

## REGENERACIÓN DE PLANTAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL CULTIVAR DE PLÁTANO VIANDA 'ZANZÍBAR' (*MUSA SPP.*)

Jorge López Torres<sup>1\*</sup>, Remberto Abad Alemán Rosquete<sup>2</sup>, Nery Montano Pérez<sup>1</sup>, Damicela Reynaldo Alvarez<sup>1</sup> Aymé Rayas Cabrera<sup>1</sup>, Víctor Medero Vega, Milagros Basail Pérez y José Enrique Pérez Martínez<sup>3</sup>.

1. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, CP: 53000, Villa Clara, Cuba.

2. Centro de Producción y Desarrollo de Semillas AGROFAR. Santo Domingo, CP: 53000, Villa Clara, Cuba.

3. Filial Universitaria Santo Domingo

\*Autor para la correspondencia: [lab.cell.biotech@inivit.cu](mailto:lab.cell.biotech@inivit.cu)

### RESUMEN

La embriogénesis somática representa un sistema útil para la mejora genética y una vía alternativa para la propagación *in vitro* de plantas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología para la regeneración de plantas por embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda 'Zanzíbar' (*Musa spp.*, Grupo AAB). Se demostró que es posible la obtención de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir de ápices de brotes de yemas axilares en el medio de cultivo ZZ líquido a 90 rpm en zaranda. Se lograron los mayores volúmenes de multiplicación celular con una densidad de inoculación de 3,0% del volumen de células sedimentadas. La formación de embriones somáticos se logró con la densidad de inoculación del 12,0% del volumen de células sedimentadas a los 45 días de cultivo. El uso de un medio de cultivo específico para la maduración de los embriones somáticos durante un período de 30 días favoreció el proceso de histodiferenciación del embrión, demostrándose que los embriones somáticos necesitan de esta etapa, para aumentar los porcentajes de germinación. El empleo del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA<sup>®</sup>, con 0,5 gMF de embriones somáticos maduros, permitió incrementar los valores de germinación a 74,60%. La evaluación de las plántulas en la fase de aclimatización mostró una respuesta agronómica similar a las plantas obtenidas por organogénesis.

**Palabras clave:** conversión a plantas, germinación de embriones, maduración de embriones.

## PLANT REGENERATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PLANTAIN CULTIVAR 'ZANZIBAR' (*MUSA SPP.*)

### ABSTRACT

Somatic embryogenesis represents a useful system for genetic improvement and an alternative pathway for *in vitro* propagation of plants. The present study was conducted to develop a methodology for plant regeneration by somatic embryogenesis in plantain cultivar 'Zanzibar' (*Musa spp.*, AAB group). Homogeneous embryogenic cell suspensions were obtained from shoot apices of axillary buds in liquid culture medium (ZZ) in shaker at 90 rpm. The highest volumes of cell multiplication were obtained with an inoculation density of 3,0% settled cell volume. The formation of somatic embryos was achieved with the inoculation density of 12,0% settled cell volume after 45 days of culture. The use of specific medium for maturation of somatic embryos for a 30 day

period favored the histodifferentiation process of embryos and an increase in germination rate was shown. The use of Temporary Immersion System (RITA<sup>®</sup>) with 0,5 gMF of mature somatic embryos allowed increasing germination values to 74,60%. The evaluation of plantlets in the acclimatization phase showed an agronomic performance similar to plants obtained by organogenesis.

**Keywords:** plant conversion, embryos germination, embryos maturation.

## INTRODUCCION

La producción de plátanos y bananos (*Musa* spp.) en Cuba, contribuye a lograr la estabilidad de productos alimentarios en el mercado, debido a su capacidad de producir durante todos los meses del año, así como por su diversidad de usos (Rodríguez, 2000). Sin embargo, con la aparición en el país de la enfermedad conocida por "Sigatoka negra", causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Sánchez *et al.*, 2002), las áreas dedicadas al cultivo de los plátanos AAB, susceptibles a esta enfermedad, fueron reemplazadas progresivamente por genotipos ABB (plátanos Burros) y por híbridos tetraploides. Todo lo cual hace necesario el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro*, como la embriogénesis somática que permitan aumentar de forma rápida sus poblaciones en campo (Daniels, 2003).

