

Efecto de dos citocininas y dos estados físicos del medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* del plátano 'Hartón Gigante' (*Musa AAB*)

Effect of two cytokinins and two physical states of the culture medium on *in vitro* multiplication of plantain 'Giant Harton' (*Musa AAB*)

S. Florio¹ y N. Mogollón¹

¹Posgrado de Horticultura. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Cabudare, estado Lara. República Bolivariana de Venezuela. Apartado Postal 400.

Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto de dos citocininas Bencilaminopurina (BAP) e Isopenteniladenina (2ip) en concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mg·L⁻¹ y dos estados físicos del medio (líquido en agitación y semisólido) sobre la multiplicación *in vitro* del plátano 'Hartón Gigante' (*Musa AAB*). La utilización de bencilaminopurina en dosis de 5 mg·L⁻¹ adicionada al medio líquido permitió incrementar el número y longitud de brotes (8,93 y 4,10 cm, respectivamente). Los resultados obtenidos favorecen la elección del medio de cultivo líquido para un protocolo más eficiente y rentable en la multiplicación *in vitro*.

Palabras clave: multiplicación *in vitro*, bencilaminopurina, isopenteniladenina, plátano 'Hartón Gigante', *Musa AAB*.

Abstract

The objective was to evaluate the effect of two cytokinins benzylaminopurine (BAP) and isopenteniladenine (2ip) in concentrations of 2.5, 5.0 and 10.0 mg·L⁻¹ and two physical states of the medium (liquid submerged and semisolid) on *in vitro* multiplication of plantain 'Giant Harton' (*Musa AAB*). The use of benzyladenine in doses of 5 mg·L⁻¹ added to the liquid medium used to increase the number and shoot length (8.93 and 4.10 cm, respectively). The results favor the choice of liquid culture medium for a more efficient and cost effective protocol in the *in vitro* multiplication.

Key words: *In vitro* multiplication, Benzylaminopurine, isopenteniladenine, plantain 'Giant Harton', *Musa AAB*.

Introducción

En Venezuela, el plátano 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB), constituye un elemento básico en la dieta de la población y es uno de los renglones agrícolas más importantes por el valor de la producción, superficie sembrada, número y características socioeconómicas de las familias involucradas en el cultivo y el mercado nacional de la fruta fresca y procesada (Martínez *et al.*, 2004). En el ámbito nacional, ocupa el primer lugar en volumen de producción con 496.478 TM, lo cual representa un 44% de la producción total de las frutas (FAOSTAT, 2008).

Al igual que otros clones del género *Musa*, el plátano es triploide estéril partenocárpico y sólo es posible la reproducción y perpetuación de la especie a través de la propagación vegetativa o asexual (Khalil *et al.*, 2002). Las "semillas" utilizadas para la siembra corresponden a partes vegetativas como retoños, rizomas o hijos con tamaños y edades variables, lo que se traduce en marcadas diferencias en la época de cosecha y maduración (Santos *et al.*, 2005; Bournsnel, 2003). Otro aspecto de gran importancia son las numerosas enfermedades en las musáceas comestibles, las cuales ocasionan pérdidas en las cosechas, debido a la reducción del área foliar, la biomasa fresca y la calidad de los racimos (Roux *et al.*, 2002).

La ineficiencia de los métodos de propagación *in vivo* para suplir la demanda de bananos y plátanos de calidad, genéticamente uniformes y libres de enfermedades, justifica el diseño

Introduction

In Venezuela, the 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB) plantain, constitutes a basic element in diet of population and it is one of more important by production value, sowed surface, number and socioeconomic characteristics of families involved on crop and national market of fresh and processed fruit (Martínez *et al.*, 2004). At national market, it occupies first place in production volume with 496.478 TM, which represent 44% of total production of fruits (FAOSTAT, 2008).

