Rev. Agricultura Tropical Vol. 1 No. 2:32-41, 2015
RNPS: 2397 (Versión electrónica)

MULTIPLICACIÓN DEL CULTIVAR DE PLÁTANO 'CEMSA ¾' (AAB) EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Milagros Basail Pérez*, Víctor Medero Vega, Yadenys Torres Núñez, Ania Robaina Jiménez, Jorge López Torres, Arletys Santos Pino, Aymé Rayas Cabrera, Maricel Bauta Toledo, Yoel Beovides García y Yenisey Gutiérrez Sánchez.
Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP: 53 000, Villa Clara, Cuba.
** Autor para la correspondencia: sit.biotec@inivit.cu*

RESUMEN
Con el propósito de desarrollar un protocolo para la multiplicación del cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal, se evaluó el efecto del tiempo (5,0; 10,0 y 15,0 minutos) y la frecuencia de inmersión (cada 3,0; 6,0 y 8,0 horas por día), el efecto del volumen de medio de cultivo por planta (20, 30, 40 y 50 ml.explante^{-1}) y la densidad de explantes por frasco de cultivo (30, 50, 70 y 90 explantes.frasco^{-1}) para incrementar el coeficiente de multiplicación. Con el empleo de un tiempo de 10 minutos y una frecuencia de inmersión cada tres horas, se alcanzaron los mejores resultados en cuanto al número de explantes obtenidos. Con este tiempo y frecuencia de inmersión los explantes presentaron el mayor diámetro del pseudotallo. Para cada frasco de 10,0 L se inocularon 70 explantes y la renovación con 2800 mL de medio de cultivo (40 mL.explante^{-1}) con un tiempo de cultivo de 21 días permitió alcanzar la mayor productividad del material en fase de multiplicación.
Palabras claves: coeficiente, densidad de explantes, frecuencia, tiempo, volumen de medio de cultivo.

MULTIPLICATION OF BANANA CLONE 'CEMSA ¾' (AAB) IN TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

ABSTRACT
In order to develop a protocol for multiplication of Banana clone 'CEMSA ¾' (AAB) in temporary immersion systems, to determine the effect of immersion time (5, 10 and 15 minutes) and frequency (3, 6 and 8 hours per day), as well as, the volume effect of culture medium plants (20, 30, 40 and 50 ml/explant) and explants density per culture flask (30, 50, 70 y 90 explants/flask) to increase the multiplication coefficient. With 10 minutes immersion time and an immersion frequency every three hours, the best results were achieved in relation to the number of explants obtained. With this immersion time and frequency, explants showed the highest pseudo stem diameter. Seventy explants were inoculated in each 10,0 L culture flask. The highest productivity at the multiplication phase was achieved with a culture medium renewal of 2800 ml (40 ml/explants), and a 21 day culture time.
Keywords: coefficient, explants density, frequency, time, culture medium volume.

INTRODUCCIÓN
En Cuba los plátanos (*Musa* spp.) constituyen un cultivo estratégico de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional debido a su capacidad de producir

todos los meses del año, su elevado potencial de rendimiento, arraigados hábitos de consumo y diversidad de usos (Rodríguez, 2000).

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, la micropropagación es una alternativa desarrollada para la producción a gran escala de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60 del siglo pasado, sus principales desventajas son: bajos coeficientes de multiplicación, alto costo por mano de obra y la escasa posibilidad de automatización que brinda el proceso (Kitto, 1997).

Se han desarrollado investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, ya que reducen el costo por explantes, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* (Aitcken-Christie *et al*., 1995).

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) además de solucionar las dificultades de los cultivos en medios líquidos estáticos, abren la posibilidad de semiautomatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al*., 1993), permiten mayor facilidad de escalado y aumentan la eficiencia biológica y productiva del material propagado (Jiménez *et al.*, 1999; Castro, 2001). Al mismo tiempo la morfología y el comportamiento fisiológico de los cultivos en los sistemas de inmersión temporal son muy semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro,* lo que permite una mayor tasa de supervivencia (Escalona *et al*., 1999; Berthouly y Etienne, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar un protocolo para la multiplicación del cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) utilizando el Sistema de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) en el año 2012; ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Material vegetal

Se utilizaron yemas axilares del clon de plátano vianda 'CEMSA ¾' (AAB), procedentes del banco de donantes de plátanos y bananos del INIVIT.

Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de plátano 'CEMSA ¾' (AAB)

En fase de establecimiento se realizó una primera desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% durante 20 minutos, seguido por tres lavados con agua desionizada estéril durante 3-5 minutos cada uno. En condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar se redujo el tamaño del material vegetal hasta 2-3 cm de alto con una base cuadrada de 1,5 cm aproximadamente, seguido de una segunda desinfección por 10 minutos con NaOCl al 3% y tres lavados de dos minutos cada uno con agua destilada estéril (Montano *et al*., 2004). Luego se redujo el tamaño hasta obtener un ápice de aproximadamente 0,50 cm^2 para su incubación en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) (sales minerales y vitaminas), suplementado con sacarosa (30,0 $g.L^{-1}$); tiamina (1,0 $mg.L^{-1}$); cisteína (40,0 $mg.L^{-1}$); 6-BAP (2,70 $mg.L^{-1}$); AIB (0,30 $mg.L^{-1}$) con pH 5,7. (López *et al*., 1998). Pasados 21 días en el medio de cultivo antes mencionado, los ápices fueron seccionados a la mitad y se colocaron en el medio de multiplicación MS suplementado 2,0 $mg.L^{-1}$ de 6-BAP; 3,5 $mg.L^{-1}$de AIA; 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarosa; 10,0 $mg.L^{-1}$ de ácido ascórbico (control) propuesto por Ventura *et al*. (1998) donde se le realizaron dos subcultivos seguidos cada 21 días. A partir de los 21 días de realizado el

subcultivo se comenzó la multiplicación de los explantes en medio de cultivo líquido en Sistema de Inmersión Temporal.

Las condiciones de cultivo utilizadas para el establecimiento y multiplicación de los brotes de yemas axilares fueron las siguiente: cámara de cultivo con temperatura de 27,0±2,0°C e iluminación artificial mediante tubos fluorescente de 40 W, con un fotoperíodo de 16 horas luz y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62,0-68,0 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

El sistema de cultivo estuvo compuesto por dos frascos de cultivo tipo *Clearboys* (Compañía Nalgene, E.U.A) de 10,0 L de capacidad, uno para el crecimiento de los brotes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Los frascos de cultivo se conectaron entre sí con una manguera de silicona de seis milímetros de diámetro mediante conectores que atravesaron la tapa. En la parte interna se colocó una manguera, la cual descendió hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circuló de un frasco de cultivo a otro en dependencia de la apertura o cierre de dos electroválvulas de tres vías, las cuales estaban conectadas a un temporizador programable para determinar el tiempo y frecuencia de la inmersión. A la entrada de los frascos de cultivo se colocaron filtros hidrofóbicos (0,22 µm, MIDISART 2000, de la compañía SARTORIUS) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire de 2,0 atm proveniente de un compresor, fue regulada por un manómetro.

Efecto del tiempo de inmersión

Se evaluaron tres tiempos de inmersión: 5,0; 10,0 y 15,0 minutos cada seis horas (cuatro inmersiones por día). Se utilizó el medio de cultivo de multiplicación propuesto por Ventura *et al*. (1998) y las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Se adicionaron 2000 mL de medio de cultivo por frasco.

Efecto de la frecuencia de inmersión

Para determinar el efecto de la frecuencia de inmersión se realizaron inmersiones cada 3,0; 6,0 y 8,0 horas, con el mejor tiempo de inmersión obtenido como resultado del experimento anterior.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales del primer experimento, así como el medio de cultivo. Se adicionaron 2000 mL de medio de cultivo por frasco.

Determinación del volumen de medio de cultivo en el sistema de inmersión temporal

Para la realización de este experimento se empleó el mejor resultado del experimento anterior (frecuencia de inmersión). Se evaluó el efecto de cuatro volúmenes de medio de cultivo (cantidad de nutrientes) por explantes: 20; 30; 40 y 60 mL. El volumen de medio de cultivo fue de 1000; 1500; 2000 (control) y 3000 mL Se emplearon las mismas condiciones del experimento anterior, excepto la cantidad de nutrientes por explantes.

Determinación de la densidad de explantes por frasco

A partir de los resultados obtenidos en el Sistema de Inmersión Temporal con condiciones predeterminadas por las experiencias en el manejo de los mismos, se estudió la densidad de inóculo con el objetivo de mejorar las condiciones de cultivo, así como la calidad del proceso. Se evaluó la influencia de cuatro densidades de inóculo: 30,0; 50,0; 70,0 y 90,0 explantes por frasco y volúmenes de medio de cultivo por frasco de 1200 mL; 2000 mL; 2800 mL y 3600 mL en la producción de explantes (40 ml por explante). Para determinar la densidad de inóculo se utilizó el mejor resultado obtenido en el experimento anterior.

