

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE FLORES MASCULINAS DE PINEO GIGANTE Y CAMBUR MANZANO¹

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM MALE FLOWER OF GIANT PINEO AND SILK FIG¹

José G. Albarrán Rincón*, Adrián E. González-Pacheco*, Ohytza González Salcedo*, Efraín G. Salazar Yamarte*, Iselen E. Trujillo Díaz**, Morela M. Fuchs Delgado* y María Ch. Torrealba Vargas*

¹ Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), a través del Proyecto ID-ARA-05-001, titulado Estrategias de obtención de plantas de calidad en rubro frutales mediante biotecnología para el aumento de la competitividad de los sistemas de producción.

* Investigadores. INIA-CENIAP. Venezuela. E-mail: jgalbarran@inia.gob.ve, esalazar@inia.gob.ve, aegonzalez@inia.gob.ve, mfuchs@inia.gob.ve

** Profesora. UNESR. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Caracas. Venezuela. E-mail: iselen03@yahoo.es

RESUMEN

El banano es importante en Venezuela y en países tropicales por su contenido de vitaminas y minerales. La demanda de semilla sana y cultivares mejorados con resistencia a enfermedades, hace necesario recurrir a métodos biotecnológicos. El objetivo del trabajo fue inducir la embriogénesis somática (ES) y suspensiones celulares, mediante el cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras, en los cultivares Pineo Gigante, *Musa* AAA y Cambur Manzano, *Musa* AAB, importantes en Aragua, Venezuela: Se seleccionaron flores entre las posiciones 6^a y 11^a de la yema floral reducida; para la ES se utilizó un medio de cultivo MS suplementado con biotina 1 mg l⁻¹, extracto de malta 0,1 g l⁻¹, glutamina 10 g l⁻¹, AIA 1 mg l⁻¹, ANA 1 mg l⁻¹, 2,4-D (0, 2, 4 y 8 mg l⁻¹) y agarosa 7 g l⁻¹. Para las suspensiones celulares se usó el medio MS1 suplementado con 2,4-D 3mg l⁻¹, caseína hidrolizada 0,4 g l⁻¹, azúcar 20g l⁻¹ y el MS2 suplementado con caseína hidrolizada 0,4 g l⁻¹, agua de coco 50 ml l⁻¹, 2,4-D 3 mg l⁻¹, arginina 50 mg l⁻¹ y azúcar 30 g l⁻¹. Se realizó un estudio histológico para el cultivo inicial, callogénesis y ES. En el cultivar Pineo Gigante se obtuvieron callos friables con embriones en estado globular, evidenciado histológicamente, a los 6 meses de cultivo y suspensiones celulares 2 meses después. En Cambur Manzano se obtuvo callogénesis e inducción de ES en el medio MS-4 siempre en menor proporción que lo obtenido para Pineo Gigante. En Manzano, no se formaron suspensiones celulares.

Palabras Clave: Embriogénesis somática; *Musa*; *Musa* AAA; *Musa* AAB; flores masculinas; biotecnología; histología.

SUMMARY

Banana is a major crop in Venezuela as well as in most tropical countries, due to its high content of vitamins and minerals. Due to the high demand for healthy plants, and for genetically improved materials with resistance to diseases, biotechnology is an useful alternative to produce these plants. The objective of the present work is to induce somatic embryogenesis and cell suspensions in 'Giant Pineo' (*Musa* AAA) and 'Manzano' (*Musa* AAB), two economically important cultivars in Aragua, Venezuela, though the *in vitro* culture of immature male flowers. Flowers were selected from the 6th and 11th reduced flower bud. In order to induce somatic embryogenesis, MS culture medium, supplemented with biotin 1 mg l⁻¹, malt extract 0,1 g l⁻¹, glutamine 10 g l⁻¹, IAA 1 mg l⁻¹, NAA 1 mg l⁻¹, 2,4-D (0, 2, 4 y 8 mg l⁻¹) and agarose 7 g l⁻¹ was used. Cell suspensions were obtained in MS1 medium supplemented with 2,4-D 3mg l⁻¹, hydrolyzed casein 0,4 g l⁻¹ and sucrose 20g l⁻¹ and in MS2 medium supplemented with hydrolyzed casein 0,4 g l⁻¹, coconut water 50 ml l⁻¹, 2,4-D 3 mg l⁻¹, arginine 50 mg l⁻¹ and sucrose 30 g l⁻¹. Histological studies at the initial culture, callogenesis and somatic embryogenesis stage were done. In Giant Pineo cultivar friable calluses were obtained. Globular somatic embryos (histologically evidenced) developed 6 months after culture. Cell suspensions were formed 2 months later. In Manzano cultivar callogenesis and somatic embryogenesis were obtained in MS-4 medium. No cell suspensions were obtained for this cultivar.

