

Propagación clonal *in vitro* de plantas de banano (*Musa AAA*) clon “*Giant cavendish*” en biorreactores de inmersión temporal

In vitro clonal propagation of banana plants (*Musa AAA*) using “*Giant cavendish*” on temporary immersion bio-reactors

Jesús Jaiber Díaz García,* Dagoberto Castro Restrepo**

Resumen

En la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente se desarrolló la técnica de micropropagación del clon de banano “*Giant cavendish*” en biorreactores de inmersión temporal (BIT). Se evaluó el efecto de la interacción entre el volumen de medio y el número de explantes sobre los coeficientes de multiplicación y la eficiencia de las plantas, así como los diferentes tiempos de duración de las fases de proliferación y elongación. Con los resultados obtenidos se determinó que mediante la utilización del medio de cultivo correspondiente a las sales minerales de Murashige and Skoog, enriquecido con 6-bencil amino purina (BAP, 5 mg L⁻¹) para la proliferación, y ácido indol butírico (AIB, 1 mg L⁻¹) para la fase de elongación, utilizando un volumen de medio de cultivo de 750 ml/recipiente, 15 explantes y una frecuencia de inmersión cada seis horas por tres minutos, por un periodo de 50 días en proliferación y tres semanas en elongación, se lograron coeficientes de multiplicación de 6,24, indicando la eficiencia de la técnica, al obtener más de 280 plántulas competentes en recipientes de 5L de capacidad y garantizar un porcentaje de supervivencia superior al 95%, en la fase de aclimatización.

Palabras clave: *Musa AAA*, Micropropagación, Biorreactores.

* M.Sc Asistente de investigación. Unidad de Biotecnología Vegetal. Universidad Católica de Oriente. A.A. 008 Rionegro, (Antioquia), Colombia. E-mail: jdiaz@uco.edu.co

** PhD en Biotecnología. Director Investigación y Desarrollo. Unidad de Biotecnología Vegetal. Universidad Católica de Oriente. A.A. 008 Rionegro, (Antioquia), Colombia. E-mail: dcastro@uco.edu.co

Abstract

At the Plant Biotechnology Unit at Universidad Católica de Oriente, the technique of micropropagation of banana clon "Giant cavendish" was performed on temporary immersion bioreactors (TIB). The effects of media volume and explant number were assessed for reproduction rates and plant efficiency, as well as how long the proliferation and elongation stages were. The results were used to establish that proliferation rates of 6.24 were obtained by using cultivation media made up of mineral salts of Murashige and Skoog, enriched with 6-bencylaminopurine (BAP, 5 mg/L) for proliferation, and Indole butyric acid (AIB, 1 mg/L) for the elongation phase using a culture medium volume of 750 ml/vessel, 15 explants and an immersion frequency every six hours for three minutes, for 50 days in the proliferation phase and three weeks in the elongation phase. This shows how efficient the technique is, since more than 280 competent seedlings were obtained in 5L-vessels, guaranteeing a survival rate higher than 95 percent, in the acclimatization phase.

Palabras clave: *Musa* AAA, Micropropagation, Bioreactors.

Introducción

Producidos ampliamente en regiones tropicales y subtropicales, los bananos y plátanos (*Musa* sp) ocupan el cuarto lugar como el producto alimenticio más importante en el mundo, sobrepasados únicamente por el arroz, el trigo y los productos lácteos (Chadha y Sahijram, 2000).

Colombia es el cuarto país exportador de banano en el mundo después de Ecuador, Costa Rica y Filipinas, con una participación de cerca de 80 millones de cajas que representan alrededor de 400 millones de dólares al año para el país y el 0,4% del Producto Interno Bruto (PIB). Debido al éxito de las exportaciones, las empresas productoras de banano han llegado a ser unas de las principales contribuyentes para el desarrollo económico del país, según lo señala la Asociación de Bananeros de Colombia —Augura— en 2011.

El género *Musa* tiene muchas especies, entre las cuales la más comercial y ampliamente cultivada en el mundo es *Musa* AAA. De este las variedades más cultivadas en las regiones bananeras de Urabá y Magdalena son el *Gran enano*, *Williams* y *Giant cavendish*, con un área aproximada de 44.000 hectáreas (Espinal *et al.*, 2006). El clon "*Giant cavendish*", además de ser muy productivo, se caracteriza por una mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas con relación al clon "Gran Enano". Pertenece al grupo de bananos Cavendish de porte bajo; debido a la forma cilíndrica del pseudotallo, soporta más la acción de vientos fuertes, y por tener una mayor separación entre manos, disminuye la pérdida por roce de puntas. En la tabla 1, se indican algunas de las principales características de esta variedad.

