

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**



Tesis en opción al Título Académico de Master en Agricultura Sostenible  
Mención Fitotecnia

Aclimatización y evaluación de plantas *in vitro* del cultivar de plátano  
vianda 'INIVIT PV - enano' (*Musa* spp., grupo AAB) en finca de  
producción

José Enrique Pérez Martínez

Santa Clara, 2018



Tesis en opción al Título Académico de Master en Agricultura Sostenible  
Mención Fitotecnia

Aclimatización y evaluación de plantas *in vitro* del cultivar de plátano  
vianda 'INIVIT PV - enano' (*Musa* spp., grupo AAB) en finca de  
producción

Autor: Ing. José Enrique Pérez Martínez

Tutores: Dr. C. Jorge López Torres  
MSc. Aymé Rayas Cabrera

Santa Clara, 2018

*En los pueblos que han de vivir de la agricultura, los Gobiernos tienen el deber de enseñar perfectamente el cultivo de los campos.*

*José Martí*

*A mi madre*

*“El tiempo, el implacable, el que pasó...”, afirmó el compositor en su entrañable letra y al redactar estas líneas las adopto con la salvedad que para mí su transcurso lejos de añoranza se reduce a compartir la sabiduría de buenos compañeros, todos partes indisolubles de los modestos aportes de esta investigación.*

*Al Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) y al Dr. Sergio Rodríguez Morales por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.*

*A mis tutores MSc. Aymé Rayas Cabrera y Dr. Jorge López Torres, por la ayuda incondicional durante toda la realización de esta investigación.*

*Al Dr. Onelio Fundora por la ayuda brindada en el asesoramiento sobre la aplicación de las técnicas estadísticas y la interpretación de los resultados.*

*Al claustro de profesores que impartieron clases durante la maestría.*

*A las técnicas Nery Montano y Damisela Reinaldo por la dedicación y esfuerzo realizado en todo el desarrollo de este trabajo y a todo el colectivo del grupo de Biotecnología del INIVIT por contribuir a la materialización de los resultados, por su preocupación y ayuda constante que han hecho posible los trabajos de investigación.*

*Al Ing. Jorge Maso, por su amabilidad en brindarme su finca para el montaje de los experimentos en campo.*

*A los Doctores Rafael Gómez Kosky y Yoel Beovides por la amable disposición en la revisión del documento.*

*Por último, quiero agradecer a mis padres, hermana y sobrinas por todo el apoyo que supieron darme y en especial a la Ing. Odalys Arcia, por constituir fuente de inspiración para la culminación de la maestría.*

*A todos, muchas gracias*

## **RESUMEN**

El desarrollo agrícola requiere de nuevos enfoques que permitan explicar las posibilidades de resolver las necesidades siempre crecientes de la población; a su vez, que los sistemas que se utilicen sean sostenibles desde el punto de vista productivo, ecológico, económico y que sean socialmente justos. En Cuba, a partir del desarrollo alcanzado en la propagación del plátano por métodos biotecnológicos (organogénesis y embriogénesis somática) y su generalización en las biofábricas, se crean las bases necesarias para que el campesino, tenga acceso directo a los cultivares propagados por estas vías. La investigación se realizó en el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV - enano' (*Musa* spp., grupo AAB) con el objetivo de lograr la aclimatización de plantas *in vitro* en condiciones de finca de producción y determinar mediante evaluaciones morfológicas y agronómicas las variaciones somaclonales que limiten su uso en la propagación. Los resultados alcanzados permitieron la aclimatización de las plantas producidas por métodos biotecnológicos con la participación de la familia campesina en condiciones de fincas de producción. Se utilizó un umbráculo rústico durante las primeras seis semanas y posteriormente fueron colocadas las plantas en bolsas durante cuatro semanas antes de su transferencia a campo. Las evaluaciones en campo mostraron rendimientos superiores al control utilizado (cormos procedentes de campo) y la factibilidad de poder propagar el cultivar objeto de estudios por métodos biotecnológicos, dado el bajo porcentaje de variaciones somaclonales encontradas.

**Índice**

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Generalidades del cultivo.....	4
2.1.1. Origen.....	4
2.1.2. Sistemática y botánica.....	4
2.2. Técnicas de cultivo de tejidos .....	5
2.2.1. Micropropagación .....	5
2.2.2. Variaciones somaclonales en plátanos y bananos .....	17
2.3. El campesino vinculado a la ciencia .....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1. Acclimatización <i>ex vitro</i> de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática en condiciones de finca de producción .....	26
3.2. Evaluación en campo de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática .....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Acclimatización <i>ex vitro</i> de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática en condiciones de finca de producción .....	32
4.2. Evaluación en campo de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática .....	38
5. CONCLUSIONES .....	49
6. RECOMENDACIONES .....	50
7. BIBLIOGRAFÍA .....	51

## **1. INTRODUCCIÓN**

El mundo se enfrenta a una grave crisis alimentaria, reflejada en el sostenido encarecimiento de los productos. De hecho, la población mundial crece vertiginosamente, cada año se agregan 76 millones de personas a la población mundial, y como es obvio, demandarán alimentos que serán cada vez más caros y estarán fuera de su alcance (Castro, 2007).

Por tanto, el desarrollo agrícola requiere de nuevos enfoques, que permitan explicar las posibilidades de resolver las necesidades siempre crecientes de la población; a su vez, que los sistemas que se utilicen sean sostenibles desde el punto de vista productivo, ecológico y económico, y además sean socialmente justos y culturalmente aceptables (Almekinders, 2001). Los enfoques descentralizados y participativos permiten a los agricultores seleccionar y adaptar las tecnologías a las condiciones locales del suelo, precipitación, así como a las condiciones sociales y económicas unido a su conocimiento autóctono (Halewood *et al.*, 2007). La puesta en funcionamiento de programas sociales que involucren el enfrentamiento ambiental y la investigación participativa, desarrolla las condiciones para la integración de la biotecnología con el campesino (Escobar y Roca, 2013).

Los plátanos y bananos (*Musa spp.*) constituyen una fuente importante de alimento para gran parte de la población mundial. En Cuba, su cultivo tiene una alta prioridad en el programa alimentario nacional, debido a sus arraigados hábitos de consumo, alta demanda y su capacidad de producir frutos durante todo el año. Para cumplir con este empeño son utilizadas en el país varias formas para la producción de “semillas”, dentro de ellas: hijos procedentes de campo, el uso de pregerminadores, viveros, Centros de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) (Álvarez, 2011) y a través de métodos biotecnológicos mediante la propagación por organogénesis de los ápices meristemáticos o por embriogénesis somática (Gómez *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de todas estas alternativas para la producción de “semillas”, aún resulta insuficiente el acceso por el campesino de los nuevos cultivares obtenidos en los centros de investigaciones y que son propagados por métodos biotecnológicos, al no disponer de las condiciones más adecuadas para su

transportación, siendo necesario realizar estudios participativos con el campesino que faciliten el acceso de estos materiales desde el laboratorio a la finca de producción mediante su aclimatización, que le permita planificar su siembra de acuerdo a las condiciones creadas, siendo este el problema a resolver.

A partir del desarrollo alcanzado en la propagación del plátano por métodos biotecnológicos y su generalización en las biofábricas cubanas, se crean las bases necesarias para llevar estos resultados directamente al pequeño agricultor. La propagación de los plátanos y bananos mediante la organogénesis, es una de las aplicaciones del cultivo *in vitro* más generalizadas, realizada a través de cinco etapas bien definidas (preparatoria, establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización), la cual es considerada como rutinaria desde hace varios años (Singh *et al.*, 2011).

Por otra parte, en Cuba, la embriogénesis somática es utilizada con fines de producción de “semilla” en dos etapas. La primera es realizada en condiciones de laboratorio de investigación y consiste en el establecimiento y multiplicación de los cultivos embriogénicos hasta la obtención de los embriones somáticos. La segunda etapa consiste en el escalado de los embriones somáticos maduros desde el laboratorio de investigación hasta las biofábricas para continuar su diferenciación en planta a través de la germinación de estos embriones somáticos (emisión de brotes y raíces) y su conversión en plantas en condiciones *ex vitro* (Suarez-Castellá *et al.*, 2012; López *et al.*, 2015).

En ambos métodos de regeneración, la aclimatización de las plantas producidas constituye un periodo crítico, por cuanto en esta etapa es inducida la transferencia del metabolismo mixotrófico al autotrófico, realizándose modificaciones graduales, tales como un progresivo aumento de la irradiación y una gradual disminución de la humedad relativa del aire que permita a la planta tener un mayor control sobre la pérdida y absorción de agua (Preece y Sutter, 1991).

Motivado por lo anterior, se utilizó el cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., grupo AAB), obtenido en el programa de mejoramiento genético del plátano vianda en Cuba.

Tomando en consideración los antecedentes descritos anteriormente, se planteó la hipótesis de trabajo siguiente:

“Es posible implementar la aclimatización de plantas del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV - enano’ (*Musa* spp., grupo AAB) propagado por organogénesis y embriogénesis somática, con la acción participativa del campesino y determinar la presencia de variaciones somaclonales mediante evaluaciones morfológicas y agronómicas del nuevo cultivar.

### **Objetivo general**

Lograr la aclimatización de las plantas producidas *in vitro* del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., grupo AAB), en condiciones de finca de producción y determinar las variaciones somaclonales que limiten su uso en la propagación.

### **Objetivos específicos**

1. Implementar las condiciones para la aclimatización del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV - enano’ (*Musa* spp., grupo AAB) propagado por organogénesis y embriogénesis somática, que garantice la supervivencia de las plantas en condiciones de finca de producción.
2. Caracterizar morfológica y agronómicamente las plantas propagadas por organogénesis y embriogénesis somática en el primer ciclo de cultivo en campo.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Generalidades del cultivo

#### 2.1.1. Origen

La península Malaya en Asia, se ha considerado como probable centro de origen primario del género *Musa*, tanto de *Musa balbisiana* como de *Musa acuminata*, cuyos cruzamientos dieron lugar a todas las variedades comestibles conocidas en América (Robinson y Galán Saúco, 2012).

La distribución de los bananos comestibles fuera de Asia se cree que pudiera haber sido desde Indonesia al océano Índico hasta Madagascar. Posteriormente, se introdujeron al este de África, Zaire y oeste de África, donde obviamente ocurrieron mutaciones que propiciaron un gran número de cultivares. Los portugueses transportaron los bananos del oeste de África hasta Islas Canarias (Robinson y Galán Saúco, 2012).

En cuanto a su introducción en América, el cronista Oviedo sostiene que el plátano fue llevado desde la Gran Canaria a Santo Domingo por Fray de Berlanga en 1516 y de ahí a Cuba (López, 1989).

#### 2.1.2. Sistemática y botánica

Los plátanos y bananos son plantas herbáceas, con un falso tallo que está formado por las vainas de las hojas superpuestas, un cormo y un sistema radical fibroso. Pertenecen al orden *Zingiberales* y a la familia *Musaceae*; ésta a su vez está formada por dos géneros: *Ensete* y *Musa* (Stover y Simmonds, 1987).

Dentro del género *Musa* se encuentran clasificadas cuatro secciones (*Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*), además de los híbridos formados entre especies de este género (*Eumusa* x *Australimusa*) (MusaNet, 2016). La sección *Eumusa* contiene la mayoría de los bananos y plátanos comestibles y se admite que esta serie de poliploides se derivan de las dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, de donde provienen las designaciones AA (*acuminata*), BB (*balbisiana*), ambas con número cromosómico  $2n=22$ . Dentro de su

evolución genética, un paso importante para el surgimiento de los bananos comestibles fue el desarrollo de la partenocarpia, que unido a la esterilidad de las semillas y la selección realizada por el hombre, dieron origen a los cultivares diploides comestibles de *M. acuminata* (AA). Luego, a partir de los cultivares AA, debido a la restitución cromosómica en su meiosis, surgieron los triploides AAA. Del cruzamiento entre los cultivares AA y AAA, con la especie silvestre *M. balbisiana* (BB), surgieron los híbridos AB, AAB, ABB, AAAB y AABB (Osuji, 1997).

## **2.2. Técnicas de cultivo de tejidos**

### **2.2.1. Micropropagación**

La micropropagación es una de las aplicaciones de la biotecnología más generalizadas del cultivo *in vitro*, consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado con el empleo de un medio de cultivo (Olmos *et al.*, 2010). Este procedimiento implica que cada una de las plantas propagadas posea las características similares de la planta donante del explante (George, 2008).

La misma puede ser realizada a partir de órganos, tejidos y células de la planta donadora del explante, mediante los métodos de regeneración de plantas conocidos como organogénesis y embriogénesis somática (George y Debergh, 2008).

