



**Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación
in vitro de plátano (*Musa paradisiaca* L)**

**Determination better culture medium in the establishment phase for the *in vitro* propagation
of banana (*Musa paradisiaca* L)**

Ancasi-Espejo Ruth Gabriela^{1*}, Montero-Tonconi Julio Ricardo², Ferreira-Castedo Napoleón Juan²,
Muñoz-Guzmán Israel²

Datos del Artículo

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales (A.C.B.N). Universidad Amazónica de Pando.

²Programa de Biología del Área de Ciencias Biológicas y Naturales (A.C. B.N.). Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Amazónica de Pando.

***Dirección de contacto:**

Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales (A.C.B.N). Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Amazónica de Pando. +591 3 8423958

Ruth Gabriela Ancasi-Espejo

E-mail address : gabyruz862@hotmail.com

Palabras clave:

Cultivo *in vitro*, propagación, establecimiento, contaminación, desinfección.

J. Selva Andina Res. Soc.
2016; 7(2):104-111.

Historial del artículo.

Recibido febrero, 2016.
Devuelto julio 2016
Aceptado julio, 2016.
Disponible en línea, agosto, 2016.

Editado por:
Selva Andina Research Society

Key words:

In vitro culture, propagation, establishment, contamination, disinfection.

Resumen

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, en el año 2014. El objetivo del estudio fue determinar un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L). Fueron seleccionadas y caracterizadas 20 plantas madres del CINTA (Centro Investigación de Nuevas Tecnologías de la Amazonia). Se empleó un diseño completamente aleatorio (DCA) con tres diferentes medios de cultivo. Los medios de cultivo fueron los siguientes: M1) Murashige y Skoog (MS) fue suplementado con ácido ascórbico 100 mg/L y L-cisteína 2 mL/L, M2) Murashige y Skoog (MS) fue suplementado carbón activo 2 g/L, el M3) Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido ascórbico 100 mg/L y ácido cítrico 100 mg/L. Las variables evaluadas fueron: La sobrevivencia de los explantes, donde se observó la contaminación y oxidación. Los resultados mostraron que en la primera fase de establecimiento, la mejor respuesta para la sobrevivencia de los explantes de plátano (*Musa paradisiaca*), fue con el medio de cultivo 3, donde se obtuvo un menor grado de oxidación (0.26) y la contaminación para todo los explantes fue de 28%.

© 2016. *Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.*

Abstract

This research was conducted at the Laboratory of Plant Biotechnology of the Department of Biological and Natural Sciences of the Amazonian University of Pando, in 2014. The aim of the study was to determine better culture medium in the establishment phase for propagation *in vitro* banana (*Musa paradisiaca* L.), 20 were selected and characterized mother plants NTRCA (New Technology Research Center Amazonia). A completely random design (CRD) with three different culture media was used. The culture media were M1) Murashige and Skoog (MS) was supplemented with ascorbic acid 100 mg/L and L-cysteine 2 ml /L, M2) Murashige and Skoog (MS) was supplemented charcoal 2 g/L, M3) Murashige and Skoog (MS) supplemented with ascorbic acid 100 mg/L and cítrico 100 mg/L acid. The variables evaluated were: The survival of the former Plantes, where contamination and oxidation was observed. The results showed that in the first phase of establishment, the best answer for the survival of the former Plantes banana (*Musa paradisiaca*), was with the culture medium 3, where a lower degree of oxidation (0.26) and pollution for all explants was obtained was 28%.

© 2016. *Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.*

Introducción

El plátano (*Musa spp.*) es una planta frutal de gran importancia alimenticia, económica y sociocultural, del género *Musa* perteneciente a la familia de las musáceas, ampliamente cultivada en las regiones tropicales del mundo. El plátano ocupa el cuarto lugar en los alimentos después del arroz, el trigo y maíz (Lassoudiere 2007).

El cultivo del plátano a escala mundial en cuanto a área cultivada se estimaba en 5,029997 ha y 30,471 870 t/anales, de las cuales el 73% están concentradas en países del África, un 3% en el Asia y el 25% en América Latina y Caribe (7,008530 t), en donde Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Perú y Venezuela eran los principales productores (FAO 2002).