En todos los experimentos las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo, se colocaron 50 brotes de yemas axilares por frasco de cultivo, excepto en el experimento de densidad de explantes y se realizaron tres repeticiones por tratamiento donde se evaluó:

- Coeficiente de multiplicación (unidades). Se determinó por el número de brotes finales con respecto al número de brotes iniciales.
- Altura de los brotes de yemas axilares (cm). Se midió desde la base del pseudotallo hasta la inserción de la primera hoja.
- Grado de oxidación según escala de Novak *et al*. (1994)
  Grado 0: no hubo oxidación, coloración del explante de blanco – amarillo crema.
  Grado 1: Incipiente coloración carmelita sin llegar a la necrosis del tejido.
  Grado 2: 25% de tejido necrótico en la base del explante.
  Grado 3: 50% de tejido necrótico en la base del explante.
  Grado 4: 75% de tejido necrótico en la base del explante con penetración.
  Grado 5: 100% de tejido necrótico en la base del explante con penetración y se necesitan cortes profundos para lograr que la asimilación de nutrientes sea efectiva.
- Diámetro del pseudotallo de los brotes de yemas axilares (cm). Se midió el diámetro de la base del pseudotallo.
- Número de hojas de los brotes de yemas axilares (unidades). Se contaron las hojas que estaban abiertas.

Procesamiento estadístico

Con los criterios de estadística descriptiva se realizaron las tablas que expresan los resultados procesados con estadística inferencial paramétrica (análisis de varianza de clasificación simple). La comparación múltiple de medias se realizó según Tukey cuando se encontró homogeneidad de varianza, (Lerch,1977). Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C de la Universidad de Micchigan (Bricker, 1993, citado por Guzmán y Castaño, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de inmersión

Al aplicar un tiempo de inmersión de 10 minutos (Tabla 1) se obtuvieron los mejores resultados en todas las evaluaciones realizadas para el coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo, grado de oxidación, número de hojas y altura del explante con diferencias significativas respecto al resto.

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado de oxidación	Número de hojas	Altura (cm)
5 minutos	5,41 c	0,17 c	4,56 c	2,12 c	1,99 c
10 minutos	7,10 a	0,69 a	3,33 a	3,83 a	2,53 a
15 minutos	6,26 b	0,28 b	3,86 b	3,01 b	2,01 b
EE ±	0,32*	0,03*	0,13*	0,18*	0,11*
CV (%)	10,92	12,59	13,04	18,07	15,20

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<0,05 según prueba de Tukey.

Roels *et al*. (2005) cuando incrementaron el tiempo de inmersión de 12 minutos, lograron lo mejores resultados en la multiplicación y las características morfológicas de los brotes de plátano 'CEMSA ¾' (AAB), no siendo así con un tiempo de 22 minutos, donde los brotes presentaron hiperhidricidad, inferior desarrollo en longitud y menor número de hojas.

Lo anterior demuestra la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases de cultivo en la micropropagación cuando se emplean SIT, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (Berthouly y Etienne, 2005; Escalona, 2006).

Efecto de la frecuencia de inmersión

Al realizar las inmersiones cada 3 horas, durante 10 minutos se obtuvieron los máximos valores para el coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo, grado de oxidación, número de hojas y altura del explante, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos sin la presencia de brotes hiperhidratados, ni multiyemas (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de inmersión en los brotes axilares en el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado de oxidación	Número de hojas	Altura (cm)
3 horas	8,93 a	0,16 c	4,11 a	3,13 c	2,00 c
6 horas	6,91 c	0,73 a	3,17c	4,08 a	3,03 a
8 horas	7,18 b	0,50 b	3,38 b	3,85 b	2,49 b
EE ±	0,32*	0,04 *	0,10 *	0,13 *	0,12 *
CV (%)	10,40	15,35	12,39	17,37	16,18

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p<0,05$ según prueba de Tukey.

