

Influencia de las condiciones de iluminación en la germinación de embriones somáticos del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Influence of illumination conditions on germination of somatic embryos of plantain crop hybrid 'FHIA-21'.

L. García Águila¹, R. Gómez Kosky¹, N.R. Albany², J.A. Vilchez³,
Y. Alvarado¹ y M. Reyes¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5,5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54830.

²Departamentos de Química y ³Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

La germinación de los embriones somáticos y formación de plantas completas es determinante en la eficiencia de la propagación masiva a través de la embriogénesis somática. Las condiciones de iluminación es uno de los factores de mayor influencia en la germinación y es por ello que se evaluó su influencia en la germinación de embriones somáticos del cultivar híbrido 'FHIA-21'. Los embriones somáticos maduros fueron colocados en cámaras de crecimiento con iluminación solar y artificial. A los 15 días se evaluó el número de embriones germinados con plúmula clorofílica expuesta y la formación de plantas completas. Se evidenció el efecto de las condiciones de iluminación en el desarrollo del proceso de germinación de los embriones somáticos. Las condiciones de cultivo en cámara de crecimiento con luz artificial y fotoperíodo de 16 horas luz proporcionaron mayor número de embriones germinados (29,4) y la formación de nuevos embriones somáticos a partir de los existentes, originados por embriogénesis secundaria o repetitiva.

Palabras clave: embrión somático, germinación, *Musa*, intensidad de luz.

Abstract

The germination of the somatic embryos and formation of complete plants is decisive in the efficiency of the massive propagation through the somatic

Recibido el 11-9-2006 • Aceptado el 10-6-2007

Autor de correspondencia e-mail: leyanis02@yahoo.es; leyanis05@ibp.co.cu; nilca_albany@cantv.net; jvilchez@cantv.net

embryogenesis. The conditions of illumination is one of factors of more influence in the germination and it is for that their influence was evaluated in the germination of somatic embryos of cultivating hybrid 'FHIA-21'. The mature somatic embryos were placed in growing cameras with solar and artificial illumination. At 15 days the number of germinated embryos and formation of complete plants were evaluated. The influence of the illumination conditions was evidenced in the development of germination process of the somatic embryos. The crop conditions of the controlled-growth environment chamber with artificial light and photoperiod of 16 hours light provided the highest number of germinated embryos (4, 29) and the formation of new somatic embryos from the existent ones, originated by secondary o repetitive embryogenesis.

Key words: germination, *Musa*, somatic embryos, illumination intensity.

Introducción

La regeneración vía organogénica a partir del cultivo de yemas axilares se mantiene como el método de propagación *in vitro* más utilizado en *Musa* sp. Sin embargo, algunos cultivares tetraploides de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) se consideran altamente "recalcitrantes" por el bajo coeficiente de multiplicación y crecimiento de brotes en forma de rosetas (4).

En *Musa*, la embriogénesis somática se desarrolló con dos propósitos, el mejoramiento genético con la aplicación de técnicas de ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas (5).

El cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (AAAB) ha ganado importancia en Cuba y en varios países de América Latina debido a sus características agronómicas y organolépticas, por lo cual se consideró importante utilizar la embriogénesis somática para la propagación masiva de plantas de este híbrido.

Daniels *et al.*, (1) determinaron parámetros físicos y biológicos para

Introduction

The regeneration via organogenic from crop of axil buds keeps like *in vitro* propagation method more used in *Musa* sp. However, some tetraploid crops of the Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) are considered like highly "recalcitrant" by its little coefficient of multiplication and growing of buds as a rowel form (4).

In *Musa*, the somatic embryogenesis was developed with two purposes, the genetic improvement with the application of techniques of genetic engineering and for the massive propagation of plants (5).

Cultivar of plantain hybrid 'FHIA-21' (AAAB) have been gain importance in Cuba and in some countries of Latin America because its agronomical and organoleptic characteristics, so it is important to use the somatic embryo genesis for the massive of plants of this hybrid.

Daniels *et al.*, (1) determined physical and biological parameters for the genetic transformation of the cul-

la transformación genética del cultivar híbrido 'FHIA-21' y propusieron un sistema de regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática. Sin embargo, el porcentaje de germinación de los embriones somáticos fue bajo para su utilización en la propagación masiva de este cultivar.