En Bolivia, el área cultivada se estimaba en 63895 hectáreas de banano y plátano (CANEB 2008), que se cultivan en la zona oriental, en Chapare de Cochabamba, en Alto Beni, en los Yungas y Caranavi de La Paz (Soto-Azurduy 2010).

Los cultivares de plátano son susceptibles a enfermedades como la Sigatoka negra (*Mycospharella fijiensis*), Hereque (*Ralstonia solanacearum*), y el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) que ocasiona pérdidas en la producción de frutas y afecta la disponibilidad de material vegetal de propagación sano en campo (Aular & Casares 2011).

La micropropagación *in vitro* es una técnica que permite la reproducción masiva de plantas libres de organismo fitopatógenos y se constituye en una herramienta para el mejoramiento genético (Roux *et al.* 2002). Por fortuna, el género *Musa* puede multiplicarse rápidamente mediante las técnicas de micropropagación (Angarita & Perea 1984). Sin embargo, en la etapa de establecimiento de cultivo *in*

vitro, en algunos plátanos, es frecuente la presencia de microorganismos, oxidación fenólica de los tejidos, baja viabilidad y baja brotación, por lo que se hace necesario la realización de pretratamientos a las plantas madres para mejorar el establecimiento de los explantes (Ramirez *et al.* 2008).

El objetivo de la investigación fue determinar un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca*), para lograr la sobrevivencia de los explantes.

Materiales y métodos

Ubicación. El presente trabajo de investigación se realizó en el año 2014 en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales (A.C.B.N) de la Universidad Amazónica de Pando. Geográficamente se encuentra ubicada a 11° 01' 59.20'' latitud sur y 62° 45' 31.13'' de longitud oeste, con una temperatura promedio de 25 °C y una humedad relativa de 54%.

Material biológico. El material vegetal usado para esta investigación fue recolectado en el Centro de Investigación de Nuevas Tecnologías de la Amazonia (CINTA) de la Universidad Amazónica de Pando (UAP).

Recolección del material vegetal de campo. Para la descripción morfológica del plátano, se utilizó la lista de descriptores para *Musa spp.*, publicados, por el Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI) (Franco & Hidalgo 2003). El banano (*Musa spp.*), se caracterizó morfológicamente de acuerdo a los descriptores del IPGRI-INIBAP/ CIRAD (1996), y considerando a los mejores cultivares de la zona, en referencia a la calidad del fruto, tamaño

uniforme del fruto, uniformidad de color, sabor y aceptabilidad en el mercado.

La planta seleccionada tuvo un tamaño mediano, con buena calidad de racimo y aparentemente sanas (libres de enfermedades), una vez seleccionada morfológicamente se marcó con una cinta plástica y se identificó con un número. La muestra seleccionada tenía las condición fitosanitaria (planta sana), se escogió a los hijos espada de 20-30 cm con un pedúnculo (o pedicelo) de 5 a 10 cm de diámetro.

La muestra tuvo un meristemo viable. Todos los hijuelos (cormos) seleccionados fueron extraídos e identificados con el mismo número de la planta madre. Paralelamente, una vez recolectadas las muestras de cada planta, se tomó también porciones de hojas (10 x 10 cm) de la misma planta para el análisis fitopatológico.

Protocolo para cultivo in vitro de plátano (Musa paradisiaca) en la fase establecimiento. Para evaluar los

medios de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* del plátano se siguieron los siguientes pasos: i) preparación de los medios de cultivo (Tabla 1), ii) desinfección del material vegetal y iii) establecimiento del cultivo de plátano.

Medios de cultivo. La composición de los medios de cultivo sólidos utilizados se describen en la Tabla 1. Estos se distribuyeron a 15 mL en cada tubo de ensayos (250 mm de largo x 15 mm de diámetro). Posteriormente, los tubos se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 15 PSI de presión y 121 °C.

Desinfección del material vegetal. Se usaron cormos de tamaño de 10 cm de forma cuadrada se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 30% (v/v) durante 12 h, alcohol al 70% por 30 s, hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% con dos gotas de tawi 20 por 15 min, agrobac 3 g /L durante 5 min (Ortega *et al.* 2011).