Sin embargo, Basail *et al.* (2012) en el cultivar de plátano 'INIVIT PV 06 – 30' (AAB), obtuvieron el mejor coeficiente de multiplicación (10.90) con inmersiones cada 6 horas. Colmenares y Jiménez (2003) en el banano 'Gran Enano' (AAA) con inmersiones de dos minutos cada cuatro horas obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 7,5 y para veinte minutos cada cuatro horas un índice de multiplicación de 8,0 en frascos de 10,0 L, lo que demuestra que es necesario determinar para cada genotipo, el tiempo y frecuencia de inmersión.

Los altos coeficientes de multiplicación pueden estar dados porque los tiempos de inmersión son cortos, por lo tanto los explantes están recubiertos de una película de medio de cultivo líquido y de esta forma se evita la desecación de los mismos. La resistencia a la difusión de gases es baja y existe una mínima ruptura de intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmósfera interna del frasco de cultivo, por tal razón esta se renueva en intervalos regulares de tiempos (Cabrera, 2009).

La frecuencia y el tiempo de inmersión constituyen factores importantes en la respuesta morfogénica de las diferentes especies de plantas. En el cultivar de ñame 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* (L) Point), Cabrera *et al*. (2005) emplearon un tiempo de inmersión de diez minutos y una frecuencia de 6 horas y obtuvieron 4,7 microtubérculos en frascos de inmersión temporal de cinco litros.

Los tiempos y frecuencias de inmersión que se ensayaron según las posibilidades de automatización, demostraron que con diez minutos de inmersión y tres horas empleados en los experimentos, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la producción y calidad de los brotes.

Determinación del volumen de medio de cultivo en el sistema de inmersión temporal

El volumen de medio de cultivo tuvo influencias en el Sistema de Inmersión Temporal "Nalgene Co'' de 10,0 L de volumen total con la adición de 50 explantes sobre el coeficiente de multiplicación de los brotes. El mayor valor se alcanzó cuando se empleó una relación de 40 ml de medio de cultivo (11,99) por explante sin diferencias significativas con el tratamiento de 50 ml por explante y sí con los tratamientos de 20 y 30 ml por explante.

Los tratamientos de 40 y 50 ml/explante presentaron el comportamiento más favorable (Tabla 3), sin diferencias significativas entre ellos en cuanto a las variables diámetro del pseudotallo, grado de oxidación y número de hojas activas, no siendo así en cuanto a la

variable altura del explante, donde si existe diferencia significativa del tratamiento (40 ml/explante), con los demás.

Tabla 3. Efecto del volumen de medio de cultivo en el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado de oxidación	Número de hojas	Altura (cm)
20 ml/explante	8,13 c	0,72 b	3,30 a	2,98 b	1,05 c
30 ml/explante	9,60 b	0,70 b	3,10 a	3,01 b	1,86 b
40 ml/explante	11,99 a	0,97 a	2,61 b	3,00 a	1,40 a
50 ml/explante	11,82 a	0,99 a	2,69 b	3,03 a	1,79 b
EE ±	0,25*	0,03*	0,09*	0,11*	0,11*
CV (%)	12,36	15,32	12,34	17,34	16,17

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<0,05 según prueba de Tukey.

Con los volúmenes de medio de cultivo 40 y 50 ml.explante^{-1} se obtuvieron los mejores resultados en la multiplicación de los brotes de yemas axilares, debido a que se garantizó durante esta fase de cultivo un adecuado equilibrio entre las necesidades de nutrientes de los brotes de yemas axilares y la disponibilidad de los mismos en el medio de cultivo, en comparación con los volúmenes de 20 y 30 ml. de medio de cultivo por explante. Lo que demuestra la necesidad de ajustar el volumen de medio de cultivo por explantes cultivados en el SIT, sin renovación del medio de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005).

Colmenares y Jiménez (2003) al utilizar un volumen de medio de cultivo de 20 ml por brote de yema axilar en el cultivar de banano 'William' obtuvo los mejores resultados en la fase de multiplicación en cuanto al coeficiente de multiplicación que fue de 8,45 .

Basail *et al*. (2013) demostraron que para el clon de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB), con un volumen de medio de cultivo de 60 ml por explante, en frascos de Sistema de Inmersión Temporal incrementó el coeficiente de multiplicación a 7,58 por cada explante inoculado.