Tabla 1. Características del clon "*Giant cavendish*"

Características	Dimensiones
Altura del pseudotallo (cm)	2,70
Circunferencia del pseudotallo (cm)	75,40
Número de hojas al parir	16
Longitud de las hojas (cm)	269
Ancho de las hojas (cm)	102,5
Peso del racimo (kg/12 semanas)	50
Número de manos	11 (falsa + 3)
Peso del vástago (kg)	9,8
Ratio	1,66

Nota: Datos obtenidos por la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente desde el año 2000.

Debido a que las variedades comerciales no producen semilla, su propagación es asexual. Como material convencional de siembra se utiliza los rizomas, los cuales generalmente presentan problemas como: tasas de multiplicación muy bajas y altos riesgos de diseminar problemas fitosanitarios —hongos, bacterias, virus y nematodos—. Como método no convencional se ha utilizado con éxito en los últimos años, la propagación a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* logrando coeficientes de multiplicación adecuados y la posibilidad de ofrecer materiales de alta calidad. Sin embargo, es una técnica que requiere del uso intensivo de la mano de obra en las diferentes etapas del proceso, espacio y gastos de energía, lo cual eleva considerablemente los costos de producción (Sandoval, 1991; Castro y Giraldo, 1993).

Sin lugar a dudas, con el inicio del nuevo milenio se han desarrollado investigaciones usando como opción la automatización de una o más etapas en los procesos de micropropagación para reducir los costos de manipulación y espacio e incrementar los volúmenes de producción al igual que la calidad de los materiales de siembra. La utilización de medios de cultivo líquidos es una condición para establecer esta alternativa, en los procesos de organogénesis con sistemas como: RITA, *air lift*, biorreactores de inmersión temporal, entre otros.

Teisson *et al.* (1996) desarrollaron un sistema de inmersión temporal, conocido comercialmente como Rita (réipient á immersion temporaire automatisé) con resultados exitosos en diversos cultivos para la micropropagación mediante organogénesis y embriogénesis. A partir de la estandarización del primer sistema semiautomatizado de inmersión temporal en Cuba, se han realizado investigaciones sobre la utilización de esta técnica en la proliferación de *Saccharum* sp (Lorenzo *et al.*, 1998), en la producción de microtubérculos de *Solanum tuberosum* (Pérez *et al.*,

1999), en micropropagación de *Ananas comosus* (Escalona *et al.*, 1999) y de *Manihot esculenta* (Medero *et al.*, 1997). En Colombia, se ha empleado el sistema para la propagación mixotrófica de *Eucaliptus grandis* (Castro, 2001) y en la producción de microtubérculos de *Solanum tuberosum* (Montoya, 2005).

Aitken-Christie *et al.* (1995) caracterizaron las condiciones convencionales *in vitro* así: alta humedad relativa, temperatura constante, bajo flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF), altas fluctuaciones diurnas en las concentraciones de CO₂, elevadas concentraciones de azúcares, sales y reguladores de crecimiento, como factores limitantes del desarrollo de los brotes. Para dar una solución alternativa, es importante proporcionar a las plántulas, desde las etapas *in vitro*, condiciones similares a las de la fase fotoautotrófica *ex vitro* (Ziv, 1995, citado por Castro, 2001). Es así como el control del microambiente en los recipientes de cultivo puede mejorar los procesos de aclimatización mediante el control de las concentraciones de CO₂, la humedad relativa y la luminosidad (Kozai *et al.*, 1997).