Key Words: Somatic embryogenesis; banana, male flower; biotechnology; histology 2,4-D: acido dichlorofenoxiacetic; IAA: indol acetic acid; NAA: naftal acetic acid.

RECIBIDO: septiembre 25, 2008

ACEPTADO: julio 13, 2009

INTRODUCCIÓN

El cultivo de bananos es importante en Venezuela debido a su alto contenido de nutrimentos (vitaminas y minerales) y gran aporte calórico (FAO, 2007). El Pineo Gigante y Cambur Manzano poseen buenas cualidades organolépticas y alta demanda para el consumo fresco, sin embargo, la baja calidad de la semilla en las regiones productoras, en particular su condición fitosanitaria, ha influido en la aplicación creciente de técnicas biotecnológicas para mejorar el cultivo.

En tal sentido, la embriogénesis somática (ES) representa un método biotecnológico de obtención de plantas sanas y de alta calidad con posibilidad de obtener variabilidad genética útil para la selección de plantas resistentes o tolerantes a patógenos (Escalant *et al.*, 1994). Esta técnica fue desarrollada originalmente con el propósito de micropropagar masivamente, realizar fusión de protoplastos y mejorar genéticamente un cultivo. El callo embriogénico proporciona el material de inicio para el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas (SCE). A partir de las SCE, es posible producir embriones y regenerar plantas (Strosse *et al.*, 2003).

La ES proporciona una alternativa de regeneración *in vitro* confiable para conseguir los requerimientos de semillas necesarios para la producción agrícola (Escalant y Sandoval, 1989), así como para la transformación genética a partir de SCE, partiendo del origen unicelular del ES (Escalant *et al.*, 1994).

La ES, aunque es un proceso morfogénico que permite obtener altos volúmenes de producción de plantas clonadas, en un período de tiempo corto y con menores costos, su empleo para la propagación comercial de banano aún es escaso (Ramírez *et al.*, 2006).

En sus investigaciones Escalant y Sandoval (1989) señalaron que la respuesta embriogénica va a depender del tipo de explante, destacando la utilidad de las inflorescencias masculinas como fuente de callos embriogénicos. A partir de flores masculinas ha sido posible propagar plantas por ES en Pineo Enano (Escalant *et al.*, 1994), así como en otros tipos de bananos, sin embargo, el porcentaje de yemas masculinas que forman callos embriogénicos depende del genotipo (Grapin *et al.*, 1998). Cuando no es posible obtener flores masculinas, como en el caso de los plátanos, el cultivo de ápices caulinares, es una opción para inducir la ES (Schoofs, 1997) o el cultivo de flores femeninas.

La obtención de SCE bien establecidas a partir de callos embriogénicos provenientes del cultivo de flores masculinas o femeninas es necesaria para establecer un sistema de propagación masiva y se ha obtenido eficientemente en Pineo Enano con buenos resultados (Côte *et al.*, 1996), así como en Curraré Enano (AAB) según (Grapin *et al.*, 1998).

En musáceas, además del tipo de explante para la realización de ensayos confiables de cultivo de tejido e inducir ES, es necesario agregar en el medio de cultivo fuentes de nitrógeno como extracto de malta y caseína hidrolizada, y en algunos casos agua de coco, debido a que promueven la proliferación de callos embriogénicos en menor tiempo (Khalil *et al.*, 2002).

El estudio morfogénico de los callos obtenidos es útil para la identificación de la etapa de desarrollo en el cual se encuentran en cada experiencia (Krikorian, 1986); este tipo de estudios ayuda a identificar la etapa óptima para realizar cultivo de células en suspensión; se ha señalado que la mejor es después de las 6 semanas del cultivo de iniciación embriogénica (etapa globular) según Jamaluddin y Novak, (1992).

En el caso de Cambur Manzano (AAB) son escasos los trabajos de ES, sin embargo (Houllou-Kido *et al.*, 2005) la observaron a partir del cultivo de flores masculinas. En Venezuela destacan los trabajos realizados en Pineo Gigante por Trujillo y García (1999), utilizando como explante la base de las hojas y el regulador de crecimiento ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D); en el caso del cultivo de flores masculinas, Villegas *et al.* (2008) realizaron un estudio de la oxidación de los callos embriogénicos obtenidos.

El objetivo de este trabajo fue inducir la ES y SCE a partir del cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras del cultivar comercial de banano Pineo Gigante y de Cambur Manzano; y corroborar la inducción de la ES mediante un estudio morfogénico e histológico de los callos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción de embriogénesis somática

Se recolectaron inflorescencias de 10 a 12 semanas de iniciada la floración en plantas de Pineo Gigante (AAA) Provenientes de la finca del productor agropecuario Tomás Malavé ubicada en el sector Paraparal, municipio

Libertador del estado Aragua (10°18'17"N; 67°58'25"O) y de Cambur Manzano (AAB) del banco de germoplasma del INIA-CENIAP, Campo Experimental, Zona Universitaria, municipio Mario Briceño Iragorry, Maracay estado Aragua (10°28'85"N; 67°60'00"O).

