donde se emplean 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP y 2,0 mg L^{-1} de TDZ y el resto de los tratamientos estudiados. Con este tratamiento se logró como promedio 2,72 yemas adventicias/explante con la menor cantidad de brotes por explante (1,24) a los 60 días de cultivo (Tabla II y Fig. 3).

Tabla II. Efecto de las diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* de banano cv. 'Gros Michel' (AAA) a los 60 días de cultivo

Tratamientos	Yemas adventicias/explante		Brotes/explante	
	Media real	Media de rango	Media real	Media de rango
1	0,94 b	25,47	2,84 ab	26,47
2	0,48 c	20,24	1,60 b	19,48
3	0,66 c	20,63	3,08 a	22,67
4	1,16 b	23,10	2,84 ab	22,32
5	1,43 b	21,52	3,21 a	22,61
6	1,08 b	22,80	1,52 b	19,38
7	**2,72 a**	**27,04**	**1,24 b**	**18,62**
8	1,32 b	20,98	1,68 b	20,98
9	0,52 c	20,79	2,04 ab	21,81
10	1,56 b	23,36	1,92 b	20,04
11	0,40 c	19,52	3,88 a	24,80

Tratamientos: 1) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 2) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 3) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 4) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 5) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 6) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 7) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 8) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 9) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 10) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$ según la prueba de Kruskall Wallis/Mann Whitney.

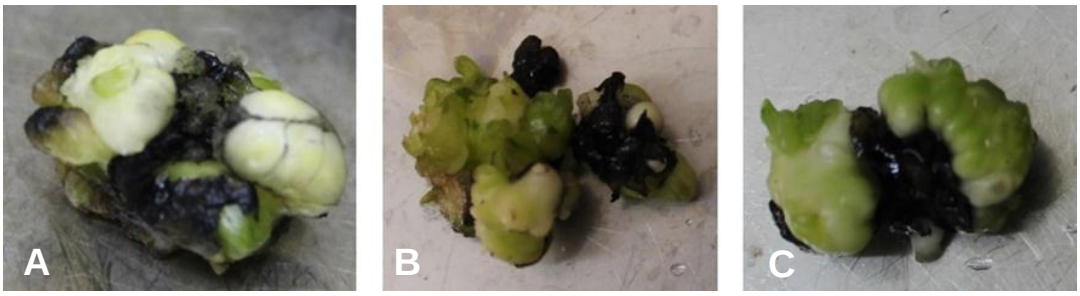
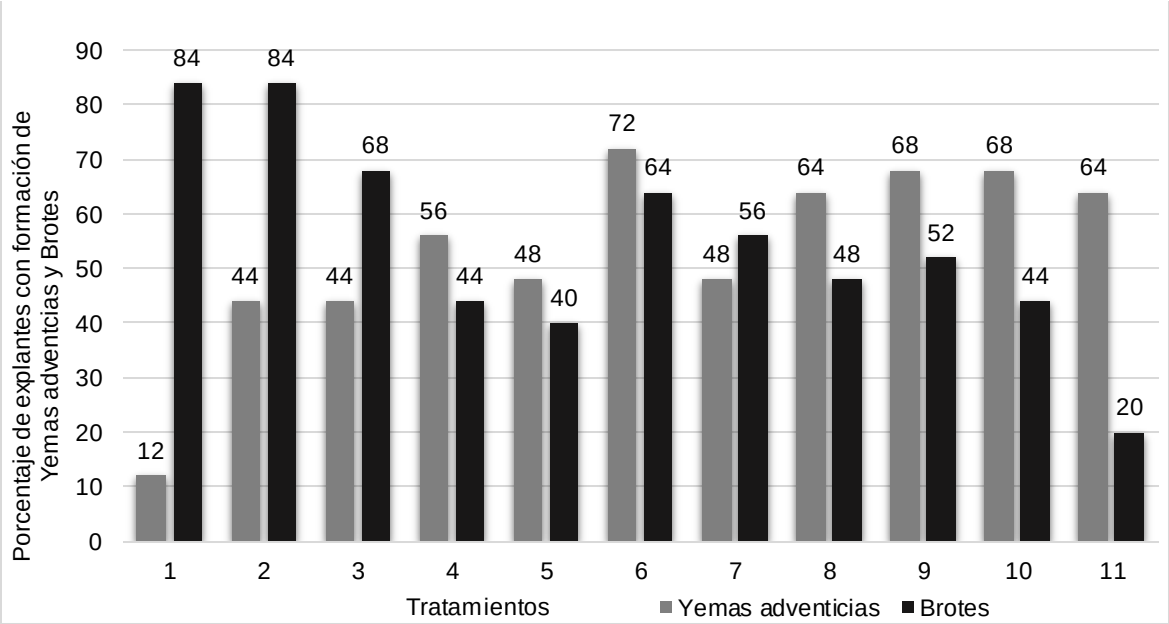


Figura 3. Efecto de las diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* de banano cv. 'Gros Michel' (AAA) a los 60 días de cultivo. A) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; B) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; C) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

En el caso del cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB), el tratamiento que tuvo el mayor porcentaje de formación de yemas adventicias fue el seis, donde se empleó una concentración de 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP y 0,8 mg L^{-1} de TDZ alcanzándose el 72%, con relación al resto de los tratamientos. Sin embargo, se logró en este tratamiento un 64% de formación de brotes por explante (Fig. 4).



Tratamientos: 1) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 2) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 3) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 4) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 5) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 6) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 7) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 8) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 9) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 10) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Figura 4. Porcentaje de explantes que formaron yemas adventicias y brotes *in vitro* de banano cv. 'Manzano' (AAB) a los 60 días de cultivo

Los mejores resultados al combinar ambos reguladores del crecimiento en el cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB) se alcanzaron en el tratamiento seis (6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ), con diferencias significativas con el resto de los tratamientos en que se combinan estos y con el tratamiento 11 (control) donde se empleó 2,0 mg L^{-1} de TDZ; pero sin diferencias estadísticas con el tratamiento 10 (control) donde se utilizó 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP. Con esta combinación de regulador del crecimiento se logró como promedio 4,92 yemas adventicias/explante y 1,28 de brotes/explante (Tabla III y Fig. 5).

Tabla III. Efecto de las diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* de banano cv. 'Manzano' (AAB) a los 60 días de cultivo

Tratamientos	Yemas adventicias/explante		Brotes/explante	
	Media real	Media de rango	Media real	Media de rango
1	0,12 e	18,04	1,68 a	18,04
2	1,12 d	20,78	2,04 a	20,78
3	2,16 cd	22,04	1,60 ab	22,04
4	2,84 c	24,36	1,28 bc	24,36
5	1,13 d	15,63	1,13 bc	15,63
6	**4,92 b**	**27,54**	**1,28 bc**	**27,54**
7	3,84 c	23,76	0,92 bc	23,76
8	3,24 c	23,42	1,08 bc	32,96
9	3,45 c	25,18	1,36 bc	25,18
10	5,80 b	27,32	0,80 bc	27,32
11	11,12 a	29,24	0,36 c	29,24

Tratamientos: 1) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 2) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 3) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,6 mg L^{-1} de TDZ; 4) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 5) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 6) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 7) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 8) 4,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 9) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 10) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$ según la prueba de Kruskall Wallis/Mann Whitney