#### **2.2.1.1. Métodos de regeneración de plantas *in vitro***

La regeneración de plantas a partir de la organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo una conexión entre los nuevos brotes y el tejido materno. La misma puede ser de forma indirecta (a partir de la formación de un callo) o directa. La organogénesis directa es una tecnología relativamente simple y bien conocida, que se realiza a partir de la multiplicación de yemas, ápices o meristemas, ampliamente utilizada para la propagación comercial, razón por la cual varios autores le han aplicado el término de “micropropagación convencional” (Orellana, 1998). Con el objetivo de incrementar los coeficientes de propagación de los propágulos, son

utilizados los medios de cultivo líquidos, siendo el más empleado en plátanos y bananos el uso de recipientes de inmersión temporal mediante sistemas semiautomáticos (Georgiev *et al.*, 2014). Dentro de ellos se encuentran los diseños de Recipiente de Inmersión Temporal tipo RITA, con la variante comercial de diseño Plantform (Welander *et al.*, 2014), y el Biorreactor de Inmersión Temporal BIT, con su correspondiente versión comercial SETIS (Vervit, 2015).

La regeneración de plantas mediante la embriogénesis somática consiste en la formación de un embrión a partir de una célula o grupo de ellas, que no es producto de la fusión de gametos. Los embriones somáticos asexuales o adventicios son estructuras bipolares con un eje radical–apical que no poseen conexión vascular con el tejido materno y deben ser capaces de crecer y formar plantas normales (Arnold *et al.*, 2002). Este método de regeneración de plantas es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, caracterizado por los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, debido a la naturaleza bipolar del embrión (Preil, 1991) y a la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo. Sin embargo, aun cuando en la literatura científica es citado el desarrollo de la embriogénesis somática en un número relativamente amplio de especies, su aplicación práctica en la propagación de los plátanos y bananos es limitada, debido a los bajos porcentajes de germinación de los embriones somáticos formados, la aparición de plantas fuera de tipo y la escasez de estudios en campo de plantas obtenidas por esta vía (Suárez-Castellá *et al.*, 2012).

#### **2.2.1.1.1. Propagación por organogénesis de los plátanos y bananos**

Los primeros trabajos sobre la propagación por organogénesis de los plátanos y bananos fueron realizados en China y Taiwán en la década de 1970, inicialmente limitados a unos pocos cultivares de *Musa* AAA, fundamentalmente de los tipos Cavendish (Ma y Shii, 1972). Posteriormente, a partir de los años 1980, se llevó a cabo la multiplicación *in vitro* de un amplio grupo de cultivares de *Musa* de diferentes grupos genómicos (Cronauer y Krikorian, 1984).

La propagación de los plátanos y bananos mediante la organogénesis se realiza a través de cinco etapas bien definidas:

**Fase 0 o preparatoria:**

Esta fase incluye la selección de la planta donadora de explantes y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia del establecimiento *in vitro* de los materiales a introducir al laboratorio, la cual tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético. El material vegetal a seleccionar para su propagación *in vitro* debe proceder de plantas con crecimiento vigoroso y en floración (siempre que sea posible con la inflorescencia masculina presente para descartar la posible presencia de enfermedades virales tales como el Bunchy Top [BBTV] y el virus del mosaico de la bráctea [BBrMV]), para garantizar su identidad varietal, además de estar libres de plagas y enfermedades (Vuylsteke, 1989; Israelí *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2011).

Según Orellana (1994), el empleo de brotes procedentes de secciones de rizomas de pregerminadores con sustrato estéril y desinfectados químicamente para el establecimiento *in vitro* de cultivar ‘Gran enano’ favoreció la supervivencia de los ápices y disminuyó notablemente el número de ápices contaminados, además de reducirse el tiempo requerido para su establecimiento.

Resultados similares a los anteriores fueron obtenidos por Cabrera (2012) al utilizar el Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS), durante la fase 0 para la propagación *in vitro* del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV-0630’ (*Musa* spp., grupo AAB). De manera que constituye un requisito indispensable que el material vegetal a utilizar para el establecimiento *in vitro* debe transferirse primeramente a condiciones semicontroladas de casas de cultivo o pregerminadores durante 45-60 días para garantizar la calidad y sanidad de los explantes iniciales que se introducirán al laboratorio.

### **Fase I o de establecimiento:**

El objetivo de esta fase es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos para posteriormente iniciar el proceso de multiplicación. Un aspecto importante a tener en cuenta en esta fase es el tamaño del explante, considerado como un factor crítico en la desinfección, el crecimiento y desarrollo del mismo (George y Debergh, 2008). De manera que a medida que es menor el tamaño del explante inicial utilizado, menor es el riesgo de contaminación, pero más difícil es la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante, es mayor el peligro de contaminación. Israelí *et al.* (1995) consideraron 0,5 cm como el tamaño más apropiado del explante para garantizar un proceso de propagación eficiente. Para el desarrollo de esta fase fueron tomados los materiales provenientes de la fase anterior (Fase 0) y se eliminan las partes más externas del rizoma y las vainas foliares hasta obtener secciones de aproximadamente 6 cm de largo por 4 cm de diámetro que encierren el ápice vegetativo seguido del procedimiento de desinfección de los explantes.

### **Fase II o de multiplicación:**

El objetivo de esta fase es la multiplicación de los propágulos a partir de los ápices vegetativos establecidos *in vitro*, lo cual depende fundamentalmente del genotipo, de la composición del medio de cultivo (principalmente su contenido en citoquininas) y el tamaño del explante inicial (Israelí *et al.*, 1995). Otro aspecto muy importante relacionado con la multiplicación de los explantes está dado por la manipulación de los mismos, sobre lo cual se han descrito varios procedimientos para este cultivo: decapitado de los ápices vegetativos, realización de varios cortes verticales en el domo meristemático, corte vertical del ápice vegetativo en dos o cuatro partes a través del ápice y obtención de ápices vegetativos intactos (Vuylsteke, 1989).

### **Fase III o de enraizamiento:**

Su objetivo es preparar las plantas para su aclimatización posterior. En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen en el laboratorio hasta formar plantas completas con sistema radical para posteriormente ser trasplantadas

a condiciones de invernadero o similares donde se desarrollará su aclimatización (Cronauer y Krikorian, 1984).

**Fase IV o de aclimatización:**

Es la fase final del proceso de propagación *in vitro* y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campo.

Para el éxito de esta fase resulta importante tener en cuenta que durante la permanencia de los materiales en las diferentes etapas de su desarrollo *in vitro*, los mismos son sometidos a un fuerte estrés ambiental, con las consiguientes respuestas fisiológicas a los componentes de los medios de cultivo y a las condiciones ambientales atmosféricamente controladas. Lo cual trae consigo que las plantas propagadas *in vitro* presentan hojas con aspectos anatómicos y fisiológicos distintos de las plantas propagadas de forma convencional, tales como una reducida diferenciación del mesófilo con grandes espacios intercelulares, una cutícula de reducido espesor con menor desarrollo de cera cuticular y estomas voluminosos, de mayor densidad, elevados externamente sobre la epidermis, poco funcionales y con un deficiente mecanismo de apertura y cierre, dando lugar esto a un fenotipo caracterizado por una conformación anatómica de limbos foliares más frágiles que los encontrados en condiciones naturales. Las hojas son también poco eficientes en términos fotosintéticos, y nunca se convertirían en hojas normales, siendo por tanto imperativo que se desarrollen con relativa rapidez nuevas hojas más similares a las emitidas en ambientes naturales. Además, estas plantas tienen una débil conexión vascular entre el sistema radical y la parte aérea, lo que les ocasiona una alta susceptibilidad a la baja humedad relativa durante la fase de aclimatización (Preece y Sutter, 1991).

Luego de este período de tiempo (8 - 10 meses) de intensa actividad metabólica bajo condiciones *in vitro* en ambiente estéril de laboratorio, las plantas deben ser aclimatizadas mediante la regulación de las condiciones ambientales (luz, agua, temperatura, humedad y viento) antes de su transferencia a campo.

Primeramente, se procede a la extracción de las plantas enraizadas que se encuentran en los frascos de laboratorio, las mismas son separadas cuidadosamente del medio de cultivo y se lavan con abundante agua para eliminar residuos del gelificante que se encuentra adherido a las raíces. Como parte de esta misma operación de preparación de las plantas para ser transferidas al sustrato, las mismas son clasificadas por tamaños, se sumergen en una solución fungicida y son plantadas.

El sustrato a utilizar durante la fase de aclimatización de las plantas producidas *in vitro*, según Carrillo (2004) tiene gran importancia en el desarrollo inicial del cultivo ya que el sistema radicular se desarrolla en esta fase. Como la planta proviene de cultivo *in vitro* tiene una gran exigencia nutricional que no será suplida por el sustrato, pero este debe presentar características estructurales y químicas que facilite el desarrollo de la misma.

En la caracterización de los sustratos se suelen distinguir tres tipos de propiedades: físicas, químicas y biológicas; del conocimiento de estas propiedades dependerá el manejo adecuado de fertilización y del riego y por lo tanto, el éxito del cultivo.

Los sustratos deben cumplir determinados requisitos, dentro de los cuales se destacan los siguientes:

- Estabilidad física. No debe perder sus cualidades físicas hasta transcurrido un tiempo razonable. Por ejemplo, que no se apelmace con demasiada rapidez.
- Densidad. El sustrato debe ser ligero para facilitar el manejo y transporte de los contenedores.
- Aireación. Las raíces para desarrollarse necesitan una buena aireación. Cuando se riega, una parte del agua drena dejando un espacio que ocupa el aire. Este espacio debe ser como mínimo un 20% del volumen.
- Acidez. Para la gran mayoría de las plantas el pH óptimo se sitúa entre 5.5 y 6.5.

- Sanidad. Debe estar libre de patógenos de cualquier tipo que puedan dañar las plantas.
- Capacidad de retención de nutrientes. Los nutrientes se aportan generalmente por el agua de riego, el sustrato debe ser capaz de retenerlos. La medida de la capacidad de retención es la Capacidad de Intercambio Iónico, que indica la facilidad con que el sustrato retiene y cede iones. Un sustrato óptimo debe tener entre 15 y 50 meq/100 cm<sup>3</sup>.
- Capacidad de retención de agua. El sustrato debe retener la mayor cantidad de agua posible sin poner en peligro la aireación.
- Mojabilidad. Si se seca el sustrato, este debe ser capaz de volverse a mojar con facilidad. A menudo cuando se utiliza turba deben añadirse otros productos que mejoren su mojabilidad.
- Fertilidad. El sustrato debe disponer de los nutrientes que necesita la planta, aunque estos pueden suministrarse externamente.

Teniendo en cuenta lo anterior Agramonte *et al.* (1998) señalaron como los materiales más apropiados para la preparación de sustratos los siguientes:

### **Turba**

Se utiliza como enmienda orgánica o como sustrato de cultivo. Por las cualidades que éste posee constituye el material base para cualquier sustrato, ya que los vegetales que le dan origen fundamentalmente los musgos del género *Sphagnum*, tienen la propiedad de ser muy higroscópicos aún después de muertos. Poseen una porosidad de llenado de aire entre 10 y 25% y debe mantenerse entre 40 y 45% de capacidad de campo, con un pH entre 5,5 y 6.5.

### **Humus de lombriz**

Es un abono orgánico producido por las deyecciones de las lombrices conocido como Vermicompost, es el abono orgánico más complejo e integral que se conoce, de fácil manejo y obtención, su presencia física es de color negro, similar a la borra

de café, muy liviano e inodoro, posee los nutrientes esenciales para la planta N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mo. Convierte con facilidad el nitrógeno y el fósforo orgánico a formas asimilables. Se emplean en proporciones de 25 a 50%.

### **Compost**

Es el producto de la mezcla de todos los desechos vegetales y estiércol en pilas bien ordenados y almacenados, con el objetivo de que sufran la descomposición microbiana mediante la fermentación, convirtiéndose en un tiempo prudencial en humus, dependiendo esto del grado de descomposición de la materia prima empleada, los microorganismos inoculados y el manejo realizado a las pilas.

### **Zeolita**

Son aluminosilicatos hidratados generalmente sódicos, su estructura es cristalina, semejante a un panal que permite la entrada de iones potasio (K) y amonio ( $\text{NH}_4$ ) que actúan como fertilizantes de lenta liberación, mezcladas con turba pueden alcanzar una capacidad de intercambio catiónico de 250-300 meq/L. Al sustituir en su estructura los átomos de silicio por los de aluminio, quedan cargas negativas que son neutralizadas por la presencia de iones positivos de la disolución del sustrato que entran en su composición.

La zeolita es capaz de retener agua utilizable por la planta lo cual reviste gran importancia ya que se puede reducir el número de riesgos, con el consiguiente ahorro de agua y energía.

