

Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones

Victor Galan¹, Antonio Rangel², Jorge Lopez³, Juan Bernardo Perez Hernandez⁴,
Jorge Sandoval⁵, Herminio Souza Rocha⁶

Resumen-Se pasa revista a los diferentes tipos de propagación del banano tradicional (fundamentalmente hijos y rizomas o partes del mismo), aún utilizada en plantaciones de tipo familiar y en plantaciones establecidas en gran número de países tropicales dedicadas al consumo local, y a través de cultivo *in vitro* (cultivo de tejidos), utilizada en las modernas explotaciones de bananos dedicados a la exportación. El trabajo se inicia con una descripción de las características morfológicas y desarrollo de la planta, una breve descripción de las estructuras de propagación a la que siguen luego dos grandes apartados: Propagación tradicional y micropropagación. En este último apartado se aborda la propagación por organogénesis, mediante la micropropagación tradicional en medios de cultivos semisólidos y más actual por bioreactores y la propagación por embriogénesis somática. Se discute en profundidad los medios de cultivo e iluminación requeridos durante las diferentes fases de propagación por cultivo *in vitro* y se finaliza abordando los aspectos de endurecimiento, aclimatación y trasplante al campo de las plantas propagadas por cultivo de tejidos.

Terminos para indexacion: Musa spp, morfología, desarrollo, cultivo de tejidos, endurecimiento, trasplante al campo.

Banana propagation: traditional techniques. New technologies and innovations

Abstract-The different propagation systems for the banana: conventional or by tissue culture are reviewed. Conventional propagation, mainly using suckers, whole rhizomes or bits are still in use for familiar plantings or in farms for local markets in many tropical countries, while vitroplants are the rule in modern commercial banana cultivation. After examining the main morphological and developmental characteristics of the banana plants and a short description of the structures required for the propagation of bananas two main subjects are examined: conventional propagation and micropropagation. In this last section the different systems of micropropagation; Propagation by organogenesis through conventional propagation in semisolid culture media and the more modern systems of micropropagation by somatic embryogenesis and by bioreactors are discussed with special attention to the culture media and illumination required for the production of tissue culture banana plants. The aspects of hardening, acclimatization and field transplant of vitroplants are discussed at the end.

Index terms: Musa spp, morphology, development, tissue culture, hardening, field transplant.

Corresponding author:
vgalan@gmail.com
herminio.rocha@embrapa.br

Received: September 22, 2017.
Accepted: June 05, 2018.

Copyright: All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License.



¹Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Santa Cruz de Tenerife, Islas Canarias, Espanha. Actually Consultant in Tropical Fruits, E-mail: vgalan@gmail.com

²Coordenação de Assistência Técnica Integral-CATI. Avaré-SP. Brasil. E-mail: antonirangel@hotmail.com

³Laboratório de Biotecnologia. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicais (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara- Cuba. E-mail: lab.cell.biotech@inivit.cu

⁴INVERMIRA SL. Arona, Santa Cruz de Tenerife. España. E-mail: i+d@invermira.com

⁵Centro de Investigaciones – CORBANA. San José, Costa Rica. E-mail: jsandoval@corbana.co.cr

⁶Embrapa Mandioca e Fruticultura - Rua Embrapa S/N - Chapadinha. Cruz das Almas-BA. Brasil. E-mail: herminio.rocha@embrapa.br

Introducción

El material de plantación puede agruparse en dos tipos diferentes: tradicional (fundamentalmente hijos y rizomas o partes del mismo) y procedente de cultivo *in vitro*. El material tradicional es utilizado en plantaciones de tipo familiar o en plantaciones establecidas en gran número de países tropicales dedicadas al consumo local. En las plantaciones comerciales destinadas a la exportación con cultivares del subgrupo Cavendish y en general en las plantaciones modernas de bananos de otros cultivares se utilizan casi exclusivamente plantas procedentes de propagación por cultivo de tejidos (cultivo *in vitro*). De hecho, las plantas de banano procedentes de técnica de cultivo *in vitro* se utilizan comercialmente como material de plantación en diversos países desde 1985 y de forma generalizada y casi exclusiva en las plantaciones de banano de los países subtropicales y mediterráneos. Los elevados costes, que incluyen laboratorios especializados y estructuras de endurecimiento del material previo a la plantación, la necesidad de cuidados extras en la plantación y establecimiento de las plantas en campo y la incidencia de variaciones somaclonales son probablemente la causa de que su uso no se haya generalizado completamente a los países latinoamericanos o del sudeste de Asia pero su utilización es cada vez más frecuente (Robinson y Galán Saúco, 2012). La micropropagación (como también se conoce a la técnica de multiplicación *in vitro*) puede ser realizada, como veremos en esta revisión, a partir de órganos, tejidos y células de la planta donadora del explante, mediante los métodos de regeneración de plantas conocidos por organogénesis y embriogénesis somática (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Características morfológicas y desarrollo de la lanta

La forma del meristema apical no difiere mucho del de muchas otras monocotiledóneas pero sí del de algunas plantas dicotiledóneas (BARKER; STEWARD, 1962). Se encuentra inicialmente situado en el centro del rizoma, ascendiendo a través del seudotallo durante el desarrollo y emisión de la inflorescencia (CHARPENTIER, 1966). Las células del tejido meristemático se caracterizan por tener citoplasma denso, núcleos grandes y nucléolos conspicuos. El meristema apical emite desde muy joven hojas que aparecen en posición helicoidal y que varían su morfología según el estado de desarrollo de la

planta. Inicialmente emergen en forma de espada, sin un limbo desarrollado. Luego aparecen hojas lanceoladas y finalmente las hojas adultas poseen cuatro partes claramente diferenciadas: la lámina o limbo con un apéndice que es una prolongación filiforme, que sufre abscisión poco tiempo después de abrirse la hoja, el seudopécíolo, la vaina y la nervadura central (SKUTCK, 1927, 1930 a-b; CHAMPION; CHARPENTIER, 1970). Las hojas en su estado adulto son oval-oblongas, con el ápice obtuso y con un semi-limbo ligeramente más grande que el otro. Generalmente, el número de hojas totales producidas por una planta antes de iniciarse la fase reproductiva está determinado para cada cultivar. Simmonds (1962) indicó que el patrón filotáxico varía, dependiendo de la edad y del cultivar, desde 1/3, 3/7 hasta 4/9 en plantas adultas. Las vainas foliares son alargadas, sin lígulas, con bordes rectilíneos excepto en sus partes terminales. Las márgenes opuestas de cada vaina no se yuxtaponen. Las hojas más viejas (externas) son rechazadas hacia afuera debido al aumento de volumen ejercido por las más jóvenes en el centro del seudotallo (SIMMONDS, 1962). La función del seudotallo es de sostén y de almacenamiento de reservas hídricas y amiláceas; varía en grosor y tamaño dependiendo del genotipo (SIMMONDS, 1962). Las vainas que conforman al seudotallo presentan estomas adaxial y abaxialmente.

La función principal del rizoma del banano es como órgano de reserva. En el caso de *Musa acuminata* CollaM. *balbisiana* Colla y todos los representantes de ambas especies, se usa este término para referirse al eje bulboso que es erecto, corto, grueso, con entrenudos vestigiales y, que según Simmonds (1962), es de crecimiento monopódico¹. En su parte superior se desarrolla el follaje y en el extremo inferior las raíces adventicias. El rizoma, en su mayor parte, consiste de parénquima, usualmente con abundantes gránulos de almidón. Subra y Guillemot (1961) realizaron un estudio del rizoma y concluyeron que dos zonas son evidentes: la externa o cortical, cuya función es de protección y un cilindro central, del cual se originan las raíces. El meristema apical se localiza en una depresión, encerrada entre las bases foliares circundantes del rizoma (SIMMONDS, 1962). Debajo del punto central de crecimiento existe lo que Skutch (1930, 1932) describió como un “cambium”, aunque este

¹ El verdadero tallo de la planta de la banana es parcial o totalmente subterráneo, y es conocido técnicamente como un rizoma tuberoso. Pese a no tener un crecimiento lateral como la mayoría de los rizomas, dado que los retoños se producen sucesivamente, sí se puede hablar de un pequeño crecimiento horizontal antes de que éstos inicien su crecimiento vertical y emergencia del suelo. Por ello no se puede considerar como un auténtico corno aunque ha habido mucha confusión al respecto ya que ciertos autores han usado libre e incorrectamente el término ‘corno’, mientras que otros han utilizado ambos términos, rizoma y corno, de forma indistinta simplemente intercambiando los términos. Finalmente, para mayor confusión, otros han usado el término ‘bulbo’.

difiere en muchos aspectos de lo que es el “cambium” en plantas dicotiledóneas (FONT QUER, 1985).

Al acercarse a la etapa de la floración, la parte central del rizoma inicia su esclerotización (endurecimiento) desde la base hacia el ápice (sentido acrópeto). En las áreas esclerotizadas se limita entonces la emisión de nuevos retoños y raíces. Sin embargo, son evidentes los hijuelos laterales en la parte media o superior, presentando raíces funcionales (SIMMONDS, 1962). Los hijuelos tienen la capacidad de favorecer nutricionalmente a la planta madre y mantenerse en contacto físico con ella. Los brotes o hijuelos laterales se desarrollan a partir de yemas laterales (TURNER, 1972).

Los entrenudos son muy cortos y consecuentemente el rizoma crece poco en altura. Un rizoma de buen desarrollo puede presentar un diámetro de 25 a 40 cm y un peso de 6,9 a 11,5 kg., dependiendo del cultivar y edad de la planta (STOVER; SIMMONDS, 1987).

Las yemas axilares que dan origen a los brotes no parecen localizarse en la posición clásica de las yemas laterales de otras plantas, sino a 180° de la posición original (FISCHER, 1978). En un estudio detallado Fisher (1978) analizó la brotación lateral de varios cultivares y especies de *Musa* y concluyó que la posición a 180° es una característica del género. Habitualmente, las 2 ó 3 yemas laterales de la parte media o superior del rizoma son las que desarrollan nuevos brotes y, consecuentemente, los brotes tienden a salir cada vez más cerca de la superficie del suelo (Simmonds, 1962).