En este contexto, dentro de las posibilidades que brinda el empleo de los sistemas semiautomatizados para la obtención de material vegetal de bananos, en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente, se desarrolló la metodología para la producción clonal *in vitro* de plantas de banano (*Musa AAA*) clon “*Giant cavendish*” en biorreactores de inmersión temporal, al evaluar el volumen del medio de cultivo, el número de explantes y la duración de las fases de proliferación y elongación, para lograr mejores coeficientes de proliferación, mayor crecimiento y desarrollo de los brotes y altos porcentajes de supervivencia de las plántulas durante la etapa de aclimatización, que garantice una alta estabilidad de los materiales micropropagados, lo cual permite además proponer un esquema general para su propagación.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el laboratorio e invernadero de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente. La selección de las plantas madres por características fenotípicas superiores se realizó en la finca Manantiales del grupo Santa María en la región bananera de Urabá. Para dar inicio al proceso de producción en biorreactores de inmersión temporal —BIT—, en la fase del establecimiento *in vitro* de los meristemas, se utilizaron brotes de banano del clon “*Giant cavendish*”, de acuerdo con el método convencional, según metodología citada por Castro y Giraldo (1993, p. 4). Se empleó un BIT modificado para la micro-

propagación mixotrófica de *Eucaliptus grandis* Castro (2001, p. 34), utilizando como recipientes de cultivo frascos de cinco litros de capacidad para los explantes y de un litro de capacidad para el medio de cultivo. Los recipientes donde se colocaron los explantes y el medio de cultivo tenían un tapón de silicona con dos orificios en los cuales se insertaron tubos de vidrio lo que permitió interconectar simultáneamente ambos frascos con mangueras de silicona a un sistema de entrada y salida de aire esterilizado por filtros hidrófobos de 0,2 micras, provenientes de un compresor accionado por un programador automático, para el manejo adecuado de la frecuencia y duración de los ciclos de inmersión (figura 1).



Figura 1. Sistema de biorreactores de inmersión temporal

El coeficiente de multiplicación se calculó por el coeficiente del número de brotes finales y el número de brotes iniciales (considerando como tales el número de explantes multiplicado por tres). El medio de cultivo se formó con sales minerales de Murashige and Skoog (1962), y se enriqueció con tiamina-HCl (0,4 mg/L), ácido cítrico (100 mg/L), ácido ascórbico (100 mg/L), 6-bencil amino purina BAP (5 mg/L) y sacarosa

(30 g/L). El medio se esterilizó en autoclave (25 minutos a 122°C y 15 libras de presión), y su pH se ajustó a 5,8 con NaOH.

Con el objetivo de determinar el volumen de medio óptimo por recipiente y el número de explantes, se utilizó un experimento bifactorial completamente aleatorizado con tres repeticiones. En cada experimento se analizaron 250, 500 y 750 mililitros de medio de cultivo por frasco, con 10,

15 y 20 explantes, respectivamente; cada explante compuesto de un cluster con tres brotes. Para todos los tratamientos se siguió una frecuencia de inmersión de seis horas con una duración de tres minutos por tratamiento. Los brotes se incubaron bajo condiciones de fotoperiodo de ocho horas, con lámparas de luz fluorescente, que garantizaron un flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $80 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y 16 horas de oscuridad, temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ y humedad relativa del 75%. Las variables evaluadas co-

rrespondieron a: coeficiente de multiplicación, número de plantas y longitud de las plantas. La evaluación se realizó a los sesenta días.

Con el objetivo de establecer el tiempo óptimo de duración de las fases de proliferación y elongación, se evaluó el comportamiento de los explantes de banano clon “*Giant cavendish*” en cuatro momentos: 30, 40, 50 y 60 días para la fase de proliferación y una, dos y tres semanas para la fase de elongación (tabla 2).

Tabla 2. Cambios de medio de cultivo a los explantes de acuerdo a las fases de proliferación y elongación.

Tratamientos (días)	Medio de proliferación (MP)	Medio de elongación (ME)
30	-	30
40	30	40
50	30	50
60	30	60

Una vez cumplidos estos periodos, se retiraron las plántulas de los biorreactores para evaluar variables como altura y clasificación en tres tipos A, B y C. Seguidamente, se sometieron a un proceso de aclimatización en condiciones de invernadero y casombrado durante diez semanas, donde se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis descriptivo e inferencial mediante análisis de varianza simple o multifactorial y la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparación de medias. Para el procesamiento estadístico se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 5.0 de 2000.

Resultados

Coefficiente de multiplicación

De acuerdo con los resultados de la tabla 3, al comparar el efecto de los factores de manera individual, se encontró que con el mayor volumen de medio de cultivo —evaluado para brotes de banano del clon “*Giant cavendish*”, correspondiente a 750 mL— se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación, 5,86, aunque se presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los volúmenes de 250 y 500 mL. El factor correspondiente al número de explantes, mostró diferencias significativas y en la medida que se incrementó el número de explantes se disminuyó la tasa de proliferación.