Los autores referidos anteriormente señalaron que las proporciones de materiales más apropiadas para a la preparación de los sustratos en nuestras condiciones deben ser zeolita (30%), humus de lombriz (50-70%) y compost (70-100%). En plátanos y bananos se han obtenido buenos resultados con la combinación de 75% de humos de lombriz y 25% de zeolita.

Durante el período de aclimatización se induce la transferencia del metabolismo heterotrófico al autotrófico, donde son realizadas modificaciones graduales mediante un aumento progresivo de la irradiación y una gradual disminución de la humedad

relativa del aire, que permita a la planta tener un mayor control sobre la pérdida y absorción de agua (Scaranari *et al.*, 2009).

La mayoría de las veces que se planifica un área para la aclimatización de plantas *in vitro* se piensa en instalaciones costosas como invernaderos, con o sin control de temperatura, humedad relativa, CO<sub>2</sub>, iluminación, etc. Sin embargo, con excepción de climas extremadamente fuertes, se pueden aclimatizar plantas con instalaciones mucho más sencillas. Para ello debe tenerse en cuenta el tipo de planta que se va a adaptar, con sus requerimientos ambientales y el clima de la zona. Posteriormente se decidirá qué tipo de instalación es la más adecuada para cumplir con estos propósitos. El umbráculo es la instalación más sencilla y de menor costo inicial y de mantenimiento. Para su construcción pueden utilizarse distintos materiales, como tuberías galvanizadas con un tejido de alambres al cual se sujeta la malla plástica de sombreo. Además, para la construcción de instalaciones más rústicas, dependiendo de las disponibilidades locales pueden utilizarse otros materiales como madera o tallos de bambú (Agramonte *et al.*, 1998).

Según Scaranari *et al.* (2009) la aclimatización del banano puede ser dividida en dos fases. En la primera fase, las plantas procedentes del cultivo *in vitro* son transferidas a un ambiente controlado (invernadero) con temperaturas que oscilen entre 20–28°C, humedad relativa del 80–90% y un sombreo del 70% por un periodo de tres a seis semanas.

Posteriormente, transcurrido la primera fase de adaptación climática las plantas pasan a una segunda fase para su endurecimiento, la cuales son colocadas en diferentes contenedores como potes o bolsas, se disminuye el sombreo (50%), aumenta el rango de temperatura (18-34°C) y la humedad relativa es mantenida por el encima del 75% para que se produzca un endurecimiento gradual. Estos mismos autores (Scaranari *et al.*, 2009), señalaron que especial atención para mantener el balance adecuado de temperatura y humedad lo constituye disponer de un sistema de riego que permita no solo la llegada de agua al contenedor donde se encuentran las plantas, sino también que se humedezcan las hojas en momentos de elevada temperatura.

Con relación al sombreado, Marie (1995) obtuvo los mejores resultados para la aclimatación del cultivar 'Gran enano' mediante el uso de un cobertor oscuro (50%) bajo una película de plástico de 100  $\mu\text{m}$  durante la segunda fase, tanto para el verano como la primavera.

Otros autores como Sandoval *et al.* (1991) resumen la aclimatación de los plátanos y bananos como sigue "inicialmente las plantas requieren de una alta humedad relativa y deben colocarse, durante las primeras tres semanas, en un ambiente húmedo y con un 75% de sombra. En estas condiciones la hoja número uno inicia su emergencia ocho días después de realizado el trasplante. El follaje que la planta desarrolla *in vitro* es transicional y las hojas tienden a atrofiarse. El ritmo de emisión foliar es de aproximadamente una hoja cada ocho días. Una práctica que favorece notablemente el desarrollo y la adaptación de las plantas, es la aplicación foliar a los 15 y 30 días después de realizado el trasplante de una solución acuosa preparada con los macro y micronutrientes de Murashige y Skoog. La etapa de adaptación en el invernadero se extiende hasta los 60 días. Una vez transcurrida esta etapa, las plantas pueden trasladarse al lugar definitivo de siembra en el campo.

Varios autores (Vuylsteke, 1989; Daniells y Smith, 1991; Vuylsteke y Talengera, 2015) han considerado las plantas aclimatizadas y aptas para el mercado cuando hayan alcanzado una altura entre 25-30 cm, de cuatro a cinco hojas fotosintéticamente activas, además de ser sometidas a una inspección rigurosa para la eliminación de las plantas débiles y/o fuera de tipo.

#### **2.2.1.1.2. Propagación por embriogénesis somática de plátanos y bananos**

El uso de la embriogénesis somática en cultivares comestibles de plátanos y bananos está basado en las metodologías desarrolladas a partir de los explantes de flores masculinas (Ma, 1991) y meristemos proliferantes (*scalps* en inglés) (Dhed'a *et al.*, 1991). A pesar de su alta capacidad de regeneración a partir de suspensiones celulares embriogénicas, esta vía de regeneración de plantas ha estado dirigida principalmente a complementar el mejoramiento genético de este cultivo por métodos biotecnológicos (a través de la transformación genética) y no a la propagación

comercial del cultivo, debido a los riesgos de variación somaclonal con relación a las plantas propagadas por ápices meristemáticos (Strosse *et al.*, 2003). Otros autores, sin embargo, hacen referencia a su posible aplicación en la propagación masiva (Suárez-Castellá *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2016).

López (2006) desarrolló una metodología para la regeneración de plantas por embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' y posteriormente fue escalada en biofábricas a los cultivares 'CEMSA ¾' e 'INIVIT PV-0630', pertenecientes al mismo grupo genómico. La transferencia fue realizada como con el objetivo de complementar la propagación por organogénesis. La primera etapa del trabajo se realizó en condiciones de laboratorio de investigación donde se establecieron las suspensiones celulares embriogénicas hasta la formación y maduración de los embriones somáticos. Posteriormente los embriones somáticos maduros en condiciones de biofábricas son colocados a germinar hasta lograr su conversión a plantas. En condiciones de producción se demostró la buena estabilidad genética de las plantas regeneradas (1,1% de variación somaclonal) (López *et al.*, 2013). De forma similar la propagación por embriogénesis somática a nivel de biofábricas ha sido posible en otros cultivares de plátanos y bananos como 'Gran Enana', 'Pequeña Enana' (Dwarf Cavendish), 'FHIA 18' y 'FHIA 21' (Gómez *et al.*, 2012; Suárez-Castellá *et al.*, 2012).

La propagación por embriogénesis somática es realizada a través de una serie de fases bien definidas: inducción de la embriogénesis somática, formación de los embriones somáticos, maduración de los embriones somáticos, germinación y regeneración de plantas, las cuales se detallan a continuación:

### **Inducción de la embriogénesis somática**

La inducción de la embriogénesis somática se realiza bajo la exposición del explante inicial a la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), donde se forma un callo no embriogénico, con porciones embriogénicas, las cuales son distribuidas al azar en la superficie del callo no embriogénico.

Luego para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas se logra a partir de embriones somáticos en etapa globular, los cuales son tomados de las porciones embriogénicas del callo, y transferidos a un medio de cultivo líquido en agitación.

### **Formación de los embriones somáticos**

Para inducir la formación de los embriones somáticos, es necesario reducir en el medio de cultivo las concentraciones de auxinas, o usar tipos menos fuertes, e incluso, sin la presencia de estas fitohormonas; especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas (Arnold *et.al.*, 2002). En el caso de los plátanos y bananos son utilizadas dos alternativas de medio de cultivo: semisólido y líquido (López, 2006).

### **Maduración de los embriones somáticos**

La fase de maduración de los embriones somáticos es el período en el desarrollo de los embriones somáticos en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva donde se adquiere tolerancia a la desecación (Arnold *et.al.*, 2002).

### **Germinación y conversión de plantas**

La germinación hace referencia al desarrollo de raíces y brotes, mientras la conversión es la supervivencia de éstos propágulos en condiciones *ex vitro* (Stuart y Strickland, 1984). La misma es realizada en medios de cultivo semisólido y en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA<sup>®</sup> o Botellones (Nalgen), de 10 L siendo estos últimos donde mayor eficiencia se ha alcanzado durante la germinación de los embriones somáticos de plátanos y bananos (Gómez *et. al.*, 2002; López, 2006). Trascurrido un mes durante la germinación de los embriones somáticos, los mismos son transferidos a la fase de aclimatización para lograr la conversión a plantas.

Las condiciones y requisitos para lograr las plantas aptas para ser llevadas a campo son las descritas para la fase IV de la propagación por organogénesis.

La aplicación de la metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en cultivares de plátano vianda, que utiliza como explante inicial ápices de brotes de yemas axilares posibilitó obtener las plantas de 12 a 14 meses (López, 2006).

### **2.2.2. Variaciones somaclonales en plátanos y bananos**

El término de variación somaclonal fue introducido por Larkin y Scowcroft (1981), para describir la variación genética en plantas regeneradas de cualquier tipo de cultivo celular.

En la estabilidad genética de las plantas procedentes del cultivo *in vitro*, varios factores pueden influir. Dentro de éstos se encuentran: la variabilidad genética del cultivar o genotipo que va a ser propagado, la composición del medio de cultivo, la elección del explante que se utilizará, así como el grado de diferenciación de sus tejidos y el tiempo de permanencia *in vitro* del cultivo (Martin *et al.*, 2006).

Las variaciones somaclonales más observadas en los plátanos y bananos han sido: cambios en altura, color, follaje, morfología del pseudotallo y los órganos reproductivos. De las citadas anteriormente (variaciones), las más comunes descritas para la fase de aclimatización han sido: mosaico y variegaciones, hojas estrechas y deformadas, hojas de tipo coriáceo, pérdida del pigmento rojo antociánico de las hojas y mutante enano (Israelí *et al.*, 1995; Daniells y Smith, 1991; Sandoval *et al.*, 1997; Daniells *et al.*, 1999).

Vuylsteke *et al.* (1991) y Dhed'a *et al.* (1991), fueron los primeros autores en hacer referencia a la variación somaclonal de las plantas del género *Musa* regeneradas a partir de suspensiones celulares.

Las variaciones que afectan la altura, se presentan con mayor frecuencia en el banano en un rango de 85-90% (Daniells *et al.*, 1999). La variación de la inflorescencia relacionada con la forma y tamaño de la fruta son frecuentes en los bananos del sub grupo Cavendish, mientras que la variación de la morfología del racimo predomina en los cultivares de plátanos de acuerdo con el grado de degeneración de la inflorescencia (Vuylsteke, 2001).

Según González (1995) en condiciones de producción del cultivar 'Gran enano' (AAA), del 75-80% del total de la variabilidad ocurrida han sido plantas enanas, 10% de plantas más altas tipo "Valery" y afectación en el limbo 10%.

Por otra parte, Reuveni e Israeli (1990) señalaron otras variantes somaclonales que incluyen hojas variegadas, láminas distorsionadas, florecimiento retardado, forma alterada del racimo y hábito de crecimiento con hojas caídas, plantas gigantes (anomalía foliar, caracterizada por hojas con bordes lobulados y presencia de manchas de tamaño irregular en ambos lados de la hoja distribuidas por todo el follaje. Otra variante llamada "Grele" se caracteriza por la presencia de plantas de estatura reducida con un pseudotallo delgado (Sandoval *et al.*, 1997).

En el caso de las plantas regeneradas vía embriogénesis somática del cultivar de 'Grande Naine' (AAA), Israeli *et al.* (1995), observaron que las variantes más frecuentes fueron el enanismo y el tipo mosaico.

Otros autores como Sandoval *et al.* (1997), después de realizar un estudio comparativo de la tasa de multiplicación *in vitro* de variantes enanas con plantas sin variación observaron que la proporción de variantes enanas aumentó con el número de subcultivos en los bananos micropropagados.

López (2006) al evaluar el cultivar 'Navolean' (AAB), regenerado por embriogénesis somática informó que del total de variantes somaclonales observadas durante el primer ciclo de evaluación en campos sólo se observó en el segundo ciclo de cultivo la regresión al plátano tipo *French*. Al respecto, Vuylsteke (2001), señaló que este tipo de variante somaclonal de inflorescencia se mantiene estable en los plátanos viandas, lo cual sugiere que esta variación es de origen genético.

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

A su vez Gómez *et al.* (2006), en un estudio realizado en campo de plantas del cultivar híbrido de banano 'FHIA-18' regeneradas a partir de embriones somáticos

multiplicados en biorreactores, observaron que las variaciones observadas (cambios de coloración del pseudotallo, enanismo y diferencias de pigmentación de las hojas) durante el primer ciclo del cultivo, se debieron a cambios epigenéticos; permaneciendo solo las plantas con crecimiento retardado durante el segundo ciclo de la plantación.

La caracterización morfológica es la herramienta básica para la correcta identificación y caracterización de cualquier cultivar. Siendo esta precisa y cualitativa para una planta que se desarrolla en condiciones óptimas donde son expresadas sus características (MusaNet, 2016).