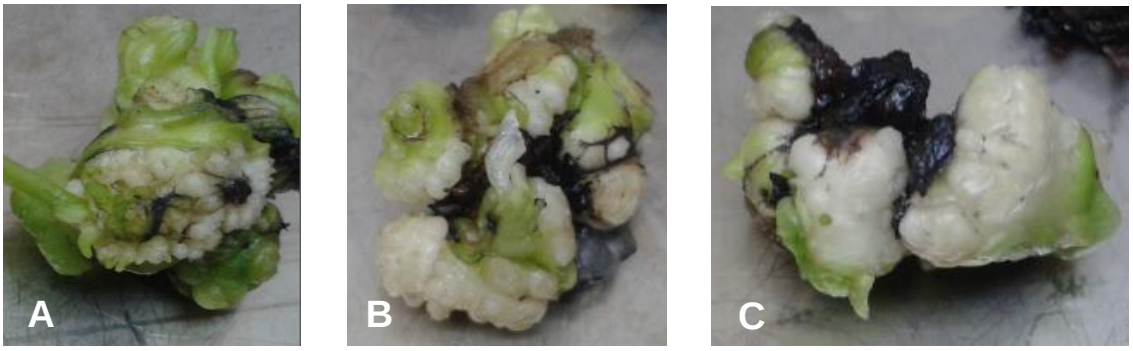


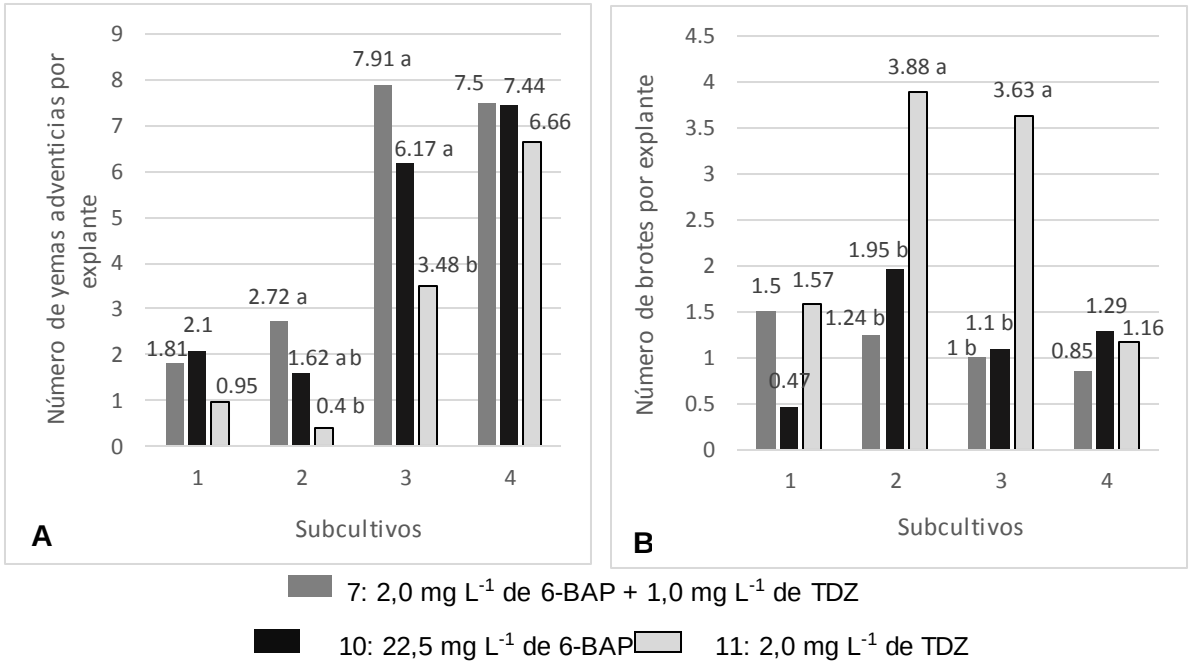
Figura 5. Efecto de las diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* de banano cv. 'Manzano' (AAB) a los 60 días de cultivo. A) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; B) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; C) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

4.2 Efecto del número de subcultivos en la multiplicación y regeneración de las yemas adventicias *in vitro*

4.2.1 Multiplicación de yemas adventicias

Al analizar el efecto del número de subcultivos en la multiplicación de yemas adventicias por explante se pudo apreciar que fue aumentando a medida que aumentaron los subcultivos para los tratamientos estudiados (seis y siete) de ambos cultivares. Mientras que la formación de brotes por explante disminuyó a medida que aumentaron los subcultivos para dichos tratamientos de manera general (Fig. 6 y 7).

Al evaluar el número de yemas adventicias y brotes/explante se pudo apreciar que en el primer subcultivo para el cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) no existieron diferencias significativas con los controles. A partir del segundo subcultivo así como en el tercero aparecieron diferencias estadísticas en ambas variables evaluadas con respecto al control 11. Al evaluarse el cuarto subcultivo estas diferencias estadísticas desaparecieron (Fig. 6 A y B). Por lo que se decidió seleccionar el cuarto subcultivo para multiplicar las yemas adventicias después de combinar las citoquininas estudiadas.

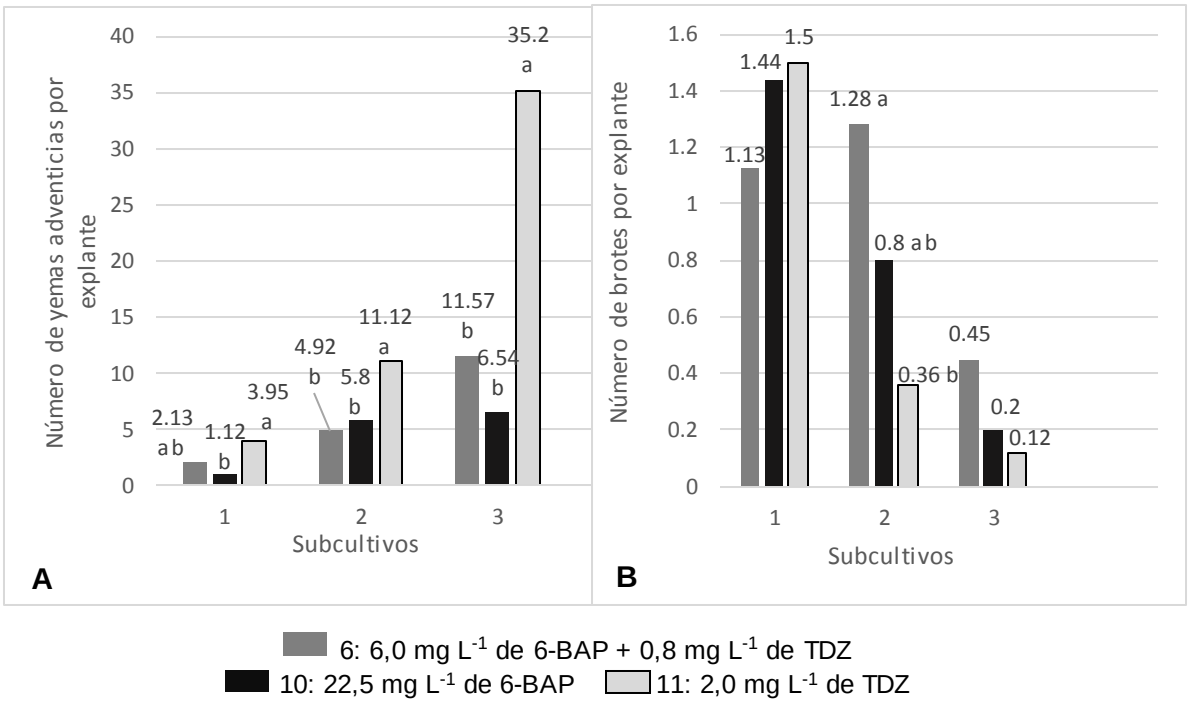


Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para p≤0,05 según la prueba de Tukey

Figura 6. Efecto del número de subcultivos en la formación de yemas adventicias (A) y brotes por explante (B) en el cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA)

En el cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB) al analizar la variable yemas adventicias/explante se pudo apreciar que en todos los tratamientos aumentó en la medida que aumentaron los subcultivos. En los subcultivos dos y tres el tratamiento seis no mostró diferencias estadísticas con el control 10, no siendo así con el control 11 que alcanzó valores muy superiores hasta el tercer subcultivo (Fig. 7A).