Tabla 3. Efecto del volumen de medio de cultivo y el número de explantes sobre el coeficiente de proliferación en bananos clon "Giant cavendish".

Volumen (mL)	Coeficiente de multiplicación	Altura de las plántulas (%)		
		Tipo A (> 6 cm)	Tipo B (3 – 5 cm)	Tipo C (< 3 cm)
250	2,02 (c)	24,78 (b)	44,87 (a)	30,44
500	4,49 (b)	39,30 (a)	29,93 (b)	30,86
750	5,86 (a)	37,68 (a)	33,78 (b)	28,49
Explantes				
10	4,72 (a)	33,99	31,19 (b)	34,80
15	4,06 (b)	34,37	38,64 (a)	27,19
20	3,59 (b)	33,40	38,74 (a)	27,81
MG ± Error Estándar	4,12 ± 0,13	33,92 ± 2,33	36,19 ± 1,75	29,93 ± 3,14
Volumen (V)	*	*	*	*
Explantes (E)	*	NS	NS	NS
Interacción V x E	*	NS	NS	NS

Los datos representan la media ± el EE (error estándar) de tres repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan.

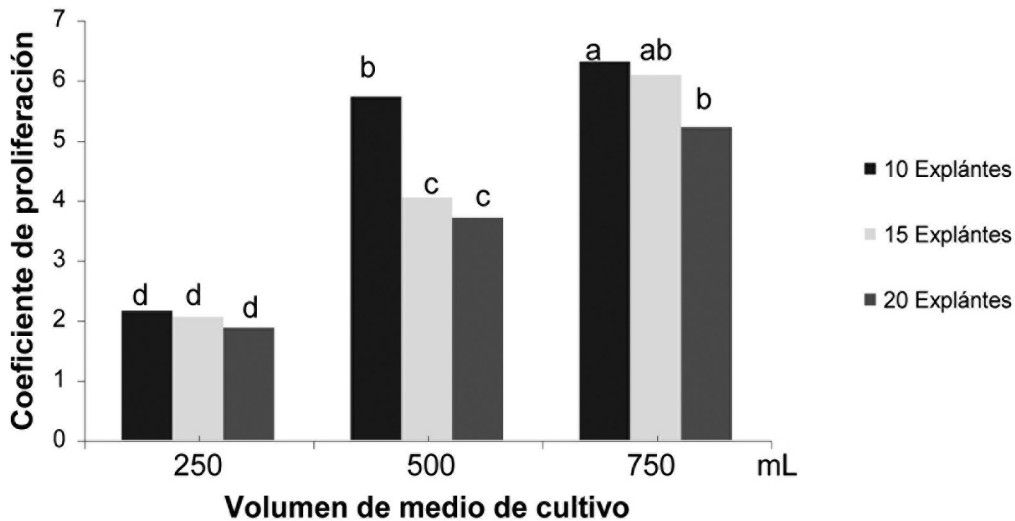


Figura 2. Efecto del volumen de medio de cultivo y el número de explantes sobre el coeficiente de proliferación. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan.

En la figura 2 puede observarse también cómo en la medida en que se incrementa el volumen de medio de cultivo se incrementa la tasa de proliferación. De igual manera, se presentó una tendencia de mayor tasa de proliferación con el menor número de explantes. Lo que indica que los mayores coeficientes de proliferación —4,72 y 4,06—, se lograron cuando se empleó un volumen de medio de cultivo de 750 mL con 10 y 15 explantes, respectivamente. Las mejores relaciones de medio de cultivo correspondieron a 25 y 16,6 mL/brote. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cejas *et al.* (2005) en la propagación de plátanos en BIT, reportando los mejores coeficientes de proliferación y calidad de los brotes cuando utilizaron 25,5 mL/brote. Castro (2001), en la propagación mixotrófica de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), indica que en la medida que se aumenta el volumen de medio de cultivo logró incrementarse las tasas de proliferación en cerca de 10,5 brotes. De otro lado, Escalona *et al.* (1998) señala que los cultivos de piña (*Ananas comosus*) y la caña de azúcar (*Saccharum* spp) obtuvieron un coeficiente de multiplicación mayor en la medida que se aumentaba la disponibilidad de nutrientes. También hacen referencia a esto Cejas *et al.* (1995) en la proliferación de plátano (*Musa AAB*) y Montoya (2005) en la tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.). Con relación a la evaluación de la calidad de los brotes, determinada por su tamaño, no se encontraron interacciones entre los factores evaluados (tabla 3). Sin embargo, al analizar el efecto individual de los factores se encontraron diferencias significativas en el volumen de medio del cultivo empleado, mientras que el número de explantes no presentó efecto alguno con relación a la altura de los brotes. Las plántulas de mayor