Las inflorescencias se redujeron a un tamaño aproximado de 2 cm de longitud, y se desinfectaron mediante un lavado con jabón detergente comercial durante 5 min, seguido de alcohol 70% (v/v) durante 1 min y luego hipoclorito de sodio comercial 2,5% (v/v) durante 25 min. En condiciones asépticas, en campana de flujo laminar, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se procedió a aislar el explante con ayuda de un microscopio estereoscópico. Las flores se aislaron entre las posiciones 6^a y 11^a de la yema floral reducida.

Para el cultivo de las flores se utilizó un medio de cultivo de Murashige y Skoog MS (1962), suplementado con biotina 1 mg l⁻¹, extracto de malta 0,1 g l⁻¹, glutamina 10 g l⁻¹, Ácido Indol Acético (AIA) 1 mg l⁻¹, Ácido Naftalenacético (ANA) 1 mg l⁻¹, diferentes concentraciones de 2,4-D (ver Cuadro) y agarosa 7 g l⁻¹. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 y esterilizó en autoclave durante 25 min a 120 °C, para posteriormente distribuirse en cápsulas de Petri estériles. Se cultivaron 5 explantes por cápsula de Petri para un total de 35 explantes por tratamiento, repitiéndose el experimento 2 veces. Los explantes se cultivaron durante 6 meses sin subcultivo en sala de crecimiento con fotoperíodo de 16 h de iluminación con luz blanca fluorescente a 15 μmol.m².s⁻¹ y 27 ± 1 °C.

Inducción de suspensiones celulares

Para inducir las suspensiones celulares se cultivaron aproximadamente 100 ± 0,01 mg de callos embriogénicos de color blanquecino o cremoso en 10 erlenmeyer de 50 ml con los siguientes medios de cultivo líquido:

MS1: MS, caseína hidrolizada 0,4 g l⁻¹, 2,4-D 3mg l⁻¹, azúcar 20g l⁻¹.

MS2: (Liu *et al.*, 1989): MS, caseína hidrolizada 0,4 g l⁻¹, agua de coco 50 ml l⁻¹, 2,4-D 3 mg l⁻¹, arginina 50 mg l⁻¹, azúcar 30 g l⁻¹.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 esterilizándose en autoclave durante 25 min a 120 °C. Los callos se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm durante 2 meses con cambios de medio cada 15 d, iluminación de 15 μmol m² s⁻¹ de intensidad lumínica y temperatura de 27 ± 1 °C.

CUADRO. Concentración de 2,4-D utilizada en los tratamientos de inducción de embriogénesis somática en cultivo de flores inmaduras de Píneo Gigante y Cambur Manzano.

Tratamiento	Conc. 2, 4-D (mg L)
MS-0 (Control)	0
MS-2	2
MS-4	4
MS-8	8

La viabilidad celular se determinó colocando una gota de colorante Azul de Evans al 1% en cada muestra de suspensión celular de 1 ml, aproximadamente, procediéndose a la observación y conteo al microscopio óptico con el uso de un hematocitómetro después de transcurridos 15 min.

Análisis histológico

Se realizaron cortes histológicos en 3 etapas del cultivo: iniciación, callogénesis y embriogénesis, que consistió en fijar muestras de flores con 2 d de cultivo y callos friables de 1, 2 y 6 meses de cultivo, en una mezcla de Formaldehído, Ácido acético y Alcohol etílico.

La técnica histológica utilizada consistió en una deshidratación a partir de una serie de alcohol butílico terciario a diferentes concentraciones (Castillo, 2003); posteriormente el material vegetal se infiltró con parafina a 63 °C durante 1 h, se realizaron 3 cambios de parafina, en el último cambio las muestras permanecieron 24 h. La tinción se realizó en una batería a base de safranina y fast green (Roth, 1964). Finalmente, se hicieron las observaciones en un microscopio óptico marca Leitz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de embriogénesis somática y suspensiones celulares

El efecto del 2,4-D sobre la respuesta morfogénica en flores masculinas de Píneo Gigante (AAA) cultivadas *in vitro* se observa en la Figura 1. La ausencia de 2,4-D en el medio de cultivo (MS-0) y una concentración rela-

tivamente baja de 2,4-D (2 mg l⁻¹;MS-2), influyó sobre los porcentajes promedio relativamente altos de necrosamiento y ensanchamiento de las flores (48,4 y 42,8%, respectivamente para MS-O y 37,1 y 47,0 para MS-2) y poca formación de callos friables (2,8%).