Al evaluar la formación de brotes/explante en el segundo subcultivo el tratamiento seis y el control 10 no mostraron diferencias estadísticas. Sin embargo, con respecto al control 11, el tratamiento seis mostró diferencias estadísticas. Estas diferencias desaparecieron en el tercer subcultivo (Fig. 7B), por lo que se selecciona el tercer subcultivo para multiplicar las yemas adventicias después de emplear las citoquininas combinadas a menores concentraciones.



Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para p≤0,05 según la prueba de Tukey

Figura 7: Efecto del número de subcultivos en la formación de yemas adventicias y brotes por explante en el cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB)

4.2.2 Estudios histológicos de la formación de las yemas adventicias *in vitro*

En las muestras obtenidas desde las yemas adventicias se observó en la superficie del tejido, pequeñas ondulaciones que eran evidencia de la formación de nuevas yemas, confirmándose el origen adventicio de estas estructuras para ambos cultivares (Figura 8 A y B).

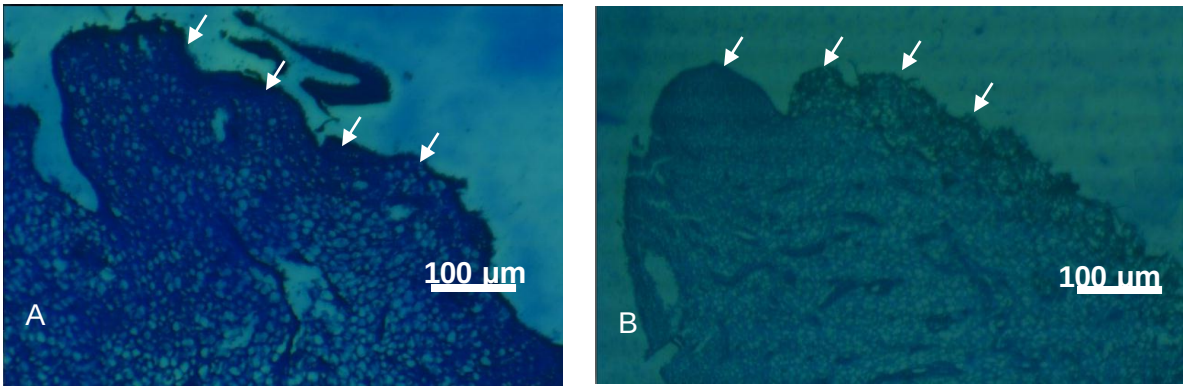
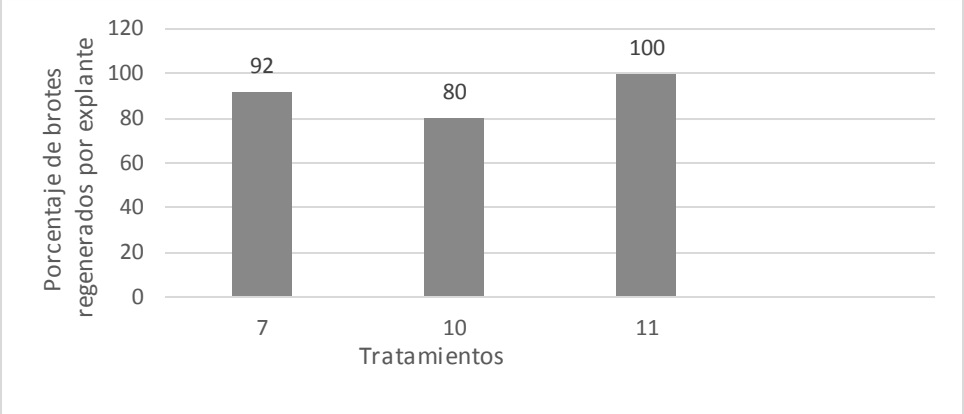


Figura 8: Estudios histológicos realizados a yemas adventicias obtenidas en el medio de cultivo con las combinaciones de citoquininas para cada cultivar en estudio. Las flechas indican el desarrollo de ondulaciones en la superficie meristemática del explante mostrando la formación de las yemas adventicias. (A) Yemas adventicias en el cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA); (B) Yemas adventicias en el cultivar de *Musa* 'Manzano' (AAB)

4.2.3 Regeneración de yemas adventicias

Al analizar el porcentaje de explantes que regeneraron brotes *in vitro* de ambos cultivares, se apreció que tanto para 'Gros Michel' (AAA) como para 'Manzano' (AAB) a los 30 días de cultivo ya se habían logrado la regeneración de brotes a partir de las yemas adventicias multiplicadas hasta el cuarto y tercer subcultivo, respectivamente.

En el caso del cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) la regeneración ocurrió en casi la totalidad de los explantes (Fig. 9) alcanzándose en el tratamiento siete donde se combinaron el 6-BAP y el TDZ, un 92% de explantes regenerados a los 30 días de cultivo.



Tratamientos: 7) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 10) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP y 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Figura 9. Porcentaje de explantes que regeneraron brotes *in vitro* de banano cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) a los 30 días de cultivo

Al analizar el número de brotes por explante y el número de hojas por brote en el cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) se pudo apreciar que no existieron diferencias significativas entre el tratamiento estudiado (siete) y los tratamientos controles. En el caso de la variable altura del brote, el tratamiento siete alcanzó los valores mayores con respecto a ambos controles (Tabla IV). El 100% de las plantas regeneradas presentaron un aspecto normal típico de plantas obtenidas *in vitro* tanto para los brotes regenerados a partir de las yemas adventicias provenientes del tratamiento siete como de ambos controles (Fig.10)

Tabla IV: Efecto del medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento en la altura de los brotes regenerados en el cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) a partir de yemas adventicias a los 30 días de cultivo

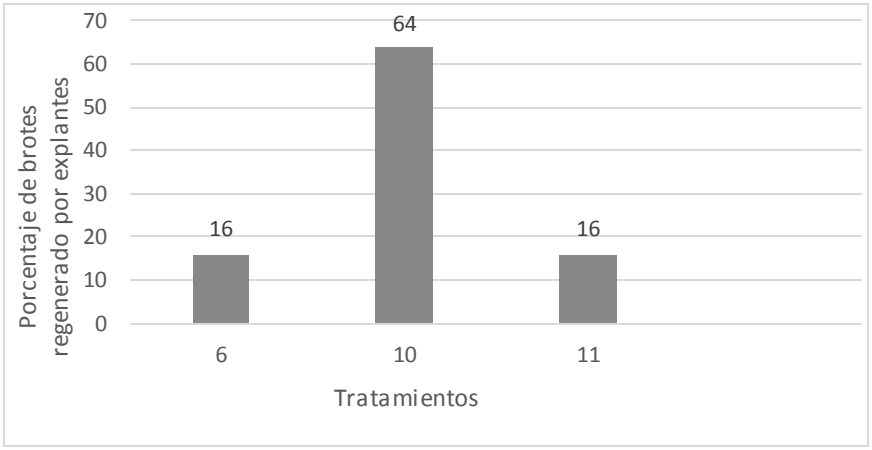
Tratamientos	Altura de los brotes regenerados/explante	
	Media real	Media de rango
7	1,48 a	88,69
10 (Control)	1,16 b	70,13
11 (Control)	0,99 b	57,37

Tratamientos: 7) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$ según la prueba de Kruskall Wallis/Mann Whitney

Figura 10. Plantas normales regeneradas a partir de yemas adventicias en un medio libre de reguladores del crecimiento en el cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA). A) 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ; B) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; C) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

En el cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB) el porcentaje de regeneración fue relativamente bajo (Fig. 11) donde el tratamiento seis y once solo alcanzaron un 16% de brotes regenerados, a diferencia del tratamiento diez que alcanzó un 64%.