La propagación *in vitro* a partir de ápices meristemáticos se ha generalizado a escala comercial y se mantiene como el método más utilizado en esta especie (Ahloowalia *et al.*, 2004). El empleo de la embriogénesis somática permite obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual hace que este método sea potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis.

Motivado por lo anterior se realizó la presente investigación con el objetivo de establecer una metodología de regeneración de plantas por embriogénesis somática en el cultivar (cv.) 'Zanzíbar' que permita su uso en el mejoramiento genético de este cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el cv. de plátano 'Zanzíbar' (AAB) procedente del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

### Establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas

Se tomaron ápices de los brotes de las yemas axilares con un tamaño de 2-3 mm obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación recomendado por López (2007), los cuales fueron utilizados con el objetivo de lograr el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (SCE).

La incubación se realizó en cinco Erlenmeyer de 10 mL con 2 mL del medio de cultivo ZZ (Dhed'a *et al.*, 1991), constituido por las sales y vitaminas propuestas por (Murashige y Skoog (MS), 1962) reducidas al 50% de su concentración y suplementado con sacarosa (30 g.L<sup>-1</sup>), mioinositol (100 mg.L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (10 mg.L<sup>-1</sup>), 2,4-D (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) y zeatina (0,22 mg.L<sup>-1</sup>), los cuales fueron colocados en un agitador orbital modelo INFORS, a la velocidad de 90 r.p.m., los cuales se colocaron a una temperatura de 27±2,0°C e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, con

régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de  $62-68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Durante esta etapa, los cambios de medios de cultivo se realizaron cada 15 días. En el primer mes la renovación del medio de cultivo fue al 100% y durante el segundo mes la renovación del medio de cultivo fue al 50%. Una vez establecidos los cultivos celulares, fueron tamizados a través de filtros de malla metálica, con un diámetro de poro de  $500 \mu\text{m}$ .

Se evaluó la cantidad de agregados embriogénicos formados por mL de cultivo a los 60 días de establecidas las SCE. Los conteos se efectuaron en cámara de Neubauer. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### **Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas**

Se estudiaron tres densidades de inóculo inicial de volumen de células sedimentadas (VCS) (3,0; 6,0 y 9,0%), se midió cada tres días el incremento celular de cada tratamiento, según la metodología descrita por (Schoofs, 1997) con el objetivo de determinar el valor mínimo de inóculo que permitiera una correcta multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas. Para el análisis del crecimiento de las SCE se utilizó el modelo de regresión no lineal de Gauss.

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

Para lograr la formación de los embriones somáticos se utilizó la metodología de López (2007). Las SCE fueron ajustadas al 12% de VCS y cultivadas en el medio de cultivo RD1 (Dhed'a *et al.*, 1991) constituido por el 50% de las sales MS y suplementado con sacarosa ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sin reguladores del crecimiento, pH 5,8 y solidificado con Phytigel (SIGMA)  $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ ). El medio de cultivo fue vertido en placas de Petri con cuatro mallas de polietileno con un tamaño de  $1,0 \text{ cm}^2$  y poros de  $100 \mu\text{m}$ . Luego se añadió una gota de células mediante una pipeta Pasteur, en las condiciones de cultivo descritas para el establecimiento *in vitro*. A los 45 días de cultivo se contó el número de embriones somáticos formados a partir de las tres suspensiones establecidas. Para la comparación de los tratamientos, se aplicó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

### **Influencia del medio de cultivo en la maduración de los embriones somáticos**

Con el objetivo de lograr la maduración de los embriones somáticos formados, fueron tomados a los 45 días de permanecer en el medio de cultivo RD1 (Dhed'a *et al.* 1991)  $0,1 \text{ gMF}$  de embriones somáticos. Se estudió el efecto de diferentes medios de cultivos para la maduración de los embriones somáticos colocados en placas de Petri durante 30 días, e incubados a la oscuridad.