Existe respuesta diferencial en el número de brotes producidos por planta según el cultivar. Subra y Guillemot (1961) encontraron para el cv. ‘Robusta’ un promedio de 4,0 brotes. En contraste, para el cv. ‘Gran Enana’ el valor promedio fue de 3,4, aunque de Langhe (1961) indica que pueden emerger hasta quince retoños siguiendo un diseño pentagonal. Las yemas del rizoma al brotar crecen inicialmente en forma horizontal, casi perpendicular a la superficie del rizoma; luego tienden a erguirse debido a que el meristema sufre un estímulo geotrópico negativo. Cuando el diámetro de la yema alcanza 6 u 8 cm, la parte basal tiende a redondearse y es evidente una constricción entre el rizoma principal y el renuevo. Si se realiza un corte transversal en este momento se observa la estructura del nuevo tallo, con su cilindro central y su zona cortical. Si se efectúa un corte longitudinal, se observa que el cilindro central del hijo o brote se une directamente al cilindro central del rizoma principal. La zona cortical se adelgaza progresivamente en su extremo superior hasta el punto vegetativo central. De acuerdo con Soto (1985), a los tres meses de edad un hijuelo puede alcanzar una altura aproximada de 50 cm, presentando sus primeras hojas de espada. Después se desarrollan hojas nuevas que poco a poco aumentan de tamaño. El sistema radical, en proceso de formación, puede estar constituido por gran número de raíces.

Se han realizado varios estudios morfológicos del sistema radical de *Musa*, pero se han llevado a cabo pocas investigaciones anatómicas (ACQUARONE, 1930; RIOPEL; STEEVES, 1964; MUELLER; BECHMAN, 1979). Los primeros trabajos anatómicos fueron realizados por Hartman en 1928 y por Acquarone (1930). Las raíces tienen el aspecto de un cordón largo, de color blancuzco cuando son jóvenes pero se tornan de una coloración amarillenta y ligeramente más oscuras conforme se hacen más viejas. Su diámetro, dependiendo del cultivar, puede oscilar entre 5 y 8 mm y a veces llega hasta 10 mm. Su longitud varía entre 3 y 5 metros. Se presentan en grupos de tres o cuatro, originándose a partir del cilindro central. El sistema radical es adventicio. En la mayoría de las publicaciones se hace referencia a las raíces del banano describiéndolas como primarias, secundarias y terciarias. Desde el punto de vista estrictamente botánico, esta apreciación es errónea, sobre todo tratándose de una planta monocotiledónea ya que por definición las raíces primarias y subsiguientes son derivadas de la radícula de un embrión (FONT QUER, 1985). Por tal razón debe recurrirse a la terminología correcta de raíces de primer, segundo y tercer orden (FONT QUER, 1985). Las raíces de primer orden emiten otras de segundo orden con un diámetro de aproximadamente 2 mm. En los extremos de las raíces de segundo orden hay considerable cantidad de pelos absorbentes. Las raíces laterales aparecen 15 a 30 cm detrás del ápice de la raíz de la que se originan (CHAMPION; OLIVIER, 1961). Su diámetro oscila entre 0,5 y 3,5 mm y su longitud varía de 3 a 15 cm. A partir de estas raíces se originan otras menores, de 1 a 4 cm de longitud, que, a su vez, pueden dar origen a raíces laterales aún menores. El número de raíces emitidas durante el ciclo vegetativo de una planta varía con relación al cultivar. En el cv. ‘Gros Michel’ se ha contado hasta 700, y en el cv. ‘Poyo’ entre 300 y 700. A partir de su punto de origen en el rizoma el grosor de las raíces tiende a disminuir (MONNET ; CHARPENTIER, 1965).

Según sugirieron Champion y Olivier (1961) existe interdependencia fisiológica y morfológica entre el hijuelo y la planta madre, debido a que el desarrollo de raíces adventicias se correlaciona con el nivel de auxinas y estos reguladores de crecimiento se sintetizan en las hojas jóvenes. Antes de la floración la planta puede desarrollar más de 400 raíces, de las cuales son funcionales apenas un 17 % del total producido. La formación de raíces disminuye después de la floración. Según estudios realizados por Soto (1985) con el cv. ‘Gran enana’, el 60 al 70 % de las raíces se encuentran en los primeros 30 cm de profundidad. En las plantas de *Musa* establecidas asexualmente todo el sistema radical es adventicio desde el inicio. El origen de las raíces adventicias es endógeno, comenzando cerca de los tejidos vasculares, atravesando todos los tejidos situados

fuera de su punto de origen (CHAMPION; OLIVIER, 1961; CHARLTON, 1982).

Estructuras de propagación

Un vivero de bananos debe instalarse en suelo libre de plagas y patógenos, utilizando material de plantación sano y debe ser regado con agua también sanitariamente limpia. Es muy importante mantenerlo en óptimas condiciones sanitarias, libre de plagas y enfermedades. Su perímetro debe ser vallado de manera que solo sea accesible previo pase por una alfombrilla o zona de desinfección. Todos los materiales, equipos y utensilios deben ser desinfectados y mantenidos en todo momento en el interior del perímetro vallado.

Propagación tradicional

La propagación tradicional se realiza fundamentalmente a través de ‘hijos’ y trozos de rizoma. El término ‘hijo’ hace alusión a un rizoma separado de la planta madre, cuyo punto de crecimiento central da lugar a la nueva planta y en el que todas las yemas axilares han sido eliminadas. Por el contrario, en los trozos de rizoma el punto central de crecimiento ya no existe, bien por tratarse de un rizoma de una planta ya recolectada, donde ya obviamente ha desaparecido, o bien porque ha sido eliminado mecánicamente, permitiendo que una yema axilar se desarrolle para dar lugar a la nueva planta. Estos tipos pueden también variar en tamaño dependiendo de la porción de rizoma que se haya conservado para favorecer el nuevo crecimiento. El material de plantación utilizado tradicionalmente en las Islas Canarias consiste en la totalidad del rizoma con o sin hijos (Fig.1) y recibe el nombre de ‘cabeza’ (GALÁN SAÚCO, 1992).

Los hijos pueden ser bien de pequeño tamaño recién emergidos de la superficie del suelo, hijos grandes de espada con hojas estrechas, seudotallo cónico y grueso rizoma, o ‘hijos de agua’ con hojas anchas, seudotallo estrecho y un rizoma pequeño y estrecho. Los hijos de agua no son vigorosos y no deben utilizarse como material de plantación ya que su conexión con la planta madre es débil, solo poseen una cantidad mínima de sustancias de reserva y tienen un débil potencial de enraizado. Los hijos de espada, por el contrario, tienen una fuerte conexión física y fisiológica con la planta madre y poseen gran cantidad de sustancias de reserva que pueden acelerar el crecimiento. La mayoría de los productores tropicales que usan todavía hijos como material de plantación prefieren utilizar hijos de espada de mayor tamaño que poseen mayores rizomas y que permiten alcanzar un alto porcentaje de establecimiento en campo bajo condiciones de humedad elevada.

Los trozos de rizoma (Fig.2) provienen bien de la división de grandes rizomas de plantas madre ya recolectadas o de pequeños rizomas de plantas en las

que se ha eliminado su yema central para favorecer el crecimiento de una yema lateral. Los rizomas grandes pueden dividirse en varios trozos, cada uno con una yema lateral claramente visible. Los materiales de plantación tradicionales, bien sean trozos de rizoma de 1-2 kg o pequeños hijos, se usan todavía de forma ocasional en los subtrópicos, y se tratan con nematicidas antes de su plantación en campo enterrados bajo la superficie del suelo. No obstante, a lo largo de los últimos 25 años la importancia de los mismos como material de plantación ha ido disminuyendo rápidamente en favor de las plantas de cultivo *in vitro*. Actualmente el uso de estos materiales tradicionales casi ha desaparecido a nivel comercial en Sudáfrica, Taiwán, Israel y las Islas Canarias y lo mismo está ocurriendo en los trópicos. En los países en desarrollo es aún muy frecuente su uso por los agricultores tradicionales debido bien a su acceso limitado a las plantas de cultivo *in vitro* o a las fuentes de financiación para la adquisición de las mismas, lo que lleva asociado numerosos riesgos para estos agricultores especialmente en lo relativo a problemas sanitarios de la planta y del suelo (ROBINSON; GALÁN SAÚCO, 2012).

Hay tres fuentes de abastecimiento para la multiplicación convencional del material de plantación con fines comerciales. Una de ellas es el establecimiento de una zona de vivero destinada a la producción del máximo número de hijos posible por unidad de área. Una segunda posibilidad consiste en permitir en una plantación comercial la producción de un número extra de hijos para su posterior separación cuando se requieran para realizar la plantación y una tercera vía es la obtención de hijos y trozos de rizoma de una plantación que vaya a eliminarse.

La utilización de hijos procedentes de una plantación comercial es una práctica habitual aunque no debe recomendarse pues tiene varias consecuencias perjudiciales ya que se reducen los rendimientos de la plantación (ROBINSON; NEL, 1990) y, además, el proceso de extracción de los hijos causa daños a las plantas de donde proceden y constituye un método sistemático de dispersión de nematodos y patógenos habitantes del suelo. Una fuente más aceptable de material tradicional de plantación es la que se deriva de una plantación vieja que se tiene previsto arrancar. En este caso puede permitirse el crecimiento durante varios meses de todos los hijos antes de su fecha de extracción. Todos estos hijos pueden extraerse sin efectos adversos en el momento en que se necesiten e incluso puede cortarse el rizoma madre en varios ‘trozos’. Sin embargo, en una plantación vieja de este estilo el nivel de nematodos puede ser elevado, por lo que el material de esta procedencia debe ser limpiado cuidadosamente eliminando por medio de un corte las raíces, inspeccionado y sumergido en un nematicida antes de su uso.

Una vez extraído el material de plantación, debe dividirse en grupos de tamaño similar para asegurar

un crecimiento homogéneo del bloque de manera que cada planta pueda obtener el mismo beneficio de la iluminación disponible. En la práctica, sin embargo, rara vez tiene lugar un crecimiento uniforme. Debe evitarse que transcurra mucho tiempo entre la separación del material de plantación del vivero o de la planta madre y su plantación ya que los hijos plantados inmediatamente tras su separación tienen un mejor arraigo, un ciclo más rápido y mayores racimos que los hijos plantados 10 días después de su extracción (PATEL;CHUNDAWAT, 1988).

Para obtener las mejores condiciones fitosanitarias y evitar la infestación de nematodos y la infección con diversas patógenos debe practicarse cortes de limpieza en los rizomas y trozos de rizoma, eliminando también la totalidad de las raíces. Para una mayor precaución los rizomas así preparados pueden ser sumergidos en agua caliente a 53–55°C durante 20 min, pero, incluso siguiendo estas recomendaciones, debe evitarse el movimiento de material de propagación tradicional entre distintas zonas de producción bananera para evitar la posible dispersión de plagas y patógenos como la marchitez por *Fusarium*, el virus del Bunchy top, el nematodo *Radopholus similis* o el picudo o gorgojo del banano, *Cosmopolites sordidus* (ROBINSON ;GALÁN SAÚCO, 2012).

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 a las de la planta donante del explante (GEORGE, 2008). Los primeros trabajos sobre multiplicación *in vitro* de 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; SHII, 1972; 1974; MA et al., 1978). 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 ;KRIKORIAN, 1984; VUYLSTEKE;DE LANGHE, 1985).