La caracterización morfoagronómica se ha utilizado en el monitoreo de la estabilidad genética entre plantas procedentes del cultivo de tejidos, especialmente en plantas regeneradas a partir de brotes axilares (organogénesis), por ser el método de propagación *in vitro* más utilizado (Sandoval *et al.*, 1997).

### **2.3. El campesino vinculado a la ciencia**

En los tiempos que median entre los descubrimientos propiamente científicos y sus aplicaciones tecnológicas se acortan progresivamente hasta el punto de que en muchos casos se pierde la frontera entre investigación fundamental y aplicada. Por otra parte, los focos de las sucesivas revoluciones científico-técnicas, por la naturaleza de sus respectivos objetos, tienen impactos sociales y económicos mayores y más directos. La primera revolución científico-técnica fue sobre la materia, la segunda sobre la energía y la tercera y actual tiene como centros la cibernética, las telecomunicaciones, la biotecnología y la ingeniería genética, elementos todos que modifican y continuarán haciéndolo mucho más las relaciones sociales (Fernández, 2005).

De una parte, el auge y desarrollo alcanzado por estos grandes acontecimientos científicos y la necesidad urgente de alimentos para la humanidad, en un mundo que se enfrenta a grandes retos imperado por el cambio climático que intensiva la sequía, la salinidad de los suelos, desertificación etc.; la agricultura familiar campesina, juega

un papel esencial tanto en la producción de alimentos como en el mantenimiento de las economías rurales y en la custodia de la biodiversidad.

Sin embargo, según Halewood *et al.* (2007) señala que en el ámbito internacional por diversas razones que escapan a su control, muchas de estas familias productoras, viven en condiciones de pobreza, se encuentran en desventaja y no tienen suficiente acceso a recursos y apoyo. Dentro de este contexto es importante señalar que la agricultura orgánica o ecológica, así como otros modelos agroecológicos, ofrecen soluciones a muchos de los desafíos que enfrentan las familias campesinas.

En el caso del campesinado cubano las plantaciones de plátanos y bananos son sustentadas mediante el uso de “semillas” obtenidas tradicionalmente mediante la extracción de hijos provenientes de plantas en producción con el riesgo implícito de contraer plagas y enfermedades asociado a los bajos rendimientos agrícolas.

Según Sonnino y Ruane (2010) las tecnologías tienen que ser apropiadas, accesibles y adaptadas a las necesidades locales de los agricultores pobres. Incluso con los niveles actuales de tecnología. Todo lo cual hace que sea necesaria la adopción *in situ* de un sistema agrícola adaptado a las familias campesinas, basado en su conocimiento y capacidad para asimilar las nuevas tecnologías y que funcione con insumos locales (Wigboldus *et al.*, 2016).

El uso de plantas propagadas por métodos biotecnológicos ha propiciado incrementos económicos al comparar el material de plantación procedente de campo. Con relación a lo anterior López *et al.* (2013) señalaron que el comportamiento de los indicadores económicos en una hectárea del cultivar ‘CEMSA ¾’, perteneciente al grupo AAB, plantado en la Cooperativa Cuba –Viet Nam, de la provincia de Villa Clara logró la mayor ganancia neta (\$ 22 294.00 CUP) cuando se utilizó el material de plantación proveniente de la embriogénesis somática, superando en \$ 62.00 CUP al material de plantación proveniente de organogénesis (meristemas apicales) y en \$ 7 585.00 CUP al material de plantación de yemas de cormos provenientes del campo.

De manera que la aplicación del cultivo de tejidos puede auxiliar a los agricultores a lograr la transición de subsistencia a generar ganancias, para lo cual es necesario incorporar nuevas alternativas para la adquisición de semillas que posean mayor calidad, que puedan complementar la propagación tradicional en el campo para poder minimizar el riesgo intrínseco de contraer y propagar plagas y enfermedades al cultivo por los métodos tradicionales de propagación (Lule *et al.*, 2013). Además de posibilitar la incorporación de nuevos cultivares de recién obtención e introducción en la producción (Halewood *et al.*, 2007).

Las plantas producidas por cultivo de tejidos son fundamentalmente libres de plagas y enfermedades (con unas pocas excepciones). Dentro de sus múltiples beneficios se encuentran la producción de plantas más vigorosas, de mayor crecimiento y rendimiento en menor periodo de tiempo comparado con el método de propagación tradicional. La posibilidad de disponer de plantaciones más uniformes garantiza poder hacer una mejor planificación para su comercialización, además de ofrecer una rápida propagación y distribución del material de plantación (Robinson y Galán-Saúco, 2012).

El traslado de las plantas aclimatizadas desde su lugar de obtención hasta su destino final es realizado por varios tipos de transportación, las cuales (las plantas) son colocadas en bolsas de polietileno de diferentes tamaños, lo cual ha provocado pérdidas debido fundamentalmente a la rotura de las bolsas, excesivo viento durante su traslado y otras condiciones inapropiadas durante la transportación. Todo lo cual ha conllevado a instituciones científicas y el campesino a buscar alternativas de acción participativa para la adopción de las plantas propagadas de plátanos y bananos por cultivo de tejidos en su finca de producción que pueda contribuir a la producción sostenible de este cultivo por el campesino (Lule *et al.*, 2013).

Los conocimientos alcanzados en el cultivo de los plátanos y bananos y el uso de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación masiva de plantas han permitido disponer en Cuba de una red nacional de biofábricas dedicadas a la producción de semillas. No obstante, a la eficiencia alcanzada durante el manejo de las etapas *in vitro* (establecimiento, multiplicación y enraizamiento) aún persisten las pérdidas

ocasionadas en la etapa de aclimatización de las plantas, unido, a las pérdidas ocasionadas durante el traslado de las plantas al destino final de la producción.

Todo lo cual hace que sea necesario realizar estudios de forma participativa que faciliten la aclimatización de las plantas con la intervención del campesino en su finca. Incentivar su escalado al campesino con recursos propios y aprovechar sus conocimientos adquiridos durante varias generaciones de apego a la tierra, a su cultura y tradiciones. Unido a lo anterior aprovechar la experiencia del campesino en la validación de nuevos cultivares de plátano obtenidos y propagados por métodos biotecnológicos, motivado por la buena estabilidad genética de las plantas propagadas por estos métodos (López *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006; García-Águila *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2010).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) y la finca “La Fortaleza”, perteneciente a la Cooperativa de Créditos y Servicios (CCS) “Quintín Bandera”, ambos ubicados en Santo Domingo, en la provincia Villa Clara, durante el período comprendido entre enero de 2014 y diciembre del 2016.

Se utilizó el cultivar de plátano ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., grupo AAB) (Gaceta oficial de la República de Cuba, 2017) procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT, el cual pertenece al grupo AAB, subgrupo *Plantain*, denominado en Cuba como plátano macho o vianda (López, 1989). La planta se caracteriza por tener porte bajo, con una longitud del pseudotallo entre 165 y 200 cm, con pseudotallo de forma cónico y de color verde. Los racimos poseen de cinco a seis manos, que llegan a tener 45 dedos por racimo como promedio con peso aproximado de 15 kg, tipo *pseudo-horn*. Susceptible a la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) (González, 2012).

Luego de discutir sobre la temática a desarrollar y sus posibilidades de aplicación, se definió como colectivo de trabajo los miembros de una familia campesina en estrecha vinculación con profesionales y técnicos vinculados al proyecto.

#### **Procedimientos generales**

#### **Propagación *in vitro* del cultivar ‘INIVIT PV - enano’ (*Musa* spp, grupo AAB) como material de plantación**

Con el objetivo de disponer la cantidad necesaria de “semilla” para el montaje del experimento en campo se multiplicó el cultivar objeto de estudio mediante la propagación por organogénesis y embriogénesis somática.

El establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos se realizó a partir de plantas en floración, previamente seleccionadas, con buen estado fitosanitario. Se seleccionaron hijuelos tipo “espada”, con una altura entre 25 y 30 cm, los cuales se plantaron en el Centro de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS) donde se

desarrolló la Fase 0 de la micropropagación. Las atenciones culturales durante esta etapa se realizaron según el protocolo desarrollado para la propagación del plátano en los CRAS, detalladas en el Instructivo Técnico para la producción de semillas de viandas (Rodríguez *et al.*, 2012).

Transcurridos 45 días en las condiciones anteriores, se establecieron los ápices *in vitro* según la metodología descrita por López (2006), para ambos métodos de regeneración de plantas,. La mitad de los materiales establecidos fueron propagados por organogénesis durante 10 subcultivos y la otra parte de los mismos se utilizaron para la propagación por embriogénesis somática (Figura 1 y Tabla 1).

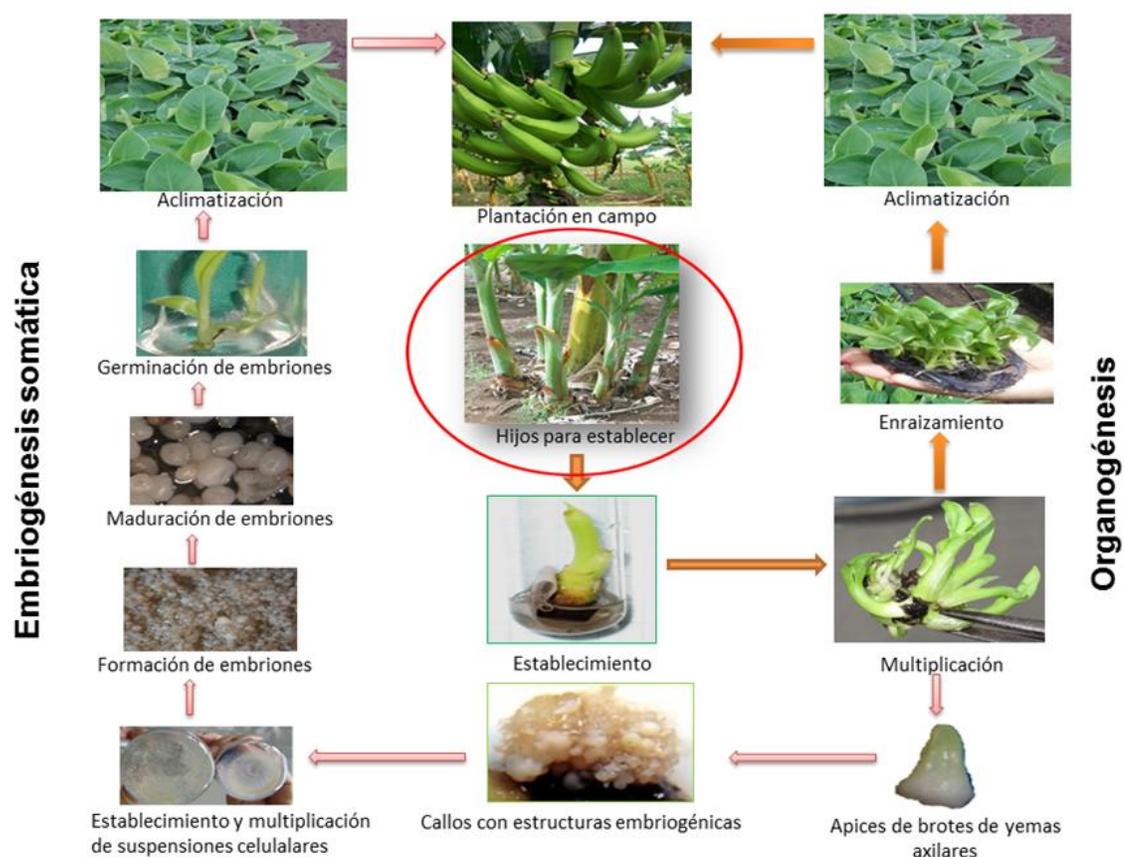


Figura 1. Metodología aplicada para la regeneración de plantas por organogénesis y embriogénesis somática, en el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV - enano' (*Musa* spp., grupo AAB) según López *et al.* (2013).

Tabla 1 Composición de los medios de cultivos utilizados en cada etapa de la propagación *in vitro* (mg.L<sup>-1</sup>) del cultivar 'INIVIT PV- enano' (*Musa spp*, grupo AAB) Según López (2006).