El uso de una concentración de 2,4-D de 4 mg l⁻¹ (MS-4) indujo la formación de un 24,2 % de callos embriogénicos en los explantes y 2,8% de callos friables. La duplicación en la concentración de 2,4-D (8 mg l⁻¹; MS-8), disminuyó a 2,8% la formación de callos embriogénicos. Esta concentración relativamente alta de 2,4-D indujo, además, altos valores de necrosamiento de los explantes sin ningún cambio morfológico y ensanchamiento de las flores durante el período de cultivo de 6 meses. Concluyebdo que el porcentaje de contaminación de los explantes fue muy bajo (1,4%).

El porcentaje de formación de callos embriogénicos (24,2% en MS4), concuerda con la Grapin *et al.* (1998), donde generalmente en bananos la tasa de obtención de callos embriogénicos a partir del cultivo de flores masculinas es relativamente baja y dependiente del genotipo, así se presentó 40% para Pineo Enano y 5% para Gros Michel.

Por otro lado, Escalant *et al.* (1994), observaron la inducción de callos embriogénicos utilizando concentraciones similares de 2,4-D (4 mg l⁻¹), pero a diferencia de estos autores, en el experimento se agregó al medio de cultivo una fuente adicional de nitrógeno (glutamina y caseína hidrolizada), que se conoce promueve la ES (Khalil *et al.*, 2002), sin embargo, los porcentajes de inducción de ES permanecieron relativamente bajos.

El efecto del 2,4-D sobre la respuesta morfológica en flores masculinas de cambur manzano (AAB) se observa en la Figura 2. El tratamiento control MS-0 no indujo ningún tipo de respuesta morfológica, comparado con el mismo tratamiento en Pineo Gigante donde se observó ensanchamiento de las flores y un porcentaje bajo de callos friables. Con el tratamiento MS-2 (2,4-D 2 mg l⁻¹) se observó ensanchamiento de la flor y alto porcentaje de explantes sin respuesta. En MS-4 (2,4-D 4 mg l⁻¹), se obtuvo un porcentaje considerablemente alto de explantes sin respuesta (50%), pero fue el único tratamiento donde se indujo la formación de callos friables y embriogénicos; sin embargo, la formación de éste último fue bajo (4,2%). El tratamiento MS-8 propició el ensanchamiento de la flor, notándose una coloración verde de las flores y un alto porcentaje de explantes sin respuesta (54%).

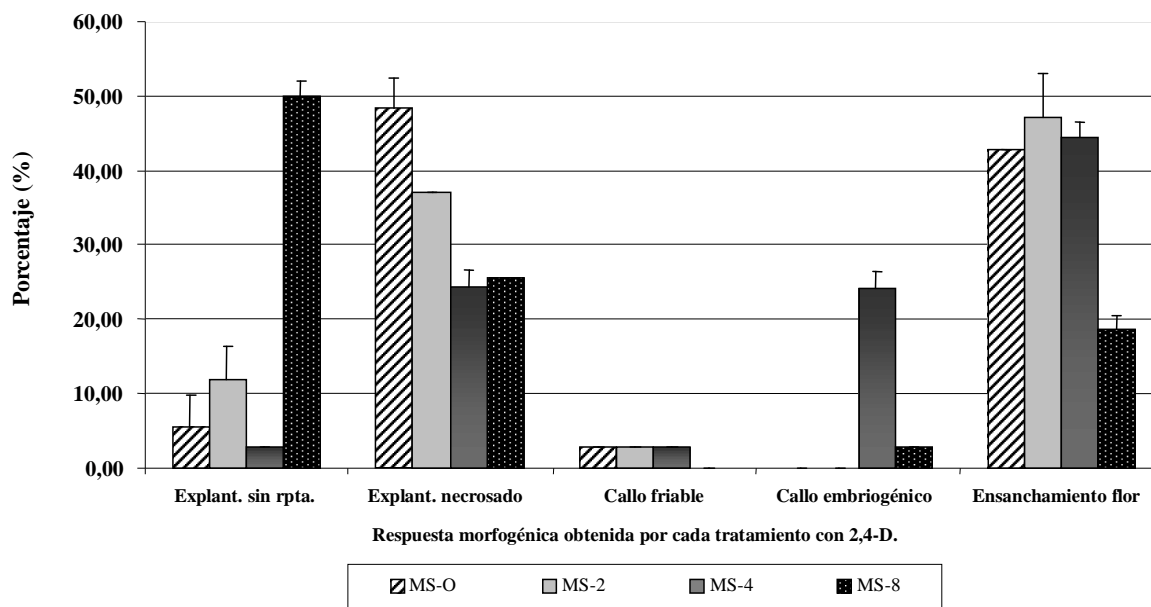


FIGURA 1. Respuesta morfológica obtenida del cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras de Pineo Gigante en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D.