Determinación de la densidad de explantes por frasco

Con el empleo de 70 explantes por frasco de 10 litros de capacidad se obtuvieron los mayores valores en cuanto al coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo y altura del explante, con diferencias significativas con los demás tratamientos. En cuanto al grado de oxidación se obtiene el menor valor sin diferencias significativas con el tratamiento de 50 explantes, al igual que con el número de hojas activas, sin diferencias con el tratamiento cuatro (90 explantes) pero sí con el resto. (Tabla 4).

Tabla 4. Determinación de la densidad de explante por frasco de cultivo en el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB).

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado de oxidación	Número de hojas	Altura (cm)
30 explantes	13,42 c	0,74 c	4,05 a	3,25 a	1,38 b
50 explantes	14,92 b	0,98 b	2,40 c	3,03 a	1,48 b
70 explantes	15,99 a	1,10 a	2,35 c	2,07 b	1,64 a

90 explantes	12,30 d	0,83 c	3,90 b	2,35 b	1,08 c
EE ±	0,36*	0,03 *	0,12 *	0,08 *	0,11 *
CV (%)	11,83	16,32	15,47	11,83	13,01

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<0,05 según prueba de Tukey.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó la densidad de 70 explantes por frasco de cultivo, pues hay una mayor asimilación de los nutrientes que componen el medio de cultivo y por tanto un mejor aprovechamiento de los frascos de cultivo de 10,0 L de capacidad (Figura 1).



Figura 1. Plantas *in vitro* del cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) multiplicadas en el Sistema de Inmersión Temporal con una densidad de 70 explantes por frasco de cultivo de 10,0 L de capacidad.

En el cultivar 'Gran Enano' (AAA), con el empleó del sistemas de inmersión temporal de 5,0 litros de capacidad, Albany (2001) señaló que la variable que determinó un incremento en el coeficiente de multiplicación, peso de los brotes, peso final y peso útil, es la densidad de inóculo, obteniendo los mejores resultados con 25 explantes.
Según Posada *et al*. (2003) los mejores resultados para la multiplicación de los cultivares de banano 'FHIA-01' y 'FHIA-18' se alcanzaron con la densidad de cinco explantes y una frecuencia de inmersión de tres veces durante un minuto cada 24 horas, en frascos de inmersión temporal (sistema RITA®).
Basail *et al*. (2013) obtuvieron que para el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en frasco de Sistema de Inmersión Temporal de 10 litros de volumen total, al utilizar una densidad de 60 explantes por frasco aumentaron el coeficiente de multiplicación de 4,18 a 8,45.
De forma general los experimentos desarrollados permitieron establecer una metodología que incrementa significativamente el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB), basada en la inmersión temporal de los explantes. La superioridad del nuevo método entre otros aspectos está dada por el empleo del medio de cultivo en estado líquido, que a diferencia del medio de cultivo en estado semisólido, facilita la asimilación de los nutrientes por los explantes. Además, en estos sistemas los explantes no están constantemente en contacto con el medio de cultivo, sino, sólo a determinada frecuencia y un período corto de tiempo que permite la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la acumulación de

gases nocivos como el etileno, así como, facilita la regulación de la concentración de CO_2 y mejora la oxigenación de los tejidos. Lemos *et al*. (2001) demostraron que los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de los nutrientes, lo cual se traduce en un crecimiento más vigoroso y mejor desarrollo. Además, estos aspectos positivos del SIT, favorecen un incremento en la fotosíntesis de las plantas (Castro *et al*., 2001).

CONCLUSIONES

Se logró multiplicar el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia de inmersión cada 3 horas con 40 ml de medio de cultivo por explante y 70 explantes por frasco de cultivo se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al coeficiente de multiplicación (15,99). El coeficiente de multiplicación y la calidad del material vegetal permitirán la introducción de explantes en las biofábricas del país.

BIBLIOGRAFÍAS

AITKEN-CHRISTIE, J.; H.E. DAVIES; C. KUBOTA and T. KOSAI. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction overview: Automation and environment control in Plant Tissue Culture Kluwer, Academic Publisher, Dordrech, pp.1-19.

ALBANY, N. 2001. Efectos de retardantes del crecimiento en la micropropagación de bananos en medios de cultivo líquidos en agitador orbital y sistemas de inmersión temporal. Tesis para optar por el grado científico de Master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, pp. 34-36.

ALVARD, D.; F. COTE and C. TEISSON. 1993. Comparison of methods of liquids medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 32(1): 55-60.

BASAIL, M.; V. MEDEROS; E. OTERO; M. TORRES; J. LÓPEZ; M. CABRERA; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA y Y. BEOVIDES. 2012. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' (*Musa* spp., AAB). *Biotecnología Vegetal,* 12(1): 53-57.