Tabla 1 Medios de cultivo para la inducción de brotes cormos de plátano (*Musa paradisiaca*) para la micropagación *in vitro*

Medio 1		Medio 2		Medio 3	
Elementos	Cantidad	Elementos	Cantidad	Elementos	Cantidad
Murashige and Skoog (MS-general)	4.33 g/L	Murashige and Skoog (MS-general)	4.33 g/L	Murashige and Skoog (MS-general)	4.33g/L
Sacarosa	30 g/L	Sacarosa	30 g/L	Sacarosa	30 g/L
Mio-inositol	100 mg/L	Mio-inositol	100 mg/L	Mio-inositol	100 mg/L
BAP	2.5 mg/L	BAP	2.5 mg/L	BAP	2.5 mg/L
IAA	2.0 mg/L	IAA	2.0 mg/L	IAA	2.0 mg/L
Phytigel	2.0 g/L	Phytigel	2.0 g/L	Phytigel	2.0 g/L
Ácido Ascórbico	100 mg/L	Carbón activo	2.0 g/L	Ácido cítrico	100 mg/L
L-Cistina	2.0 mL/L			Ácido Ascórbico	100 mg/L
pH	5.7	pH	5.7	pH	5.7

Establecimiento. Dentro de una cámara de flujo laminar, los cormos fueron reducidos a un tamaño de 3 cm y se dejó en hipoclorito de sodio (NaClO) al 3.6% durante 5 min, luego en una solución 30 mg/L de cisteína, posteriormente se redujeron a 1 cm y fueron depositados en solución de ácido ascórbico 10 mg/10 mL por 10 s (Ortega *et al.* 2011).

La extracción se realizó bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar y con la ayuda de pinzas y bisturí estériles. Se colocó los explantes en tubos de ensayos con medio de cultivo previamente esterilizado.

Pará el establecimiento, se dejó en cuarenta (48 h), con ausencia de luz total para reducir el proceso de

oxidación. Una vez cicatrizadas las heridas se evaluaron el grado de Oxidación con una escala de 1 = 5-15% a 5 = 100%, según la escala de Novak *et al.* (1989), El porcentaje de contaminación de hongos y bacteria, se evaluó mediante la observación de microscópica, cada cinco días durante 30 días, se determinó la presencia de contaminantes fungosos que se basó en la identificación visual del micelio generalmente saliendo de la meristemo del explante, las bacterias se identificaron por su apariencia lechosa y su color blanquecino y amarillo/anaranjado las cuales se manifestaron dentro del medio de cultivo o alrededor el explante en contacto con el medio de cultivo. El porcentaje de contaminación se hizo con la fórmula recomendada por (Méndez-Mantuano 2014).

El experimento fue implementado en un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con tres tratamientos. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) ácido ascórbico 2) carbón activo y 3) ácido ascórbico y ácido cítrico.

Análisis estadísticos. Se realizaron análisis de varianza de un grado de libertad previa verificación de normalidad y homogeneidad de las variables. Las comparaciones de medias fueron realizadas a una $P < 0.01$ de probabilidad, mediante la prueba de Proc GLM y Mixed del SAS (SAS 2004).

Resultados

Análisis de varianza para el grado de oxidación y porcentaje de contaminación.

Grado de oxidación. El análisis de varianza (ANVA) mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 0.95 y un coeficiente de variación (C.V.) de 15% (Tabla 2); según el modelo estadístico hubo un 95% de variación. Por lo que, el modelo fue apropiado para explicar la variación existente en los datos. Por

otra parte, el C.V. fue inferior al 35%; lo cual, significa que las transformaciones realizadas homogeneizaron adecuadamente los datos.