altura denominadas tipo A (> 6 cm) se presentaron en mayor porcentaje cuando se utilizaron 500 y 750 ml de medio de cultivo, mientras que las intermedias llamadas tipo B (3-5 cm), se presentaron en mayor proporción al emplear 250 mL; mientras tanto, para las plántulas tipo C (<3 cm) no se observó un efecto significativo del volumen de medio sobre el tamaño de estas. Es de anotar que los resultados obtenidos en este estudio reportan los mejores coeficientes de multiplicación y calidad de los brotes al utilizar el mayor volumen de medio de cultivo correspondiente a 750 mL con 15 explantes. De tal manera, a partir de 45 brotes iniciales se obtuvo un promedio de 264 plántulas competentes por biorreactor, con un coeficiente de multiplicación de 5,86, que supera el coeficiente de multiplicación obtenido por las técnicas convencionales, en el rango de 1,4 a 3.

Estos resultados coinciden con los referidos por Castro (2001), teniendo presente que cuando se utilizó un mayor número de explantes se presentó una disminución en el coeficiente de multiplicación, debido seguramente a la competencia de los explantes por nutrientes, espacio, luz, entre otros.

Duración de la proliferación en presencia del BAP y de la elongación en presencia de IBA

Al evaluar el efecto individual de los tratamientos, la tabla 4 indica que cuando los brotes permanecieron 50 días en medios de cultivo suplementados con BAP (5 mg/L), estos presentaron coeficientes de multiplicación de 6,03. En la medida que se incrementó el tiempo de exposición de los brotes en este regulador de crecimiento se observó una disminución en el coeficiente de multiplicación y en la altura de los brotes.

Tabla 4. Efecto de la duración de los tratamientos con BAP y AIB sobre el coeficiente de proliferación y la elongación de brotes de bananos clon “Giant cavendish”

Factor	Coeficiente de multiplicación	Altura de los brotes (%)			Superviv. (%)	
		A. Días en BAP	Fase proliferación	Tipo A (> 6 cm)		Tipo B (3 – 5 cm)
30	1,69 (d)		14,00 (d)	33,18 (c)	52,81 (a)	89,81 (c)
40	2,39 (c)		44,62 (c)	37,77 (b)	17,60 (c)	92,81 (b)
50	6,03 (a)		49,14 (a)	29,81 (d)	21,05 (b)	96,36 (a)
60	3,80 (b)		47,70 (b)	39,74 (a)	12,54 (d)	96,68 (a)
MG ± Error Estándar	3,48 ± 0,01		38,86 ± 0,44	35,12 ± 0,41	26,00 ± 0,44	93,91 ± 0,11
B. Semanas en AIB	Fase elongación					
1	3,25 (c)		38,21 (b)	36,38 (a)	25,40 (b)	93,11 (c)
2	3,61 (a)		40,28 (a)	34,93 (b)	24,78 (b)	94,12 (b)
3	3,56 (b)		38,10 (b)	34,07 (b)	27,82 (a)	94,51 (a)
MG ± Error Estándar	3,48 ± 0,08		38,86 ± 0,77	35,12 ± 0,35	26,00 ± 0,38	93,91 ± 0,10
Interacciones A x B	***					

Los datos representan la media ± el EE (error estándar) de tres repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para p < 0,05 por el test de Duncan.

Aunque no se esperaba que el AIB (1 mg/L) tuviera un efecto sobre la proliferación se observó que los brotes que permanecieron por periodos de dos semanas en este medio presentaron un incremento en número, lo que se puede atribuir al desarrollo de yemas que se encontraban iniciando su desarrollo (una elongación de brotes que aún no se habían desarrollado) y no a un

efecto directo del AIB sobre la proliferación. Al evaluar la interacción de los factores en la figura 3 se indica que en todos los casos la permanencia de los brotes en BAP durante 50 días presentó los mejores coeficientes de multiplicación; y con AIB durante tres semanas se logró la máxima eficiencia de la proliferación, con un coeficiente de 6,24.