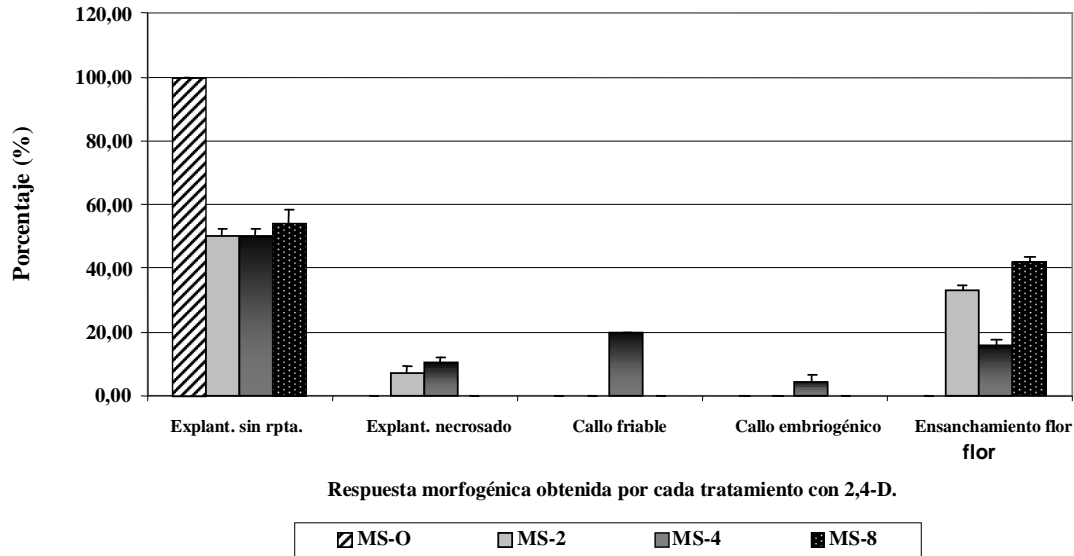


FIGURA 2. Respuesta morfológica obtenida del cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras de Cambrur Manzano en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D.

Estos resultados indican que el uso de un medio de cultivo MS con la adición de las auxinas AIA, ANA, fuentes adicionales de nitrógeno y 2,4-D a la concentración de 4 mg l⁻¹ permitió obtener ES tanto en Píneo Gigante (AAA) como en Cambrur Manzano (AAB). La diferencia en la respuesta obtenida entre los 2 tipos de musáceas es dependiente del genotipo. Se ha considerado que el potencial embriogénico de los genotipos de *Musa* aumenta con la presencia de cromosomas B. De esta manera, plátanos (AAB) y otros genotipos como ABB poseen mayor respuesta a la producción de callos y suspensiones embriogénicas que los genotipos AAA.

En el experimento probablemente otros factores genéticos o fisiológicos influyeron para que el porcentaje de callos embriogénicos en Cambrur Manzano fuera menor que el obtenido en Píneo Gigante, tal como la formación de compuestos fenólicos. De los 2 cultivares, en Cambrur Manzano se observó la liberación de sustancias fenólicas al medio de cultivo, lo cual debió influir en la respuesta morfológica obtenida.

La oxidación fenólica provoca un fenómeno de ennegrecimiento que ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas, como las ocasionadas al realizar cortes para extraer los explantes (Ramírez, 1998; Anderson y Ievinsh, 2002), lo que podría implicar que las oxidaciones fenólicas fuertes debido a los numerosos cortes que deben realizarse en los

explantes para su iniciación *in vitro*, podrían inhibir el crecimiento de los mismos y hacer que pierdan su viabilidad. Sin embargo, Trujillo y García (1999) señalan que la oxidación no constituyó un factor inhibitorio en la inducción de ES en diversos clones de musáceas; y Villegas *et al.* (2008) determinaron que seccionando la bellota con las inflorescencias masculinas y cultivando los explantes en la oscuridad se reducía drásticamente el proceso de oxidación de los explantes.

En el experimento aunque no se utilizó oscuridad total, los explantes se encontraban en condición de muy baja intensidad de iluminación o penumbra, lo que disminuyó la posibilidad de oxidación de los explantes, sin embargo, en Cambrur Manzano la generación de compuestos fenólicos al medio de cultivo, pudo afectar el porcentaje de callos embriogénicos obtenido.