Just like other clones of *Musa* genre, plantain is parthenocarpic sterile triploid and reproduction and specie perpetuation are only possible by vegetative or asexual way (Khalil *et al.*, 2002). "Seeds" used for sowing correspond to vegetative parts like sprouts, rhizomes with variable sizes and ages, which is traduced into marked differences in harvest time and maturation (Santos *et al.*, 2005; Bournsnel, 2003). Other important aspect are the numerous diseases in edible samples, which causes losses in harvest because reduction of foliar area, fresh biomass and bunches quality (Roux *et al.*, 2002).

The inefficiency of *in vivo* propagation methods to supply quality bananas and plantains requirements, genetically uniform and diseases off, justify the design of *in vitro* propagation methodologies, such as, massive propagation through the use of cytokinins added to culture medium (Albarrán *et al.*, 2006). Cytokinins during multiplication stage promote the number of

de metodologías de propagación *in vitro*, tales como, la propagación masiva mediante el uso de citocininas adicionadas a los medios de cultivo (Albarrán *et al.*, 2006). Las citocininas durante la etapa de multiplicación promueven el número de propágulos o plantas a obtener en *Musa* (Orellana, 1994).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de dos citocininas: Bencilaminopurina (BAP) e Isopenteniladenina (2ip) en concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mg.L⁻¹ y dos estados físicos del medio (líquido y semisólido) sobre la multiplicación *in vitro* del plátano 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB).

Materiales y métodos

La multiplicación *in vitro* se realizó en la Unidad de Biotecnología del Decanato de Agronomía, núcleo "Héctor Ochoa Zuleta", Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), en Cabudare, municipio autónomo Palavecino, estado Lara, Venezuela. Los explantes utilizados estuvieron constituidos por brotes de 3,0 cm de longitud provenientes de vitroplantas. Estos se cultivaron en el medio constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 30 mg.L⁻¹ de tiamina HCl, 2 mg.L⁻¹ de glicina, 5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina HCl, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol y 60 g.L⁻¹ de cisteína (antioxidante). En el caso del medio de cultivo semisólido se agregó 8 g.L⁻¹ de agar (Bacto Agar®) y 2 g.L⁻¹ de carbón activado. El pH del medio se ajustó a 5,7 ± 0,1 con HCl ó NaOH 1N.

propagules or plants to be obtained in *Musa* (Orellana, 1994).

The purpose of this research was to determine the effect of two cytokinins: Benzylaminopurine (BAP) and Isopenteniladenine (2ip) in concentrations of 2.5; 5.0 and 10.0 mg.L⁻¹ and two physical stages of medium (liquid and semisolid) on *in vitro* multiplication of plantain 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB).

Materials and methods

The *in vitro* multiplication was done at the Biotechnology Unit, Decanato de Agronomía, "Héctor Ochoa Zuleta", Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Cabudare, Palavecino municipality, Lara state, Venezuela. Explants used were formed by shoots of 3.0 cm length from vitroplants. These were cultivated on a medium formed by mineral salts of Murashige and Skoog (1962), supplemented with 30 g.L⁻¹ sucrose, 30 mg.L⁻¹ thiamine HCl, 2 mg.L⁻¹ glycine, 5 mg.L⁻¹ of nicotinic acid, 1 mg.L⁻¹ pyridoxine HCl, 100 mg.L⁻¹ myo-inositol and 60 g.L⁻¹ cysteine (anti oxidant). In case of semi solid culture medium, 8 g.L⁻¹ of agar (Bacto Agar®) and 2 g.L⁻¹ of activated carbon were added. pH of medium was adjusted to 5.7 ± 0.1 with HCl or NaOH 1N.

