

## Nuevo protocolo para la rápida inducción de yemas adventicias y la regeneración de plantas en banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*)

Lourdes R. García\*, J.P. Pérez, Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Pedro Orellana, Novisel Veitía, Leonardo García, Yenny Padrón, Carlos Romero. \*Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. Cuba. e- mail: lourdes@ibp.co.cu

### RESUMEN

Fue desarrollado un protocolo para la rápida formación de yemas adventicias en banano cv. 'Grande naine' y el desarrollo de plantas. Varias concentraciones de 6-Bencilaminopurina y 1-fenil-3-(1,2,3-thiazol-5-yl) urea (TDZ) fueron estudiadas en el medio de cultivo para la inducción de estas estructuras y se evaluaron cuatro tamaños de explante para la multiplicación. El mayor número de yemas adventicias fue obtenido cuando el TDZ fue adicionado al medio de cultivo, solo dos subcultivos fueron necesarios para el desarrollo de explantes con la emisión de este tipo de yemas. Los explantes de 1.0 mm<sup>3</sup> fueron seleccionados para la multiplicación y un medio de cultivo compuesto por las sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina y 2.0% de sacarosa para la regeneración de plantas, alcanzando valores de 96%. El uso de este protocolo pudiera ser una alternativa útil en los programas de mejoramiento genético con este cultivar mediante la inducción de mutaciones y la variación somaclonal.

Palabras clave: cultivo de tejidos, organogénesis, thidiazuron

### ABSTRACT

A protocol for the quick formation of adventitious buds in banana cv. 'Grande Naine' and the development of plants was developed. Several concentrations of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) and 1-phenyl-3-(1,2,3-thiazol-5-yl)urea (TDZ) were studied in the culture media for the induction of these structures, evaluating some explants sizes for multiplication. The highest number of adventitious buds was obtained when TDZ was used in the culture medium, with only two subcultures needed to develop explants with adventitious buds. The explants of 1mm<sup>3</sup> were selected for the multiplication and a medium of MS salts with 1.0 mg.l<sup>-1</sup> thiamine HCl and 2.0% sucrose for plant regeneration, reaching the values of 96%. The use of this protocol could be a very useful alternative in genetic improvement programs with the cv. 'Grande naine' using the mutation induction and somaclonal variation.

Key words: organogenesis, thidiazuron, tissue culture

### INTRODUCCIÓN

Para el uso del cultivo *in vitro* en un programa de mejoramiento genético, un requisito indispensable es contar con un sistema eficiente de regeneración de plantas que permita que las células modificadas genéticamente puedan desarrollarse y regenerar plantas que manifiesten las características deseadas. El uso de técnicas biotecnológicas tales como la mutagénesis *in vitro* (Novak, 1992) se ve afectada debido a que el tratamiento mutagénico a tejido multicelular resulta en un alto grado de quimerismo (Ahloowalia, 1998). De aquí la importancia de utilizar explantes que se formen de una o pocas células como los embriones somáticos (Lee *et al.*, 1997) y las yemas adventicias (Vuylsteke *et al.*, 1997). Además, con el uso de yemas adventicias, la variabilidad puede ser incrementada, lo cual es un requerimiento para el mejoramiento genético.

En el cultivar 'Grande naine', debido a su alta dominancia apical (INIBAP, 1996), son necesarios varios subcultivos, con el uso de altas

concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), para obtener yemas adventicias. Esto puede entorpecer todo el proceso de selección de individuos promisorios, debido a que es conocido que la edad del cultivo *in vitro* es uno de los factores determinantes en el incremento de aneuploidías y cambios epigenéticos en las plantas (Sandoval *et al.*, 1996; Orellana, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998; Jambhale *et al.*, 2001; Sahijram *et al.*, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue establecer un nuevo protocolo reproducible para la regeneración de plantas *in vitro* a partir de yemas adventicias en el cultivar 'Grande naine'.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Material vegetal y condiciones de incubación

Como material vegetal de partida se utilizaron ápices del cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*), obtenidos de hijos tipo espada con un tamaño aproximado de 50 a 100 cm de altura. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Orellana (1998).

Todo el material vegetal fue incubado en condiciones de luz solar ( $48-62 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y una temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Después del establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos (explantos) a los 25 días, los mismos fueron colocados en los diferentes medios de cultivo para la formación de yemas adventicias.

### Inducción de yemas adventicias

Se evaluó el efecto de dos citoquininas en el medio de cultivo compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962),  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina y  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sacarosa, 6-BAP ( $5.0, 10.0, 20.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ó 1-phenil-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)urea (TDZ) ( $1.0, 5.0, 10.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Estos medios de cultivo fueron solidificados con  $7.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de agar (Tipo A, Sigma). El pH fue ajustado a 5.8 antes del proceso de esterilización a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 min.