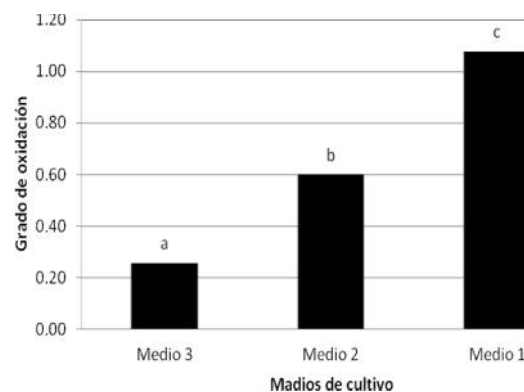
Tabla 2 Análisis de varianza para el grado de oxidación de los ex plantas *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca*)

Oxidación		
FV	GL	CM
tratamiento	6	0.3**
Error	66	
C.V.	15	
R^2	0.95	

C.V.= Coeficiente de Variación.
**=Significativo al 0.01, R=Coeficiente de determinación.

Asimismo el ANVA para el grado de oxidación por efecto de fenolización mostró que hubo diferencias altamente notables entre los tratamientos ($p < 0.01$). La comparación de medias mostró que el medio 3 mostró diferencias notables y tuvo menor grado de oxidación (0.26). En cambio las oxidación de los otros dos medios de cultivo fueron visiblemente superiores (0.6-1.1) (Figura 1).

Figura 1 Grado de oxidación de los explantes de plátano, sometidas a tres diferentes medios de cultivo



Porcentaje de contaminación de los explantes. La contaminación se evaluó durante los 30 días, Se

contaminaron por hongos, 4/36 explantes y por bacteria, 6/36 explantes. El total de explantes contami-

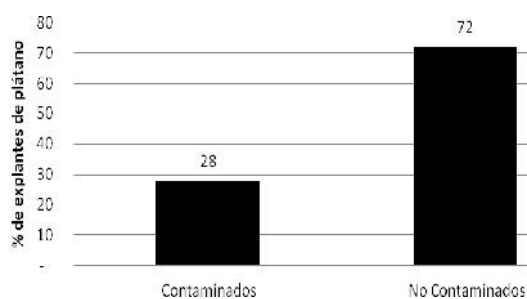
nados fueron de 10 y de explantes no contaminados fueron 26 (Tabla 3).

Tabla 3 Explantes contaminados por efecto de bacterias y hongos de plátano (*Musa paradisiaca*)

Nº Explantes iniciales (Vellaco)	Nº Explante contaminado por hongo	Nº Explante contaminado por bacteria	Total de Explantes contaminados	Total de Explantes no contaminados
36	4	6	10	26

De los 36 explantes iniciales de plátano, 10 explantes (28%) fueron contaminados por de hongos y bacterias y 26 explantes (72%) no fueron contaminados (Figura 2).

Figura 2 Porcentaje de contaminación de los explantes de plátano



Discusión

La oxidación de compuestos fenólico en cultivo *in vitro* son catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) que producen quinonas, que son compuestos químicos reactivos y propensos a reaccionar, causando daño e incluso la muerte celular. Al respecto Monzón-Ostorga (2005) indica que los compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido hacia el medio, a la vez son atrapados por el gelificante y acumulados, formando un área negra alrededor del explante, causando la inhibición del crecimiento (Amiot *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000). Murashige (1974) señala que en la etapa de estable-

cimiento *in vitro* en algunas especies es necesario agregar al medio de cultivos antioxidantes para evitar la oxidación del explante o medio de cultivo. Los antioxidantes más usados en el plátano son el ácido ascórbico, ácido cítrico y L-cisteína, estos compuestos se utilizan antes del establecimiento del material o adicional al medio de cultivo (George 1996, Jiménez 1998). Aliyu (2005), menciona que mediante la adición de carbón activo (CA) se evita la oxidación del explante. Sin embargo, en el presente estudio se observó que el medio tres Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido ascórbico y ácido cítrico obtuvo menor grado de oxidación (0.26) que con el tratamiento dos Murashige y Skoog (MS), suplementado con carbón activo obtuvo mayor grado de oxidación (0.60). El ácido cítrico y ascórbico son los antioxidantes más utilizados en cultivo *in vitro* para evitar la oxidación en los tejidos (Aguirre 2010). Los productos químicos antioxidantes como el ácido cítrico y ácido ascórbico, presenta una mayor efectividad cuando se los utiliza de manera conjunta (Pérez *et al.* 2014).