El medio de cultivo y las condiciones de incubación, en relación con la iluminación han tenido una influencia directa en el reajuste y optimización de la propagación de plantas *in vitro* de *Musa* spp.

Medios de cultivo

Como norma general, la composición básica de los diferentes medios de cultivo incluye diversas sales minerales, una fuente de carbono, un suplemento vitamínico, la dotación específica de reguladores de

crecimiento que requiera cada fase del proceso y método de micropropagación empleado y, en caso necesario, un agente gelificante que proporcione un soporte físico al material vegetal en cultivo.

Independientemente del método de regeneración de plantas utilizado para la micropropagación, el uso de un medio de cultivo en estado líquido es un aspecto de vital importancia para la automatización de la propagación *in vitro*. Su utilización permite disminuir las manipulaciones a realizar, incrementar los coeficientes de multiplicación y reducir los costos (SLUIS, 2006). Su empleo en agitación mediante el uso de biorreactores para la propagación vía organogénica o embriogénica tiene la posibilidad de producir grandes volúmenes de plantas bajo un sistema computerizado que permite definir los requerimientos para el desarrollo de las células y la regeneración de plantas de una forma más precisa que las técnicas *in vitro* convencionales (AFREEN, 2006).

Entre las distintas formulaciones de sales minerales empleadas en cultivo *in vitro*, destaca la combinación MS propuesta por Murashige y Skoog (1962) por su amplio uso y por su adecuación a la micropropagación de plátanos y bananos (VUYLSTEKE, 1998). Partiendo de esta composición basal de sales en la formulación MS, muchos laboratorios incorporan pequeñas modificaciones basadas en mejoras empíricas adaptadas a requerimientos nutricionales específicos, como pueden ser una mayor necesidad en fósforo y potasio (MARCHAL et al., 1988).

La sacarosa es el azúcar más comúnmente empleado como fuente de carbono, siendo incorporada al medio de cultivo por lo general a una concentración del 3% durante las fases de establecimiento y multiplicación de cultivos. En las fases de enraizamiento y preaclimatización, por el contrario, es una práctica común reducir el contenido en azúcar en el medio de cultivo a valores del 1-2% a fin de favorecer la emisión y el desarrollo de raíces. Por razones económicas, el empleo de azúcares distintos a la sacarosa no es habitual, aunque pueden incluso mejorar el crecimiento de las plantas, como es el caso de la fructosa (MARCHAL et al, 1992).

La composición en vitaminas de la formulación MS suele ser frecuentemente sustituida por otras combinaciones más complejas que generalmente aportan una mayor cantidad de tiamina. De hecho, la tiamina podría no sólo ser la única vitamina necesaria en la micropropagación de plátanos y bananos, sino que incluso aumentando su contenido con respecto a la dotación básica del medio MS (0,1 mg/L) se favorece la multiplicación en *Musa* (SSEKIWOKO et al., 2014), por lo que es frecuente su empleo a dosis variables entre 0,5 y 1 mg/L. Su efecto favorable en el cultivo *in vitro* de platanera en el que aparecen frecuentemente problemas derivados de la oxidación de polifenoles pudiera estar relacionado con la capacidad que esta vitamina proporciona a las plantas para tolerar el estrés oxidativo (TUNC-OZDEMIR et al.,

2009). A fin de reducir aún más el efecto adverso de estos derivados fenólicos, es igualmente frecuente incorporar compuestos antioxidantes al medio de cultivo.

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo resulta indispensable en la micropropagación comercial de *Musa*, modulando el tipo de respuesta biológica que determinará el crecimiento de células y tejidos. El principal efecto que se persigue en la propagación por la vía de la organogénesis es la regulación de la dominancia apical y el control de la emisión de raíces. Por el contrario, en el caso de las rutas embriogénicas los reguladores de crecimiento juegan un papel primordial en la dediferenciación y rediferenciación celular.

Si bien la composición de los medios de cultivos puede considerarse relativamente estándar, o en cualquier caso incluir pequeñas modificaciones, quizás uno de los aspectos más novedosos en cuanto a las técnicas de micropropagación de *Musa* sea la inoculación de microorganismos durante las fases de cultivo *in vitro*. Han sido estudiados y son conocidos los efectos beneficiosos de distintos microorganismos endógenos y colonizadores de la rizosfera de plátanos y bananos, generalmente aplicados como inoculantes en las fases de aclimatación y endurecimiento *ex vitro* de plantas producidas *in vitro*. Varios autores (PANIGRAHI et al., 2016; SUADA et al., 2015; KOFFI; DECLERCK 2015) recomiendan adelantar la inoculación a la fase *in vitro*, realizando la micorrización de plantas de banano durante la micropropagación, estudiando su efecto sobre distintos parámetros durante la fase de aclimatación. Las mejoras obtenidas en cuanto a la calidad de las plantas durante las primeras fases *ex vitro* abren nuevas posibilidades para el cocultivo *in vitro* de *Musa* con diferentes microorganismos, frente a los métodos de cultivo axénicos convencionales empleados hasta la fecha.

Efecto de los tipos de luz sobre el desarrollo de las plantas *in vitro*

La intensidad luminosa puede tener un efecto pronunciado sobre el desarrollo foliar modificando características tales como el espesor de las hojas, la diferenciación del mesofilo, la división celular o el desarrollo de los estomas (LICHTENTHALER et al., 1981; TERRY et al., 1983, citados por LEE et al., 1988).

Las condiciones de incubación en relación con la iluminación juegan un papel fundamental en el reajuste u optimización de la propagación de plantas *in vitro*. La utilización de lámparas fluorescentes blancas se cita como fuente de luz utilizada en el 90% de los trabajos de investigación en cultivo de tejidos de plantas, (DOOLEY, 1991). Existen en la literatura científica pocos trabajos sobre los efectos de la iluminación sobre la micropropagación de plátanos y bananos. pero la mayor parte de la producción *in vitro* de *Musa* se

lleva actualmente a cabo de forma convencional bajo condiciones prácticamente universales de iluminación artificial en cámaras de cultivo que distan mucho del entorno natural para estas especies. Como norma generalizada, se han venido empleando tubos fluorescentes de luz blanca fría para proporcionar radiaciones lumínicas del orden de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VUYLSTEKE, 1989) con fotoperíodos que varían entre 12 y 16 horas de luz. Una excepción al modelo más o menos estándar de iluminación fluorescente es el adoptado en Cuba en los laboratorios comerciales para propagación de plantas (denominados biofábricas), donde se aprovecha la luz natural mediante amplias superficies acristaladas y claraboyas en el techo. Su empleo en el caso del banano propició aumentar hasta un 10,8 % el coeficiente de multiplicación y permitió reducir los costos de producción en un 3,0 % (PÉREZ et al., 2000).

Los costes de iluminación, principalmente de las salas de crecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos suponen el 65% del gasto total de electricidad (STANDAERT DE METSENAERE, 1991) y constituyen uno de los más elevados componentes del coste total de producción con excepción de los de mano de obra (DOOLEY, 1991). Kodym y Zapata-Arias, (1999) estudiaron las ventajas potenciales de la utilización de luz solar sobre la luz artificial para el cultivo *in vitro* de plantas de banano de 'Gran Enana', y los efectos de las fluctuaciones de temperaturas, del fotoperiodo y de la intensidad luminosa en las tasas de multiplicación y en la calidad de las plantas obtenidas. En un ensayo con tres ambientes diferentes de cultivo *in vitro*, cámara de crecimiento con luz artificial y temperatura controlada, sala de crecimiento con luz natural sin control de temperatura y vivero de aclimatación con luz natural, también sin control de temperatura, se puso de manifiesto que se obtuvieron las mayores tasas de multiplicación bajo condiciones de luz natural en vivero de aclimatación, obteniéndose plantas verdes claras con mayor área foliar y sistemas radicales más vigorosos que bajo luz artificial, observándose bajo luz artificial fenómenos de quema de hojas y pérdida de turgor. Como conclusión de su estudio, estos dos autores indicaron que la estructura ideal para un laboratorio de micropropagación vegetal estaría compuesta por salas de crecimiento con luz natural, posibilitando condiciones elevadas de higiene, similares a los de una cámara de crecimiento.

Debe señalarse que, a pesar de la influencia positiva de la luz natural sobre las tasas de multiplicación, existe una gran dificultad para mantener una uniformidad de intensidad de la luz solar a lo largo del día y también durante las diferentes épocas del año. De hecho, las elevadas incidencias solares durante las horas más calurosas del día pueden fácilmente ocasionar temperaturas superiores a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ provocando la muerte de todos los explantes en el interior de los frascos de cultivo. Por ello, la aplicación

de una etapa fotoautotrófica debe estar condicionada al seguimiento diario de las condiciones solares, permitiendo cuando sea preciso maniobras rápidas de sombreado y control de temperatura para la preservación de la integridad de todos los explantes. Por otra parte, la condición fotoautotrófica presupone la absorción de CO₂ externo para la promoción de la actividad fotosintética y la consiguiente generación de cadenas carbónicas en los tejidos de las plantas, lo que hace necesario el uso de frascos de cultivo con tapas que promuevan intercambios gaseosos, sin incurrir en la contaminación de los medios de cultivo.

En el caso de iluminación LED, la mayor parte de la investigación sobre distintos aspectos de la micropropagación y el cultivo de tejidos se ha desarrollado en especies ornamentales, siendo muy limitados los estudios publicados para el caso de bananos y plátanos. (WILKEN *et al.*, 2014; DO NASCIMENTO VIEIRA *et al.*, 2015), pero puede decirse, como norma general en horticultura, que un incremento en la proporción de luz azul tiene un efecto sobre el acortamiento del tamaño de las plantas y consecuentemente provoca un crecimiento más compacto (WOLLAEGGER, 2014). Esto hace que el uso de la luz azul resulte beneficioso desde el punto de vista de la propagación *in vitro*, especialmente en la multiplicación de bananos y plátanos en sistemas de cultivo en medio líquido, incluyendo el uso de biorreactores de inmersión temporal, en los que un excesivo crecimiento de los brotes puede suponer una limitación (Albany *et al.*, 2005). Por otro lado, también parece probable que pueda existir un máximo en la proporción de luz azul para cada especie, a partir del cual pueda inhibir tanto el crecimiento *in vitro*, como el posterior desarrollo de las plantas (MITCHELL *et al.*, 2015). Por todo ello, a la hora de optar por el uso de iluminación LED como fuente de luz en micropropagación de bananos y plátanos resulta de gran importancia definir, para cada fase de cultivo, la combinación óptima de calidad (rangos de longitudes de onda) y cantidad (niveles de radiación luminosa relativa dentro de cada uno de estos rangos) de luz a emplear.

Efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de las plantas *in vitro*

Kozai (1991) señaló como razón fundamental para los elevados costes de producción de la micropropagación convencional la utilización de sacarosa en el medio de cultivo. La presencia de sacarosa inhibe la formación de clorofila y por tanto la actividad fotosintética retrasando el crecimiento autotrófico, además de favorecer el crecimiento heterotrófico de hongos y bacterias e incluso en algunos casos provocando altos porcentajes de mortalidad durante la fase de aclimatación (George, 1993), Por ello, debe preferirse, en principio, un medio de cultivo desprovisto de la misma, lo que a su vez según

Debergh (1988) permite la utilización de recipientes de mayor tamaño que los convencionalmente usados para cultivo de tejidos con pocos riesgos de contaminación, resultando en una economía de mano de obra (KOZAI ; IWANAMI, 1988). No obstante, la eliminación total de sacarosa del medio de cultivo no es aconsejable en todos los casos. Así, Fuentes *et al.* (2005) indican que si bien el uso de sacarosa durante la fase de multiplicación *in vitro* induce algunos desórdenes fisiológicos en los explantes, la sacarosa eleva las tasas de supervivencia tras el trasplante a los viveros de aclimatación debido al aporte de carbohidratos demandados como fuente de carbono por las células vegetales, lo que hace que la sacarosa contribuya como suplemento de energía favoreciendo el crecimiento y el proceso de biosíntesis de compuestos esenciales e influyendo de forma positiva en el enraizamiento *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2011). De hecho, las concentraciones de 2 a 4% (p/v) son usualmente las más empleadas en los medios de cultivo. Por debajo del 2% puede aparecer clorosis y por encima del 4% puede incurrirse en problemas de excesivo potencial osmótico del medio, posibilitando la degradación de los tejidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Efecto de la combinación de sacarosa e iluminación

La combinación de esos dos factores, luz natural con una reducción de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, permite la transferencia de un metabolismo heterotrófico a otro autotrófico sin mayores perjuicios para la calidad de los materiales *in vitro*, además de proporcionar una significativa economía financiera. Con todo, se sabe que la renovación de la concentración de CO₂ en el interior de los frascos de cultivo bajo condiciones de luz natural y la eliminación o reducción de la concentración de sacarosa es la condición necesaria para el establecimiento de un ambiente fotoautotrófico. El gran desafío, en este caso, consiste en permitir el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior los frascos sin incurrir en contaminación (XIAO *et al.*, 2010). Las condiciones fotoautotróficas deben ser proporcionadas en la fase de enraizamiento/endurecimiento de los explantes de plantas de bananos, que deben ser realizadas en una sala de crecimiento con luz natural en frascos con tapas con alguna permeabilidad que permitan el intercambio gaseoso con el ambiente externo. Pese a lo expuesto, Rocha *et al.* (2007) observaron como condición ideal para la fase de multiplicación *in vitro* de bananos 'Prata Anã' un régimen de luz artificial, con un suplemento de 30 g L⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo. Como contrapartida señalan que la fase de enraizamiento/endurecimiento *in vitro* debe ser conducida también bajo luz natural (Fig. 5), pero con un suplemento de apenas 15 g L⁻¹ de sacarosa al medio de cultivo.

Métodos de regeneración de plantas

En la actualidad la multiplicación *in vitro* es considerada como una técnica rutinaria debido a las habilidades alcanzadas en el manejo de los materiales *in vitro* y el conocimiento del cultivo. 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 por organogénesis y embriogénesis somática (GEORGE; DEBERGH, 2008).

La organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido materno. La organogénesis directa es una tecnología relativamente simple y bien conocida, que se realiza a partir de la multiplicación de yemas, ápices o meristemas, más ampliamente utilizada para la propagación comercial (HU; WANG, 1983), razón por la cual varios autores le han aplicado el término de “micropropagación convencional” (ORELLANA, 1998).

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 (MERKLE et al., 1995). 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 (LITZ; JARRET, 1991; 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 se cita el desarrollo de la embriogénesis somática en un número relativamente amplio de especies (TISSERAT et al., 1979; KRISHNARAJ ; VASIL, 1995), 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).

Propagación por organogénesis

Los bananos son propagados mediante organogénesis a través de cinco etapas bien definidas:

Fase 0 o Fase 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 de las nuevas plantas. 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 patógenos (VUYLSTEKE, 1989; ISRAELÍ et al., 1995; SINGH et al., 2011). El empleo de brotes procedentes de secciones de rizomas de pregerminadores con sustrato estéril y desinfectados químicamente favorece la supervivencia *in vitro* de los ápices y disminuye notablemente el número de ápices contaminados, además de reducirse el tiempo requerido para su establecimiento (ORELLANA, 1994). Por ello, el material a utilizar para el establecimiento *in vitro* debe ser transferido 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 serán introducidos al laboratorio.

Fase I o Fase 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 que influye en la desinfección y en el crecimiento y desarrollo del mismo (regeneración de plantas). Cuanto menor tamaño tiene el explante menor es el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas (VILLALOBOS, 1982). Israelí et al. (1995) consideran 0,5 cm como el tamaño más apropiado del explante para garantizar un proceso de propagación eficiente. Para su realización primeramente se toman los materiales provenientes de la fase anterior, eliminándose 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 y procediéndose luego a la desinfección de los explantes.

Fase II o Fase de multiplicación. El objetivo de esta fase es la multiplicación de propágulos a partir de los ápices vegetativos establecidos *in vitro*, la 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 viene dado por la

manipulación de los mismos, sobre lo cual se han descrito cuatro procedimientos para los plátanos y bananos: (i) decapitado de los ápices vegetativos (MA; SHII, 1972; HWANG et al., 1984), (ii) realización de varios cortes verticales en el domo meristemático (JARRET et al., 1985), (iii) corte vertical del ápice vegetativo en dos o cuatro partes a través del ápice (DE GUZMAN et al., 1980) y (iv) obtención ápices vegetativos intactos (VUYLSTEKE; DE LANGHE, 1985; BANERJEE et al., 1986).

Fase III o Fase de enraizamiento. Su objetivo es preparar las plántulas para su aclimatación posterior. En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen en laboratorio hasta formar plantas completas con sistema radical que les permite ser trasplantadas a condiciones de vivero o invernadero durante 7-10 semanas (CRONAUER ; KRIKORIAN, 1984; VUYLSTEKE ; DE LANGHE, 1985).

Fase IV o de aclimatación.

Durante la fase de aclimatación de las plantas precedida por un período medio de 8 a 10 meses de intensa actividad metabólica bajo condiciones *in vitro* debe emplearse el mayor criterio técnico en el cuidado de las mismas. Las tiernas plantas procedentes del ambiente estéril del laboratorio deben ser endurecidas con extremo cuidado regulando al máximo las condiciones ambientales (luz, agua, temperatura, humedad y viento) antes de su transferencia a un vivero sombreado. El procedimiento de endurecimiento y aclimatación ha sido descrito en profundidad por Robinson y Galán Saúco (2009b), aunque resumimos a continuación algunos detalles del mismo.

El lugar de endurecimiento puede ser un invernadero normal con cubierta de polietileno y con una doble puerta de entrada por razones higiénicas y debe evitarse temperaturas por debajo de 13°C o por encima de 35°C, por lo que debe contar si fuera necesario con un sistema de nebulización, y un sistema de enfriamiento (*cooling system*). Durante la multiplicación *in vitro*, los explantes 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. Las plantas producidas por cultivo *in vitro* están expuestas desde el inicio de su producción a microambientes seleccionados para lograr óptimas condiciones de desarrollo creciendo dentro de frascos de cultivo (fig.3) bajo condiciones asépticas y con reducida intensidad luminosa, en un medio de cultivo conteniendo sacarosa y nutrientes en cantidad suficiente para promover un crecimiento heterotrófico, dando lugar a un fenotipo caracterizado por una conformación anatómica de limbos foliares más frágiles que los encontrados en condiciones naturales (PREECE; SUTTER, 1991). Estos factores dificultan en gran manera la transferencia de las plantas del ambiente *in vitro* (sala de crecimiento) a las condiciones naturales más adversas del vivero de

aclimatación y endurecimiento. Por ello, debe aplicarse estrategias de aclimatación y endurecimiento desde las fases finales del cultivo *in vitro* (enraizamiento) de forma que puedan aumentarse las tasas de supervivencia. Una vez separadas cuidadosamente las plantas del medio de agar en el que normalmente se encuentran en los frascos de laboratorio deben lavarse, eliminar todas las raicillas y sumergirlas en un fungicida apropiado antes de su plantación en el sustrato. El sustrato más usado durante la fase de endurecimiento/aclimatación es musgo de turba, musgo de sphagnum o similar con 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. Durante el proceso de endurecimiento/aclimatación las plantas deben mantenerse adecuadamente fertilizadas siguiendo un programa, preferentemente de lenta liberación de fertilizantes, diseñado por un experto en nutrición.

Durante el período de aclimatación que dura entre 1 a 4 semanas se induce la transferencia del metabolismo heterotrófico 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 (SMITH et al. 1986). La fase de aclimatación se realiza normalmente en invernadero bajo condiciones ambientales de baja humedad relativa, alta intensidad lumínica, crecimiento autotrófico y ambiente aséptico. Las plantas micropropagadas (fig.4) poseen hojas de menor grosor que las producidas por medios tradicionales y se asemejan a las plantas de sombra, por el hecho de haber sido expuestas a bajos niveles de luminosidad y cuando se someten condiciones de alta intensidad lumínica pueden sufrir clorosis y quemadura de hojas. Por ello, algunos laboratorios elevan la intensidad lumínica durante la fase de enraizamiento *in vitro* para aumentar la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación (GRIFFIS et al., 1993, citado por PREECE Y SUTTER, 1991). De igual manera, el aumento de la irradiación durante la fase de enraizamiento puede contribuir a la reducción de las pérdidas, tornándose menos frágiles cuando se trasladan del ambiente *in vitro* al ambiente *ex vitro* (CAPELLADES et al., 1990).

Micropropagación en biorreactores

Los biorreactores, entendidos como complejos recipientes de cultivo que permiten un control preciso de parámetros físicos y químicos del medio, fueron originalmente desarrollados para el cultivo de microorganismos. Aunque no estrictamente correcto desde el punto de vista técnico, el término “biorreactor” se encuentra ampliamente difundido en el ámbito de la micropropagación, donde hace referencia al uso de medios líquidos en recipientes de cultivo semiautomatizados para

intensificar la producción de propágulos. De entre las distintas variantes o soluciones en cuanto a la renovación o no del medio de cultivo y a la inmersión total o parcial del material vegetal, la más empleada en plátanos y bananos es la inmersión temporal mediante sistemas semiautomáticos (GEORGIEV et al., 2014), y dentro de ésta la inmersión total por circulación forzada y sin renovación del medio de cultivo mediante circuito de aire a presión, lo que permite además la renovación completa de la atmósfera de cultivo (BERTHOULY; ETIENNE, 2005). Con esta base de funcionamiento existen varios diseños, entre los que destacan el Recipiente de Inmersión Temporal Automático RITA (ALVARD et al., 1993), con la variante comercial de diseño Plantform (WELANDER et al., 2014), y el Biorreactor de Inmersión Temporal BIT (ESCALONA et al., 1999), con su correspondiente versión comercial SETIS (VERVIT, 2015).