BASAIL, M.; V. MEDEROS; E. OTERO; M. TORRES; J. LÓPEZ; M. CABRERA; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA y Y. BEOVIDES. 2013. Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV-2011' (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal,* 15(1): 98-107.

BERTHOULY, M. and H. ETIENNE. 2005. Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: A. K. Hvoslef-Eide y W. Preil (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp. 165-195.

CABRERA, M.; R. GÓMEZ; M. BASAIL; A. SANTOS; V. MEDEROS; J. LÓPEZ; A. RAYAS; M. GARCÍA and J. VENTURA. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 83(1): 103-107.

CABRERA, M. 2009. Formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon 'Pacala duclos' en Sistema de Inmersión Temporal como material vegetal de plantación. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias

Agrícolas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV). Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). 94 p.

CASTRO, D. 2001. Propagación mixotrófica de *Eucalipto grandis* Hill ex Maide en biorreactores de inmersión temporal. Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplantas. Cuba.

COLMENARES, M Y JIMÉNEZ, C. 2003. Multiplicación *in vitro Musa* spp. mediante el Sistema de Inmersión Temporal. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 20(4): 468-477. Caracas, Venezuela. Consultada el 22 de Julio del 2011. Disponible en: http://200.74.222.178/index.php/agronomia/article/download/12037/12026

GUZMÁN, O. A. Y CASTAÑO, J. 2002. Reconocimiento de nemátodos fitopatógenos en plátanos 'Dominico hartón' (*Musa* AAB, Simmonds), 'Africa', 'FHIA-20' y 'FHIA-21' en Colombia. *InfoMusa*, 11(2):34-35.

JIMÉNEZ, E.; N. PÉREZ; M. de FERIA; R. BARBÓN; A. CAPOTE; M. CHÁVEZ; E. QUILA and C. PÉREZ. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 59(1):19-23.

KITTO, S.L. 1997. Commercial Micropropagation. *HortScience,* 32(6):1012-1014.

LEMOS, O.F.; M.S. FERREIRA; L.M. ALENTAR; J.G. OLIVEIRA y V.S. MAGALHA. 2001. Micropropagación de clones de banana cv. Terra en Biorreactor de inmersión temporal. *Rev. Brasileña de Fruticultura,* 23(3): 482-487.

LERCH, G. 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Científica y Técnica. La Habana, 288p.

LÓPEZ, J.; J.C. VENTURA y J.A. PINO. 1998. Genetic Improvement of *Musa* spp. by *in vitro* mutational plant breeding. Report of the Second Research Co-ordination Meeting of FAO/IAEA/BADC Co-ordinate Research Project, held in Kuala Lumpur, Malaysia, 13-17 October, 1997. IAEA, Vienna, Austria, pp. 63-64.

MONTANO, N.; D. REYNALDO; J. LÓPEZ; M. TORRES; E. OTERO; V. GUTIÉRREZ y M. MARTÍNEZ. 2004. Nueva metodología para la implantación *in vitro* del plátano y el banano en biofábricas. XVI Forum de Ciencia y Técnica Municipal. Santo Domingo, Villa Clara, 8p.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, pp. 473-497.

NOVAK, F., AFZA, R., DUREN, M. 1994. Field evaluation of tissue-culture bananas in grade oxidation. *Australian Journal of Experimental Agriculture,* 30: 569-574.

POSADA, P.L.; R. GÓMEZ; M. REYES y L. ÁLVAREZ. 2003. Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Biotecnología Vegetal,* 3(1): 6-8.

RODRÍGUEZ, S.; FOLGUERAS, M.; MEDERO, V. 2000. La Yuca en Cuba. *Continente Yuquero.* Informativo del Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca, CLAYUCA. Colombia. N^{o} 2. Agosto, 5p.

ROELS, S.; NOCEDA, C.; ESCALONA, M.; SANDOVAL, J.; CANAL, M.; RODRÍGUEZ, R.; DEBERGH, P. 2005. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by Temporary immersion System. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* 82:57-66.

VENTURA, J.; V. MEDERO; J. LÓPEZ; M. GARCÍA; S. RODRÍGUEZ; J. GARCÍA y D. REYNALDO. 1998. Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de Plátano ´FHIA-18´. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacios de Convenciones de La Habana. FAO. Cuba, 64p.