Durante el estudio de la embriogénesis somática en diferentes cultivares de banano Strosse *et al.* (14) consideraron como factores importantes la presencia de agregados embriogénicos en la suspensión celular, la edad de la suspensión celular embriogénica y las condiciones de iluminación en la cámara de cultivo. Tomando en cuenta este último factor en este trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de iluminación en la germinación de embriones somáticos del cultivar híbrido 'FHIA-21'.

Materiales y métodos

Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares

Los callos con estructuras embriogénicas se formaron a partir de flores masculinas inmaduras extraídas de la inflorescencia de plantas de campo. La formación de callos se observó a partir del quinto mes en el medio de cultivo semisólido propuesto por Escalant *et al.* (3), en condiciones de oscuridad y temperatura de $27 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Se observaron callos de diferentes aspectos morfológicos, pero para el establecimiento de las suspensiones celulares solo fueron seleccionados los callos formados por grupos

de cultivar híbrido 'FHIA-21' and they proposed a plants regeneration system through somatic embryo genesis. However, the germination percentage of somatic embryos was little for its use in the massive propagation of this crop.

During study of the somatic embryo genesis in different banana crops, Strosse *et al.* (14) considered like important factors the presence of embryogenic added in the cellular suspension, age of the embryogenic cellular suspension and the illumination conditions in the crop camera. Taking into consideration this last factor, in this paper the effect of the illumination conditions on germination of somatic embryos of cultivar hybrid 'FHIA-21' was evaluated.

Materials and methods

Callus formation and cellular suspension establishment

Callus with embryogenic structures were formed from immature male flowers extracted from inflorescence of field plants. Callus formation was observed from fifth month in the semi-solid crop medium proposed by Escalant *et al.* (3), in darkness conditions and temperature of $27 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Callus of different morphological aspects were observed but for the establishment of cellular suspension only were selected those callus formed by pro embryos groups and somatic embryos transparent in globular stage (13).

For the establishment and multiplication of the embryogenic

de proembriones y embriones somáticos translucidos en etapa globular (13).

Para el establecimiento y multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas se utilizó el medio de cultivo líquido propuesto por Daniels *et al.* (1), que contenía las sales propuestas por Murashige y Skoog (MS) (10); 0,5 mg.L⁻¹ de biotina; 100 mg.L⁻¹ de L-glutamina; 100 mg.L⁻¹ de extracto de malta, 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 45 g.L⁻¹ de sacarosa. Se utilizaron Erlenmeyer de 25 mL de volumen con 3 mL de medio de cultivo, a los cuales se adicionaron 150 mg de masa fresca de proembriones y embriones en estado globular. Después de 15 días de cultivo, las suspensiones celulares formadas fueron tamizadas a través de filtros de malla metálica con un tamaño de poro de 500 μ m. A partir de los filtrados se inició la multiplicación de las suspensiones celulares y con ello el incremento de la cantidad de agregados celulares embriogénicos. Para ello fue necesario utilizar Erlenmeyer de 250 mL de volumen y adicionar 25 mL de medio de cultivo líquido. Cada 15 días se renovó la mitad del medio de cultivo y se adicionó medio de cultivo fresco. Los Erlenmeyer se colocaron en un agitador orbital INFORS modelo HT a una velocidad de 90 rpm, en condiciones de oscuridad y temperatura de 27 \pm 2,0°C.

Formación de embriones somáticos

Los embriones somáticos se derivaron a partir de los agregados celulares embriogénicos en suspensión, colocados en medio de cultivo

cellular suspensions the liquid crop medium proposed by Daniels *et al.* (1) was used, it container salts proposed by Murashige and Skoog (MS) (10); 0.5 mg.L⁻¹ of biotine; 100 mg.L⁻¹ of L-glutamine; 100 mg.L⁻¹ of malt extract, 3 mg.L⁻¹ of 2.4-D and 45 g.L⁻¹ of succrose. Erlenmeyer of 25 mL of volume with 3 mL of the culture medium, to those 150 mg of fresh mass of pro embryos and embryos were added. After 15 days of cultivation, the formed cellular suspensions were sieved through filters of metallic with a pore size of 500 μ m. From filtrates the multiplication of cellular suspensions was began and the quantity of embryogenic cellular aggregates increased too. It was necessary to use Erlenmeyer of 250 mL volume and to add 25 mL of liquid culture medium. Each 15 days the half of culture medium was renovated and fresh culture medium was added. Erlenmeyer were placed in an orbital agitator INFORS model HT at a speed of 90 rpm in and temperature of 27 \pm 2.0°C.