Suspensiones celulares

Se observó la formación de células o agregados celulares en suspensión en uno de los erlenmeyer del cultivar Píneo Gigante (10%), en el medio de cultivo MS2. La suspensión celular se obtuvo a los 2 meses de cultivo con apariencia homogénea, de color beige y con alto porcentaje de viabilidad (85%). El medio de cultivo MS2 se diferencia del MS1, en que el primero presenta en su composición agua de coco y una mayor concentración de sacarosa; posiblemente estos compuestos influyen en la iniciación de una suspensión celular en Píneo Gi-

gante y futuro establecimiento de suspensiones celulares de muy buena calidad para la regeneración de plantas. En el caso de Cambur Manzano no se obtuvieron suspensiones celulares en ninguno de los medios de cultivo utilizados.

La tasa de éxito de la iniciación de una SCE de buena calidad depende de la calidad y volumen de los callos embriogénicos seleccionados. En el caso de las monocotiledóneas es necesario iniciar cientos de explantes para obtener un callo embriogénico de buena calidad e igualmente ocurre para obtener una suspensión celular de buena calidad. En algunos casos dependiendo del genotipo una suspensión celular puede tardar entre 7 y 14 meses (Strosse *et al.*, 2003).

El desarrollo reciente de SCE abre la posibilidad para la producción masiva de plantas de banano a bajo costo (Haicour *et al.*, 1998), sin embargo, la tasa de regeneración de plantas a través de este proceso no es alta, lo que es limitante para considerarlo como una alternativa para procesos eficientes de multiplicación *in vitro*.

Análisis histológico

En la Figura 3 se observa, la callogénesis a los 4 meses de cultivo para Pineo Gigante en medio M1-4, ya que

en Cambur Manzano la callogénesis fue relativamente baja. En la Figura 3a y 3b se observa la formación de callos friables con células parenquimáticas en activa división celular, pero aún no se observan estructuras embriogénicas.

En la Figura 4a se observa la morfología de un callo embriogénico en Pineo Gigante de color blanco-cremoso y friable; y en la Figura 4b, embriones globulares totalmente separados del tejido materno, con una capa de células epidérmicas bien definida que delimitan el embrión, así como una fuerte tinción de las células parenquimáticas que poseen un citoplasma denso. Vidal *et al.* (2000) demostraron el origen ontogenético de los ES en bananos, demostrando que procedían del parénquima perivascular en el caso de cultivo de hojas. En este caso, la adición de citocininas no favoreció el desarrollo posterior de los embriones globulares observados.

Con respecto a los otros medios de cultivo, se mencionan que los ES obtenidos fueron escasos. En la Figura 5 se observan flores masculinas ensanchadas y con necrosamiento de Pineo Gigante cultivadas en medio de cultivo M1-0, así como también la flor inmadura *in vivo* en donde se presentan las posiciones en las cuales, se extrajeron los explantes.

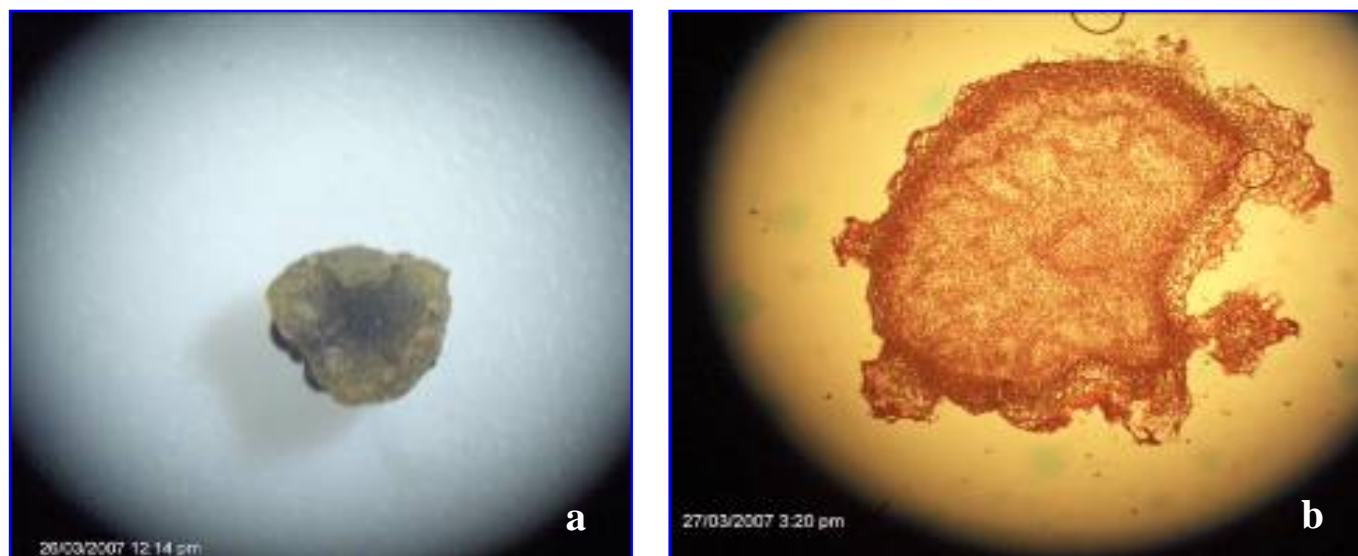


FIGURA 3. a. Vista a 4X de callos no embriogénicos de Pineo Gigante inducido en medio M1-4. b. Fotomicrografía a 20X de callogénesis. La formación de callo se obtuvo entre los 4 y 6 meses de cultivo.