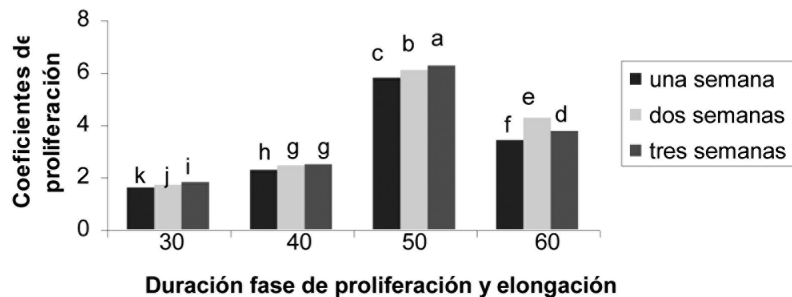


Figura 3. Efecto de la duración de los tratamientos con BAP y AIB sobre el coeficiente de proliferación y la elongación de brotes de banano clon *Giant cavendish*. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para p < 0.05 por el test de Duncan.

Si bien los reportes de investigación son relativamente escasos para compararlos con los resultados obtenidos en este trabajo, pueden señalarse los de Escalona *et al.* (1999), en piña (*Ananas comosus*), quienes obtuvieron el mayor coeficiente de multiplicación a las siete semanas, mientras que en eucaliptos (*Eucalyptus grandis*), Castro (2001) presentó un coeficiente de 10,5 brotes en seis semanas. Así mismo, Montoya (2005) indica en papa (*Solanum tuberosum*) un coeficiente de multiplicación de 7,25 en 100 días para un proceso completo de obtención de microtubérculos, y Medero *et al.* (1997) reportan coeficientes de multiplicación de 6,6 brotes en treinta días para malanga (*Xanthosoma violaceum*). De otro lado, cuando los brotes se mantuvieron en medios con BAP durante cincuenta días y por dos semanas en el medio de elongación con AIB, se obtuvo la mejor calidad de plántulas en lo que a la altura de las mismas respecta, con 49,14 y 40,28%, respectivamente (tabla 4).

Al observar la interacción entre los factores, la figura 3 indica que los mejores coeficientes de multiplicación, elongación y calidad de los brotes se lograron cuando se utilizó un volumen de 750 mL de medio de cultivo y 15 explantes por recipiente o biorreactor. De esta manera, es posible obtener 281 plántulas con un coeficiente de multiplicación de 6,24 brotes durante un periodo de 50 días en medio de proliferación suplementado con BAP y tres semanas en medio de elongación suplementado con IBA.

Respecto a la supervivencia de las plantas pueden observarse diferencias significativas entre los factores evaluados (tabla 4); los mejores resultados se obtuvieron cuando estas permanecieron 60 días en fase de proliferación y tres semanas en elongación, lográndose en promedio un porcentaje de prendimiento del 95,4%. El porcentaje de supervivencia es un indicador muy importante en la fase de aclimatización, pues de

este proceso depende la cantidad de plantas que se llevaran a campo posteriormente. Este resultado de supervivencia se considera aceptable si se compara con los que informan otros autores como Izquierdo *et al.* (2005), donde informan porcentajes de supervivencia cercanos al 80% en el caso de banano tipo FHIA-18.

Conclusiones y recomendaciones

Los mejores coeficientes de multiplicación, elongación y calidad de los brotes se lograron cuando se utilizó un volumen de 750 mL de medio de cultivo y 15 explantes por recipiente o biorreactor. De esta manera es posible obtener 281 plántulas con un coeficiente de multiplicación de 6,24 brotes durante un periodo de 50 días en medio de proliferación enriquecido con BAP y tres semanas en medio de elongación con IBA. Con el biorreactor de inmersión temporal se logró la mayor eficiencia biológica y técnica, ya que al compararlo con el método convencional de micropropagación se obtuvo los mejores coeficientes de multiplicación de 6,24 y 3,0, respectivamente. De igual manera, se logró la mejor relación masa fresca/masa seca de 0,057 y 0,037, lo que implica una mayor actividad fotosintética y posiblemente una tendencia hacia el mixotrofismo.

Implementar la tecnología propuesta para la propagación clonal de musáceas a escala comercial, como una alternativa para semiautomatizar y optimizar los procesos de producción.