Los medios de cultivo utilizados fueron el M1: Medio maduración según Gómez *et al.* (2002) con suplemento adicional de ácido ascórbico ( $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Sales y vitaminas MS, sacarosa ( $45,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), biotina ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido indolacético (AIA) ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 6-bencilaminopurina (6-BAP) ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), pH 5,8 y gelificado con Phytigel (SIGMA) ( $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ ), M2: Sales de Schenk and Hildebrandt (SH)

(1972), vitaminas de Morel y Wetmore (1951), sacarosa ( $45,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIA ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 6-BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), pH 5,8 y gelificado con Phytigel (SIGMA) ( $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) y M3: Medio de maduración según López (2007), constituido por las sales y vitaminas MS, sacarosa ( $45 \text{ g.L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), zeatina ( $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$ ), pH 5,8 y gelificado con Phytigel (SIGMA) ( $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Para determinar la maduración de los embriones somáticos se utilizó como criterio la germinación de los mismos, la cual se evaluó a los 30 días de cultivo en el medio de germinación propuesto por Gómez *et al.* (2002), constituido por las sales y vitaminas de MS y suplementado con sacarosa ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), AIA ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 6-BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), biotina ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y biobrás-6 ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ). El gelificante utilizado fue Phytigel (SIGMA) ( $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) y el pH del medio de cultivo fue 5,8. La muestra evaluada fue de 45 embriones somáticos, colocados en tres repeticiones que contenían 15 embriones somáticos por placa de Petri. Como control del experimento se utilizaron 45 embriones somáticos tomados del medio de cultivo RD1 sin incubarse en medio de cultivo de maduración.

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con un nivel de significación de  $p < 0,01$ .

### **Influencia del Sistema de Inmersión Temporal en la germinación de los embriones somáticos**

El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) para alcanzar un mayor número de embriones somáticos que germinen (emisión de hojas y raíz). Se utilizó el SIT tipo RITA<sup>®</sup> (Teisson y Alvard, 1995), con un volumen de 500 mL, al cual se le adicionaron 0,5 gMF de inóculo inicial y 200 mL del medio de cultivo propuesto por Gómez *et al.* (2002) para la germinación de los embriones somáticos. La frecuencia de inmersión fue de tres veces al día con un minuto de duración cada uno (Escalant *et al.*, 1994). Se evaluó el número de embriones somáticos que germinaron a los 40 días de inoculados en los SIT y se calculó el porcentaje que esto representó.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas**

Se logró el establecimiento de tres suspensiones celulares embriogénicas de los cinco Erlenmeyers iniciados a partir de los ápices de brotes de yemas axilares sin diferencias estadísticas en relación al número de agregados embriogénicos obtenidos (Tabla 1).

Durante el desarrollo de los explantes primeramente se observó fenolización en la zona de corte de los mismos y posteriormente engrosamiento. Transcurridos dos meses de cultivo fueron observados estructuras globulares amarillas en la superficie de los explantes, las cuales se separaron de estos y comenzaron a liberarse los agregados embriogénicos.

Resultados similares fueron obtenidos por Chong *et al.* (2005) al utilizar las inflorescencias masculinas del cultivar 'Grande naine' (AAA) para establecer suspensiones celulares embriogénicas directamente del medio líquido sin pasar por una fase de callo.

Durante las primeras semanas se pudo apreciar el desarrollo de agregados celulares, a medida que se realizaron los subcultivos, la cantidad de células aisladas y parenquimatosas disminuyeron a valores casi nulos. Estos agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre 90 y 94% de la suspensión celular y su tamaño varió entre 80 y 300  $\mu\text{m}$ . Transcurridos 60 días de cultivo, se lograron suspensiones celulares homogéneas, las que se caracterizaron por poseer células embriogénicas aisladas y en forma de agregados celulares, constituidos por células embriogénicas pequeñas y esféricas.