The addition of Benzylaminopurine (BAP) e Isopenteniladenine (2ip), in concentrations of 2.5; 5.0 and 10.0 mg.L⁻¹ at two physical stages of medium (liquid and semi-solid) was assessed. For semi-solid and liquid medium, the explants were implanted

Se evaluó la adición de Bencilaminopurina (BAP) e Isopenteniladenina (2ip), en concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mg.L⁻¹ a los dos estados físicos del medio (líquido y semisólido). Para los medios semisólido y líquido, los explantes se implantaron en frascos de 180 mL de capacidad (10 cm de longitud x 6 cm de diámetro), contentivos cada uno de 20 mL de medio de cultivo, previamente esterilizados en autoclave a 121°C de temperatura y 15 PSI de presión durante 20 minutos y los de medio líquido se colocaron en un agitador orbital (Digisystem Laboratory Instruments Inc.) a 100 rpm. Todos los cultivos fueron transferidos a un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 67,57 mol.m⁻².s⁻¹, temperatura de 25 ± 2°C y un fotoperíodo de 16 horas luz, por un período de seis semanas.

El diseño estadístico empleado fue un completamente al azar, bajo un arreglo factorial 2 x 2 x 3 (dos estados físicos del medio, dos citocininas y tres concentraciones de cada una de las citocininas) con dos testigos únicos por citocinina, para un total de 14 tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento y un explante por frasco como unidad experimental. Las variables evaluadas a los 45 días de cultivo fueron: número de brotes obtenidos por explante, longitud de los mismos y longitud máxima de raíces. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el programa SAS versión 8.1 para Windows, realizando el análisis de la varianza correspondiente al diseño empleado. La separación de medias se realizó

in flasks of 180 mL capacity (10 cm length, 6 cm diameter), each of them having 20 mL of culture medium, previously sterilized on autoclave at 121°C temperature and 15 PSI pressure during 20 minutes and those of liquid medium were placed on an orbital agitator (Digisandstem Laboratory Instruments Inc.) at 100 rpm. All the cultures were moved to a growth chamber with a light intensity of 67.57 mmol.m⁻².s⁻¹, temperature of 25 ± 2°C and a photoperiod of 16 hours light during six weeks.

Statistical design used totally at random, under factorial arrangement 2 x 2 x 3 (two physical stages of medium, two cytokinins and three concentrations of each of cytokinins) with two unique controls by cytokinin, for a total of 14 treatments, 10 replications per treatment and one explant per flask as experimental unit. Variables evaluated at 45 days of cultivation were: number of shoots obtained per explant, length and maximum length of roots. Data were processed statistically through SAS program, version 8.1 for Windows, making the analysis of variance corresponding to the design used. Means separation was done through the Duncan multiple range test at a significance level of 1 and 5%.

Results and discussion

Highly significant differences were detected with the analysis of variance to treatments in the three variables evaluated (table 1). In relation to the number of shoots per explant, the higher values were

mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 1 y 5%.

Resultados y discusión

El análisis de la varianza detectó diferencias altamente significativas para tratamientos en las tres variables evaluadas (cuadro 1). Con relación al número de brotes por explante, los mayores valores se alcanzaron en medio líquido en presencia de BAP, independientemente de la concentración usada. Esta misma tendencia se observó al usar Zip en medio líquido donde tampoco hubo diferencias estadísticas entre las concentraciones usadas. Sin embargo, en el medio semisólido todos los tratamientos, incluyendo el testigo, se comportaron estadísticamente iguales con rendimientos inferiores al resto de los tratamientos en medio líquido.

Los resultados obtenidos para cantidad de brotes, difirieron de los reportados por Hardy y García (1994), donde la dosis de 5 mg.L⁻¹ de BAP adicionado al medio MS semisólido, fue la mejor concentración para la inducción de brotes en banano 'Cavendish' (AAA). Igualmente, mostraron diferencias de los obtenidos por Arinaitwe *et al.* (2000), los cuales establecieron una tasa promedio de 10,2 brotes por explante en el cultivar 'Ndiziwemiti'; 9,5 en el cultivar 'Kibuzi' y 8,2 en el cultivar 'Bwara', con una dosis de 5 mg.L⁻¹ de BAP en medio líquido en constante agitación. Se presume que la diferencia en estos resultados podría atribuirse a las características propias de cada genotipo.

reached in liquid medium in presence of BAP, independently of concentration used. This tendency was observed when using Zip in liquid medium where statistical differences were not observed between concentrations used. However, in semi-solid medium all the treatments, including control, were statistically behave with yields inferior to the rest of treatments in liquid medium.