Elementos	Organogénesis			Embriogénesis somática			
	Establecimiento <i>in vitro</i>	Multiplicación P5-02*	Enraizamiento	C y S	FE	ME	GE
Macro elementos	MS	MS	MS	½MS	½MS	MS	MS
Micro elementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Acido ascórbico	10	10	10	10	10	10	10
Myo- inositol	100	100	100	100	100	100	100
AIA	0,88	0,18	-	-	-	-	2
BAP	1,13	2,25	-	-	-	-	0,5
AIB	-	-	0,1	-	-	-	-
Ancymidol	-	0,2-0,4	-	-	-	-	-
2,4-D	-	-	-	1	-	-	-
Zeatina**	-	-	-	0,22	-	0,22	-
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g	30g	45 g	30 g
Gelrite***	2,3 g	2,3 g	2,3 g	2,3 g	2,3 g	2,3g	2,3g

pH 5,7

**Leyenda:**

C y S. Callos y Suspensiones celulares

FE. Formación de embriones

ME. Maduración de embriones

GE. Germinación de embriones

MS Murashige y Skoog (1962)

*Reguladores del crecimiento:*

AIA. Ácido indol acético BAP. 6-Bencilaminopurina

AIB. Ácido indol butírico 2,4D. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

\*Añadir adicionalmente ancymidol (fase preparativa para inducir la embriogénesis somática)

\*\*Esterilizar por filtración, (0,22µ)

\*\*\* No incluir para el medio de suspensiones celulares

### **3.1. Aclimatización *ex vitro* de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática en condiciones de finca de producción**

A partir de los embriones somáticos y plantas producidas por organogénesis se obtuvo el material vegetal necesario para su evaluación durante la fase de aclimatización y campo (Figura 2).



Figura 2. Embriones somáticos (izquierda) y plantas regeneradas por organogénesis (derecha) utilizadas para el montaje de los experimentos del cultivar de plátano vianda 'INIVIT- PV enano' (*Musa* spp., grupo AAB).

Con el objetivo de lograr la aclimatización *ex vitro* de las plantas procedentes del cultivo de tejidos (organogénesis y embriogénesis somática) en condiciones de finca de producción, a partir de las condiciones locales existentes, se utilizó un umbráculo

rústico utilizado para el establecimiento de semilleros de hortalizas en la CCS “Quintín Bandera” referida anteriormente (Figura 3), según el manual para la aclimatización de plantas de plátanos y bananos obtenidas *in vitro* (IBP, 2013) (Figura 4).



Figura 3. Umbráculo rústico utilizado en la finca de producción para la aclimatización de las plantas producidas *in vitro* por organogénesis y embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., grupo AAB).



Figura 4. Plantación de las plantas producidas por organogénesis y embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., grupo AAB) para su aclimatización *ex vitro*.

El mismo, fue cubierto completamente hasta el suelo con una malla antiáfidos y protegido parcialmente por una cerca de Escandón a uno de los lados y a lo largo del umbráculo.

Durante el período de aclimatización, el experimento consistió en el manejo del cobertor del umbráculo (malla antiáfidos) combinado con el tipo y frecuencia del riego. El tiempo total para la aclimatización fue de 10 semanas (Tabla 2).

Tabla 2. Manejo para la aclimatización del cultivar ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., grupo AAB) en umbráculo rustico perteneciente a la CCS “Quintín Bandera” del municipio de Santo Domingo.

Cantidad de semanas	Uso del cobertor	Riegos diarios	Tipo de riego
3	Umbráculo cubierto con malla antiáfidos doble	3	Regadera
2	Umbráculo cubierto con malla antiáfidos sencilla	3	Regadera
1	Umbráculo descubierto de malla antiáfidos	3	Regadera
4	Transferencia de las plantas a bolsas de polietileno fuera del umbráculo	3	Manguera

Dentro del umbráculo fueron colocadas bandejas de plástico de 28 alvéolos, donde se plantaron las plantas a un centímetro de profundidad, en un sustrato constituido por compost, según Agramonte *et al.* (1998). Posteriormente las plantas fueron colocadas en bolsas de polietileno negro (55 cm de diámetro x 32 cm de alto) con el sustrato constituido por 70% de suelo y 30% de compost durante cuatro semanas antes de su transferencia a campo.

Se utilizaron 1000 plantas procedentes de cada tipo de método de propagación *in vitro* utilizado (organogénesis y embriogénesis somática). Las plantas utilizadas de ambos métodos de regeneración de plantas tuvieron una altura de 3-5 cm con 2-4 hojas, según lo indicado por varios autores como requisitos de buena calidad para la aclimatización de plátanos y bananos propagados *in vitro* (Vuylsteke, 1989; Robinson y Galán-Saúco, 2009; IBP, 2013).

A las dos semanas de realizada la plantación se evaluó la supervivencia de toda la población y a las 10 semanas (antes de la transferencia a campo de las plantas *in vitro*) se evaluaron variables morfológicas (50 plantas) de cada procedencia y los

cambios fenotípicos de toda la población según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997) para el género *Musa*.

- Variaciones somaclonales observadas:
  - Cambio de coloración en las hojas y el pseudotallo
  - Hojas deformadas
  - Hojas coriáceas
  - Plantas enanas
- Variaciones morfológicas evaluadas:
  - Altura de la planta (cm)
  - Diámetro del pseudotallo (cm)
  - Número de hojas

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba T Studen con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .

### **3.2. Evaluación en campo de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática**

Con el objetivo de evaluar la variabilidad fenotípica que se podría producir mediante la propagación por el cultivo *in vitro*, en condiciones de finca de producción se plantaron en el campo todas las plantas procedentes de la regeneración por embriogénesis somática y de la regeneración por organogénesis, en comparación con la propagación convencional (cormos) como control del experimento, durante su primer ciclo del cultivo en campo.

Los cormos utilizados como control de la propagación convencional fueron de calibre B, los cuales tenían un peso entre 1,81 - 2,72 kg y se mondaron de forma ligero con machetín para evitar daños excesivos, según recomendaciones técnicas (Rodríguez *et al.*, 2012).

La plantación se realizó en un suelo Pardo mullido medianamente lavado (Hernández *et al.*, 2015). Se utilizó una distancia de plantación de 3,60 x 1,20 m. Las atenciones

culturales se realizaron según el Instructivo Técnico para el cultivo del plátano (INIVIT, 2007).

Se evaluó el porcentaje de variaciones somaclonales a los seis meses de la plantación y en el momento de la cosecha, según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997).

- Cambio de coloración en las hojas y el pseudotallo
- Hojas deformadas
- Pseudotallos finos
- Variaciones del racimo en el momento de la cosecha

En el momento de la cosecha fueron evaluadas las variables morfológicas y agronómicas siguientes:

➤ Variables morfológicas evaluadas en el momento de la cosecha:

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

➤ Variables agronómicas evaluadas en el momento de la cosecha:

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

Se utilizó un diseño experimental en bloques al azar con tres replicas.

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aclimatización *ex vitro* de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática en condiciones de finca de producción

Independientemente a las condiciones rústicas y de bajos insumos en la finca de producción para la aclimatización de plantas, la estrategia implementada por la familia campesina permitió que las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (organogénesis y embriogénesis somática) tuvieran una buena adaptación climática a las condiciones *ex vitro*.

Durante esta fase las atenciones culturales realizadas fueron encaminadas a producir un cambio gradual en las plántulas, de manera que las mismas puedan sobrevivir en las condiciones actuales de aclimatización debido a la intensa actividad metabólica bajo las condiciones *in vitro* antes de su trasplante.

Sin menospreciar la importancia de los procedimientos de aclimatización *in vitro* y el valor incalculable que éstos pueden tener para lograr plantas de mayor calidad y disminuir los costos, hay que decir que la aclimatización *ex vitro* sigue siendo una etapa necesaria en cualquier protocolo de micropropagación.

Transcurridas dos semanas de adaptación climática el porcentaje de supervivencia de las plantas regeneradas por organogénesis fue de 94,2% y de 92,6% en las plantas regeneradas por embriogénesis somática. Los resultados alcanzados en este indicador permitieron continuar los estudios sobre la aclimatización de las plantas en las condiciones de trabajo descritas anteriormente, al obtener porcentajes de supervivencia por encima del 90% (IBP, 2013).

La desecación de las plántulas, debido a la pérdida de agua foliar y restringida toma de la misma por la incapacidad de las raíces en los primeros momentos, es la principal causa de la muerte de las mismas en condiciones *ex vitro*. Durante el proceso de aclimatización la humedad relativa, la luz y la temperatura son los factores ambientales que más afectan la supervivencia y la fotosíntesis neta de las plántulas (Preece y Sutter, 1991)

La luz es uno de los factores que influyen en la fase de aclimatización. El control de la intensidad lumínica es importante ya que las plantas provienen de un ambiente con baja intensidad y se transfieren a uno con alta intensidad, lo cual puede causar quemaduras severas del follaje.

Para atenuar el efecto de la luz se emplean mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombreo durante las primeras semanas. Posteriormente, estas se retiran gradualmente, hasta que las plantas son expuestas al mayor nivel de luz posible, lo cual facilita su posterior adaptación a condiciones de campo (Agramonte *et al.*, 1998).

Las condiciones creadas en el umbráculo con el manejo del cobertor utilizado, posibilitaron un aumento gradual de la luz solar a medida que transcurrieron los días para su aclimatización, lo cual se logró disminuyendo en el tiempo el número de capas utilizadas durante el periodo de aclimatización en el umbráculo rústico.

Según el Instructivo técnico “Fase de Aclimatización de Bananos y Viandas” editado por la dirección de Agricultura (MINAG, 2018) la intensidad de la luz durante la aclimatización debe ser regulada, en las dos primeras semanas a partir de la siembra, es aconsejable una reducción de la luz solar hasta un 30%; entre los 15 y 30 días posteriores, la intensidad puede alcanzar el 70% y a partir de los 30 días ya pueden recibir la luz solar directa en especies de ciclo en adaptación de 30 a 45 días. En sentido general se le puede retirar el cobertor o sarán 15 días antes de la salida a campo abierto si contamos con túneles o casas de cultivo.

Las áreas que tienen las Biofábricas para aclimatizar en estos momentos son umbráculos, que no permiten la regulación de la intensidad luminosa, por lo que empleamos sarán que proporciona 70% de sombra con 30% de luz, esto hace que las plantas al llegar a las condiciones de campo abierto sufran más e incluso si el riego no es muy eficiente tengan un porcentaje de pérdida en el trasplante que no debe exceder nunca del 10% y sea necesario en ocasiones la resiembra en campo.

Por otra parte, como las plantas provenientes del cultivo *in vitro* no son capaces de regular su economía hídrica, éstas deben mantenerse en condiciones de alta

humedad relativa en el período inicial de aclimatización, lo cual se logró además con la frecuencia y tipo de riego utilizado por la familia campesina, hasta lograr disminuir la humedad relativa gradualmente hasta alcanzar los niveles del ambiente externo.

Durante el desarrollo de esta etapa no se observaron plantas con cambios fenotípicos en ambos métodos de regeneración de plantas utilizados por cultivo de tejidos. Con relación a esto Sandoval *et al.* (1997), señalaron que en esta fase solamente se puede detectar alrededor de un 60% de variantes somaclonales, o sea, que no quiere decir que no hayan estado presentes, lo que hace necesario continuar las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar su ciclo de desarrollo.

Côte *et al.* (2000), durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cultivar 'Grande Naine' (AAA), observaron hojas variegadas (0,5-1,3%) y plantas con hojas dobles que constituyeron el 0,5 - 2,0% de la población.

López *et al.* (2005), al evaluar la presencia de variantes somaclonales durante la aclimatización de embriones somáticos del cultivar de plátano vianda 'Navolean' (*Musa* AAB) utilizando como explante inicial ápices meristemáticos de brotes de yemas axilares y multiyemas (*scalps*), obtuvieron una variación somaclonal correspondiente a manchas irregulares de las hojas (variegadas), cuyos porcentajes fueron 0,4 y 0,5% respectivamente.

Posteriormente, Gómez *et al.* (2006), durante un estudio comparativo en casa de cultivo de plantas del cultivar híbrido de banano 'FHIA-18' (AAAB), obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis describieron un 0,4% de plantas con hojas variegadas en las plantas de embriones somáticos regeneradas en biorreactores y 0,3% en las obtenidas de brotes axilares.

Orellana *et al.* (2010) en una población de 13 000 plantas del cultivar 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) obtenidas mediante embriogénesis somática evaluadas en la fase de aclimatización solo encontraron 0,1% de cambios fenotípicos distribuidos en plantas con hojas variegadas (0,02%), plantas en forma de abanico (0,06 %) y plantas coriáceas (0.01%).

García-Águila (2011), observó en la fase de aclimatización el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' regenerado por embriogénesis somática, variantes somaclonales correspondientes a plantas con hojas variegadas, plantas con hojas dobles y cambio en el hábito de crecimiento (abanico). La incidencia de los diferentes tipos de cambios fenotípicos anteriores representó el 0,19% de las plantas regeneradas por embriogénesis somática y el 0,50% de las plantas obtenidas por organogénesis según la misma autora.