En nuestro estudio se observó que la combinación de ácido ascórbico y cítrico logra controlar la oxidación permitiendo la sobrevivencia de los explantes del plátano en condicione *in vitro*. El ácido ascórbico inhibe la oxidación, reduciendo el complejo fenólico. Este compuesto en la micro propagación puede actuar en dos formas: como reductor o como

vitamina, Por otro lado el ácido cítrico es un ácido tricarbóxico muy común en las plantas, que es utilizado en la preparación de explantes y medios, siendo uno de los compuestos claves del ciclo de Krebs y es un antioxidante por que ejerce un efecto inhibitorio sobre la PPO (polifenol oxidasa) (Monzón-Ostorga 2005). Asimismo, Canchignia *et al.* (2004), mencionan que el ácido cítrico se ha usado, para superar problemas específicos de oxidación los cuales se asocian con cultivo de tejidos en musáceas.

La combinación de ambos antioxidante se manifestó en una reducción de la oxidación para la propagación *in vitro* de plátano. Resultados similares se observaron en teca, donde el ácido ascórbico y el ácido cítrico usados conjuntamente durante 24 horas, disminuyeron los compuestos fenólicos (Akram & Aftab 2009). De igual manera D'Silva & D'Souza (1993), utilizaron el ácido cítrico y el ácido ascórbico, para combatir la oxidación de los explantes en condiciones *in vitro*.

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos *in vitro* se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del explante a su medio, así como por las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como explante (Mroginski & Roca 1991). Esto fue evidente en nuestra investigación, ya que cuando se introdujo material proveniente de campo, hubo altos porcentajes de contaminación que no permitieron el establecimiento *in vitro*.

Alonso-Gómez (2002), Recalde-Bastidas (2007), menciona que la contaminación, más que matar a los explantes directamente, invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micro propagación. Existen varios compuestos químicos que se utilizan para la desinfección en la fase de

establecimiento en cultivo *in vitro*, entre ellos el hipoclorito de sodio (NaClO), con menor frecuencia el cloruro de calcio (Aguirre *et al.* 2010). En la presente investigación se utilizó el NaClO en concentraciones de 5% y 3.6% respectivamente en diferentes tiempos (menores a 15 min), donde se obtuvo el 70% de explantes sin contaminación.

La concentración y el tiempo de exposición al desinfectante están relacionados tanto a la especie como al tipo de explante, siendo el hipoclorito de sodio uno de los más utilizados, ya que se considera gentil con el tejido vegetal y no con los microorganismos contaminantes, además, es de fácil adquisición y bajo costo en el mercado. Araya (2000), menciona que a mayor concentración y tiempo de exposición al NaOCl, menor porcentaje de contaminación. Asimismo (Ramirez-Villalobos *et al.* 2004), menciona que a altas concentraciones de NaClO y/o tiempos muy prolongados (mayores a 20 min) inhiben el crecimiento del explante, dependiendo el tipo de especies.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés con la presente investigación.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de esta investigación a la Dirección de Investigación de Ciencias y Tecnología de la Universidad Amazónica de Pando. Asimismo, nuestros agradecimientos al Dr. Julio Gabriel por la revisión y contribución para la mejora de la presente publicación.