Referencias

- Aitken-Christie, J.; Kozau, S. T. y Takayama, S. (1995). Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. En: Aitken-Christie, J., Kozai, T. y Smith, M. A.-L. (eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Países Bajos: Dordrecht, pp. 1-18.

Augura (2011). Asociación de Bananeros de Colombia. [En línea] www.colciencias.gov.co/agenda/pdfs/pn_44pdf <http://augura.com.co/> Consultado en: Noviembre de 2011.

Castro R., D. (2001). Propagación mixotrófica de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maidem en biorreactores de inmersión temporal. Tesis Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba. 89 pp.

_____ y Giraldo, M. C. (1993). Identificación de puntos de control de calidad en la producción de plantas *in vitro* de banano (*Musa acuminata*). En: *Serie Investigaciones. Universidad Católica de Oriente*. Rionegro. 12 pp.

Cejas, I.; Capote, I.; Escalona, M.; Noceda, C.; Rodríguez, R.; Cañal, J.; Roels, S.; Sandoval, J. y Deberhg, P. (2005). Protocolo para la proliferación de plátano *Musa* AAB (Cemsa ¾) con el empleo de meta-topolina en biorreactores de inmersión temporal. En: *Taller internacional sobre biotecnología vegetal y agricultura sostenible. Bioveg 2005*. Centro de Bioplantas. Ciego de Ávila, Cuba. pp. 3-4.

Chadha, K. L. y Sahijram, L. (2000). Application of biotechnology to *Musa*. En: Chadha, K. L.; Ravindran, P. N.; Sahijram, L. (eds.). *Biotechnology in horticultural and plantain crops*. Nueva Delhi: Malhotra Publishing House, pp. 232-247.

Escalona, M. (1999). Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr) en sistemas de inmersión temporal. Tesis doctor en ciencias agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. Centro de Bioplantas, Cuba. 89 pp.

Espinal, C., F; Martínez C., H. y Peña, M. (2005). *La cadena del banano. Una mirada global de su estructura en Colombia (1991-2005)*. [En línea] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/432>.

Consultado en: 20 de febrero.

Izquierdo, H.; González, M.; Núñez, M.; Iglesias, R. y Pinzón, E. (2005). *Influencia de nuevos biorreguladores de crecimiento vegetal en la aclimatización del banano (musa spp.) clon FHIA-18*. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. Bioveg 2005. Centro de Bioplantas. Ciego de Ávila. Cuba. p. 8.

Kozai, T.; Kubota, C. H. y Jeong, B. R. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 49-56.

Lorenzo, J. C.; González, B. L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P. y Barroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant cell, tissue and organ culture*. 54: 197-200.

Medero, V.R.; García, M.; López, J.; Ventura, J.; Rodríguez, S.; García, J.; Martínez, M.; Bauta, M. y Álvarez, M. (1997). Uso de los sistemas de inmersión temporal en yuca (*Manihot esculenta*) y malanga (*Xanthosoma violaceum*). En: *Memorias técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. Bioveg' 97*. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila. Cuba, p. 10.

Montoya, P.N. (2005). *Tuberización in vitro de papa (Solanum tuberosum) variedad Diacol capiro en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo*. Trabajo de grado para optar el título de magíster en biotecnología. Convenio Universidad Católica de Oriente-Universidad Pontificia Bolivariana. Rionegro, Antioquia.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*. 15: 473-497.

Navarro, C.; Escobedo, R. M.; Sens, I.; Mayo, A.; Espadas, F. y Espinosa, J. (1994). Applications of tissue culture of *Musa* sp.

En: *Memorias Advances in Tissue Culture Technology for Improved Planting Material*. Memorias de congreso sobre biotecnología. Scientific Research Council. Kingston, Jamaica. pp. 85-92.

Pérez, N.; De Fera, M.; Jiménez, E.; Capote, A.; Chaves, M. y Quiala, E. (1999). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* l. var. Atlantic) en sistemas de inmersión temporal y estudio de su comportamiento en campo. En: *Libro de reportes cortos. Quinto Coloquio*

Internacional de Biotecnología Vegetal. IPB-UCLV, Cuba.

Sandoval F., J. A. (1991). Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el Catie. En: *Serie técnica. Informe técnico N° 186*. Catie. Turrialba, Costa Rica, 24 pp.

Teisson, C.; Alvard, D.; Berthouly, B.; Cote, F.; Escalant, J.; Etienne, H. y Lartaud, M. (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526.