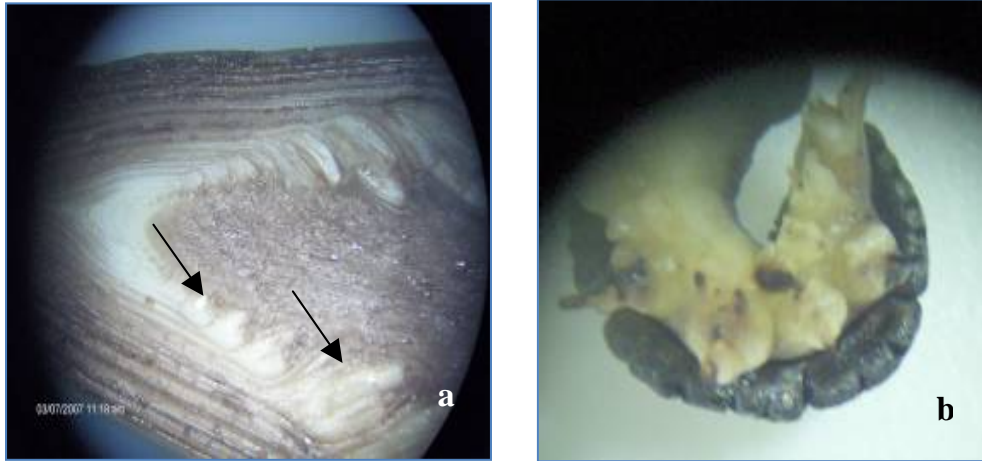


FIGURA 4. a. Callos embriogénicos de Pinoe Gigante inducido en un medio M1-4, visto a 4X. b. Fotomicrografía a 40X de callo embriogénico de Pinoe Gigante inducido en un medio M1-4. Los callos obtenidos poseen 6 meses de edad.

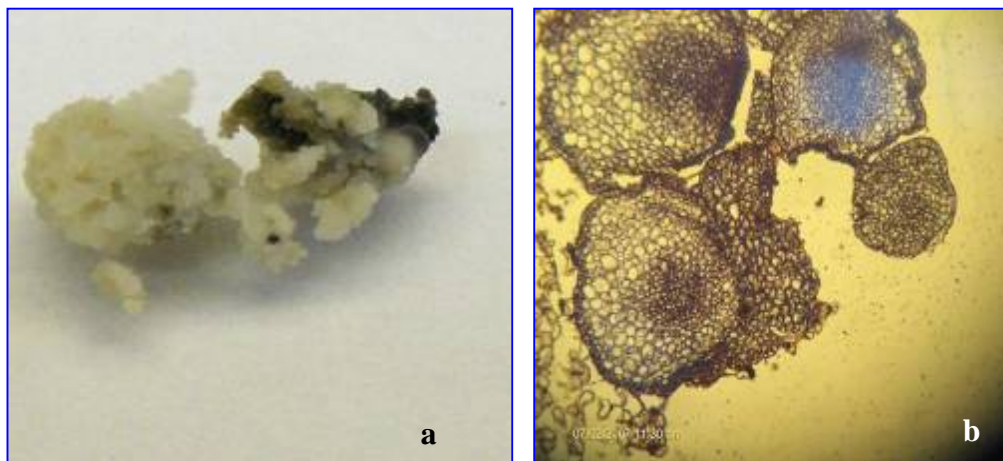


FIGURA 5. a. Flor inmadura de Pinoe Gigante en donde se observa desde la 6° hasta la 11° posición en los cuales se extrajeron los explantes b. Flores masculinas de Pinoe Gigante en medio M1-0, nótese el ensanchamiento de las flores sin ninguna respuesta morfogénica, vista a 4X.

CONCLUSIONES

- El análisis morfogénico e histológico efectuado reveló que el mejor medio de cultivo para la inducción de ES de los cultivares en estudio fue el M1-4 debido a su capacidad de inducir ES, y esto se relaciona con la concentración de 2,4-D utilizada (4 mg l^{-1}). Los resultados obtenidos en esta investigación indican que concentraciones mayores de esta hormona o su ausencia no promueven la ES para Pinoe Gigante.
- La oxidación fenólica resultó un factor determinante en el porcentaje de callo embriogénico obtenido para Cambur Manzano, donde la liberación de compuestos fenólicos fue mayor que para Pinoe Gigante, clon que no representó un problema en su establecimiento *in vitro*.
- Existe un efecto del genotipo en la respuesta obtenida y en el caso del Cambur Manzano presenta cierta recalcitrancia a los tratamientos en estudio.