Tratamientos: 6) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 10) 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP y 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Figura 11. Porcentaje de explantes que regeneraron brotes *in vitro* de banano cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB) a los 30 días de cultivo

En el caso del cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB) al analizar el número de brotes por explante, la altura de los brotes y el número de hojas por brote se pudo apreciar que entre el tratamiento seis y los controles existieron diferencias estadísticas para las tres variables evaluadas (Tabla V). En el tratamiento en que se combinaron ambas citoquininas, se alcanzaron los menores valores sin embargo, el 100% de las plantas regeneradas mostraron un aspecto normal, típico de plantas regeneradas *in vitro*. En ambos controles

se observó la presencia de plantas fuera de tipo, con aspecto de roseta y hojas deformadas. En el control 10 el porcentaje de plantas fuera de tipo fue de un 75% con presencia de brotes en forma de roseta (Fig. 12A) y en el caso del control 11 fue de un 100% de plantas con hojas deformadas (Fig. 12B).

Tabla VI. Efecto del medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento en la regeneración de plantas del cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB) a partir de yemas adventicias a los 30 días de cultivo

Tratam.	Brotes/explantes		Tamaño/brote		Hojas/brote	
	Media real	Media de rango	Media real	Media de rango	Media real	Media de rango
6	0,24 b	19,84	0,16 b	23,56	0,29 b	21,72
10 (Cont.)	1,16 a	31,16	0,54 a	41,05	1,62 a	42,29
11 (Cont.)	0,20 b	25,42	0,07 b	26,13	0,57 b	27,02

Tratamientos: 6) 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ; 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP; 11) 2,0 mg L^{-1} de TDZ

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para p≤0,05 según la prueba de Kruskall Wallis/Mann Whitney

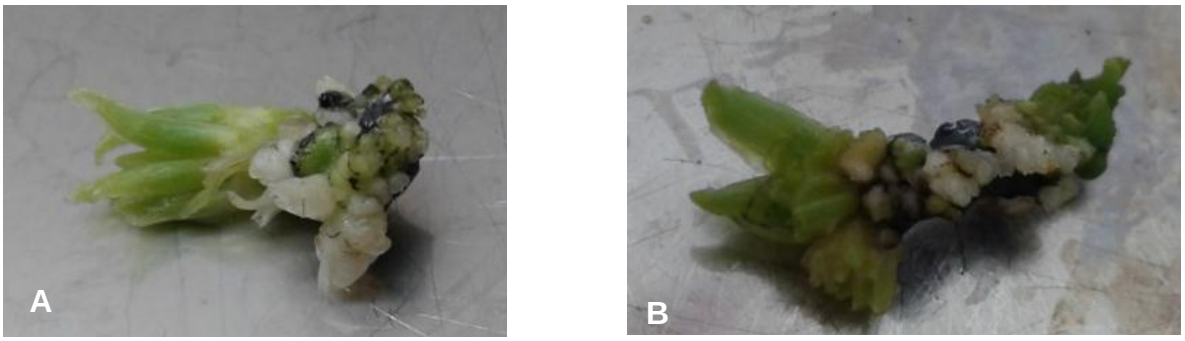


Figura 12: Plantas deformadas regeneradas a partir de yemas adventicias en un medio libre de reguladores del crecimiento en el cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB). (A) Plantas en forma de roseta en el Control 10 (22,5 mg L^{-1} de 6-BAP) y (B) Brotes con hojas deformadas en el Control 11 (2,0 mg L^{-1} de TDZ)

5. Discusión

5.1 Efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro*

Los resultados alcanzados en el presente estudio demostraron el efecto del uso combinado de las citoquininas empleadas (6-BAP y TDZ) en la formación de yemas adventicias en los cultivares de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) y 'Manzano' (AAB), lo cual permitió la selección de los mejores tratamiento. El empleo combinado de las dos citoquininas en el medio de cultivo parece haber influido en la asimilación de estos reguladores del crecimiento por los tejidos vegetales que probablemente causó un efecto aditivo lo cual estimuló la formación de las yemas adventicias. En el cv. 'Gros Michel' (AAA) la mejor combinación fue 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 1,0 mg L^{-1} de TDZ (tratamiento siete) y en el caso de 'Manzano' (AAB) fue 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP + 0,8 mg L^{-1} de TDZ (tratamiento seis), pues se logró la formación de las yemas adventicias y la disminución de la formación de los brotes; con la consiguiente disminución de las concentraciones de citoquininas empleadas tradicionalmente en la formación de dichas estructuras en bananos y plátanos (22,5 mg L^{-1} de 6-BAP y 2,0 mg L^{-1} de TDZ). López *et al.* (2000) en los cultivares de *Musa* 'Zanzibar' (AAB) y 'Navolean' (AAB) con concentraciones de 6-BAP de 22,5 mg L^{-1} y cuatro subcultivos para la formación de yemas adventicias lograron el establecimiento de suspensiones celulares. Así mismo, Sadik *et al.* (2007) utilizando 2,2 mg L^{-1} de TDZ como control lograron la formación de los "scalps" en seis subcultivos, en los cultivares de *Musa* 'Musakala' (EA-AAA), 'Kibuzi' (EA-AAA), 'Mbwazirume' (EA-AAA) y 'Lwadungu' (EA-AAA).

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación fueron alcanzados por Sadik *et al.* (2007) en la proliferación de yemas adventicias mostrando que una combinación de 6-BAP y TDZ, a bajas concentraciones de 2,9 mg L^{-1} y 1,0 mg L^{-1} respectivamente, fueron capaces de inducir la formación de yemas adventicias para obtener meristemos proliferantes o "scalps". Cuando se emplearon separadas ambas citoquininas se requerían concentraciones mayores o iguales a 23,8 mg L^{-1} (Schoofs *et al.*, 1998) y mayores o iguales a 2,2 mg L^{-1} (Nahamya, 2000), respectivamente, para inducir la formación de meristemos proliferantes. Lee (2001) evaluó el efecto del TDZ en la multiplicación de

yemas adventicias en cultivares de bananos adicionando desde 0,002 mg L^{-1} hasta 2,0 mg L^{-1}. Con una concentración de 0,2 mg L^{-1} logró el mayor número de yemas formadas, sin embargo, altas concentraciones inhibieron la elongación de las yemas y apareció en la base de estas, grupos de pequeñas estructuras globulares.

Datos similares fueron reportados por Sadik *et al.* (2015) donde la formación de yemas adventicias fue significativamente mayor en un medio de cultivo que contenía una combinación de TDZ y N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenilurea (4-CPPU) de 2,88 mg L^{-1} y 3,25 mg L^{-1}, respectivamente, al compararlos con los medios de cultivo donde ambas citoquininas se pusieron independientemente a una concentración de 5,77 mg L^{-1} y 6,50 mg L^{-1}.

La interacción de TDZ y 4-CPPU indujo mayor proliferación de yemas adventicias cuando se usó en combinación a bajas concentraciones comparado a cuando fue utilizado independientemente a mayores concentraciones, sugiriendo un sinergismo y efecto aditivo entre ambos, demostrando que deben evitarse altos niveles de cada uno por separado (Sadik *et al.*, 2015). El empleo de bajas concentraciones de TDZ y 4-CPPU podría ser ventajoso para reducir la variación somaclonal *op. cit*. En bananos, la variación somaclonal ha sido frecuente por el empleo de altas concentraciones de hormonas del crecimiento como 6-BAP y dicamba (Leela *et al.*, 2003).