Tabla 1. Cantidad de agregados embriogénicos presentes a los 60 días de cultivo de establecidas las suspensiones celulares embriogénicas del cv. 'Zanzíbar'.

Suspensiones	Número de agregados embriogénicos.mL <sup>-1</sup> de suspensión celular	Suma de rangos
Suspensión 1	26,9 x 10 <sup>4</sup>	34,5
Suspensión 2	27,5 x 10 <sup>4</sup>	35,9
Suspensión 3	28,0 x 10 <sup>4</sup>	52,3

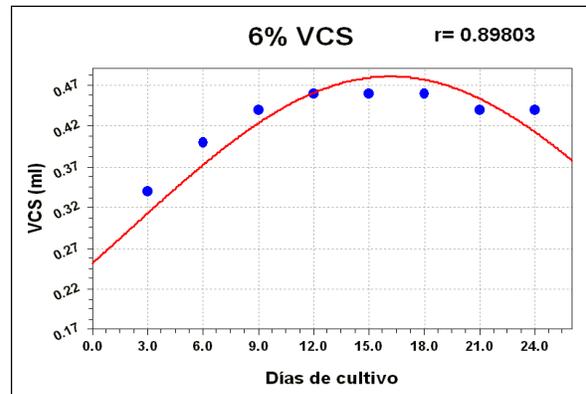
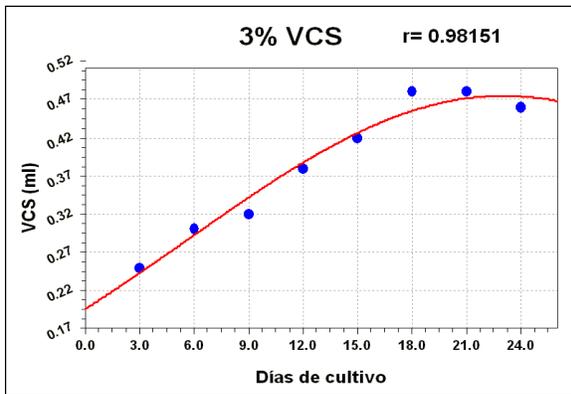
H = 2,1502. n.s. para  $p < 0,005$  según la prueba de Kruskal-Wallis. n.s.: No significativo

### **Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas**

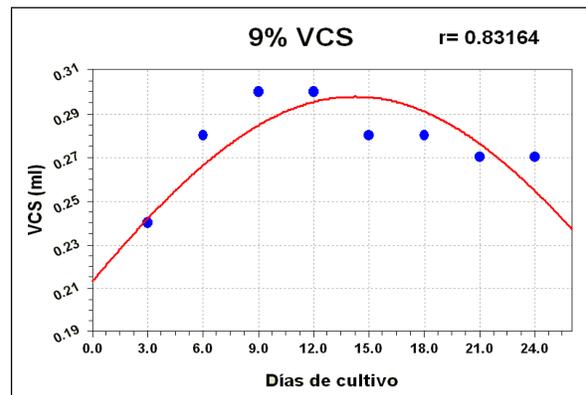
Las curvas de crecimiento celular establecidas de las suspensiones celulares, se caracterizaron al inicio por una fase de reposo o latencia.

La densidad celular de 3,0% de VCS favoreció el incremento celular con relación a las curvas de crecimiento del 6,0 y 9,0% de VCS (Figura 1). En los datos obtenidos mediante el modelo de Gauss se observó que el mayor incremento de biomasa celular se produjo a los 22 días de cultivo (0,49 mL) al 3,0% de VCS.

Esta misma densidad celular mostró una fase de crecimiento exponencial, bien definida y continua, sin deterioro de la calidad celular (predominio de células meristemáticas y vitalidad celular de 90-95%).