Vizcaíno (2012), al evaluar los cambios fenotípicos de plantas propagadas por embriogénesis somática y organogénesis del cultivar de plátano 'INIVIT PV - 0630' grupo AAB), observó en ambos sistemas de regeneración de plantas solo 1% de plantas atípicas, entre ellas plantas con cambio de coloración en las hojas y plantas con hojas coriáceas.

Transcurridos seis semanas de adaptación climática en el umbráculo (Figura 5) las plantas fueron trasplantadas a bolsas de polietileno (Figura 6).



Figura 5. Plantas del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV – enano' (*Musa* spp., AAB) durante seis semanas en el umbráculo, antes de su transferencia a bolsas.



Figura 6. Transferencia de las plantas del cultivar de plátano vianda ‘INIVIT PV – enano’ (*Musa* spp., AAB) del umbráculo a bolsas durante cuatro semanas.

A las 10 semanas en esta fase y previo a su trasplante a las condiciones de campo, con relación a las variables medidas (altura de la planta, número de hojas y diámetro del pseudotallo) solo hubo diferencias estadísticas significativas en la altura de la planta a favor de las plantas regeneradas por embriogénesis somática (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis del cultivar de plátano vianda INIVIT PV - enano' (*Musa* spp., grupo AAB) a las 10 semanas de aclimatización *ex vitro*.

Método de regeneración utilizado	Altura planta (cm)	No. de hojas	Diámetro Pseudotallo (cm)
Embriogénesis somática	17,0 a*	4,7	1,1
Organogénesis	15,0 b	5,0	1,0

\*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de T-Student para  $p \leq 0,05$  (n=50)

Resultados similares fueron obtenidos por Gómez *et al.* (2006), al evaluar plantas propagadas por ápices meristemáticos (organogénesis) y embriogénesis somática del cultivar híbrido 'FHIA-18' referente a la altura de la planta, donde resultó significativamente superior esta variable en las plantas propagadas por embriogénesis somática con relación a las plantas propagadas por organogénesis.

Según los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas por varios investigadores (Gómez *et al.*, 2006; López, 2006) sobre las diferentes variables evaluadas durante la fase de aclimatización de las plantas regeneradas por métodos biotecnológicos de diferentes cultivares de *Musa*, se ha demostrado que resulta indispensable continuar con estos estudios hasta la fase de campo para poder estimar la frecuencia de variantes somaclonales de las plantas regeneradas por métodos biotecnológicos.

Con relación al uso de plantas procedentes de la propagación por métodos biotecnológicos por los campesinos, Escobar *et al.* (2002) establecieron un laboratorio piloto rural para la producción de material de siembra de los agricultores en la zona del departamento del Cauca (Colombia) con el objetivo de desarrollar e implementar con los agricultores una técnica *in vitro*, simple, eficiente y de bajo costo para la propagación de cultivares de yuca de importancia.

En el cultivo de los plátanos y bananos las iniciativas anteriores han estado dirigidas a la aclimatización de las plantas en zonas campesinas. Lule *et al.* (2013) elaboraron un manual para la aclimatización de plantas de bananos producidas *in vitro* en condiciones de campesinos para la aclimatización de plantas de bananos producidas *in vitro*.

Dubois *et al.* (2015), en un estudio realizado en diferentes sitios (Burundi, Kenya y Uganda) para la aclimatización de plantas de bananos producidos *in vitro*, concluyeron que la tecnología de cultivo de tejido es especialmente importante para las familias campesinas ubicadas en áreas con restricciones de producción de plátanos y bananos, así como áreas situadas de los grandes mercados.

Wong *et al.* (2015), en estudio realizado para la aclimatización del cultivar 'Berangan' (AAA) por campesinos, señalaron que los mismos prefirieron las plantas procedentes del laboratorio que tenían una altura entre 10 - 15 cm, las que tuvieron mejor desarrollo en relación a altura entre 15 – 25 cm también empleada. No obstante, a lo anterior, estos autores concluyeron que ambas plantas con diferentes alturas estuvieron listas para su trasplante a bolsa en los primeros 36 días.

Los resultados alcanzados en este experimento demostraron la factibilidad de poder realizar la aclimatización de las plantas obtenidas por métodos biotecnológicos (organogénesis y embriogénesis somática) en el cultivar objeto de estudio en las condiciones de la finca de producción del campesino, motivado además por el interés de este en su empeño de llevar al surco lo que mejor se va a comportar en su suelo y le genere ganancias para su economía familiar.

#### **4.2. Evaluación en campo de las plantas regeneradas por organogénesis y embriogénesis somática**

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en campo se pudo apreciar el buen vigor de la plantación y las características morfológicas que identifican al cultivar objeto de estudio (González, 2012).

Las observaciones fenotípicas realizadas a los seis meses de la plantación permitieron determinar algunos cambios morfológicos entre las plantas regeneradas

*in vitro* con relación al control utilizado de cormos. De manera que la frecuencia total de variación somaclonal en las plantas procedentes de organogénesis fue de 0,21% y de en las plantas regeneradas por embriones somáticos 0,54% (Tabla 4).

Tabla 4. Variantes fenotípicas observadas en las plantas propagadas por embriogénesis somática, organogénesis y cormo durante el primer ciclo vegetativo en campo del cultivar de plátano vianda 'INIVIT - PV enano' (*Musa* spp., grupo AAB).

Tipos de variantes (%)	Organogénesis		Embriogénesis somática		Campo	
	Cant	%	Cant	%	Cant	%
Cambio de color pseudotallo	2	0,21	3	0,32	0	0
Pseudotallo finos	0	0	2	0,22	0	0
Cambios totales	2	0,21	5	0,54	0	0

Las plantas con la presencia del pseudotallo fino (Figura 7) se caracterizaron por un desarrollo inferior y alargamiento del ciclo de producción con relación al resto de la población



Figura 7. Planta con pseudotallo fino procedente de embriones somático del cultivar de plátano vianda 'INIVIT - PV enano' (*Musa* spp., grupo AAB), durante el primer ciclo de cultivo en campo (420 días).

Los estudios disponibles en la literatura científica sobre la evaluación en campo de plátanos y bananos propagados por métodos biotecnológicos indican que es posible su propagación *in vitro*. Al respecto Côte *et al.* (2000) no observaron cambios fenotípicos durante la evaluación de 500 plantas de 'Grande Naine' (*Musa* AAA) obtenidas a partir de suspensiones celulares embriogénicas con similar respuesta agronómica a las plantas propagadas por organogénesis.

Se observaron cambios fenotípicos en las plantas propagadas *in vitro*, tal como se ha descrito, los cuales han sido relacionados con el genotipo, explante inicial y las

condiciones de cultivo *in vitro* (Reuveni e Israeli, 1990). Por otra parte, Gómez *et al.* (2006) encontraron 1,0% de plantas con retardo del crecimiento (enanos) en 1 500 plantas del cultivar híbrido 'FHIA-18' regeneradas de embriones somáticos cultivados en biorreactores.

López (2006), durante la evaluación en campo de 1000 plantas del cultivar 'Navolean' (*Musa* ABB) al utilizar el mismo explante utilizado para inducir la embriogénesis somática que en la presente investigación (ápices de brotes de yemas axilares) obtuvo una variación somaclonal de 1,1%.

Otros autores, cuando evaluaron la presencia de cambios fenotípicos en campo en un mayor número de plantas de diferentes cultivares de plátanos y bananos obtenidas mediante embriogénesis somática, también encontraron bajos los porcentajes de plantas con cambios fenotípicos. Por ejemplo, García-Aguila *et al.* (2007) en la evaluación de 6252 plantas durante un ciclo de cultivo en campo del cultivar híbrido 'FHIA-21' (*Musa* spp., grupo AAAB) encontraron solo una variación de 0,015% y Orellana *et al.* (2010) al evaluar 6720 plantas del cultivar 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) durante dos ciclos en campo, informaron 0,34% de variabilidad observada. Esto mismos autores señalaron que en el segundo ciclo en campo de los cultivares referidos anteriormente las únicas variaciones que permanecieron fueron las referidas al porte bajo de la planta y menor circunferencia del pseudotallo en las mismas plantas detectadas en el primer ciclo.

También Vizcaíno (2012), en el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV - 0630' (*Musa* spp., grupo AAB) y durante el primer ciclo vegetativo en campo al estudiar la presencia de variantes fenotípicas en plantas regeneradas por embriogénesis somática y organogénesis en comparación con plantas propagadas por cormos encontró 0,7% de variaciones en las plantas propagadas por embriones somáticos, 0,9% para las plantas propagadas por organogénesis y 0,1% en el control de cormos procedentes de campo.

Al evaluar en el momento de la cosecha (Tabla 5) el diámetro del pseudotallo de las plantas procedentes de embriones somáticos se observó que alcanzaron el mayor valor (44,21 cm), las cuales se diferenciaron estadísticamente con las plantas

provenientes de organogénesis (43,12 cm) y estas a su vez con las procedentes de campo que alcanzaron el menor valor (39,96 cm). Con relación a la altura de la planta y el número de hojas activas correspondientes a las plantas procedentes de embriones somáticos (265,02 cm de altura y 11,06 hojas) y organogénesis (264,56 cm de altura y 10,96 hojas) no hubo diferencia significativa entre estas y sí con relación a las plantas procedentes de campo donde se obtuvieron los valores más bajos (249,75 cm de altura y 9,33 hojas).

Tabla 5. Características morfológicas de las plantas procedentes de embriogénesis somática, organogénesis y cormos del cultivar de plátano vianda 'INIVIT - PV enano' (*Musa* spp., grupo AAB), durante el primer ciclo de cultivo en campo (420 días).

Procedencia	Altura (cm)	Diámetro pseudotallo (cm)	Hojas activas
Embriogénesis somática	265,02 a	44,21 a	11,06 a
Organogénesis	264,56 a	43,12 b	10,96 a
Cormos	249,75 b	39,96 c	9,33 b

\*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$  n= 48

Gómez *et al.* (2006), al evaluar la altura en plantas propagadas por ápices meristemáticos (organogénesis) y embriogénesis somática del cultivar híbrido 'FHIA-18' en condiciones de campo no encontraron diferencias significativas en ambas poblaciones.

Por otra parte Orellana *et al.* (2010), cuando evaluaron plantas del cultivar 'Cavendish enano' (*Musa* spp., grupo AAA) en condiciones de campo y procedentes de embriones somáticos y cormos, afirmaron que las evaluaciones en las variables cuantitativas relacionadas con el rendimiento, durante el primer ciclo, al comparar los dos métodos de propagación, mostraron que las plantas obtenidas por embriogénesis somática no difirieron significativamente tampoco en la altura de la planta pero sí en el resto de las variables donde mostraron valores superiores, incluyendo un mayor peso del racimo. Luego en el segundo ciclo de cultivo en campo

encontraron diferencias significativas en la altura de la planta y se mantuvo la superioridad de las plantas obtenidas por embriogénesis somática, respecto a las de cormo en todas las variables evaluadas, con excepción el número de dedos de la primera mano que no difirió entre las dos poblaciones.

Los resultados anteriores, mostraron que las plantas procedentes de embriogénesis somática y organogénesis tuvieron un mejor desarrollo con respecto a las plantas procedentes de cormos

En cuanto a las variables de producción como componente principal del rendimiento (Tabla 6) se observó la misma tendencia cuando se evaluó las variables vegetativas anteriores. En todas las evaluaciones realizadas en plantas provenientes de la propagación por métodos biotecnológicos (Figura 8) éstas superaron las plantas procedentes del método de propagación por cormos con diferencias estadísticas significativas.

Tabla 6. Características agronómicas evaluadas en las plantas procedentes de embriogénesis somática, organogénesis y cormos del cultivar. 'INIVIT - PV enano' durante el primer ciclo de cultivo en campo (420 días).

Procedencia	Peso racimo (kg)	Número de manos	Número de dedos
Embriogénesis somática	12,04a	7,04a	45,58 a
Organogénesis	11,86 a	6,58 b	45,52 a
Cormos	10,01 b	6,04 c	39,88 b

\*Medias con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$  (n=48)

Al evaluar el peso del racimo de las plantas regeneradas por embriones somáticos no difirieron estadísticamente (12,04 kg) con relación a las plantas regeneradas por organogénesis (11,86 kg). En el caso del número de dedos no se obtuvo diferencias estadísticas significativas entre ambos métodos de regeneración de plantas por biotecnológicos y si difirieron estadísticamente con las plantas procedentes de campo.



Figura 8. Cultivar de plátano vianda ‘INIVIT- PV enano’ (*Musa* spp., grupo AAB) propagado por embriogénesis somática en la finca de producción.

En el caso del número de manos fue superior en las plantas procedentes de la embriogénesis somática (7,04) con diferencias estadísticas significativas de las plantas regeneradas por organogénesis (6,58) y campo (6,04) donde se obtuvieron los valores más bajos.