Results obtained for shorts quantity differs from those obtained by reported by Hardy and García (1994), where doses of 5 mg.L⁻¹ of BAP by adding the semi-solid MS medium, was the best concentration for shoots induction in banana 'Cavendish' (AAA). Also, they showed differences from those obtained by Arinaitwe *et al.* (2000), which established the mean rate of 10.2 shoots per explant in cultivar 'Ndiziwemiti'; 9.5 in cultivar 'Kibuzi' and 8.2 in cultivar 'Bwara', with a doses of 5 mg.L⁻¹ BAP in liquid medium in constant agitation. Difference in these results could be attributed to the proper characteristics of each genotype.

In relation to shoots length, the higher values were obtained in semi-solid medium supplemented with BAP, independently of concentration used. Also, when using BAP in concentrations of 2.5 and 5.0 mg.L⁻¹ on liquid medium and Zip (2.5; 5.0 and 10.0 mg.L⁻¹) on semi-solid medium, there was not statistic differences. On the other hand, when using BAP (10.0 mg.L⁻¹) and any of Zip concentrations on liquid medium, values statistically inferior to the rest of treatments were registered (3.16 to 3.48 cm). Controls showed the shorter shoots, which

Cuadro 1. Efecto de dos citocininas: Bencilaminopurina (BAP) e Isopenteniladenina (2ip) y dos estados físicos del medio: líquido y semisólido sobre el desarrollo de los brotes de plátano ‘Hartón Gigante’ (*Musa AAB*) a los 45 días de cultivo.

Table 1. Effect of two cytokinins: benzylaminopurine (BAP) and isopentenyladenine (2ip) and two physical stages of medium: liquid and semi-solid on shoots development of ‘Hartón Gigante’ plantain (*Musa AAB*) at 45 days of crop.

Tratamientos	Concentración (mg L ⁻¹)	Número de brotes/explante	Longitud de brote (cm)	Longitud máxima de raíces (cm)
Líquido (agitación)	Testigo	3,18 ^{az}	1,32 ^{dz}	0 ^{cz}
	BAP	6,50 ^a	4,34 ^b	0 ^c
		5,0	4,10 ^b	0 ^c
	2ip	7,97 ^a	3,48 ^c	0 ^c
		2,5	3,34 ^c	0 ^c
		5,0	3,27 ^c	0 ^c
Semisólido (agar)	Testigo	5,98 ^b	3,16 ^c	0 ^c
	BAP	1,46 ^d	1,85 ^d	4,06 ^a
		2,5	5,76 ^a	3,98 ^a
		5,0	5,95 ^a	3,95 ^a
	2ip	1,62 ^d	5,24 ^a	3,90 ^a
		2,5	4,21 ^b	3,18 ^b
	5,0	1,28 ^d	4,11 ^b	3,14 ^b
	10,0	1,39 ^d	4,08 ^b	3,11 ^b
C. V. (%)		12,36	11,29	11,35
P		***	***	***

^z Valores con la misma letra no difieren estadísticamente al nivel del 5%, según las Pruebas de Rangos Múltiple de Duncan (n=10). *** P<0,001.

En cuanto a la longitud de los brotes, los mayores valores se obtuvieron en el medio semisólido suplementado con BAP, independientemente de la concentración usada. Además, se observó que al utilizar BAP en concentraciones de 2,5 y 5,0 mg.L⁻¹ en medio líquido y 2ip (2,5; 5,0 y 10,0 mg.L⁻¹) en el medio semisólido, no hubo diferencias estadísticas. Por otra parte, al usar BAP (10,0 mg.L⁻¹) y cualquiera de las concentraciones de 2ip en el medio líquido, se registraron valores estadísticamente inferiores al resto de los tratamientos (3,16 a 3,48 cm). Los testigos presentaron los brotes más cortos, lo que evidencia la necesidad de agregar citocinina al medio de cultivo para obtener una adecuada longitud de brote, tal como ha sido señalado por Lisei *et al.* (2002) y Daquinta *et al.* (2001).