Formation of somatic embryos

They were derivate from embryogenic cellular aggregates in suspension, placed in semi solid culture medium and total darkness. The culture medium proposed by Dhed *et al.* (2) was used. The somatic embryos formed in globular state were placed into a culture medium of maturity and subsequently they were moved to a culture medium of germination, both proposed by Gomez *et al.* (7).

Effect of the illumination conditions in germination of

semisólido y oscuridad total. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Dhed *et al.* (2). Los embriones somáticos formados en estado globular se colocaron en medio de cultivo de maduración y posteriormente fueron transferidos a medio de cultivo de germinación, ambos propuestos por Gómez *et al.* (7).

Efecto de las condiciones de iluminación en la germinación de los embriones somáticos.

Para estudiar el efecto de las condiciones de iluminación en la germinación, se colocaron 10 grupos de embriones por frasco (500 mL de capacidad total) que contenían 60 mL de medio de cultivo de germinación. Los grupos contenían de 4 a 5 embriones maduros y se establecieron 20 repeticiones (frascos) por tipo de iluminación estudiada. Los frascos se colocaron en:

Cámara de crecimiento con luz solar, fotoperíodo promedio de 12,5 horas luz y densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de $50-62,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cámara de crecimiento con luz artificial (lámparas fluorescentes de 40 W del tipo Full Spectrum), fotoperíodo de 16 horas luz y DFFF de $62-68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La calidad de la luz respecto a la disponibilidad del espectro fue similar en ambas cámaras de crecimiento objeto de estudio. Al igual que la luz solar, las lámparas fluorescentes de 40 W del tipo Full Spectrum se caracterizan por presentar todos los colores del arco iris y temperatura del color de $6500 \text{ }^\circ\text{K}$ (10). En ambas condiciones de iluminación es-

somatic embryos

For studying the effect of the illumination conditions on germination, 10 groups of embryos were placed by flask (500 mL of total capacity) by containing 60 mL of culture medium of germination. Groups had 4 - 5 mature embryo and 20 repetitions were established (flasks) by type of illumination studied. Flasks were placed on:

Growing chamber with solar light, mean photo period of 12.5 hours light and flux density of photons (DFFF) of $50-62.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Growing chamber with artificial light (fluorescents lamps of 40 W of the type Full Spectrum), photo period of 16 hours light and DFFF of $62-68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Light quality respect to availability of spectra was similar in both growing chambers studied. As same as solar light, the fluorescent lamps of 40 W of type Full Spectrum are characterized by presenting every color of rainbow and heat temperature $6500 \text{ }^\circ\text{K}$ (10). In both illumination conditions studied, temperature was of $27 \pm 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$.

At 15 days the somatic embryos number was determined with germination type I and type II according to classification established by Escalant *et al.* (3). Germination type I corresponded to embryos germinated with chlorophyll plumule exposed (little protuberance of green color) whereas germination of type II corresponded to embryos totally germinated it means formation of plants with opened leaves.

Statistical analysis

tudiadas, la temperatura fue de $27 \pm 2,0^\circ\text{C}$.

A los 15 días se determinó el número de embriones somáticos con germinación tipo I y tipo II según la clasificación establecida por Escalant *et al.* (3). La germinación de tipo I correspondió a los embriones germinados con plúmula clorofílica expuesta (pequeña protuberancia de color verde). Mientras que la germinación de tipo II correspondió a los embriones germinados completamente, o sea formación de plantas con hojas abiertas.

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar y se realizaron dos repeticiones del experimento con el objetivo de disponer de suficientes datos para validar los resultados. Los datos que corresponden al número de embriones con germinación de tipo I y II por frasco se procesaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5,1 para Windows de Microsoft®.

Resultados y discusión

Se demostró el efecto de las condiciones de iluminación en la germinación de los embriones somáticos del cultivar híbrido 'FHIA 21'. Los mejores resultados respecto al número de embriones con germinación tipo I y II se obtuvieron en la cámara de crecimiento con luz artificial. Estos resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los obtenidos en la cámara con luz solar (cuadro 1).