Literatura citada

- Aguirre G, Jean B, Ligue L. Aplicaciones del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia; 2010. p 55.
- Akram M, Aftab F. An efficient method for clonal propagation and *in vitro* establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). For Stud China. 2009; 11(2): 105-10.
- Aliyu MO. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. Afric J Biotechnol. 2005; 4: 1485-89.
- Alonso-Gómez M. Biotecnología aplicada a la mejora de *Pelargonium* [tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 2002; p. 142.
- Amiot M, Forget F, Goupy P. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. Herba-Polonica. 1996; 42: 237-47.
- Angarita A, Perez M. Avances del proyecto Estudios orientados al control de la Sigatoka Negra en plátano y banano. Segundo informe Colciencias; 1984. p. 60.
- Araya E. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de jaúl (*Alnus acuminata*) [tesis licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. 2000.
- Aular J, Cáceres M. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. Rev Bras Frutic. 2011; 33(1): 187-98.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses. In W Gruissem, B Buchanan, R Jones, Eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD; 2000. p. 1158-249.
- Canchignia-Martínez HF, Sigcha-Sigcha LE, Toaquiza-Soatunsig JP, Ramos-Gavilanez LE, Saucedo-Aguilar SG, Carranza-Patiño MS, et al. Propagación vegetativa de plátano y banano con la aplicación de benzilaminopurina (6-BAP) y ácido indolacético (AIA). Cien y Tecnol. 2008; 1(1): 43-8.
- CANEB. Cámara Nacional de Exportadores de Bolivia. 2008.
- D'Silva I, D'Souza L. Controlling contamination and browning of *in vitro* cultures of cashew. J Plant Crops. 1993; 21: 22-9.
- FAO. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. FAO: Rome. 2002.
- Franco TL, Hidalgo R. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico n°8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia; 2003. p. 89.
- George EF. Plant Propagation by Tissue Culture In Practice. 2ed. England. s.n.t., 1996; p. 639-649.
- IPGRI-INIBAP/CIRAD. Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia y el Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, Montpellier, Francia; 1996. Disponible en: <http://www.ipgri.cgiar.org/Publications>.
- Jiménez E. Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Módulo 4. Propagación Masiva de Plantas *in vitro*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba; 1998; 82 p.

- Lassoudiere A. Le Bananier et sa Culture. Collection Savoir Aire, ditions Quae: Versailles, France. 2007; p. 384.
- Méndez-Mantuano MO. Efecto de cinco dosis de quitosano para el establecimiento *in vitro* del plátano dominico hartón (musa AAB Simmonds) en la zona de Daule [tesis licenciatura]. Universidad de Guayaquil; 2014. p. 111.
- Monzón-Ostorga JD. Propagación *in vitro* de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) por medio de la multiplicación de ápices de brote [tesis licenciatura]. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala; 2005. p. 82.
- Mroginsky L, Roca W. Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia; 1991. p. 19-40.
- Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol.* 1974; 25:135-66.
- Novak FJ, Afza R, van Duren M, Perea-Dallos M, Conger BV, Xiaolang T. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio Technol.* 1989; 7: 147-58.
- Ortega DF, Tamayo AC, Calderón J, Galván R. Establecimiento aséptico en la migro propagación *in vitro* de banano Williams (AAA, SUBCRUPO CANVENDISH). *Tierra Tropical.* 2011; 7(2): 205-20.
- Pérez J, Sejaz J, Folrez M. Propagación *in vitro* de cinco variedades de clavel, (*Dianthus caryophyllus* L.). La biotecnología - Dirección Nacional de Investigación Ciencia y Tecnología Escuela Militar de Ingeniería. La Paz, Bolivia. 2014; 2.
- Ramirez M, Lindorf H, Garcia E. Cambios morfológicos en los ápices y del vástago y de la raíz del banano Williams (*Musa* sp AAA), bajo distintas concentraciones de N6-bencil Adenina. *J Agricul Univ Puerto Rico.* 2008; 92(1-2): 53-72.
- Ramirez-Villalobos M, Lindorf H, García E. Cambios morfo anatómicos del ápice del vástago en banano CIEN BTA-03 y su parental Williams bajo condiciones *in vitro*. *Rev Fac Agron (LUZ).* 2004; 28 (Supl 1): S62-72.
- Recalde-Bastidas CA. Establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de nepeta hederácea variegata [tesis licenciatura]. Universidad Politécnica Militar. Ecuador; 2007. p. 92.
- Roux N, Toloza A, Busogoro JP, Panis B, Srosse H, Lepoivre P, et al. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. In: Jacome, L.; P. Lepoivre.; D. Marin; R. Ortiz.; R. Romero and J. Escalant (EDS). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José, Costa Rica. 20-23 May 2002, 2002; p. 239-50.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT Users Guide, SAS Institute Inc., Cary, N.C. Version 6, Fourth Edition. 2004; 2.
- Soto-Azurduy VS. Cuantificación de almidón total y de almidón resistente en harina de plátano verde (*Musa cavendishii*) y banana verde (*Musa paradisiaca*). *Rev Bol Quim.* 2010; 27(2): 94-99.