VCS	A	b	c
3.0 %	0,4867	22,0140	17,3083
6.0 %	0,4610	16,1477	14,1804
9.0 %	0,2978	14,2365	17,4109



Modelo de Gauss:  $y = ae^{-(x-b)^2/2c^2}$

**Leyenda:** a. Máximo crecimiento de VCS, b. Número de días en que se alcanza el valor máximo de VCS, c. Varianza del modelo Gaussiano.

Figura 1. Influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares establecidas en el cv. 'Zanzíbar'.

Barranco, (2001) a partir de SCE obtenidos del cultivo de flores masculinas en el cv. 'FHIA-18' (AAAB), alcanzó la mejor multiplicación a la densidad celular de 3,0% de VCS con una curva de crecimiento exponencial.

Lo anterior demuestra que durante esta fase las células son biológicamente activas y alcanzan su máxima tasa de división, lo cual indica que los subcultivos de las suspensiones celulares deben realizarse a la densidad celular del 3,0% de VCS y a los 15 días de cultivo, para que las células se mantengan en multiplicación continua sin pasar a la fase lineal.

En la densidad celular de 6,0% de VCS, según los datos obtenidos mediante el modelo de Gauss se observó que el mayor incremento de biomasa celular se produjo a los 16,14 días de cultivo (0,46 mL de VCS). A partir de esta fecha no se produjo incremento del volumen de células y comenzó a disminuir su calidad y vitalidad.

Cuando se multiplicaron las células al 9,0% de VCS, no se llegó a duplicar su volumen inicial y la calidad de la suspensión celular y su vitalidad disminuyó bruscamente. El momento adecuado para realizar el subcultivo de las suspensiones celulares, no puede coincidir con la máxima expresión de la densidad celular del cultivo en suspensión, ni

con el momento en que se agotan las principales fuentes de energía, sino con la última fase de crecimiento exponencial.

### Formación de los embriones somáticos

Independientemente de la suspensión celular evaluada la formación de los embriones somáticos se comportó entre 1528 y 1600 embriones somáticos sin diferencia significativa entre ellas (Tabla 2).

Barranco, (2000) en el cultivar 'Gran Enano' (AAA), con el empleo del 15% de VCS, logró el proceso de histodiferenciación en medio de cultivo líquido y formar  $2\ 561,5 \pm 95,3$  embriones somáticos.

### Influencia del medio de cultivo en la maduración de los embriones somáticos

A los 30 días de incubados los embriones somáticos en los diferentes medios de cultivo para su maduración (Tabla 3), el mayor porcentaje de embriones germinados (54%) se alcanzó en el medio de cultivo M2 que contenía las sales SH (1972) como medio basal, con diferencias significativas del resto de los tratamientos estudiados.

Tabla 2. Número de embriones somáticos formados a los 45 días de cultivo en el medio de cultivo RD1 semisólido del cv. 'Zanzibar'.

Suspensiones	Embriones somáticos formados
Suspensión 1	1528
Suspensión 2	1565
Suspensión 3	1600

KW = 2,71ns. para  $p < 0,005$ . n.s.: No significativo

Tabla 3. Porcentaje de embriones germinados a los 30 días de incubados los embriones somáticos en los diferentes medios de cultivo para su maduración.

Tratamientos	Germinación de embriones	Media de rango
M1	36,44	16,83 b
M2	54,00	32,00 a
M3	39,11	20,17 b
M4	15,20	5,00 c
KW =		30,07**

**Leyenda:** Medio de cultivo (M1): Medio de maduración según Gómez *et al.* (2002); Medio de cultivo (M2): Sales de Schenk and Hildebrandt (SH) (1972), vitaminas de Morel y Wetmore (1951), sacarosa ( $45,0\text{ g.L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100,0\text{ mg.L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10,0\text{ mg.L}^{-1}$ ), AIA ( $2,0\text{ mg.L}^{-1}$ ), 6-BAP ( $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ ), pH 5,8 y gelificado con Phytigel (SIGMA) ( $2,3\text{ g.L}^{-1}$ ); Medio de cultivo (M3): Medio de maduración según López (2007); Germinación de los embriones sin ser subcultivados en medio de maduración.