The experimental design used was totally at random and two replications were accomplished with the purpose of getting enough data for validating results. Data corresponding to number of embryos with germination of type I and II by flask were processed with the non parametric test of Kruskal-Wallis. The statistical program Stat graphics Plus version 5.1 for Windows of Microsoft® was used.

Results and discussion

The effect of illumination conditions on germination of somatic embryos of the cultivar hybrid 'FHIA 21'. The better results respect to number of embryos with germination type I and II were obtained in the growing chamber with artificial light. These results showed statistical significant differences respect to those obtained in the chamber with solar light (table 1).

The somatic embryos placed on growing chambers with artificial light developed with high rapidity the events related to germination in a semi-solid culture medium. At 15 days of culture was quantified a high number of embryos germinated with formation of total plants and embryos with the chlorophyll plumule exposed (table 1, figure 1A) besides of formation of new embryos from those existents originated by secondary or repetitive embryogenesis which also germinated.

An important factor to be considered in the photomorphogenic answer of vegetable tissues is the light

Cuadro 1. Efecto del tipo de iluminación en el número de embriones somáticos germinados del cultivar híbrido 'FHIA 21' a los 15 días de cultivo.

Table 1. Effect of the illumination type on number of germinated somatic embryos of the cultivar hybrid 'FHIA 21' at 15 cultivation days.

Tipo de iluminación	Germinación tipo I		Germinación tipo II	
	Nº de ES	Media de Rangos	Nº de ES	Media de Rangos
Artificial	20,1	29,4 ^a	1,65	27,5 ^a
Solar	10,8	11,6 ^b	0,10	13,5 ^b

Media de rangos con letras distintas en una columna difieren estadísticamente según Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Nº de ES: Número de embriones somáticos.

Los embriones somáticos colocados en cámara de crecimiento con luz artificial desarrollaron con mayor rapidez los diferentes eventos relacionados con la germinación, en medio de cultivo semisólido. A los 15 días de cultivo se cuantificó mayor número de embriones germinados con formación de plantas completas y embriones con la plúmula clorofílica expuesta (cuadro 1, figura 1A), además de la formación de nuevos embriones somáticos a partir de los existentes, originados por embriogénesis secundaria o repetitiva, los cuales también germinaron.

Un factor importante a considerar en la respuesta fotomorfogénica de los tejidos vegetales es la calidad de la luz. En este trabajo no se consideró como determinante su influencia porque las cámaras de crecimiento objeto de estudio presentaron igual disponibilidad del espectro de luz, por lo que es posible que la respuesta

quality. In this paper was not consider like determinant its influence because the growing chambers studied showed the same availability of the light spectra, so it is possible that the photomorphogenic answer in germination of the observed somatic embryos is determined by the light intensity and the photoperiod of the growing chambers.

The light intensity and the photoperiod were higher in the chamber with artificial light (figure 1B). Subsequently, the somatic embryos receipt a continuous intensity with little variation. Also, they kept exposed to the illumination during a high period of time respect to embryos placed in the growing chamber with solar light.

The illumination conditions of chamber with artificial light gave a high efficiency in the beginning of the photosynthetic process in embryos which became of green color in the

fotomorfogénica en la germinación de los embriones somáticos observada este determinada por la intensidad de la luz y el fotoperíodo de las cámaras de crecimiento.

La intensidad de la luz y el fotoperíodo fue mayor en la cámara con luz artificial (figura 1B). Por consiguiente, los embriones somáticos recibieron una intensidad continua y con poca variación. Además, permanecieron expuestos a la iluminación durante mayor período de tiempo con respecto a los embriones colocados en la cámara de crecimiento con luz solar.

Las condiciones de iluminación de la cámara con luz artificial propiciaron mayor eficiencia en la iniciación del proceso fotosintético de los embriones, los cuales se tornaron de color verde en los primeros cinco días de cultivo. Además, determinó que germinará el mayor número de embriones así como el crecimiento que originó plantas con hojas abiertas (cuadro 1, y figura 1C). Según Raven *et al.* (13) la luz influye en la germinación de los embriones a través del fitocromo. Los embriones absorben la luz de la zona activa del infrarrojo que interacciona con los mecanismos endógenos, y se desencadenan numerosos cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que inducen la germinación. Se conoce que la luz induce la acetilación de las histonas activando los genes relacionados con la fotomorfogénesis (9).