En el caso de la multiplicación de yemas adventicias, Strosse *et al.* (2008) constataron que el 6-BAP es la más eficiente a altas concentraciones. Sin embargo, el TDZ puede ser aplicado a bajas concentraciones pues Huetteman y Preece (1993) establecieron que este regulador del crecimiento puede inhibir la elongación de las yemas. Por su parte, Lee (2001) observó que altas concentraciones de TDZ inhibieron la elongación de las yemas y aparecieron grandes grupos globulares de yemas en la base del explante.

En los cultivares empleados en esta investigación se logró aumentar la formación de yemas adventicias unido a la disminución en la formación de brotes/explante, parámetro muy positivo ya que el objetivo principal de la investigación fue lograr la mayor cantidad de yemas adventicias para iniciar el proceso de formación de callos embriogénicos y posterior establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas, para ser empleadas en los Programas de Mejoramiento Genético en ambos cultivares. Por lo que se seleccionaron los tratamientos anteriormente mencionados como los mejores para la formación de yemas adventicias en banano cvs. de *Musa* 'Gros Michel' y 'Manzano', ya que se logró disminuir

los niveles de 6-BAP y de TDZ que tienen efectos negativos en la posterior regeneración de plantas.

5.2 Efecto del número de subcultivos para lograr la multiplicación de las yemas adventicias *in vitro*

5.2.1 Multiplicación de yemas adventicias

Según los resultados de la presente investigación para el cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) fueron necesarios cuatro subcultivos y en el caso del cultivar 'Manzano' (AAB) solamente tres se requirieron para lograr formar yemas adventicias en la superficie de los explantes. Datos muy positivos ya que se redujo el tiempo necesario para obtener las yemas adventicias. Según Sadik (2013), un impedimento al usar el método de las yemas adventicias para generar callos en bananas del este de África (EA-AAA) ha sido el largo tiempo requerido para formar las yemas adventicias ideales para tales propósitos.

La diferencia en el número de subcultivos entre ambas cultivares pudo deberse a que difieren en su constitución genómica siendo el cv. de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) mientras que el cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB). Una fuerte correlación se encontró por INIBAP (1996) entre la constitución genómica de los cultivares (el porcentaje del genoma B), la dominancia apical *in vitro* y el número de subcultivos en el medio de cultivo de multiplicación necesarios para sobreponer la dominancia apical. Clones con genoma BB y ABB tienen una baja dominancia y en relativamente bajas concentraciones de citoquininas pueden multiplicarse eficazmente, mientras que los cultivares AAA requieren hasta nueve subcultivos en el medio de cultivo antes de que la dominancia apical se elimine.

Roux *et al.* (2001) obtuvieron yemas adventicias del cultivar de *Musa* 'Grande naine' (AAA) en el sexto subcultivo con 4,5 mg L^{-1} de 6-BAP, pero un largo tiempo de subcultivo puede ser la causa de variación somaclonal. La edad del cultivo realza la variabilidad entre las plantas regeneradas (Leela *et al.*, 2003) pues las condiciones del cultivo *in vitro* y la rápida multiplicación de un tejido afecta la estabilidad genética e incrementa las mutaciones lo cual conlleva a variación somaclonal (Duncan, 1997). Este mismo fenómeno también se observó en bananos (El-Dougdoug *et al.*, 2007).

Según Sadik *et al.* (2015) en cultivares de banano donde predominaba el genoma AAA, las yemas adventicias se obtuvieron en todas las combinaciones de TDZ y 4-CPPU en el cuarto subcultivo.

5.2.2 Estudios histológicos de la formación de las yemas adventicias *in vitro*

Las concentraciones de 6-BAP y TDZ y el número de subcultivos empleados en la presente investigación pudieron haber estimulado la división celular en los puntos meristemáticos de crecimiento, observándose la acción morfogénica de ambos reguladores del crecimiento. La formación adventicia comenzó fuera de la región vascular central, en las células del parénquima por debajo de la epidermis. El diámetro de las células aumentó y el crecimiento de estas secciones predominantemente resultó una alta actividad meristemática en esta zona (García *et al.*, 2006)

Estos resultados corroboran lo planteado por Novak *et al.* (1990) quienes encontraron dos tipos de yemas durante la proliferación de ápices irradiados de bananos: los primordios meristemáticos que emergieron de la zona relacionada con los primordios foliares tuvieron un origen axilar, mientras que las yemas desarrolladas en la zona del cormo tuvieron un origen adventicio y diferenciaron a partir de una o pocas células superficiales.

En estudios realizados por Banerjee *et al.* (1986) se demostró el origen adventicio de nuevos brotes por la presencia de citoquininas en el medio de cultivo. Se observó en el cv. de *Musa* 'Bluggoe' (ABB) una rápida expansión de la base del explante debido a que las células superficiales del domo meristemático se dividieron rápidamente y comenzó la formación de nuevas yemas con el desarrollo de los primordios de hojas en cada nuevo ápice formado. Los brotes adventicios tienen su origen en la formación de tejido meristemático y la posterior diferenciación de ápices, ya sea directamente o partir de callos originados también del explante (Villalobos y Thorpe, 1993).

5.2.3 Regeneración de yemas adventicias

Según los resultados obtenidos en esta investigación altas concentraciones de reguladores del crecimiento produjo brotes regenerados fuera de tipo; pues el efecto de los reguladores del crecimiento vegetal sobre los tejidos posee un efecto aditivo (Sadik *et al.*, 2007) y un alto número de subcultivos con una elevada concentración de citoquinina produce yemas adventicias y brotes en *Musa* fuera de tipo (Cedeño-García *et al.*, 2016).
La regeneración de las yemas adventicias en el caso del cultivar de *Musa* 'Gros Michel' (AAA) fue de un 92% de plantas regeneradas mostrando un aspecto normal, típico de plantas regeneradas *in vitro* tanto para las yemas adventicias provenientes del tratamiento siete como ambos controles. Por tanto, la selección del tratamiento siete con cuatro subcultivos no produjo hasta este momento de la micropropagación plantas fuera de tipo.

En el caso del cv. de *Musa* 'Manzano' (AAB) al tercer subcultivo el tratamiento seis (6,0 mg L^{-1} de 6-BAP y 0,8 mg L^{-1} de TDZ) no presentó plantas fuera de tipo. A diferencia de los controles 10 (22,5 mg L^{-1} de 6-BAP) y 11 (2,0 mg L^{-1} de TDZ) con un 75% y 100% de plantas fuera de tipo, respectivamente. Estos resultados evidenciaron el efecto negativo de altas concentraciones de citoquininas en la regeneración de plantas. Similares resultados obtuvieron Bairu *et al.* (2008) al emplear altas concentraciones de 6-BAP lo cual inhibió el crecimiento de las yemas y provocó la aparición de plantas fuera de tipo en forma de roseta en banano. En este aspecto hay numerosos informes los cuales muestran las diferencias de usar altos niveles de citoquininas que produce efectos negativos en la regeneración de plantas (Martin *et al.*, 2006, Shirani *et al.*, 2009).

Farahani *et al.* (2008) refirieron que con altas concentraciones de TDZ el número de yemas normales se redujo y aparecieron en un número elevado yemas fuera de tipo.

Todo lo anterior confirma que la utilización de concentraciones más bajas de reguladores del crecimiento y en un menor número de subcultivos brinda mayores posibilidades para la formación de yemas adventicias, su multiplicación y posterior regeneración para su empleo en los Programas de Mejora Genética.

Análisis de los costos de aplicación del tratamiento

El 6-BAP y el TDZ fueron los dos Reguladores del Crecimiento (RC) utilizados en la realización de los experimentos anteriormente descriptos, para obtener las yemas adventicias que se utilizarán en los Programas de Mejoramiento Genético del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Dicho centro de investigaciones adquiere estos RC en el mercado internacional a precios elevados que encarecen los costos de las investigaciones.