Al evaluar las variables agronómicas se observó un incremento a favor de las plantas procedentes de métodos biotecnológicos, probablemente esto está relacionado por el rejuvenecimiento fisiológico *in vitro* que se produce al perder el tejido la señal que poseía de la planta madre, siendo esta pérdida más rápida a medida que el explante sea más pequeño, esto se manifiesta con un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas (Pérez, 1998). Lo cual ha sido muy observado en plátanos y bananos por varios autores (Sandoval *et al.*, 1991).

García-Águila (2007) señaló que la evaluación de los caracteres agronómicos en las plantas del cultivar híbrido 'FHIA 21' (peso de los racimos, número de manos y número de frutos) no mostraron diferencias estadísticas entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (embriogénesis somática y organogénesis), pero sí con respecto a las plantas procedentes de semilla asexual (cormos). Sin embargo, estos mismos autores señalaron que el mayor número de hojas funcionales, en el momento de la cosecha, se presentó en las plantas obtenidas de embriones somáticos.

López (2006) al evaluar en campo plantas propagadas por embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' *Musa* spp., grupo AAB, luego de dos ciclos de cosecha demostró que del total de variantes somaclonales observadas durante el primer ciclo de evaluación en campo, sólo se observó en el segundo ciclo de cultivo la regresión al plátano tipo French. Con relación a esto, Vuylsteke (2001), señaló que este tipo de variante somaclonal de inflorescencia se mantiene estable en los plátanos viandas, lo cual sugiere que esta variación es de origen genético. Por el contrario, las variaciones con hojas variegadas o con limbos deformados tienden a retroceder en su segundo ciclo de cultivo y hasta en el primero (Israelí *et al.*, 1995).

Las evaluaciones realizadas durante todo el ciclo de cultivo demostraron que se puede propagar el cultivar objeto de estudio por métodos biotecnológicos por no ser significativo el porcentaje de variantes somaclonales.

Por otra parte, este cultivar mantuvo las características fenotípicas descritas por sus obtentores (Tabla 7).

Tabla 7. Descriptores esenciales para la caracterización del cultivar 'INIVIT PV – enano.

No.	Descriptor
<i>Descriptores de la planta</i>	
Hábito foliar:	Normal
Altura:	1,60 m – 2,0 m
Perímetro:	0,40 - 0,50 m
Color del pseudotallo:	Verde
Número de hijos:	más de 4
Manchas en los hijos:	Sin manchas
<i>Hojas</i>	
Número de hojas en floración:	12
Número de hojas en cosecha:	7
Longitud del pecíolo:	40 cm
Longitud de la hoja:	≤ 170 cm
Ancho de la hoja:	71-80 cm
Color de las hojas:	Verde
Aspecto de la cara superior:	Brillante
Canal de la III hoja:	Estrecho con márgenes erectos
<i>Inflorescencia</i>	
Posición del racimo:	Formando un ángulo de 45°
Forma del racimo:	Cónico
Apariencia del racimo:	Compacto
Frutos:	Uniseriados
Tipo de raquis:	Ausente
<i>Frutos</i>	
Posición de los frutos:	Curvos hacia arriba
Forma del ápice:	Puntiagudo
Número de frutos / racimo:	45-50 frutos
Longitud del fruto:	± 25 cm
Grosor de los frutos:	± 15 cm
Color de la cáscara:	Verde
Color de la cáscara madura:	Amarillo vivo
Sabor:	Astringente y dulce

---

De manera que ha sido de consenso entre los productores de plátanos y bananos los criterios de Stover (1987) al considerar comercialmente aceptable hasta un 5,0% de variantes somaclonales en plantas propagadas por organogénesis.

Resultados más resientes obtenidos por Nandhakumar *et al.* (2017), al estudiar la estabilidad genética de las plantas regeneradas por embriogénesis somática en comparación con las plantas producidas mediante la propagación tradicional por cormos, de los cultivares 'Rasthali' *Musa* spp., grupo AAB, Silk) y 'Gran enano' (*Musa* spp., grupo AAA) demostraron mediante marcadores genéticos (*ISSR*) que en los cultivares estudiados por estos autores es posible la obtención de plantas genéticamente estables mediante el uso del sistema de regeneración de plantas por embriogénesis utilizado. Los resultados alcanzados en la presente investigación demostraron que es posible lograr la aclimatización de las plantas propagadas por métodos biotecnológicos en condiciones de finca de producción con la participación de la familia campesina, además del uso por los campesinos del cultivar objeto de estudio dado el bajo porcentaje de variaciones fenotípicas observadas. Todo lo cual evidencia la factibilidad de poder utilizar el esquema de trabajo desarrollado (Figura 9) como una alternativa para mitigar el cuello de botella en la cadena productiva de este cultivo.

Según Altieri *et al.* (1912) una estrategia para lograr una productividad agrícola sustentable tendrá que hacer mucho más que simplemente modificar las técnicas tradicionales. Una estrategia exitosa será el resultado de enfoques novedosos para diseñar agroecosistemas que integren el manejo con la base de recursos regionales y que operen dentro del marco existente de condiciones ambientales y socioeconómicas. Por otra parte una agricultura sustentable se logra al restituir la diversidad agrícola, siendo un problema crítico en la agricultura moderna la pérdida de biodiversidad, la que llega a su máximo en forma de monocultivos agrícolas.

Basado en lo anterior la posibilidad que le ofrece al campesino conocer y explotar otra forma de asimilar la producción de semillas en la finca le provee a este los conocimientos necesarios para no solo incrementar los rendimientos sino para

ampliar la estructura clonal de los cultivos a través de la introducción de nuevos cultivares obtenidos en el país.

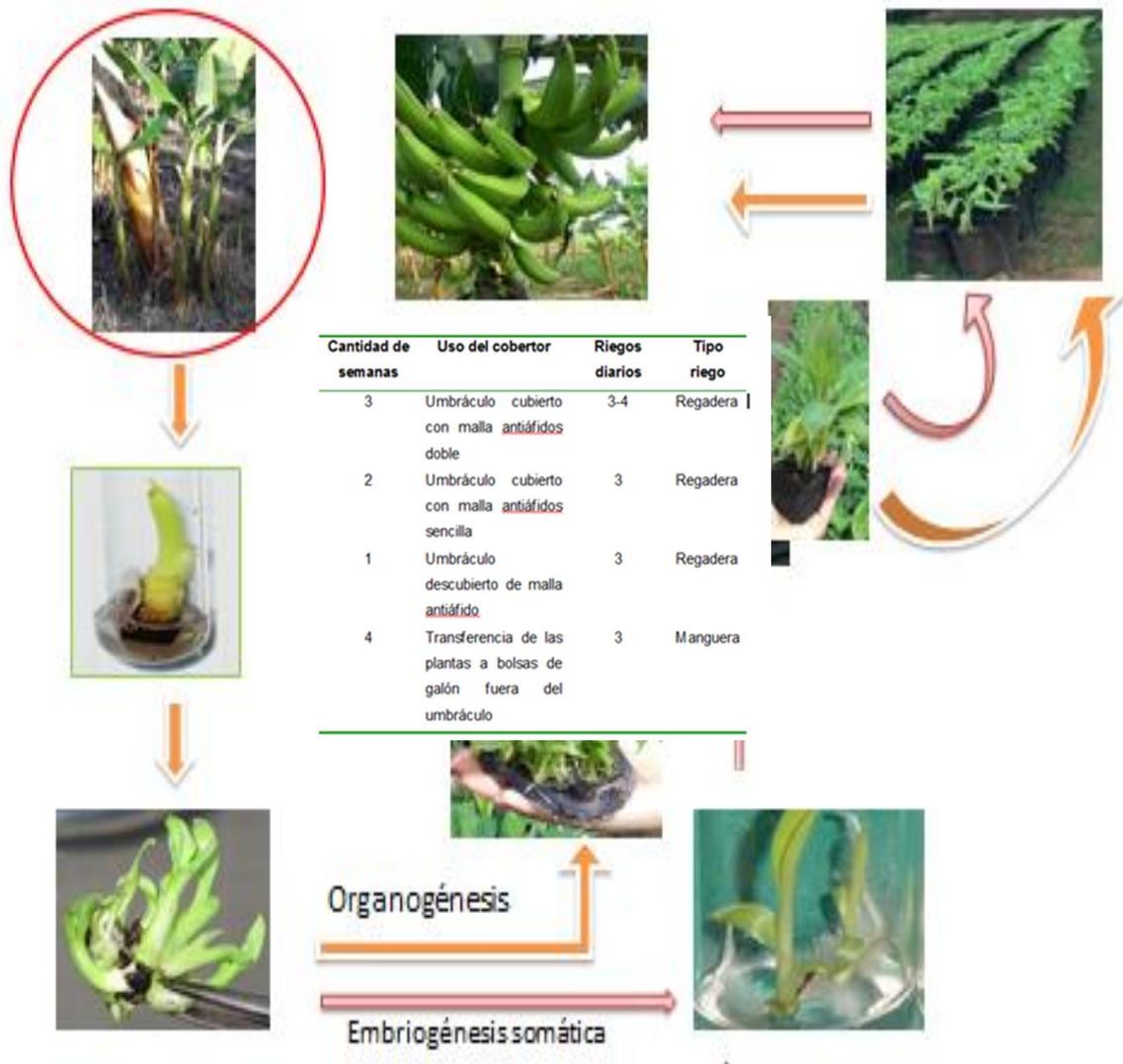


Figura 9. Metodología desarrollada para el uso del material de plantación procedente del laboratorio a la finca de producción del cultivar de plátano vianda 'INIVIT- PV enano' *Musa* spp., grupo AAB).

## **5. CONCLUSIONES**

1. Se logró la aclimatización *ex vitro* de las plantas producidas *in vitro* por métodos biotecnológicos con la participación de la familia campesina en condiciones de fincas de producción.
2. Las evaluaciones realizadas en condiciones de campo demostraron la factibilidad de poder propagar por métodos biotecnológicos el cultivar de plátano vianda 'INIVIT- PV enano' (*Musa* spp., grupo AAB) debido al incremento de los rendimientos alcanzados y bajo porcentaje de variaciones fenotípicas.
3. Se estableció una metodología de trabajo que permitió el uso de las plantas producidas *in vitro* directamente desde el laboratorio a la finca del campesino.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Emplear la metodología de trabajo desarrollada con el campesino para el uso del material de plantación de plátano procedente del laboratorio a la finca de producción.
2. Motivar la incorporación de la familia campesina a la aclimatización de plantas producidas *in vitro* en condiciones de finca de producción.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D.; F. Jiménez y M.A. Dita. (1998). Aclimatización. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez JN (ed). IBP, Santa Clara, pp 193-206.
- Almekinders, C. (2001). Management of Crop Genetic Diversity at Community Level. Conceptual elements for support. *Managing Agrobiodiversity in rural areas*, Eschborn. pp 9-15.
- Altieri, M.; Funes-Monzote, F.R.; Petersen, P. 2012. Agroecologically efficient agricultural systems for smallholder farmers: contributions to food sovereignty. *Agron. Sustain. Dev.* (2012) 32:1–13.
- Arnold, S.; I. Sabala; P. Bozhkov; J. Dyachok and L. Filonova. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 233–249.
- Álvarez, J. M. (2011). Compendio de las Musáceas. La Habana: Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”. ISBN 978-959-7111-57-3. 271 p.
- Cabrera, K. (2012). Propagación del cultivar de plátano ‘INIVIT PV - 0630’ (AAB) en la Biofábrica de Cienfuegos. Tesis en opción de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Cienfuegos. Facultad de Agronomía. Cuba, 59 p
- Carrillo Villatoro, M. A. (2004). Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatación *in vitro*-plantas de banano (*Musa* spp.) en la fase de vivero, bajo condiciones de sombreador. Tesis en opción de Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos De Guatemala. Facultad de Agronomía Instituto de Investigaciones Agrícolas. Guatemala, 69 p
- Castro, F. (2007). Reflexiones de Fidel. Se intensifica el debate. 9 de mayo. 70 p
- Côte, F.; M. Folliot; R. Domergue and C. Dubois. (2000). Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). *Euphytica* 112: 245-251.