Khalil *et al.* (8) obtuvieron 90% de embriones germinados y desarrollo de plantas completas de banano (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian), utilizando iluminación artificial, pro-

first five days of cultivation. Also, it determined that the higher number of embryos will germinate so the growing that gave plants with opened leaves (table 1 and figure 1C). According Raven *et al.* (13) light influencing on embryos germination through phyto-chrome. Embryos absorb light of the active region of the infra red that interacts with endogenous mechanisms and they release numerous morphological, biochemical and physiological changes that leads to germination. It is known that light leads to acetylation of the histonas by activating genus related with photo morphogenesis (9).

Khalil *et al.* (8) obtained 90% of germinated embryos and developing of entire banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) plants by using artificial illumination given by fluorescents lamps of 40 W, cool-white type and photo period of 16 hours light.

The somatic embryos placed in the growing chamber with solar light developed the same events related with germination but in minor quantity (table 1, figure 1D). In this chamber the light intensity was minor and with minor and superior variation; duration of photoperiod also was inferior which was determined by day duration, depending on the time year; this could be the cause of obtaining an inferior number of germinated embryos and inferior plants formation. However, in *Ipomoea batata* a higher number of embryogenic callus in solar light chamber respect to total darkness

porcionada por lámparas fluorescentes de 40 W del tipo cool-white y fotoperíodo de 16 horas luz.

Los embriones somáticos colocados en la cámara de crecimiento con luz solar desarrollaron los mismos eventos relacionados con la germinación, pero en menor cuantía (cuadro 1, figura 1D). En esta cámara la intensidad de luz fue menor y con mayor variación; la duración del fotoperíodo también fue menor, el cual estuvo determinado por la duración del

conditions and chamber with artificial light (6).

Light is one of the more important factors that determines developing of autotrophic organisms; here is the importance of controlling light on *in vitro* crops. The crop chamber have to reproduce the best possible the illumination requirements of crop (11).

Plants formed from the somatic embryos were moved to the culture medium composed by salts MS (100%)

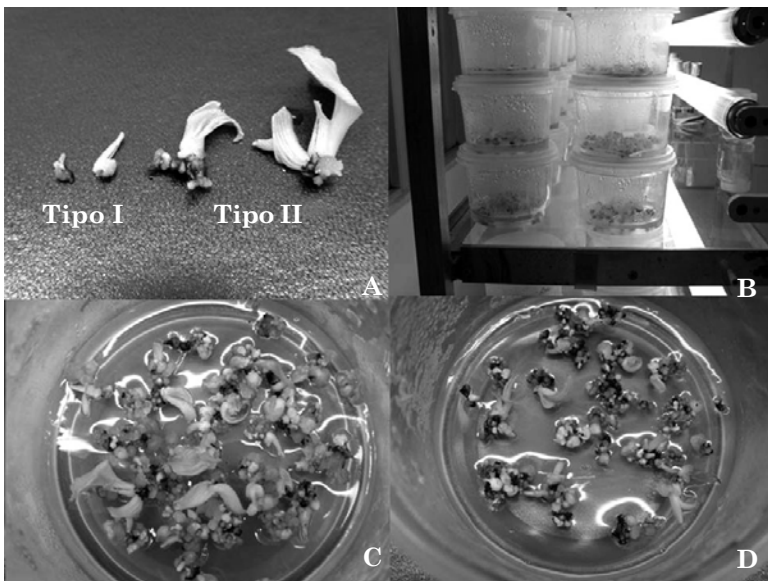


Figura 1. (A) Cámara de crecimiento con luz artificial. (B) Embriones germinados del cultivar híbrido ‘FHIA-21’ con germinación de tipo I y germinación de tipo II. (C) Embriones germinados en cámara de crecimiento con luz solar. (D) Embriones germinados en cámara de crecimiento con luz artificial.

Figure 1. (A) Growing chamber with artificial light. (B) Germinated embryos of the hybrid cultivar ‘FHIA-21’ with germination of type I and germination of type II. (C) Germinated embryos in growing chamber with solar light. (D) Germinated embryos in growing chamber with artificial light.

día, dependiendo de la época del año; esta pudo ser la causa de obtener menor número de embriones germinados y menor formación de plantas. Sin embargo, en *Ipomoea batata* se formó mayor número de callos embriogénicos en cámara con luz solar, respecto a condiciones de oscuridad total y cámara con luz artificial (6).