Uno de los países proveedores de estos productos es Holanda, mediante la compañía Duchefa, donde los precios para el 6-BAP por cada frasco de 25 mg es de 107 euros y en el caso de TDZ según la Compañía Sigma Aldrich por cada frasco de 25 mg son 131,50 USD. Precios que en caso de adquirirse por esta última compañía que tiene sede de sus Oficinas Centrales en Misuri, Estados Unidos ascienden grandemente; pues tienen que adquirirse por terceros países por el bloqueo económico a que está sujeto nuestro territorio nacional.

Usualmente para la formación de las yemas adventicias se utiliza el medio de cultivo P4, como se ha mencionado anteriormente que necesita 22,5 mg L^{-1} de 6-BAP, pero la combinación de ambos RC propuestos por la presente investigación no solo reduce la

posibilidad de regenerar plantas fuera de tipo sino también el tiempo de subcultivo así como los costos de las investigaciones.

Por ejemplo, cada 10 L de medio de cultivo de multiplicación se utilizarían de 6-BAP, 225 mg, o sea, 963 euros.

De acuerdo a las combinaciones seleccionadas en este trabajo serían necesarios por cada 10 L 40 mg de 6-BAP y 9,0 mg de TDZ, o sea, 171,20 euros y 47,34 USD, respectivamente para un total de 218,54 CUC (proponiendo una tasa de cambio de uno por uno, de ambas monedas extranjeras al CUC) (Fig. 12).

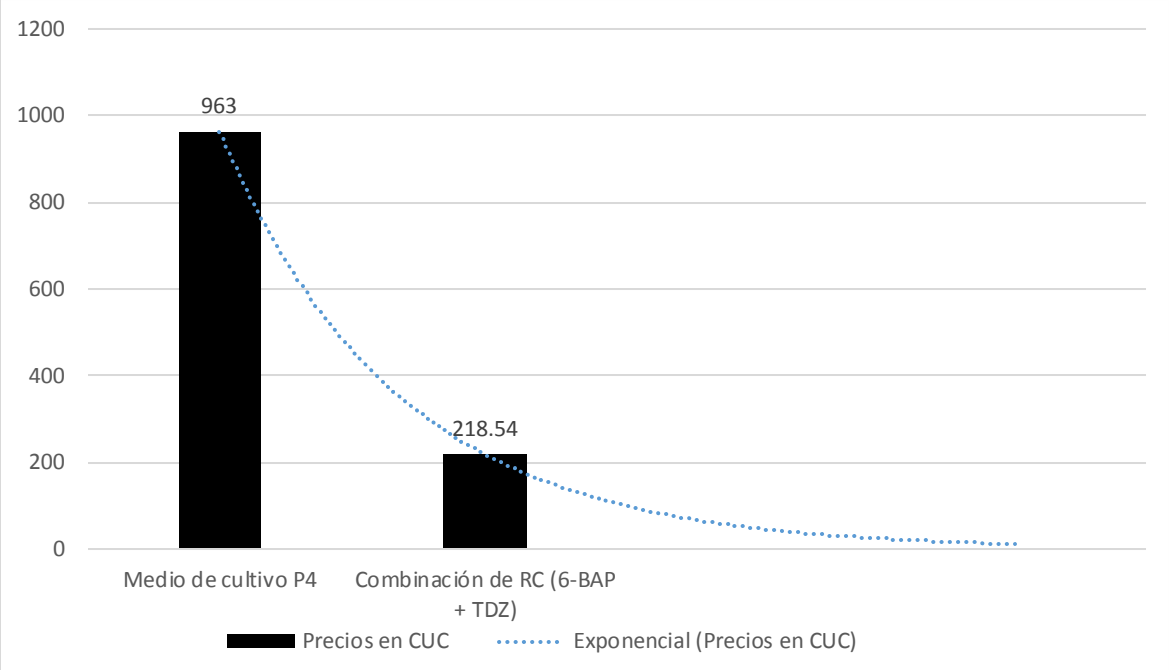


Figura 12. Costos en la realización del medio de cultivo de formación de yemas adventicias en cultivares de *Musa*

De acuerdo a los Lineamiento del Sexto Congreso del PCC que plantean la disminución de las importaciones, la presente investigación logró disminuir los gastos por concepto de compra de estos Reguladores de Crecimiento en un 77, 31% que es lo mismo que 744,46 CUC o 17 867,04 CUP para la formación de yemas adventicias en los cultivares 'Manzano' y 'Gros Michel', cada 10 L de medio de cultivo de formación de yemas adventicias.

6. Conclusiones

1. La mejor combinación de 6-BAP y TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro* de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA), resultó ser 6,0 mg L^{-1} de 6-BAP y 0,8 mg L^{-1} de TDZ y 2,0 mg L^{-1} de 6-BAP y 1,0 mg L^{-1} de TDZ, respectivamente.

2. Se logró la multiplicación y regeneración de yemas adventicias *in vitro* de los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA) con tres y cuatro subcultivos respectivamente.

3. Se comprobó el origen de las yemas adventicias en los cultivares de *Musa* 'Manzano' (AAB) y 'Gros Michel' (AAA).

7. Recomendaciones

1. Estandarizar los protocolos empleados para formar yemas adventicias en otros cultivares de *Musa*.

2. Emplear las yemas adventicias en los programas de mejora genética por biotecnología.

Referencias bibliográficas

Abeyaratne, W. y Lathiff, M. (2002) *In-vitro* propagation of 'Rathambala' (*Musa* AAA) and the occurrence of phenotypic variations in the pseudostem. *Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture (LKA).* 4: 191-197.

Afza, R., Van-Duren, M., Morpurgo, R. y Novak, F. J. (1996) Banana Tissue Culture and Its Prospective Use in the Developing Countries. En: Islam, A. S. (ed.). *Plant Tisuue Culture.* pp. 59-70. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.

Albany, N. (2001) Efecto de retardantes del crecimiento en la micropropagación de bananos en medio de cultivo líquidos en agitador orbital y sistemas de inmersión temporal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba: Universidad Central de Las Villas, pp. 80.

Ali, A., Sajid, A., Naveed, N. H., Majid, A., Saleem, A., Khan, U. A., Jafery, F. I. y Naz, S. (2011) Initiation, Proliferation and Development of Micro-Propagation System for Mass Scale Production of Banana through Meristem Culture. *African Journal of Biotechnology.* 10: 15731-15738.

Álvarez-Acosta, J. M. (2011) Producción mundial de las Musáceas e importancia socioeconómica. En: Álvarez-Acosta, J. M. (ed.). *Compendio de las Musáceas.* pp. 252-262. Quivicán, La Habana: Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova".

Bairu, M., Stirk, W., Doleţal, K. y Staden, J. V. (2008) The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grande naine' (*Musa spp*. AAA). *Plant Cell Tissues and Organ Culture.* 95: 373-379.

Banerjee, N., Vuylsteke, D. y De-Langhe, E. (1986) Meristem tip culture of *Musa*: histomorphological studies of shoot bud proliferation. En: Withers, L. A. y P.G.Alderson (eds.). *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications.* pp. 359-370. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Barranco, L. (2000) Desarrollo de la embriogénesis somática en medios líquidos (*Musa* AAA cv. 'Grande naine'). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba: Universidad Central de Las Villas, pp. 57.

Basil, M., Kosky, R. G., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., García, M., Santos, A., Rayas, A., Ventura, J. C., Bauta, M., Álvarez, M., Paz, E., Beovidez, Y., Albert, J., Ortega, A., Espinosa, A. y García, J. (2007) Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la propagación *in vitro*

del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal.* 7: 53-56.

Belalcázar, S. (1991) *El cultivo del Plátano en el trópico.*Cali, Colombia. Blume: ICA, 247 pp.