Entre los distintos parámetros que juegan un papel destacado a la hora de establecer un protocolo eficiente de propagación para los distintos genotipos de *Musa*, se encuentran los tiempos de inmersión, la frecuencia de las inmersiones, el volumen de medio líquido, el volumen total del recipiente o el número de explantes a emplear como inóculo (Tabla 1).

Igualmente, la ventilación forzada es quizás uno de los aspectos con mayor influencia en el crecimiento y la calidad final de las plantas obtenidas. En un estudio reciente, Aragón *et al.*, (2014) comparan el efecto sobre la calidad de las plantas durante la fase *in vitro* y en la aclimatación de la propagación de plátano en BITs con el cultivo convencional en medio sólido. Entre las mejoras obtenidas en los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), destacan la obtención de mejores brotes en cuanto a talla, peso y sistema radical. Además se incrementa la actividad fotosintética y disminuye la respiración celular, lo que resulta en una mayor acumulación de almidón en las hojas. Esto, unido a una mejor regulación estomática, confiere a las plantas producidas en SIT mayor capacidad de supervivencia en la fase de aclimatación. En parte estas mejoras son atribuibles al efecto de la renovación cíclica de la atmósfera de cultivo en los BITs y la consiguiente eliminación de compuestos volátiles como el etileno (ROELS et al., 2006). Wilken et al., (2014) llegaron a conclusiones similares al comparar dos sistemas de inmersión temporal con diferencias, entre otras, en la capacidad de renovación del aire en los recipientes. Al reducir la frecuencia de renovación, disminuyó la biomasa producida y la tasa de multiplicación de brotes de banano 'Gran Enana'. Además de favorecer la ventilación de los cultivos, los SIT permiten adaptaciones para realizar la renovación de la atmósfera con aportes extra de aire enriquecido en CO₂, favoreciendo así la actividad fotosintética, el desarrollo general de las plantas y su adaptabilidad a condiciones *ex vitro* (ARAGÓN et al., 2010). En cualquier caso, la aplicación de SIT no

constituye un sistema único de cultivo, debiendo ser complementado con el uso convencional de medios sólidos, semisólidos o líquidos en fases previas (establecimiento del material, multiplicación inicial de brotes) o posteriores (enraizamiento) del proceso de micropropagación.

González (2005) propone dos rutas alternativas de propagación de banano empleando biorreactores y SIT en combinación con embriogénesis somática para la multiplicación y/o germinación de embriones. En cuanto a la germinación de embriones y atendiendo a publicaciones recientes, Korneva et al., (2013) lograron una frecuencia de conversión de plantas de plátano del 84,5% a partir de embriones somáticos mediante inmersión temporal en BITs. Por otro lado, utilizando inmersión temporal en recipientes RITA, López (2015) obtuvo un 70,6% de germinación de embriones somáticos de plátano. Más allá de las posibles diferencias en cuanto a genotipos o técnicas de cultivo empleadas en cada caso, estos valores no parecen variar sustancialmente con respecto a los primeros datos sobre germinación de embriones somáticos de *Musa* spp. en inmersión temporal, publicados hace ya más de dos décadas por Escalant et al., (1994). Aunque la ruta embriogénica en inmersión temporal resulte factible para la micropropagación de plátanos y bananos, la falta de aplicación rutinaria y comercial permanece sujeta a las limitaciones propias del desarrollo de cultivos embriogénicos de calidad (SCHOOFS et al., 1999). La multiplicación de brotes en SIT es, por el contrario, más fácilmente utilizable en la micropropagación de *Musa* por vía organogénica y ha suscitado mayor interés en los últimos años.

Propagación por embriogénesis somática

El uso de la embriogénesis somática en cultivares comestibles de bananos y plátanos está basado en las metodologías desarrolladas a partir de los explantes de flores masculinas (MA, 1991; ESCALANT et al., 1994) y meristemos proliferantes (scalps en inglés) (DHED'A et al., 1991; SCHOOFS, 1997). 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 un mayor riesgo de variación somaclonal en comparación con las plantas propagadas por ápices meristemáticos (STROSSE et al., 2003). Hay autores, sin embargo, que hacen referencia a su posible aplicación en la propagación masiva (SUÁREZ-CASTELLÁ et al., 2012; ORELLANA et al., 2010; LÓPEZ et al., 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se desarrolló una nueva metodología de regeneración de plantas por embriogénesis somática a partir de de domos

meristemáticos de ápices de brotes de yemas axilares que facilitó la propagación del cultivar 'Navolean' (AAB), con buena estabilidad genética de las plantas regeneradas durante dos ciclos de cosecha en campo (LÓPEZ et al., 2005; LÓPEZ, 2007). A partir de estos resultados se aplicó la metodología desarrollada a otros cultivares pertenecientes al grupo AAB, ('CEMSA ¾' e 'INIVIT PV-06-30') (López et al., (2013) a nivel de biofábricas (laboratorios comerciales), como una alternativa para la propagación de plantas que pudiera 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 maduros se transfirieron en placas Petri a cinco biofábricas en Cuba donde se realizó la germinación de los embriones somáticos y la aclimatación de las plantas obtenidas. La evaluación posterior de las plantas en campo en diferentes entidades productivas demostraron la buena estabilidad genética de las plantas regeneradas (1,1% de variación somaclonal) (LÓPEZ et al., 2013). De forma similar la producción 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' (ORELLANA et al., 2010; SUÁREZ-CASTELLÁ et al., 2012).

Sin embargo, aun cuando se han obtenido resultados alentadores durante la transferencia de este método de propagación de plantas por embriogénesis somática, se requiere de un gran número de trabajos de investigaciones básicas antes de llevarlo a la rutina de la producción práctica al nivel en que se encuentra la micropropagación por organogénesis (KOSKY, 1998). No obstante, su uso en la propagación masiva de plantas constituye un reto importante para biotecnólogos y productores en general.

Consideraciones finales

Una vez transcurrida la fase de endurecimiento los frascos deben ser transferidos para la fase de aclimatación, sembrando las plantas en bandejas conteniendo un sustrato vegetal totalmente libre de plagas y patógenos tales como *Rhizoctonia*; *Pythium*; *Phytophthora* y nematodos. Los sustratos a base de fibra de coco han demostrado permitir un excelente vigor y rápido desarrollo de las plantas, en viveros con sombreado inicial de hasta un 70% durante los primeros 15 días, dotados de sistema de riego con nebulización que permita disponer durante esa fase inicial del mantenimiento de una capa de agua sobre las hojas de las plantas evitando así su desecación. Transcurridos los primeros quince días, el sombreado debe ser reducido al 50% e incluso exponer al final las plantas a plena luz antes de proceder a su traslado al vivero y disminuir la aportación de agua a las hojas para evitar la incidencia de antracnosis. Las bolsas utilizadas

para el trasplante deben ser escogidas en función de la facilidad de transporte de las plantas, la disponibilidad de sustrato y la opción de los compradores por adquirir plantas ya listas para su plantación en campo o plantas ya preaclimatadas, que necesiten concluir su aclimatación en los lugares de plantación (fig. 5). Es también importante que la conductividad del agua sea menor de 30 mS m⁻¹ y la concentración de sales solubles totales inferior a 250 mg l⁻¹, siendo ideal que la temperatura se mantenga entre 25 y 32°C durante toda la fase de endurecimiento. La humedad relativa debe mantenerse al 90% durante la 1ª semana y luego entre 50 y 90% durante el resto de esta fase (ROBINSON; GALÁN SAÚCO, 2009).

Las plantas micropropagadas presentan hojas con aspectos anatómicos y fisiológicos distintos de las plantas propagadas de forma convencional, tales como una reducida diferenciación del mesofilo 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. Estas 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 o en viveros de endurecimiento (PREECE ;SUTTER, 1991). 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 aclimatación (BRAINERD et al, 1981; GROUT Y ASTON, 1978; WETZSTEIN ; SOMMER, 1983; PIERIK 1990). Es por ello que durante la fase de endurecimiento, cuya duración no debe estar entre 45 y 60 días, debe reducirse la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, permitiendo así la inducción del paso del metabolismo heterotrófico para el autotrófico, con la formación de nuevas hojas más endurecidas y adaptadas al ambiente externo.

Dado que la densidad estomática está claramente afectada por la intensidad luminosa, diversos trabajos han demostrado que bajo condiciones de alta irradiación, la frecuencia de estomas por unidad de área superficial de la hoja es mayor (BJORKMAN; HOLMGREN, 1963; EVANS, 1973; BOARDMAN, 1977; ASHTON; TURNER, 1979; MEDRI; LLERAS, 1980). Rocha et al., (2007) indican que la relación de las medidas de los diámetros medios polares sobre los diámetros medios ecuatoriales de los estomas debe ser utilizada como forma de evaluación de la funcionalidad de los mismos. Cuanto mayor sea dicha relación, mayor es la funcionalidad de los estomas que con sus eficientes mecanismos de apertura

y cierre permiten evitar la desecación de los tejidos, especialmente bajo condiciones de fuerte estrés hídrico.

Endurecimiento final y selección de plántulas en vivero

Al igual que durante la fase de aclimatación, las jóvenes plantas deben ser protegidas de cualquier tipo de estrés hasta su endurecimiento satisfactorio para lo que deben colocarse en un vivero consistente en una sólida estructura bajo malla de polipropileno de al menos 3m de altura donde las plantas deberán permanecer hasta que alcancen al menos 25-30 cm de altura, momento en que están ya disponibles para su trasplante al campo, lo que usualmente toma un tiempo de unas 6-12 semanas dependiendo del estado inicial de las plantitas procedentes de la fase de aclimatación, de las condiciones ambientales y culturales, así como del tamaño en el que se decida realizar la plantación.