Le siguió en orden decreciente con 39,11% de embriones germinados el medio de cultivo M3, utilizado por López, (2007) para la maduración del cv. 'Navolean'. Por otra parte cuando los embriones somáticos no fueron cultivados previamente en el medio de cultivo de maduración, sólo germinó el 15,2% de los mismos.

El 6-BAP ha sido empleado en varias especies de plantas; Schuller *et al.* (2000), incrementaron el número de embriones somáticos y su maduración con el empleo de la citoquinina anterior, sola y en combinación con el ABA en el medio de cultivo en la especie *Abies alba*.

### **Influencia de la densidad de inóculo en la germinación de los embriones somáticos en el Sistema de Inmersión Temporal**

La germinación de los embriones somáticos (Figura 2) alcanzó un 74,60% de embriones germinados, a la densidad de 0,5 gMF de embriones, con diferencias significativas con el medio de cultivo de constitución semisólida que sólo se obtuvo un 41,10% de embriones germinados, el cual resultó el porcentaje más bajo, difiriendo significativamente del anterior.

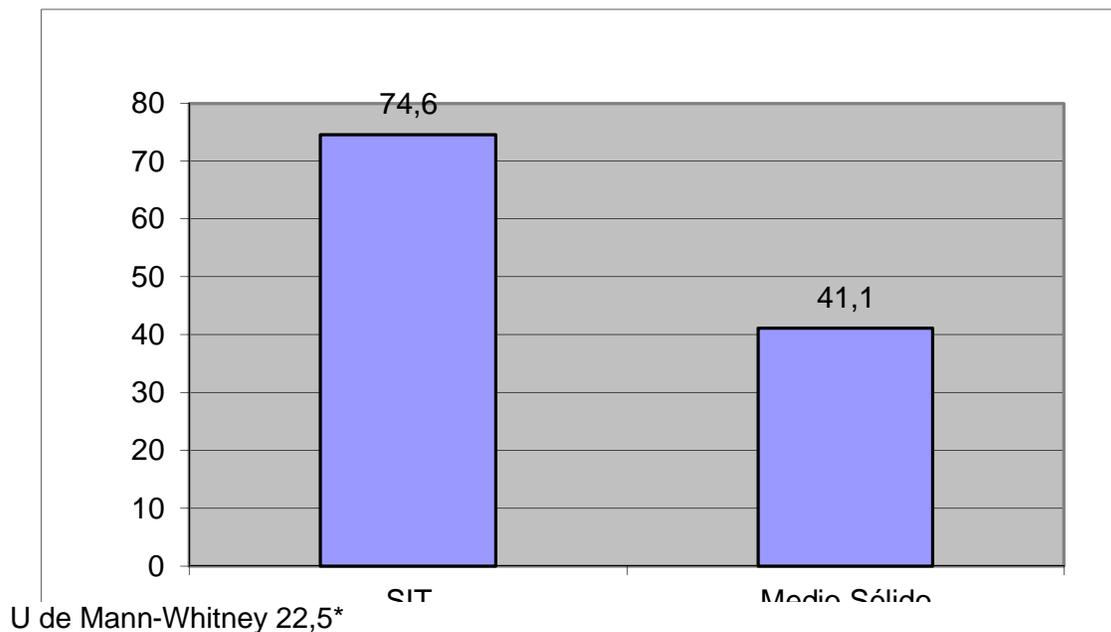


Figura 2. Efecto de la germinación de los embriones somáticos en SIT y medio de cultivo semisólido en el cv. 'Zanzíbar'.