Bibadabi, S., Meon, S. y Mahmood, M. (2010) Study of genetic and phenotypic variability among somaclones induced by BAP and TDZ in micropropagated shoot tips of banana (*Musa* spp.) using RAPD markers. *Journal Agriculture Science.* 2: 49-60.

Buah, J., Danso, E., Taah, K., Abole, E., Bediako, E., Asiedu, J. y Baidoo, R. (2010) The effects of different concentration cytokinins on the *in vitro* multiplication of plantain (*Musa* spp.). *Biotechnology.* 9: 343-347.

Cardona, T. C., Yepes, G. G. y Castaño, J. (2000) Severidad de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach) en *Musa balbisiana* (AAB) cv. Dominico artón sometido a irradiación con Co 60 . *INFOMUSA.* 9: 17-19.

Castro, D., Díaz, J. y Montoya, N. (2002) *Propagación clonal de bananos en biorreactores de inmersión temporal. Memorias XV Reunión Internacional ACORBAT.*Medellín, Colombia, 45-48 pp.

Cedeño-García, G., Soplín-Villacorta, H., Helfgott-Lerner, S., Cedeño-García, G. y Sotomayor-Herrera, I. (2016) Aplicación de biorreguladores para la Macropropagación del banano cv. 'Williams' en cámara térmica. *Agronomía Mesoamericana.* 27: 397-408.

Côte, F., Domergue, R., Monmarson, S., Schwendiman, J., Teisson, C. y Escalant, J. (1996) Embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. 'Grande naine'). *Physiology Plant.* 97: 285-290.

Daniels, D. D. (1999) Micropropagación del Clon de Plátano, Híbrido 'FHIA-21' (AAAB) y sus somaclones. Villa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Instituto de Biotecnología de Las Plantas, pp. 64.

Daniell, H., Muthokumar, B. y Lee, S. B. (2001) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet.* 39: 109-116.

Denchev, P., Velcheva, M., Dragijska, R., Kuklin, A. y Atanassov, A. (1990) Somatic embryogenesis in *Medicago. Biotechnology and Biotechnological.* 4: 5-6, 66-70.

Dharaneeswara, D., Suvarna, D. y Muralidhra, D. (2014) Effects of 6-benzyl amino purine (6-BAP) on *in vitro* shoot multiplication of 'Grande naine' (*Musa sp*.). *International Journal Advance Biotechnological Research.* 5: 36-42.

Dhed'a, D., Dumotier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. y De-Langhe, E. (1991) Plant regeneration in cell suspensions cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB gruop). *Fruits.* 46: 125-135.

Duncan, R. (1997) Tissue culture-induced variation and Crop improvement. *Advanced Agronomy*. 58: 201-240.

El-Dougdoug, K. A., El-Harthi, H. M. S., Korkar, H. M. y Taha, R. M. (2007) Detection of somaclonal variations in banana tissue culture using isozyme and DNA fingerprint analysis. *Journal of Applied Sciences Research.* 3: 622-627.

Escalant, J. y Teisson, C. (1989) Somatic embryogenesis and plants form immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports.* 7: 665-668.

Escalant, J., Teisson, C. y Côte, F. (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant.* 30: 181-186.

FAO (2015) Banana market review 2013-2014.

Farahani, F., Aminpoor, H., Sheidai, M., Noormohammadi, Z. y Mazinani, M. (2008) An improved system for *in vitro* propagation of banana (*Musa acuminate L*.) cultivars. *Asian Journal Plant Science.* 7: 116-118.

García, L. R., Pérez, J. P., Bermúdez-Caraballoso, I., Orellana, P., Veitía, N., García, L., Padrón, Y. y Romero, C. (2006) Nuevo protocolo para la rápida inducción de yemas adventicias y la regeneración de plantas en banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). *Biotecnología Vegetal.* 6: 19.

Gómez, R. (1998) Cultivo de Células y Tejidos. En: Pérez-Ponce, J. N. (ed.). *Propagación y Mejora Génetica de Plantas por Biotecnología.* pp. 25-44. Villa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP).

Gómez, R., Posada, L., Gilliard, T., Bernal, F., Reyes, M., Chávez, M. y Quiala, E. (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 68.

Gómez, R. K. (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* Syd) de la caña de azúcar (*Saccharum* sp., híbrido). Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP): Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, pp. 98.

Grapin, A., Schwendiman, J. y Teisson, C. (1996) Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant.* 32: 66-71.

Grapin, A., Ortiz, J., Lescot, T., ferriére, N. y Côte, F. (2000) Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain (*Musa* AAB). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 61: 237-244.

Hanumantharaya, M., Kerutagi, M., Patil, B., Kanamadi, V. y Bankar, B. (2009) Comparative economic analysis of tissue culture banana and sucker propagated banana production in Karnataka. *Karnataka Journal Agriculture Science.* 22: 810-815.

Haruki, S., Sakae, A., Makiko, U., Yuko, M. y Akihiro, N. (2007) Effect of urea-type cytokinins on the adventitious shoots regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Production Science.* 10: 47-56.

Hernández, R. (1997) *Obtención de plantas libres de patógenos. Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas.*Villa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 31-43 pp.

Huang, X., Lu, X., Zhao, J., Chen, J., Dai, X., Xiao, W., Chen, Y., Chen, Y. y Huang, X. (2010) MaSERK1 gene expression associated with somatic embryogenic competence and disease resistance response in banana (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology.* 28: 309-316.

INIBAP (1996) *Musa germoplams management. Anual Report. Networking banana and plantain.*Montpellier. Francia, 54 pp.

INIBAP (2000) International Network for the Improvement of Banana and Plantain.

INIBAP (2001) *Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 2000. International Network for the Improvement of Banana and Plantain.*Montpellier, Francia: Cirad, 48-56 pp.

INIBAP (2003) *Networking Banana and Plantain: INIBAB Annual Report 2002.International Network for the Improvement of Banana and Plantain.*Montpellier, France, 40 pp.

INIBAP (2004) Bananos: alimento y riqueza. Hojas divulgativas.

Jensen, W. (1962) *Botanical histochemistry: priciples and practice.*San Francisco, CA, EE.UU.: W. H. Freeman and Co.

Jiménez, E. (1998) Cultivo de ápices y meristemos. En: Pérez-Ponce, J. N. (ed.). *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología.* pp. 45-56. Villa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP).

Jones, D. R. y Diekmann, M. (2000) Quarantine and the safe movement of *Musa* germoplasma. En: Jones, D. R. (ed.). *Disease of Banana, Abaca and Enset.* pp. 409-423. Wallingford, Oxon, UK. : CAB International.

Kraus, J. y Arduin, M. (1997) Manual básico de métodos em morfología vegetal. *Seropédica: Edur.* 198p.

Krikorian, A. y Scott, M. (1995) Somatic embryogenesis in bananas and plantain (*Musa* clones and species). En: Bajaj, Y. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Protoplasts and Genetic Engineering VI.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Krishnaraj, S. y Vasil, I. (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: Thorpe, T. (ed.). *In vitro embryogenesis in plants.* pp. 417-470. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers.

Langford, E., Abram, B., Daruni, N., Jens, W. y Choochad, S. (2012) Macropropagation of Bananas for Pig Fodder in Northern Thailand. En: *al.,* K. S. *e.* (ed.). *International Scientific Conference on "Sustainable Land Use and Rural Development in Mountain Areas".* pp. 201-202. GER.: University of Hohenheim, Stuttgart.

Lee, S. (2001) *Thidiazuron in the improvement of banana micropropagation. The Second International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. 5-9 Nov.*Taipei, Taiwan, Republica de China, 1-11 pp.

Leela, S., Jaya, R. y Bollama, K. (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp). *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant.* 39: 551-556.

Lescot, T. (2013) World plantain and banana production systems. *Proceedings XX International Meeting ACORBAT. September 9 – 13, 2013, Fortaleza, CE, Brazil.* 26-34.