Las características constructivas y las dimensiones del vivero así como el procedimiento de endurecimiento y selección de plantas, incluyendo los medios de cultivo y el manejo agronómico del mismo, ha sido descrito en profundidad por Robinson y Galán Saúco (2009a), aunque se resumen a continuación algunos detalles del mismo. Es evidente que lo ideal sería disponer de un invernadero de cristal con control total del ambiente (fig.6) pero si el coste fuera excesivo pueden utilizarse invernaderos de malla. En ese caso la malla de la cubierta del vivero debe ser blanca (para reflejar el calor en lugares calientes) o negra (para absorber calor) en lugares fríos. Las características de la misma deben ser tales que aseguren no más de un 50% de sombreado a nivel del suelo. Aparte de las medidas sanitarias que eviten problemas fitopatológicos descritas en el trabajo reseñado, es muy importante que el vivero se encuentre alejado al menos 1 km de plantas de *Cucurbitaceae* como protección frente a áfidos transmisores del virus del mosaico del pepino

Aunque algunos viveros llegan a utilizar una densidad de 25 plantas m⁻² es deseable que la densidad de las plantas no sea superior a 12 plantas m⁻² para evitar problemas de competencia entre plantas causantes de fenómenos de elongación, ahilamiento y caída prematura de hojas así como para facilitar la eliminación de plantas fuera de tipo. Es también de gran importancia haber realizado separación de las plantas a la llegada al vivero de acuerdo a su tamaño.

Durante todo el proceso es muy importante mantener un aporte adecuado de agua a través de un sistema que permita no solo la llegada de agua al medio de propagación de las bolsas sino también que permita humedecer las hojas en momentos de elevada temperatura. Al igual que en la fase de aclimatación, durante el proceso de endurecimiento y selección las plantas deben mantenerse adecuadamente fertilizadas siguiendo un programa, preferentemente de lenta liberación de fertilizantes, diseñado por un experto en nutrición.

La eliminación de los posibles mutantes, plantas

débiles y/o fuera de tipo, operación que debe realizarse antes del trasplante a campo, es de especial relevancia en esta fase. Las mutaciones más comunes han sido descritas para los tipos Cavendish por Israeli et al., (1988), 1995; Daniells y Smith, (1991); Daniells et al., (1999) y consisten en:

- 1) Mosaico y variegada; 2) Masada, 3) Hojas estrechas y deformadas; 4) Hojas de tipo coriáceo; 5) Pérdida del pigmento rojo antocianico de las hojas y 5) Mutante enano.

Plantación en campo

Para obtener los mejores resultados es imprescindible que tanto la preparación del terreno como el procedimiento de plantación se ejecuten de forma correcta. Ambos han sido descritos en profundidad por Galán Saúco y Robinson (2010) y son suficientemente conocidos por los productores modernos de bananos y similares a los generalmente utilizados para diversos cultivos aunque resumimos a continuación algunos detalles relevantes del mismo para el caso del banano. Se debe elegir el mejor suelo (profundo, fértil, sin excesiva pendiente y con buen drenaje). Se debe evitar en lo posible volver a plantar bananos en terrenos previamente plantados con bananos salvo que se haya practicado rotación de cultivos. En las plantaciones de los subtrópicos debe realizarse la plantación en el momento en que las temperaturas sean las mejores para el banano, lo que coincide con primavera tardía o comienzos del verano, y el trasplante a campo debe hacerse a primeras horas de la mañana o cuando el tiempo esté nublado evitando los días o momentos de excesivo calor.

La plantación en campo de plantas con una altura entre 30– 60 cm de parte aérea y con una media de 5 hojas jóvenes completamente expandidas y una hoja 'cigarro' en activo desarrollo (Fig. 6) debe realizarse en surcos con un abundante aporte de materia orgánica y un suplemento a base de fósforo establecido de acuerdo con las características del suelo. La plantación debe dotarse de un sistema de riego preferentemente de microaspersión, permitiendo así el rápido desarrollo de las plantas provistas ya de un abundante sistema radical. Durante el mes siguiente a la plantación debe humedecerse la superficie del suelo y las hojas al menos dos veces al día durante 15 minutos, especialmente en días calurosos, y optimizar las técnicas culturales y en particular al riego durante los tres primeros meses tras el trasplante al campo. Si no fuera posible la instalación de un sistema de riego debe realizarse la plantación al inicio de la estación de lluvias para evitar o disminuir así el riesgo de pérdida de plantas por desecación. En el caso de la adquisición de plantas preaclimatadas para la posterior finalización de su aclimatación en la plantación será necesario colocar las mismas en bolsas plásticas de aproximadamente 18 x 25cm, conteniendo sustrato vegetal igualmente libre de plagas y patógenos, situarlas bajo sombra y mantener sus

hojas mojadas de forma constante durante los primeros 10 días para facilitar su adaptación a las nuevas condiciones climáticas y evitar quemaduras e incluso la pérdida de las mismas si las condiciones de temperatura fueran demasiado elevadas .

Existen más de 40 especies vegetales hospederas del virus del mosaico del pepino (CMV), del Virus del mosaico estriado (BSV), y del virus del mosaico de la bráctea (BBrMV) que se comportan como plantas competidoras del banano particularmente gran número de ellas dentro de la familia de las cucurbitáceas, por lo que las plantas deben ser plantadas en áreas bajo riego,

mantenidas limpias de malas hierbas o potenciales plantas competidoras al menos durante los primeros seis meses de desarrollo, ya que en esa fase inicial la aún tierna constitución de los tejidos foliares es una fuente de atracción para los áfidos transmisores de estos virus.

Señalemos por último que la selección de hijos es muy crítica y de especial relevancia en el caso de las plantas de cultivo *in vitro* que producen gran número de hijos. Durante los 3 primeros meses estos hijos deben cortarse pero no arrancarse o destruirse para evitar dañar el rizoma de la planta y efectuar posteriormente la selección del retoño sucesor transcurrido un periodo de 4 a 8 meses tras

la plantación entre los nuevos hijos que emergen entre los previamente cortados.

Tabla 1- Parámetros importantes para el establecimiento de un protocolo eficiente de propagación de distintos cultivares .

Publicación	Cultivar	Grupo	Biorreactor	Vol recipiente	Vol medio	Vol noculo	Tiempo inm	Nº inm/día
Aragon et al 2006	CEMSA 3/4	AAB	BIT	250 mL	100 mL	10		
Aragon et al 2010b	CEMSA 3/4	AAB	BIT	250 mL	50 mL	5		
Aragon et al 2010a	CEMSA 3/4	AAB	BIT	?	200 mL	5	4 min	9
Aragon et al 2014	CEMSA 3/4	AAB	BIT		150 mL	5	4 min	9
Pérez et al 2012	FHIA 18	AAAB	BIT	10 L	2,8 L	70	10 min	8
Pérez et al 2013	INIVITPV2011AAB	AAB	BIT	10 L	3,6 L	60	10 min	8
Castro et al 2002	Williams	AAA	BIT	5 L	500 mL	15	3 min	4
Cejas et al 2011	CEMSA 3/4	AAB	BIT	1 L	150 mL	5	4 min	8
Colmenares y Giménez 2003	Williams	AAA	RITA	500 mL		3	2-20 min	
Colmenares y Giménez 2007	Hartón Gig	AAB	RITA	500 mL				
Escalona et al 2003	CEMSA 3/4	AAB	BIT	250 mL		5	4 min	8
Giménez y Colmenares 2004	Williams	AAA	BIT	500 mL		3	2 min	4
Matsumoto y Brandao 2002	Maca	AAB	BIT	5 L + 10 L	2 L	65	4 min	6
Lemos et al 2001	Terra	AAB?	BIT	3 L	1 L	40	10 min	6
Wilken et al 2014	Gran Enana	AAA	BIT	5 L	3 L	60	1 min	4 (+ 6 vent 1 min)



Figura 2. Rizomas y pedazos de rizomas (bits) (A) bit; (B) rizoma entero.



Figura 1. Rizoma con hijos.



Figura 3. Plantas en frascos en laboratorio .

Figura 4. Planta tierna de banano propagada por cultivo in vitro preparada para su endurecimiento en vivero.

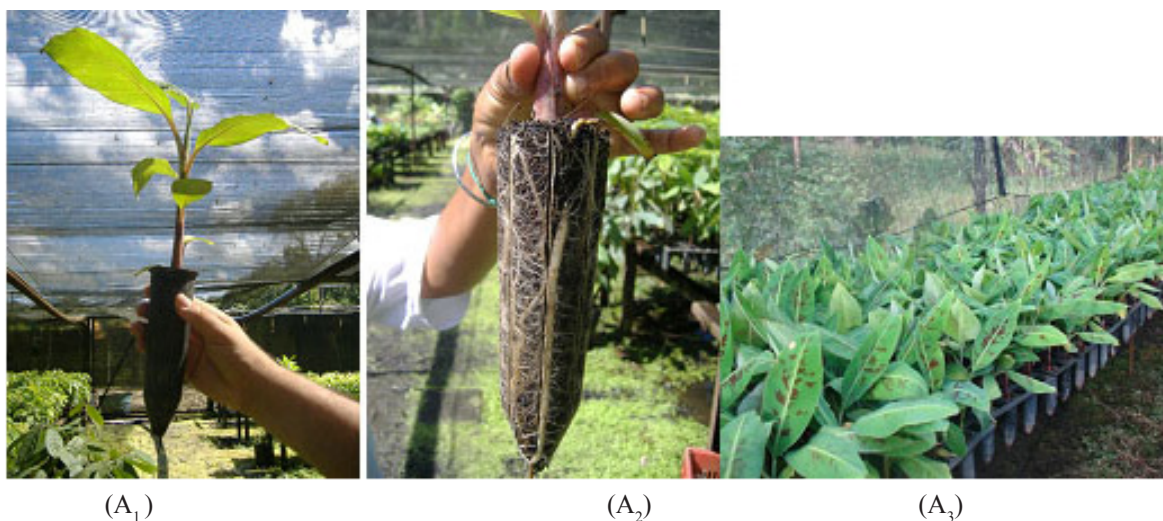


Figura 5. (A₁ y A₂) Plantas micropropagadas de bananos, aclimatadas en tubos de 19 cm de longitud, tras un período



de enraizamiento/endurecimiento bajo luz (natural. (A₃) Plantas preparadas para su plantación en campo.

Figura 6. Sala de crecimiento con luz natural. Ambiente ideal para promover el cambio del metabolismo heterotrófico

References

ACQUARONE, P. **The roots of *Musa sapientum* L.** Guatemala: United Fruit Co., 1930. (Bulletin, 26).

AFREEN, F. Temporary immersion bioreactor. Engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, J. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.187–201.

ALBANY, N.; GONZÁLEZ, E. J.; VILCHEZ, J.; GARCÍA, L.; DE FERIA, M.; PÉREZ, N.; CLAVELO, J. Use of growth retardants for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. In: HVOSLEF-EIDE, A.K.; PREIL, W. (Ed.). **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. Dordrecht: Springer, 2005. p.213-224.

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, Berlin, v.32, n.1, p.55-60, 1993.

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, S. Ex vitro acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.54, n.2, p.237-244, 2010a.

ARAGÓN, C.E.; ESCALONA, M.; CAPOTE, I.; CEJAS, I.; RODRÍGUEZ, R.; SANDOVAL, J.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.L. Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (CEMSA ³/₄) micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT). **Cultivos Tropicales**, San Jose, v.27, n.1, p.39-44, 2006.