Estos resultados destacaron el efecto positivo de las citocininas en promover la multiplicación y crecimiento en longitud de los brotes de plátano 'Hartón Gigante', siendo mayor cuando se utilizó BAP en medio semisólido. Las respuestas fueron similares con lo reportado en bananos (AAA) y topocho (ABB), donde BAP fue la citocinina más efectiva en la inducción y proliferación de los brotes (Peres de Oliveira *et al.*, 2008; Muhammad *et al.*, 2006; Jambhale *et al.*, 2001; Arinaitwe *et al.*, 2000).

Con respecto a la longitud máxima de raíces se observaron diferencias altamente significativas. En este experimento, sólo se obtuvo rizogénesis en los tratamientos en medio semisólido, registrándose raíces que variaron entre 3,11 a 4,06 cm. En este sentido, los resultados coinci-

makes evident the necessity of adding cytokinin to the culture medium to obtain an adequate shoot length, as reported by Lisei *et al.* (2002) and Daquinta *et al.* (2001).

These results detached the positive effect of cytokinins when promoting multiplication and growth in shoots length of plantain 'Hartón Gigante', being higher when using BAP in semi-solid. Responses were similar with those reported in bananas (AAA) and "Topocho" (ABB), where BAP was the more effective cytokinin on induction and proliferation of shoots (Peres de Oliveira *et al.*, 2008; Muhammad *et al.*, 2006; Jambhale *et al.*, 2001; Arinaitwe *et al.*, 2000).

Respect to the root maximum length, highly significant differences were observed. In this experiment, rhizogenesis was only obtained in treatments on semi-solid medium, being roots registered varying between 3.11 and 4.06 cm. Results agree with those reported by Oliveira and Silva (1997) and Dhumale *et al.* (1997), where the most of *Musa* genre plants showed a notable increase on roots length only on semi-solid cultivation mediums.

On the other hand, a tendency to the increase on shoots number per explant and to the decrease on length, with the increase on BAP concentration, which could be due to the internodes shortening common in high cytokinins concentrations, according to those established by Salisbury and Ross (1994). Capellades *et al.* (1991) reported increases on cytokinins levels could improve the multiplication rate, but

dieron con los reportados por Oliveira y Silva (1997) y Dhumale *et al.* (1997), donde la mayoría de las plantas del género *Musa* presentaron un notable incremento en la longitud de raíces sólo en los medios de cultivo semisólidos.

Por otra parte, se observó una tendencia al incremento del número de brotes por explante y a la disminución de la longitud de los mismos, con el aumento en la concentración de BAP, lo cual podría deberse al acortamiento de entrenudos común en altas concentraciones de citocininas, de acuerdo a lo establecido por Salisbury y Ross (1994). Esto se correspondió con los estudios de Capellades *et al.* (1991), quienes señalaron que incrementos en los niveles de citocininas podrían mejorar la tasa de multiplicación, pero al mismo tiempo afectar el tamaño y calidad del brote.

Conclusiones

En la multiplicación *in vitro* del plátano 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB), la utilización de la bencilaminopurina en dosis de 5 mg L⁻¹ adicionada al medio de cultivo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog en estado líquido, permitió incrementar el número de brotes/explante y longitud de brotes (8,93 y 4,10 cm, respectivamente).

Los resultados obtenidos favorecieron la elección del medio de cultivo líquido para el establecimiento de un protocolo más sencillo, eficiente y rentable en la multiplicación *in vitro*; ya que la exclusión del agar o cualquier otro agente gelificante podría disminuir hasta un 60% los costos de pre-

at the same time to affect size and quality of shoot.

Conclusions

The use of benzylaminopurine in doses of 5 mg.L⁻¹ added to the cultivation method formed by mineral salts of Murashige and Skoog in liquid stage, permitted to increase the number of shoots/explant and length of shoots (8.93 and 4.10 cm, respectively) on *in vitro* multiplication of plantain 'Hartón Gigante' (*Musa* AAB),.