Marroquin *et al.* (1993), lograron porcentajes de germinación de 20-36% en *Musa acuminata*. Mientras que Grapin *et al.* (1996), obtuvieron en el plátano 'French Sombre' (AAB) porcentajes de germinación de 10-40%. Estos resultados son bajos en comparación con los logrados por Escalant *et al.*, (1994), en diferentes cultivares de *Musa spp.* quienes obtuvieron entre 60 y 70% de germinación de embriones somáticos en un SIT tipo RITA®.

Posteriormente los embriones somáticos germinados fueron transferidos a la fase de aclimatización.

## CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología para la regeneración de plantas del cv. de plátano vianda 'Zanzíbar' vía embriogénesis somática.
2. El uso combinado de los embriones somáticos maduros, y el Sistema de Inmersión Temporal propició el mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos (74,60%).

## RECOMENDACIONES

1. Emplear el protocolo desarrollado para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en el cv. de plátano 'Zanzíbar' (AAB) y evaluar el comportamiento de la metodología en otros cultivares de interés para el mejoramiento genético y la propagación masiva.
2. Evaluar en condiciones de campo la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

## BIBLIOGRAFÍA

- AHLOOWALIA BS, J. PRAKASH, V.A. SAVANGIKAR and C. SAVANGIKAR. 2004. Plant tissue culture. Proceedings of low cost options for tissue culture technology in developing countries. FAO/IAEA Vienna, Austria 26-30 August 2002. pp 3-10.
- BARRANCO, L.A. 2000. Desarrollo de la embriogénesis somática en medios líquidos (*Musa* AAA cv. Gran Enano). Tesis para optar al grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba; 57p.
- BARRANCO, L.A. 2001. Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. 'FHIA-18') empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba; 107p.
- CHONG B, R. PÉREZ, R. GÓMEZ, M. REYES, I. BERMÚDEZ, J. GALLARDO, M. FREIRE, L. POSADA, L. HERRERA y R. SWENNEN. 2005. Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de 'Grande naine' (AAA). *InfoMusa* (14) 1: 13-18.
- DANIELS D. 2003. Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA 21' (*Musa* spp. AAAB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP, Santa Clara, Cuba. 123p.
- DHED'A D, DUMORTIER F, PANIS B, VUYLSTEKE D and DE LANGHE E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- ESCALANT JV, TEISSON C AND CÔTE F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181-186.
- GÓMEZ R, DE FERIA M, POSADA LP, GILLIARD T, BERNAL FM, REYES MV, CHÁVEZ MM and QUIALA EM. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA 18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26.

- GRAPIN A, J. SCHWENDIMAN and C. TEISSON. 1996. Somatic embryogenesis in banana plant. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 32: 66-71.
- LÓPEZ, J. 2007. Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda Navolean. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas. Ciego de Ávila, Cuba 100p.
- MARROQUIN CG, PADUSCHECK C, ESCALANT JV AND TEISSON C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 43-46.
- MURASHIGE T and SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- RODRÍGUEZ, S. 2000. Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Programa Nacional de Ciencia y Técnica, Informe final Proyecto 00200091, INIVIT, 96p.
- SÁNCHEZ R, PINO JA, VALLIN C, PÉREZ ME, IZNAGA Y and MALPARTIDA F. 2002. Effects of the natural fungicide F20 on black Sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain (AAB) and banana (AAA). *Infomusa* 11(1):14-16.
- SAVANGIKAR VA. 2004. Role of low cost options in tissue culture. Proceedings of low cost options for tissue culture technology in developing countries. FAO/IAEA Vienna, Austria 26-30 August 2002. pp 11-15.
- SCHOOFS H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thesis Ph.D. K. Leuven, Belgium. 257p.
- SCHULLER A, R. KIRCHNER-NEß and G. REUTHER. 2000. Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 60: 23-31.
- TEISSON C and ALVARD D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En: Terzi M, Cella R y Falavigna A (eds) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, Kluwer Academic Publishers. pp 105-109.