- ARAGÓN, C.E.; ESCALONA, M.; RODRIGUEZ, R.; CAÑAL, M.J.; CAPOTE, I.; PINA, D.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.46, n.1, p.89-94, 2010 b.
- ARAGÓN, C.E.; SÁNCHEZ, C.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.58, n.1, p.29-38, 2014.
- ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.6, p.233-249, 2002.
- ASHTON, D.H.; TURNER, J.S. Studies on the light compensation point of *Eucalyptus regnans* Muell. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.27, p.289-607, 1979.
- BANERJEE, N.; VUYLSTEKE D.; DE LANGHE, E. Meristem tip culture of *Musa* p.histomorphological studies of shoot bud proliferation. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p.139-147.
- BARKER, W.; STEWARD, E.C. Growth and development of the banana plant. 1. The growing regions of the vegetative shoot. **Annals of Botany**, Oxford, v.26, n.103, p.389-410, 1962.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Temporary immersion system p.a new concept for use liquid medium in mass propagation. HVOSLEF-EIDE, A.K., PREIL, W. (Ed.). **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. Dordrecht: Springer, 2005. p.165-195.
- BJORKMAN, O.; HOLMGREN, P. Adaptability of the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.16, p.889-915, 1963.
- BOARDMAN, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.28, p.355-377, 1977.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.J.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C.S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, Alexandria, v.16, p.173-175, 1981.
- CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA; DEBERGH, P. Environment influences anatomy os stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of The American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141-145, 1990.
- CASTRO, D.; DÍAZ, J.; MONTOYA, N. Propagación clonal de bananos en biorreactores de inmersión temporal. In: REUNIÓN ACORBA, 15., 2002, Cartagena de Indias, Colombia. **Proceedings...** Medellín: AUGURA, 2002. p.44-48.
- CEJAS, I.; CAPOTE, I.; ARAGÓN, C. E.; ESCALONA, M.; PINA, D.; GONZÁLEZ, J.; ROELS, S. Optimización del protocolo de propagación del plátano cv. CEMSA ¾ en Biorreactores de Inmersión Temporal. **Agrociencia Uruguay**, Montevideo, v.15, n.1, p.13-18, 2011.
- CHAMPION, J.; CHARPENTIER, J.M. La position des feuilles du bananier 'poyo'. **Fruits**, Paris, v.25, n.7/8, p.508-510, 1970.
- CHAMPION, J.; OLIVIER, P. Études préliminaires sur les racines de bananier. **Fruits**, Paris, v.16, n.7, p.371-374, 1961.
- CHARLTON, W.A. Distribution of lateral root primordia in root tips of *Musa acuminata* Colla. **Annals of Botany** 49(4):509-520. Charpentier, J.M. 1966. La remontée du méristème central du bananier. **Fruits**, Paris, v.21, n.3, p.103-119, 1982.
- COLMENARES, M.; GIMÉNEZ, C. Multiplicación in vitro *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Caracas, v.20, n.4, 2003.
- COLMENARES, M.A.G.; GIMÉNEZ, A. Inducción de yemas múltiples en *Musa* plátano, Hartón Gigante" con inmersión temporal. **Ciencia**, Zuliam v.15, n.3, p.331-340, 2007.
- DANIELLS, J.W.; SMITH, M.K. **Post-flask management of tissue-cultured bananas**. Canberra: ACIAR, 1991. 9p. (Technical Reporter, 18)
- DANIELLS, J.W.; SMITH, M.K.; HAMILL, S.D. **Banana offtypes**. An Illustrated Guide. Information Series Q199019. Queensland: , Department of Primary Industries, 1999. 10p.
- DEBERGH, P.C. Control of *in vitro* plant propagation. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS , 1., 1988, Piracicaba, sp. **Anais...** Piracicaba: CEBTEC-FEALQ-USP, 1988.

- DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). **Fruits**, Paris, v.46, p.125-135, 1992.
- DOOLEY, J.H. Influence of lighting spectra on plant tissue culture. **American Society Of Agricultural Engineers Papers**, Illinois, n.1, p.6539, 1991.
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.; COTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.30, n.4, p.181-186, 1994.
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.; CÔTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.30, p.181-186, 1994.
- ESCALONA, M.; CEJAS, I.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; CAPOTE, I.; ROELS, S.; CAÑAL, M. J.; DEBERGH, P. Efecto de la metatopolina sobre la propagación del plátano utilizando un bioreactor de inmersión temporal. **InfoMusa**, Montferrier sur Lez, v.12, n.2, p.28-30, 2003.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLEZ, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, n.9, p.43-748, 1999.
- EVANS, L.T. The effect of light on plant growth, development and yield. In: SLATTYER, R.O (Ed.). **Plant response to climatic factors**. Paris:UNESCO, 1973. p.21-35.
- FERREIRA, W.M.; SUZUKI, R.M.; PESCADOR R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO R.C.L.; KERBAUY G.B. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium Second Love* (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.47, p.420-427, 2011.
- FISHER, J.B. Leaf opposed buds in *Musa* p.their development and a comparison with allied monocotyledons. **American Journal of Botany**, Lawrence, v.65, n.7, p.784-791, 1978.
- FONT QUER, P. **Diccionario de botánica**. Barcelona: Editorial Labor, 1985. 1244 p.
- FUENTES G.; TALAVERA C.; OPEREZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.41 p.69-76, 2005.
- GALÁN SAÚCO, V. **Los frutales tropicales en los subtropicos**. II. El plátano. Madrid: Mundi-Prensa, 1992. 173 p.
- GALÁN SAÚCO, V.; ROBINSON, J. Field establishment of *in vitro*-produced banana plants. **Fruits**, Paris, v.65, n.1, p.43-51, 2010.
- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by tissue culture: the components of culture media**. 2nd ed. Great Britain: Exegetics, 2008. 574 p.
- GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK. G-J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v.1, p.29-64.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK. G-J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v.1, 501 p.
- GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v.14, n.6, p.607-621, 2014.
- GIMÉNEZ, C.; COLMENARES, M. Sistemas prototipos para la micropropagación por inmersión temporal. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Bogotá, v.21, supl.1, p.1-7, 2004.
- GONZÁLEZ, E. J. Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. In: HVOSLEF-EIDE, A.K.; PREIL, W. (Ed.). **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. Dordrecht: Springer, 2005. p.197-211.
- GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. **Annals of Botany**, Oxford, v.42, p.993-995, 1978.
- GUZMAN, E.V.; DECENA, A.C.; UBALDE, E.M. Plante regeneration from unirradiated and irradiated banana shoot tip tissues cultured *in vitro*. **Philippine Agricultural Scientist**, Queensland, v.63, p.140-146, 1980.

- HU, C.V.; WANG, J.P. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMEDA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell**. New York: Macmillan Publishing, 1983. v.1, p.177-227.
- HWANG, S.C.; CHEN, C. L.; LIN, J.C.; LIN, H. L. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. **HortScience**, Alexandria, v.19, p.231-233, 1984.
- ISRAELI, Y.; LAHAVE, E.; REUVENI, O. *In-vitro* culture of bananas. In: GOWEN, S. (Ed.). **Bananas and plantains**. London: Chapman and Hall, 1995. p.147-178.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; NAMERI, N. Genetic variability and performance of *in-vitro* propagated banana plants. In: REUNIÓN SOBRE AGROFISIOLOGÍA DEL BANANO, 4., 1988. San Jose. **Memorias 1986 ...** San Jose: ASBANA, 1988. p.97-104.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of bananas (*Musa acuminata* cv, 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.55, p.141-145, 1999.
- KOFFI, M.C.; DECLERCK, S. *In vitro* mycorrhization of banana (*Musa acuminata*) plantlets improves their growth during acclimatization. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v.51, n.3, p.265-273, 2015.
- KORNEVA, S.; FLORES, J.; SANTOS, E.; PIÑA, F.; MENDOZA, J. Plant regeneration of plantain 'Barraganete' from somatic embryos using a temporary immersion system. **Biotecnología Aplicada**, Toronto, v.30, n.4, p.267-270, 2013.
- KOZAI, T.; IWANAMI, Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, Tokyo, v.57, p.279-288, 1988.
- KRIKORIAN, A.D.; CRONAUER, S.S. Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement. **Economic Botany**, New York, v.38, p.322-331, 1984.
- KRISHNARAJ, S.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: THORPE, T.A (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.417-470.
- LANGHE, E. La phyllotaxie du bananier et ses conséquences pour la compréhension du système rejetonnat. **Fruits**, Paris, v.16, p.429-441, 1961.
- LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo*-developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, (1) p.167-171, 1988.
- LEMOS, E. E. P. D.; FERREIRA, M.D.S.; ALENCAR, L.; OLIVEIRA, J.G.L.; MAGALHAES V.S. Micropropagation of banana Terra using temporary immersion bioreactors. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.482-487, 2001.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.143-172.
- LÓPEZ J. Regeneración de plantas por embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda 'Zanzíbar' (*Musa* spp.). **Agricultura Tropical**, Ciudad de la Habana, v.1, n.1, p.12-21, 2015.
- LÓPEZ, J. MONTANO, N; REINALDO, D.; RAYAS, A.; MEDERO V, SANTOS, A. Somatic embryogenesis for the production of plantain planting materials in Cuba. In: RUANE, J.; DARGIE, J.D.; MBA, C.; BOETTCHER, P.; MAKKAR, H.P.S.; BARTLEY D.M.; SONNINO, A. (Ed.). **Biotechnologies at work for smallholder: case studies from developing countries in crops, livestock and fish**. Rome: FAO, 2013. p.47-55 .
- LÓPEZ, J. **Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda Navolean Musa spp.; Grupo AAB**. 2006. 100 p. Tesis (Doctor en Ciencias Agrícolas) - Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, 2006.
- LÓPEZ, J.; GÓMEZ, R.; TOLEDO, CHONG, H. B.; MONTANO, N.; RAYAS, A. Estudio en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir del explante de yemas brotadas en el cultivar 'Navolean' (AAB). **Biotecnología Vegetal**, Las Vilas, v.5, n.1, p.60-64, 2005.