La luz es uno de los factores que determina el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar la luz en los cultivos *in vitro*. La cámara de cultivo debe reproducir lo mejor posible las necesidades de iluminación del cultivo (11).

Las plantas formadas a partir de los embriones somáticos fueron transferidas a medio de cultivo compuesto por las sales MS (100%) y libre reguladores del crecimiento donde continuaron su crecimiento y desarrollo fisiológico. Se obtuvieron 4200 plantas a partir de embriones somáticos; estas plantas alcanzaron de 3 a 4 cm de altura, más de 3 hojas abiertas y un sistema radical (datos no mostrados) que permitió su establecimiento en condiciones *ex vitro*, en invernadero.

Conclusiones

Las condiciones de cultivo en cámara de crecimiento con luz artificial, fotoperíodo de 16 horas luz y densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $62-68 \mu \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, generó el mayor número embriones germinados y formación de plantas completas. La optimización de la propagación vía embriogénesis somática a través del estudio de las condiciones de iluminación permitirá la propagación eficiente del cultivar híbrido 'FHIA-21'.

and free growing regulators in where they continue its growing and physiological development. 4200 plants from somatic embryos; these plants reached 3 - 4 cm height, more of 3 opened leaves and a radical system (data not shown) that permitted its establishment in *ex vitro* conditions, in glasshouse.

Conclusions

The crop conditions in growing chamber with artificial light, photoperiod of 16 hours light and flux density of photosynthetic photons of $62-68 \mu \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, generated the higher number of germinated embryos and entire formation. Optimization of the propagation via somatic embryogenesis through the study of illumination conditions will permit the efficient propagation of the cultivar hybrid 'FHIA-21'.

Acknowledgements

Authors want to express their thanks by the collaboration of the doctor Raul Barbon Rodriguez by the critical revision of this paper.

End of english version

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del doctor Raúl Barbón Rodríguez por la revisión crítica de este trabajo.

Literatura citada

1. Daniels D., R. Kosky, y M. Vega. 2002. Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hibrid cultivar FHIA 21 (*Musa* spp. AAAB Gropl). *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 38:330-333.
2. Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke y E. De Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46:125-135.
3. Escalant J. V., C. Teisson y F. Cote. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Cell Dev. Biol 30:181-186.
4. García L., B. Pérez, Z. Sarría y J. Clavero. 2002. Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20. *INFOMUSA* 11(1):35-38.
5. Grapin A., J. L. Ortíz, R. Domergue, J. Babeau, S. Monmarson, J. V. Escalant, C. Teisson y F. Côte. 1998. Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flower of *Musa* spp. *INFOMUSA* 7(1):13-15.
6. González O., J. Silva, A. Espinosa, E. Oliva y I. Milanés. 2001. Efecto de la iluminación en la inducción de callos morfogénicos en boniato. *Biotecnología vegetal*. 1(2):89-92.
7. Gómez R., Gilliard T., Barranco L.A. & Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). *INFOMUSA* 9(1):12-16
8. Khalil S.M., K.T. Cheah, E.A. Pérez, D.A. Gaskill y S.M. Hu. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20: 1128-1134.
9. Moore, R., W. D. Clark y D.S. Vodopich. 1998. "*Botany*". Second edition. WCB Mc Graw-Hill. New York. 234 p.
10. Murashige T., y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
11. Penacho A., L. Martín, R. Cueva, J. Sanfelire y G. Alins. 2002. Cultivo *in vitro*. Escuela técnica superior de ingeniería agrícola de Lleida. [en línea]: documento electrónico fuente en Internet. Fecha de consulta: 6 de junio 2006. Disponible en. <[http://www.etsea2.udl.es/in vitro/ luz](http://www.etsea2.udl.es/in_vitro/luz)>
12. Raven P.H., R.F. Evert y S. E. Eichhorn. 1999. *Biology of Plants*. Sixth edition, W.H. Freeman and Company. 122 p.
13. Strosse H., R. Domergue, B. Panis, J. V. Escalant y F. Côte. 2003. Suspensiones de células embriogénicas de bananos y plátanos. Guías técnicas INIBAP. 8: 6-6.
14. Strosse H., I. Van den Houwe y B. Panis. 2004. Banana cell and tissue culture-review. p. 1-12. En J. S. Mohaan y R. Swennen (Eds). *Banana improvement cellular, molecular biology and induced mutations*.