Results obtained favors the selection of liquid cultivation medium for the establishment of a simpler, efficient and profitable protocol on *in vitro* multiplication, since exclusion of agar or any other jellifying agent that could diminish almost 60% the medium preparation costs and also, creates possibility for micro propagation automation.

End of english version

paración de medios y abre la posibilidad de la automatización de la micropropagación.

Literatura citada

Albarrán, J., O. González, M. Torrealba, E. Salazar e I. Trujillo. 2006. Propagación masiva de plantas de banano mediante cultivo de ápices caulinares utilizando sistema de biorreactores. p. 1. En: Congreso Nacional de Fruticultura (Ed.). Barquisimeto, Venezuela. 24 al 27 de Octubre de 2006.

Arinaitwe, G., P. Rubaihayo y M.

- Magambo. 2000. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Horticulturae* (NLD) 86:13-21.
- Bournsnel, C. 2003. El poder de los genes alimenta una revolución agrícola en África. pp: 14-19. En: Informe Anual. International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP) (Eds). Montpellier, Francia.
- Capellades, M., R. Lemeur y P. Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:21-26.
- Daquinta, M., Y. Lezcano, M. Escalona y R. Santos. 2001. Multiplicación *in vitro* del banano FHIA-18 con el empleo de paclobutrazol. *InfoMusa* 10:22-24.
- Dhumale, D., A. Kadu, S. Gholar y G. Ingole. 1997. *In vitro* multiplication of banana var. 'Shrimanti' from the shoot tip explants. *Annals of Plant Physiology* 11:214-218.
- FAOSTAT, 2008. Base de datos estadísticos FAOSTAT. Disponible en: <http://www.faostat.fao.org>
- Hardy, I. y E. de García. 1994. Micropropagación de banano (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. *ÖYTON* 1:31- 41.
- Jambhale, N., S. Patil, A. Jadhav, S. Pawar y B. Waghmode. 2001. Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. *InfoMusa* 10:38-39.
- Khalil, S., K. Cheah, E. Perez, D. Gaskill y J. Hu. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 20:1128-1134.
- Lisei, M. de Sá y M. Braga. 2002. Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata-Anã (Subgrupo AAB). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal* 24:236-239.
- Martínez, G., O. Tremont y J. Hernández. 2004. Manual técnico para la propagación de Musáceas. *Revista Digital Ceniap Hoy* 4. Enero – Abril. Maracay, Venezuela. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n4/texto/gmartinez.htm>
- Muhammad, A., H. Rashid, I. Hussain y S. Saqlan. 2006. Comparison of BAP and Kinetin on proliferation rate of banana (*Musa* spp.) cv. 'Basrai'. pp: 494-497. En: *Proceedings of XVII ACORBAT International Meeting*. Soprano, E., F.A. Teacenco, L.A. Lichtemberg y M.C. Silva (Eds.). Santa Catarina, Brasil.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Oliveira, R. y S. Silva. 1997. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32:415-420.
- Orellana, P. 1994. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Resumen de Tesis Doctoral. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 25 p.
- Peres de Oliveira, J., F. Da Silva Costa y J. Scherwinski-Pereira. 2008. Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, 43:1429-1432.
- Roux, N., A. Toloza, J. Busogoro, B. Panis, H. Strosse, P. Lepoivre, R. Swennen y F. Zapata-Arias. 2002. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. pp: 239-250. En: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Jacome, L., P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero y J. Escalant (Eds.). *Proceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San José, Costa Rica.*

Salisbury, F. y C. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F. pp: 423-435.

Santos, C., N. Martins, H. Hörberg, E. Almeida, M. Coelho, R. Togawa, F. Da Silva, A. Caetano, N. Miller y M. Souza. 2005. Analysis of

expressed sequence tags from *Musa acuminata* ssp. Burmannicoides var. Calcutta 4 (AA) leaves submitted to temperature stresses. Theor Appl Genet 110:1517-1522.