- La composición del medio de cultivo MS2 fue efectivo en la iniciación de una SCE y puede contribuir en el establecimiento de SCE de buena calidad para la regeneración masiva de plantas de Píneo Gigante.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, U. and G. Ievinsh. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *In vitro*. *Annals of Botany* 90(2):293-298.
- Castillo, E. 2003. Proliferación de yemas para la embriogénesis somática en tres variedades de *Musa*. Tesis de Pregrado. San Juan de Los Morros, Venezuela. Universidad Experimental Rómulo Gallegos. 50 p.
- Côte, F., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson and J. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Escalant, J., C. Teisson and F. Côte. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Cell. Dev. Biol. 30P: 181-186.
- Escalant, J. y J. Sandoval. 1989. Inducción de callos, suspensión de células y posibilidades de regeneración en *Musa* sp. previa presión de selección. **In:** 9na Reunión de la Asociación para la Cooperación en Investigaciones de Banano en El Caribe y América Tropical. Resúmenes, Mérida, Venezuela. p. 35-42.
- Grapin, A., J. Ortíz, R. Domergue, J. Babeau, S. Monmarson, J. Escalant C. Teisson y F. Côte. 1998. Obtención de callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras masculinas y femeninas de *Musa*. *INFOMUSA*. 7(1):13-15.
- Haicour, R., V. Bui Trang, D. Dhed'a, A. Assani, F. Bakry and F. X. Cote. 1998. Banana improvement through biotechnology-ensuring food security in the 21st century (Abstract in English). *Cahiers Agricultures* 7:468-475.
- Houllou-Kido, L., E. Kido, M. Falco, M. Silva, A. Vargas, N. Nogueira, M. Lanzoni and A. Tulmann. 2005. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40(11):1 081-1 086.
- Jamaluddin, S., and F. Novak. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration of banana cultivars, *Musa* cv. Mas (AA) and *Musa* cv. Rastali (AAB). **In:** Proceeding: International Symposium on Recent Development in Banana Cultivation Technology (Valmayor RV y col eds). INIBAP/ ASPNET. Los Baños. Filipinas. pp. 201-212.
- Khalil, S., K. Cheah, E. Pérez and D. Gaskill. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell REp.* 20: 1128-1134.
- Krikorian, A. 1986. Callus and cell culture, somatic embryogenesis, androgenesis and related techniques for *Musa* improvement. Proceedings of an International Workshop held at Cairns. INIBAP. Camberra. 21:128-135.
- Liu, J., E. Rosa, E. Lizardi, A. Arocho, N. Díaz y J. A. Rodríguez, 1989. *In vitro* Propagation of Plantain (*Musa acuminata* x *M. balbisiana* AAB) and banana (*M. acuminata* AAA) in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 73(1):51-58.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-490.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2007. FAOSTAT. [En línea]. Datos estadísticos de consumo calórico de los principales cultivos en Venezuela. [Consultado: 03.03.2007]. [Disponible:] <http://faostat.fao.org/site/556/DesktopDefault.aspx?PageID=556>
- Ramírez, M. 1998. Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.). Trabajo de Grado. Maracaibo, Ven. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. Programa Fruticultura. Venezuela. 132 p.

- Ramírez, M., E. García and H. Finol. 2006. Ultrastructural studies on embryogenic and non embryogenic calluses from Williams' banana (*Musa* spp.). *Agronomía Trop.* 56(4):615-620.
- Roth, I. 1964. *Microtécnica Vegetal*. Escuela de Biología. Caracas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. 88 p.
- Schoofs, H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. *Dissertationes de Agricultura* 330. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 257 p.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J. V. Escalant and Côte; F. 2003. Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano (A. Vézina y C. Picq, eds). *Guías técnicas INIBAP* 8. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia. 36 p.
- Trujillo, I. and E. García. 1999. Somatic embryogenesis *in vitro* of *Musa* clones. *PHYTON* 64:7-17.
- Vidal, M., T. Vargas y E. García. 2000. Estudios anatómicos y morfológicos de la iniciación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices meristemáticos de *Musa* spp. *Acta científica Venezolana*. 51(2):78-83.
- Villegas, F. Z., A. C. Giménez, P. J. Vilchez, M. Moreno, L. Sandoval y M. Colmenares. 2008. Oxidación en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa* AAA). *Rev. Fac. Agron.* 25(3):