- MA, S.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. In: SYMPOSIUM ON TISSUE CULTURE OF HORTICULTURAL CROPS. DEPARTMENT OF HORTICULTURE, 1991. **Proceedings...** Taipé: National Taiwan University, 1991. p.181-188.
- MA, S.S.; SHII, C.T. Growing banana plantlets from adventitious buds. **Journal of the Chinese Society of Horticultural**, Taipei, v.20, p.6-12, 1974.
- MA, S.S.; SHII, C.T. In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. **Journal of the Chinese Society of Horticultural**, Taipei, v.18, p.135-142, 1972.
- MA, S.S.; SHII, C.T.; WANG, S.O. Regeneration of banana plants from shoot meristem tips and inflorescence sections in vitro. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 20., 15-23 aug, 1978, Sydney. **Abstracts...**
- MARCHAL, J.; SENS, I.; TEISSON, C. Influence des sucres et de facteurs bioclimatiques sur la culture in vitro du bananier. **Fruits**, Paris, v.47, n.1, p.17-24, 1992.
- MARCHAL, J.; TEISSON, C.; ESCALANT, J. V. Y NAVARRO-MASTACHE, L. C. Echanges d'éléments minéraux et carbonés en culture in vitro p.cas du bananier. **Fruits**, Paris, v.43, n.9, p.485-490, 1988.
- MATSUMOTO, K.; BRANDAO, A.K.C. Comparison of temporary and permanent immersion systems for the in vitro culture of banana. **Infomusa**, Montferrier sur Lez, v.11, p.36-37, 2002.
- MEDRI, M.E.Y.; LLERAS, E. Ecofisiologia de plantas da Amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanha-do-Pará) – Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v.9, n.1, p.15-23, 1980.
- MERKLE, S.; PARROTT.; FLINN, W. B. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.155-203.
- MITCHELL, C.A.; DZAKOVICH, M.P.; GOMEZ, C.; LOPEZ, R.; BURR, J.F.; HERNÁNDEZ, R.; BOURGET, C.M. Light-emitting diodes in horticulture. **Horticultural Reviews**, Hoboken, v.43, n.1, p.1-88, 2015.
- MONNET, J.; CHARPENTIER, J.M. Le diamètre des racines adventives primaires des bananiers en fonction de leur degré de polypl oidie. **Fruits**, Paris, v.20, p.171-173, 1965.
- MUELLER, W.C.; BECHMAN, C.H. Isotropic layers in the secondary cell walls of fibers in the roots of banana and other monocotyledons. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.57. n.24, p.2776-2781, 1979.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NASCIMENTO VIEIRA, L.; DE FREITAS FRAGA, H.P.; DOS ANJOS, K. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' in vitro plantlets. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Berlin, v.27, n.2, p.91-98, 2015.
- NHUT D.T.; NAM, N.B. Light-emitting diodes (LEDs): an artificial lighting source for biological studies In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE DEVELOPMENT OF MEDICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING, 3., 2010, Vietna. **Proceedings...** p.133–138.
- NHUT, D.T.; DON, N.T.; TANAKA, M. Light-emitting diodes as an effective lighting source for in vitro banana culture. In: JAIN, S.M.; HÄGGMAN, H. **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer, 2007. p.527-541.
- OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E.. **Biología y Mejoramiento Vegetal: II Capítulo Micropropagación**. INTA. pp 353-362, 2010.
- ORELLANA, P. Introducción a la Propagación Masiva. In: PÉREZ, J. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, 1998. p.125-133.
- ORELLANA, P. **Micropropagación in vitro de plátanos y bananos**. 1994.100 f. Tesis (Doctor en Ciencias Agrícolas) - Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, 1994.
- ORELLANA, P.; GÓMEZ, R.; GARCÍA-AGULA, L.; CHONG-PÉREZ, B.; LEÓN, M.; REYES, M. Respuesta en campo de plantas de 'Cavendish enano' (*Musa AAA*) obtenidas mediante embriogénesis somática. **Biología Vegetal**, Santa Clara, v.10, n.4, p.245-250, 2010.

- PANIGRAHI, S.; LAKSHMI, K. A.; MADHURI, V.; SOUMYA, A. N. Acclimatization of invitro propagated banana grand naine by biotization—survival rate by phenol concentrations. In: AVADHANAM, S.; JYOTHSNA, G.; KASHYAP, A. **Next generation DNA led technologies**. Dordrecht: Springer, 2016. p.105-112.
- PATEL, N.L.; CHUNDAWAT, B.S. Effect of size and resting period of suckers on growth and yield of banana. **Indian Journal of Horticultura**, New Delhi, v.45, p.189–196, 1988.
- PÉREZ, J. N.; SUÁREZ, M.; ORELLANA, P. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. **Bioteología Vegetal**, Santa Clara, v.1, p.3-12, 2000.
- PÉREZ, M.B.; VEGA, V.; DELGADO, M.T.; TORRES, J.L.; PINO, A.S.; CABRERA, A.R.; ORTIZ, A.O. Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda “INIVITPV-2011”(AAB). **Revista Colombiana de Bioteología**, Bogotá, v.15, n.1, p.98-107, 2013.
- PÉREZ, M.B.; VEGA, V.M.; MARTÍN, J.D.L.C.V.; GÁLVEZ, E.O.; DELGADO, M.T.; TORRES, J.L.; GARCÍA, Y.B. Multiplicación del clon de banano ‘FHIA-18’(AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. **Revista Colombiana de Bioteología**, Bogotá, v.14, n.1, p.8-19, 2012.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990.326 pp.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1991. p.72-93.
- PREIL, W. Application of bioreactors in plant propagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMANN, H. (Ed.). **Micropropagation: technology and applications**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.425-445.
- ROBINSON, J. C.; GALÁN SAÚCO, V. **Plátanos y bananas**. Mundiprensa, Madrid, 2012. 321 p.
- ROBINSON, J.; GALÁN SAÚCO, V. Nursery hardening of *in vitro*-produced banana plants. **Fruits**, Paris, v.64, n.6, p.383-392, 2009a.
- ROBINSON, J.; GALÁN SAÚCO, V. Weaning (acclimatization) of *in vitro*-produced banana plants. **Fruits**, Paris, v.64, n.5, p.325-332, 2009b.
- ROCHA, H.S.; SILVA, C.R.R.; ARAUJO, A.G.; SILVA, A.B. Propagação *in vitro* de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.3, p.10-16, 2007.
- ROELS, S.; NOCEDA, C.; ESCALONA, M.; SANDOVAL, J.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R.; DEBERGH, P. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.84, n.2, p.155-163, 2006.
- SCHOOFS, H.; PANIS, B.; STROSSE, H.; MAYO MOSQUEDA, A.; LOPEZ TORRES, J.; ROUX, N.; SWENNEN, R. Bottlenecks in the generation and maintenance of morphogenic banana cell suspensions and plant regeneration via somatic embryogenesis therefrom. **InfoMusa**, Montferrier sur Lez, v.8, p.3-7, 1999.
- SIMMONDS, N. **The evolution of the nananas**. New York: John Wiley & Sons, 1962. 170 p.
- SINGH, H.P.; UMA, S.; SELVARAJAN, R.; KARIHALOO, J.L. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. New Delhi: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, 2011. 92 p.
- SKUTCH, A. Anatomy of leaf of banana, *Musa sapientum* L. var. hort. ‘Gros Michel’. **Botanical Gazette**, Chicago, v.84, p.337-339, 1927.
- SKUTCH, A. Anatomy of the axis of the banana. **Botanical Gazette**, Chicago, v.93, p.233-258, 1932.
- SKUTCH, A. On the development and morphology of the leaf of the banana (*Musa sapientum* L.) **American Journal of Botany**, Lawrence, 17 p.252-271, 1930a.
- SKUTCH, A. Unrolling of leaves of *M. sapientum* and some related plants and their reaction to environmental aridity. **Botanical Gazette**, Chicago, v.90, p.337-365, 1930b.
- SLUIS, C.J. Integrating automation technologies with commercial micropropagation. An economic perspective. In: GUPTA, S.D.; IBARAKI, Y. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.231–251.
- SMITH, M.K.; BIGGS, B.J.; SCOTT, K.J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, n.3, p.221-228, 1986.

- SOTO, M. **Bananos, cultivo y comercialización**. San José: Litografía e imprenta Lil, 1985. 627 p.
- SSEKIWOKO, F.; TALENGERA, D.; KIGGUNDU, A.; NAMUTEBI, M.K.; KARAMURA, E.; KUNERT, K. In-vitro proliferation of *Musa balbisiana* improves with increased vitamin concentration and dark culturing. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, Gwalior, v.2, n.3, p. 1-7, 2014.
- STANDAERT-DE-METSANAERE, R.E.A. Economic considerations. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.131-140.
- STOVER, R.; SIMMONDS, N. **Bananas**. 3rd ed. New York: Longman Scientific Technical, 1987. 468 p.
- STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.V.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier: INIBAP, 2003. 36p. (Technical Guidelines, 8)
- SUADA, E. P.; JASIM, B.; JIMTHA, C. J.; GAYATRI, G. P.; RADHAKRISHNAN, E. K.; REMAKANTHAN, A. Phytostimulatory and hardening period-reducing effects of plant-associated bacteria on micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.51, n.6, p.682-687, 2015.
- SUÁREZ-CASTELLÁ, M.; GÓMEZ, R.; CHONG-PÉREZ B.; LEÓN. M.; REYES GARCÍA-ÁGUILA, M.L. Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa* spp.; su impacto económico **Biología Vegetal**, Santa Clara, v.12, n.1, p.41 - 48, 2012.
- SUBRA, P.; GUILLEMOT, J. Contribution à l'étude du rhizome et des réjets du bananier. **Fruits**, Paris, v.16, n.1, p.19-23, 1961.
- TISSERAT, B.; ESAN, E.; MURASHIG, T.E. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, Hoboken, v.1, p.1-78, 1979.
- TUNC-OZDEMIR, M.; MILLER, G.; SONG, L.; KIM, J.; SODEK, A.; KOUSSEVITZKY, S.; SHINTANI, D. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.151, n.1, p.421-432, 2009.
- TURNER, D.W. Banana plant growth. I. Gross morphology. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Melbourne, v.12, p.209-215, 1972.
- VERVIT. **The ideal bioreactor for plant micropropagation**. Zelzate, 2015. Disponible em: <http://www.setis-systems.be/>.
- VILLALOBOS, A.; GARCÍA, V.A. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos. **Agrociencia**, Montevideo, v.48, p.107- 118, 1982.
- VUYLSTEKE, D.; LANGHE, E. de. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.62, n.4, p.323-328, 1985.
- VUYLSTEKE, D.R. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of Musa germplasm**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1989. 56 p.
- WELANDER, M.; PERSSON, J.; ASP, H.; ZHU, L.H. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae**, New York, v.179, p.227-232, 2014.
- WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.108, p.475-480, 1983.
- WILKEN, D.; GONZALEZ, E.J.; GERTH, A.; GÓMEZ-KOSKY, R.; SCHUMANN, A.; CLAUS, D. Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. 'Grande naine' AAA). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.50, n.5, p.582-589, 2014.
- WOLLAEGER, H.M.; RUNKLE, E.S. Growth of impatiens, petunia, salvia, and tomato seedlings under blue, green, and red light-emitting diodes. **HortScience**, Alexandria, v.49, n.6, p.734-740, 2014.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.105, n.2, p.149-158, 2011.