Lescot, T. (2015) Genetic diversity of banana. Close-up. *FruitRep 231.*

Litz, E. R. y Jarret, R. L. (1991) Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). *In vitro Embryogenesis in plants.* pp. 155-203. Holanda.

López, J. (1999) Genetic improvement of *Musa* spp. by *in vitro* mutational plant breeding. *Infomusa.* 8: 2 - *PROMUSA XV*.

López, J., Montano, N., Swennen, R., Ventura, J., Schoofs, H., Medero, V., García, M., Del-Sol, L. y Cabrera, M. (2000) Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB). *Biotecnologia Vegetal.* 1: 59-62.

López, M. (1989) *El plátano.*La Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación, 210 pp.

Lorenzo, J., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P. y Borroto, C. (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 54: 197-200.

Ma, S. (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops. *Department of Horticulture, National Taiwan University.* 181-188.

Martin, K., Pachathundikandi, S., Zhang, C., Slater, A. y Madassery, J. (2006) RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. 'Grande naine' and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant.* 42: 188-192.

Mok, M., Mok, D., Turner, J. y Mujer, C. (1987) Biological and biochemical effects ofcytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22: 1194-1196

Morton, J. (1987) Banana. En: Morton, J. F. (ed.). *Fruits of warm climates.* pp. 29-46. Miami, FL

Mugo, S., Bunde, A., Korir, M. y Mudaki, J. (2013) Factors influencing tissue culture banana output and its impact on income in Nyamusi division, Nyamira North district, Kenya. *Int. J. Sci. Basic Appl. Res.* 2: 1-24.

Müller, D. y Leyser, O. (2011) Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annual of Botanical.* 107: 1203-1212.

Nahamya, P. (2000) Development of Embryogenic cell suspensions for East African Highland bananas. Kampala, Uganda: Makerere University.

Ngo-Samnick, E. (2011) Improved plantain production. The Pro-Agro collection. Engineers without Borders, Cameroon (ISF Cameroun) and the Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation (CTA), Douala-Bassa, CMR.

Ngomuo, M., Mneney, E. y Ndakidemi, P. A. (2014) The *in vitro* Propagation Techniques for Producing Banana Using Shoot Tip Cultures. *American Journal of Plant Sciences.* 5: 1614-1622.

Novak, F. J., Afza, R., Van-Duren, M. y Omar, M. S. (1990) Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa* cvs.). *Tropical Agriculture (Trinidad).* 67: 21-28.

Okole, B. N. y Schulz, F. A. (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*- resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. *Plant Cell Reports.* 16: 339-343.

Orellana, P. P. (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa spp.* Cuba: Instituto de Biotecnología de Las Plantas, pp. 120.

Pereira, L., Ramírez, C., Pereira, J. y Alvarenga, A. (2001) Efeitos do BAP e do TDZ na produção de mudas de bananeira-'Maçã' através da propagação rápida *in vivo*. *Revista Brasileña Fruticultura.* 23: 230-233.

Peres, L. E. P. y Kerbauy, G. B. (1999) High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lind (Orchidaceae). *Plant Cell Reports.* 18: 1002-1006.

Pérez-Vicente, L., Batlle, A., Fonseca, J. y Montenegro, V. (2004) *Reaction of FHIA hybrids and landraces cultivars to Fusarium wilt caused by Fusarium oxysporum f.sp. cubense. Abstracts of The International Congress on Banana: harnessing research to improve the livelihoods. INIVAP. Penang*

Ploetz, R. (2005) Panama Disease: An Old Nemesis Rears its Ugly Head. Part 1: The Beginnings od the Banana Export Trades: 13 p.

PRO-ECUADOR (2013) *Análisis del sector bananero.*Quito, Ecuador.

Ramírez, D. (1995) Estudio del comportamiento *in vitro* del clon de banano (*Musa* spp) 'FHIA 01' (AAAB). Villa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas, pp. 52.

Riopel, J. y Steeves, T. (1964) Studies on the roots of *Musa acuminata* cv.

Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (1993) Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* pp. 1-18. Cali, Colombia: Publicación CIAT

Roux, N., Dolezel, J., Swennen, R. y Zapata-Arias, F. (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa spp*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 189-197.

Roux, N. (2004) Mutation induction in *Musa*- Review. En: Jain, S. y Swennen, R. (eds.). *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations.* pp. 23-32. Enfield, USA: Science.

Sadik, K., Rubaihayo, P., Magambo, M. y Pillay, M. (2007) Generation of cell suspensions of East African highland bananas through scalps. *African Journal of Biotechnology.* 6: 1352-1357.

Sadik, K. (2013) Enhancement of Somatic Embryogenesis in Recalcitrant East African Highland Bananas. Makerere University.

Sadik, K., Arinaitwe, G., Rubaihayo, P. y Mukasa, S. (2015) TDZ and 4-CPPU Induce Embryogenic Response on Scalps of Recalcitrant East African Highland Banana. *Journal of Agricultural Science;.* 7: 215-222.

Sandoval, J. y Escoute, J. (1996) Aspectos citológios y descripción de una metodología para el conteo de los cromosomas en el género *Musa*. *CORBANA.* 21: 51-56.

Schoofs, H. (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. Leuven, Belgium, pp. 257.

Schoofs, H., Panis, B. y Swennen, R. (1998) Competence of scalps for Somatic Embryogenesis in *Musa*. *Acta Horticulturae.* 490: 475-483.

Shirani, S., Mahdavi, F. y Maziah, M. (2009) Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. *African Journal of Biotechnology.* 8: 5755-5761.

Simmonds, N. (1966) *Bananas. 2 ed.*London: Longmaus Green and Co.Soc. Suppl

Simpson, M. (2006) *Plant Systematics.*Canadá: Academia Press, 590 pp.

Skoog, M. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 54: 118-130.

Strosse, H., Hauwe, I. y Parils, B. (2004) Banana cell and tissue culture-review. En: Jain, S. y Swennen, R. (eds.). *Banana Improvement Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations.* pp. 1-12. Inc, Enfield, NH, USA: Science Publishers.

Strosse, H., Andre, E., Sagi, L., Swennen, R. y Panis, B. (2008) Adventitious shoot formation is not inherent to micropropagation of banana as it is in maize. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 95: 321-332.

Suprasanna, P., Sági, L. y Swennen, R. (2002) Positive selectable marker genes for routine plant tranformation. *In Vitro Cellular and Develpmental Biology Plant.* 38: 125-128.

Valmayor, R. (2008) Classification of the Bananas. III. Critical Notes on Species. cv. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L. *Kew Bulletin.* 2.n.3: 145-153.

Vasane, S., Patil, A. y Kothari, R. (2009) Phenotypic characters of various types identified in laboratory, primary and secondary hardening in tissue cultured banana var. 'Grande naine'. *Indian Journal Biotechnology.* 9: 178-186

Vasil, I. (1985) Somatic embryogenesis and its consequences in the gramineae. En: Henke, R. *et al.* (eds.). *Tissue Culture in Forestry and Agriculture.* pp. 31-48. Plenum, New York.

Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A. (1993) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* pp. 127-141. Cali, Colombia.

Vuylsteke, D., Crouch, J., Pellegrineschi, A. y Thottappilly, G. (1998) The Biotechnology case history for *Musa.* En: Drew, R. (ed.). *Proc. Int. Symp. Biotechnology Tropical and Subtropical Species*: Acta Horticulturae. 461.

Ying-Hua, S., Yu-Bo, L. y Xian-Sheng, Z. (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant.* 4: 616-625.

Zaffari, G. R., Kerbavy, G. B., Kraus, J. E. y Romano, E. C. (2000) Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 63: 187-192.

Ziv, M., Ronen, G. y Raviv, M. (1998) Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large-scale micropropagation of plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 34: 152-158.