- Cronauer, S.S. and A.D. Krikorian. (1984). Somatic embryos from cultured tissue of triploid plantains (*Musa ABB*). *Plant Cell Reports* 2: 289-291.
- Daniells, J.W. and M. Smith. (1991). Post-flask management of tissue-cultured bananas. *ACIAR Technical Reports* 18. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. 8 p.
- Daniells, J.W.; M.K. Smith and S.D Hamill. (1999). Banana off types: An illustrated guide. Queensland Department Primary Industries, Brisbane, Australia. 23 p.
- Dhed'a, D. ; F. Dumortier ; B. Panis ; D. Vuylsteke and E. De Langhe. (1991). Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Escobar, R. H.; C.M. Hernández; J.M. Restrepo; G.I. Ospina; J. Tohme y W.M. Roca. (2002). Desarrollo participativo de un sistema de propagación *in vitro*, a bajo costo. CIAT, Cali; Colombia Poster. 1 p.
- Escobar, R.H.; J. Restrepo; J. Tohme and W.M. Roca. (2013). Use of Tissue Culture in Cassava for Rural households in Colombia En: *Biotechnologies at work for smallholders: Case studies from developing countries in crops, livestock and fish*. Ruane J, Dargie J.D, Mba C, Boettcher P, Makkar H.P.S, Bartley D.M and Sonnino A. (eds.). FAO. Roma, pp 56- 62.
- Fernández, A. (2005). La innovación, una herramienta para el desarrollo sostenible. Retos y perspectivas ante la globalización neoliberal. [www.ciget.pinar.cu/Revista/No.2005-1/innovacion.htm](http://www.ciget.pinar.cu/Revista/No.2005-1/innovacion.htm).
- Gaceta Oficial de la República de Cuba. (2017). Lista Oficial de Variedades Comerciales. <http://www.gacetaofical.cu/> 45 p.
- García-Águila, L.; M. León; R.G. Kosky; P. Orellana y R. González. (2007). Evaluación en campo de la estabilidad genética en plantas obtenidas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA 21' (*Musa AAAB*). *Biología Vegetal* 7(3): 143 – 147.

- García-Águila, L. (2011). Embriogénesis somática del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) en medios de cultivo líquidos, caracterización del proceso embriogénico Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Cuba; 100 p.
- George, E.F. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture: The components of Culture Media. 2<sup>nd</sup> Edition. Great Britain: *Exegetics Ltda.*, 574 p.
- George, E.F. and P. C. Debergh. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En: Plant Propagation by Tissue Culture. Chapter 2 3<sup>rd</sup>. Edition. Volume 1. The Background. George, E.F.; M.A. Hall; G-J. De Klerk. (Eds). Springer: 29-64
- Georgiev, V.; A. Schumann; A. Pavlov and T. Bley. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621.
- Gómez, R.; M. de Feria; L. Posada; T. Gilliard; F. Bernal; M. Reyes; M. Chávez and E. Quiala. (2002). Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21–26, 2002.
- Gómez, R.; L. A. Barranco; B. Chong; D. Daniels; M. Reyes and M. De Feria. (2006). Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. *Euphytica* 150: 63–68
- Gómez, R.; M. Suárez; B. Chong; L. García; M. Reyes; Z. Zarría; M. González; P. Orellana; M. León; R. Triana; Z. Pérez; B. Pérez y A. Rodríguez. (2012). Propagación vía embriogénesis somática de bananos y plátanos empleando inflorescencias masculinas. Premio Academia de Ciencias de Cuba. 10 p.
- González, C. (1995). Evaluación, detección y métodos de control de variación somaclonal en el clon Gran Enano (*Musa* spp.) (AAA). Tesis en Opción del grado de Master en Ciencias. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas (UCLV). 90 p.

- González, L. (2012). Clon de plátano vianda 'INIVIT PV - enano'. Registro de Variedades Comerciales No. 10/2012. Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Ministerio de la Agricultura, Cuba. 11 p.
- Halewood, M.; P. Deupmann; B. Sthapit; R. Vernooy and S. Ceccarelli. (2007). Participatory plant breeding to promote *Farmers' Rights*. *Bioversity International*, Rome, Italy. 7 p.
- Hernández, A.; J.M. Pérez; D. Bosch y N. Castro. (2015). Clasificación de los suelos de Cuba edit. Ediciones INCA, Mayabeque, Cuba, 93 p. ISBN 978-959-7023-77-7.
- IBP. (2013). Aclimatización de plantas de plátanos y bananos obtenidas *in vitro*. Instructivos técnicos No. 001-2013 6 p.
- INIVIT. (2007). Instructivo técnico del cultivo del plátano. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. Biblioteca ACTAF, primera edición. 21 p
- Israelí, Y.; E. Lahav and O. Reuveni. (1995). *In-vitro* culture of bananas. In: *Bananas and Plantains*. Gowen, S. (ed.) Chapman and Hall, London (UK): 147-178.
- Larkin, P. and W. Scowcroft. (1981). Somaclonal variation: A novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. *Theoretical Applied Genetic* 60: 197-214.
- López, M. (1989). El plátano. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 210 p.
- López, J.; R. Gómez; H. Toledo; B. Chong; N. Montano y A. Rayas. (2005). Estudio en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir del explante de yemas brotadas en el cultivar 'Navolean' (AAB). *Biotecnología Vegetal* 5(1): 60-64.
- López, J. (2006). Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'Navolean' (*Musa* spp., Grupo AAB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba; 100 p.

- López, J.; N. Montano; D. Reinaldo; A. Rayas; V. Medero and A. Santos. (2013). Somatic embryogenesis for the production of plantain planting materials in Cuba. En: *Biotechnologies at work for smallholders: Case studies from developing countries in crops, livestock and fish*. J. Ruane; J.D. Dargie; C. Mba P. Boettcher; Makkar, H.P.S., Bartley D.M, and Sonnino, A. (Eds.). FAO. Roma: pp 47-55.
- López, J.; R. Gómez; B. Chong; A. Rayas; V. Medero; A. Santos; M. Basail y Y. Beovides. (2015). Impacto de la embriogénesis somática en la propagación de plantas y el mejoramiento genético de plátanos tipo vianda (*Musa* spp., AAB). Premio Ramal del MINAG. 34 p.
- Lule, M.; T. Dubois; D. Coyne; D. Kisitu; H. Kamusiime and J. Bbemba. (2013). Trainer's manual. A Training Course on Setting Up and Running a Banana Tissue Culture Nursery. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. 88 p.
- Ma, S.S. and C.T. Shii. (1972). *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Chin. Soc. Hort. Sci.* 18: 135-142.
- Ma, S.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: pp 181-188.
- Martin, K.P.; S.K. Pachathundikandi; C.L. Zhang; A. Slater and J. Madassery. (2006). RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cultivar 'Grande Naine' and its propagation via shoot tip culture. *In vitro Cell Dev. Bio-Pl.*, 42(2): 188-192.
- Marie, P. (1995). L'acclimatation des vitroplants de bananiers de Grande Naine. Fort de France: CIRAD-FLHOR, (Fascicules de la Base Centre Bananes Antilles). 1995. 21 p.
- MINAG. 2018. Instructivo Técnico. Fase de Aclimatización de Bananos y Viandas. Ministerio de la Agricultura, Dirección de agricultura. 26 p.

- MusaNet (2016). Global Strategy for the Conservation and Use of *Musa* Genetic Resources ISBN: 978-92-9255-050-9. Laliberté, compiler). Bioersity International, Montpellier, France. 8 p.
- Nandhakumar, N.; K. Soorianathasundaram; D. Sudhakar and K.K. Kumar. (2017). Genetic fidelity analysis in the micropropagated banana derived from immature primordial male flower bud. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(4): 1759-1769. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.211>
- Olmos, S.; G. Luciani and E. Galdeano. (2010). Micropropagación. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Levitus, G.; V. Echenique; C. Rubinstein; E. Hopp; L. Mroginski (Eds). ArgenBio, Ediciones INTA: 352-376.
- Orellana, P. (1994). Micropropagación *in vitro* de plátanos y bananos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. 100 p.
- Orellana, P. (1998). Introducción a la Propagación Masiva. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba: pp.125-133
- Orellana, P.; R. Gómez; L. García-Aguila; B. Chong-Pérez; M. León y M. Reyes. (2010). Respuesta en campo de plantas de 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) obtenidas mediante embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 10(4): 245 - 250
- Osuji, J. O. (1997). Multivariate pattern of quantitative tract variation in triploid banana and plantain cultivars. *Scientia Horticulturae* 71: 197-202.
- Pérez, J.N., 1998. Variación somaclonal. In: Pérez JN (eds) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 105–121. IBP, Santa Clara. Pierik, R.L.M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 326 p.

- Preece, J.E. and E. G. Sutter. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. Micropropagation technology and application. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher: pp 72-93.
- Preil, W. (1991). Application of bioreactors in plant propagation. En: Micropropagation. Technology and Applications. Debergh, P.C.; H. Zimmermann (Eds). Kluwer Academic Publishers, London: pp 425-445.
- Rodríguez, S.; García, M.; Folgueras, M.; Ruíz, L.; Morales, A. (2012). Instructivo técnico para la producción de semillas de viandas. INIVIT/ FAO. ISBN:978-959-295-006-1. 162 p
- Rodríguez, D.; J. López y N. Montano. (2016). Embriogénesis somática y regeneración de plantas en FHIA-25 (*Musa* spp). Una alternativa para el mejoramiento genético. Editorial Académica Española Verlag 73 p.
- Robinson, J. y V. Galan Sauco. (2012). Banana and Plantain. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK. (2"d Edition). España. 336 p
- Robinson, J. and V. Galán Sauco. (2009). Weaning (acclimatization) of *in vitro*-produced banana plants. *Fruits* 64(5): 325-332.
- Reuveni, O. and Y. Israeli. (1990). Measures to reduce somaclonal variation in vitro propagated bananas. *Acta Horticulturae* 257: 307-313.
- Sandoval, J. A.; L. Pérez y F. Côte. (1997). Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). *CORBANA* 22(48): 41-60.
- Sandoval, J.A.; G. Giibert Brenes y L. Pérez. (1991). Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Informe técnico pp 186: 23
- Singh, H.P.; S. Uma; R. Selvarajanand and J.L. Karihaloo. (2011). Micropropagation for Production of Quality Banana Planting Material in Asia-Pacific. *Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology* (APCoAB), New Delhi, India.92 p.

- Stover, R.H. (1987). Somaclonal variation in Grand Naine and Saba bananas in the nursery and field. En: Bananas and plantain breeding strategies. Aciar Persley GJ & De Langhe E (eds) Proceedings. Australia. 187 p.
- Stover, R. and N. Simmonds. (1987). Bananas. 3. Ed. Longman Scientific Technical. New York (E.E.U.U.) 468 p.
- Strosse, H.; R. Domergue; B. Panis; J.V. Escalant and F. Côte. (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. Vézina y Picq (Eds). *Technical Guidelines* 8, INIBAP, Montpellier, France 36 p.
- Sonnino, A. y J. Ruane. (2010). La innovación en agricultura como herramienta de la política de seguridad alimentaria: el caso de las biotecnologías agrícolas. Centro Internacional de la Papa en Perú. 52 p.
- Suárez-Castellá, M.; R. Gómez; B. Chong-Pérez; M. León; M. Reyes y L. García-Águila. (2012). Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa* spp. y su impacto económico. *Biotecnología Vegetal* 12(1): 41 - 48.
- Stuart, D.A. and S.G. Strickland. (1984). Embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa*. The role of aminoacid additions to the regeneration medium. *Plant Science Lett* 34: 74-81.
- Scaranari, C.; P.A. Martins and P. Mazzafera. (2009). Shading and periods of acclimatization of micropropagated banana plantlets cv. Grande Naine. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 66:(3):331-337.
- Vervit. (2015). <http://www.setis-systems.be/>
- Vuylsteke, D.R. (1989). Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. *International Board for Plant Genetic Resources*, IBPGR. ISBN 92-9043-140-7. Rome 56 p.

- Vuylsteke, D.R. ; R. Swennen and E. de Langhe. (1991). Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp. AAB group) derived from shoot-tip culture. *Fruits*. 46(4): 429-439.
- Vuylsteke, D.R. and D. Talengera. (2015). Postflask Management of Micropropagated Bananas and Plantains. A manual on how to handle tissue-cultured banana and plantain plants. International Institute of Tropical Agriculture ISBN 998-131 -134-7 21 p
- Vuylsteke, DR. (2001). Strategies for utilization of genetic variation in plantain improvement. Thesis Ph.D. K.Leuven, Belgium. 80 p.
- Welander, M.; J. Persson; H. Asp and L.H. Zhu. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 179: 227-232.
- Wigboldus, S.; K. Laurens; C. Leeuwis; M. Schut; S. Muilerman and H. Chemsén. (2016). Systemic perspectives on scaling agricultural innovations. A review. 12 p.
- Vizcaino, R. (2012). Evaluación en campo del cultivar de plátano 'INIVIT PV – 06-0' propagado por embriogénesis somática en biofábrica. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Villa Clara. Cuba. 60 p
- Wong, K.F; O. Suhaimi and K. Fatimah. (2015). On –farm grower. Friendly nursery technique for acclimatization of tissue-culture banana seedling. *Asian Journal For Poverty Studies* 3(2): 146 – 151.