En este trabajo se nombraron yemas adventicias a las estructuras globosas, de color blanquecino, de tamaño entre 1.0 y 3.0 mm, que se desarrollaban en la superficie del explante.

Fueron evaluados a los 60 días de cultivo el número de explantes que formaron yemas adventicias y el número de brotes desarrollados por frasco.

Los explantes fueron subcultivados, cada 30 días, en el mismo medio de cultivo. Se utilizaron frascos de 250 ml de capacidad. Cada frasco contenía 30 ml de medio de cultivo y fue inoculado con 10 explantes. Se utilizaron 10 frascos por tratamiento repitiéndose el experimento tres veces.

### Determinación del tamaño mínimo del explante para la multiplicación

Conociendo las desventajas que presenta utilizar tejidos multicelulares en los programas de mejoramiento genético por mutaciones, se estudiaron diferentes tamaños de explantes: 9.0, 4.0, 1.0, 0.36  $\text{mm}^3$ , con el objetivo de seleccionar el explante más pequeño posible.

Estas secciones fueron colocadas en frascos que contenían un medio de cultivo compuesto por las sales MS,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina, 2.0% de sacarosa y  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de TDZ (M1).

A los 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia y debido a la imposibilidad del conteo de las yemas adventicias formadas la multiplicación de los explantes fue evaluada a través del incremento de masa fresca. Se determinó, además, la tasa de crecimiento relativa según Vázquez y Torres (1995).

Cada frasco de cultivo con 30 ml de M1 fue inoculado con 10 explantes. Se utilizaron 10 frascos como repetición por tratamiento.

### Regeneración de plantas a partir de yemas adventicias

Segmentos de explantes de  $1.0 \text{ mm}^3$  que crecieron durante tres subcultivos en medio de cultivo M1 fueron colocados para la regeneración de plantas en los siguientes medios de cultivo:

\_ Sales MS,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina,  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sacarosa,  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA) y  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 6-BAP acorde con la metodología propuesta por Orellana (1998)

\_ Sales MS,  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina y  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sacarosa.

Cada frasco de cultivo fue inoculado con 10 explantes. Se utilizaron 10 frascos como repetición por tratamiento.

Para los análisis estadísticos se realizaron análisis de varianza de clasificación simple y la prueba t-student. Para determinar los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes, a un nivel de 5.0%, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan o Dunnett's C, esta última cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos. El procesamiento de los datos se realizó con los paquetes estadísticos SPSS/PC ver. 9.00 para Windows.

## RESULTADOS

### Inducción de yemas adventicias

Cuando los explantes provenientes del medio de cultivo de establecimiento fueron colocados en los medios de cultivo para la formación de yemas adventicias, se encontraron diferencias morfológicas en cuanto al desarrollo de los brotes formados en el primer subcultivo (Figura 1).

Previamente para distinguir entre las yemas formadas fueron usados criterios morfológicos y estudios histológicos (resultados no mostrados).

El efecto de los reguladores del crecimiento estudiados en la formación de las yemas adventicias a los 60 días de cultivo (segundo subcultivo) se muestra en la tabla 1. La citoquinina que mayor influencia ejerció sobre la inducción de yemas adventicias fue el TDZ. Se obtuvieron altos porcentajes de explantes con desarrollo de estas estructuras en todas las concentraciones ensayadas.

Solo dos subcultivos fueron necesarios para lograr el desarrollo de yemas adventicias en la superficie de los explantes (Figura 2). Las concentraciones de 6-BAP ensayadas fueron desfavorables para la obtención de estas estructuras en el genotipo evaluado.



Figura 1. Influencia de las concentraciones de 6-BAP (A) y TDZ (B) en el desarrollo de yemas adventicias en el cv. 'Grande naine'.

Tabla 1. Influencia del 6-BAP y el TDZ en la formación de yemas adventicias a los 60 días de cultivo en el cv. 'Grande naine'.

Citoquinina (mg.l <sup>-1</sup> )	Número de explantes por frasco con inducción de yemas adventicias	Número de brotes formados por frasco
6-BAP – 5.0	0.50 b	22.1 b
– 10.0	1.40 b	23.0 b
– 20.0	0.10 b	33.5 a
TDZ – 1.0	7.20 a	14.8 c
– 5.0	6.20 a	11.1 d
– 10.0	8.30 a	6.9 e

Medias con letras distintas en una columna difieren por Duncan para  $p < 0.05$ .

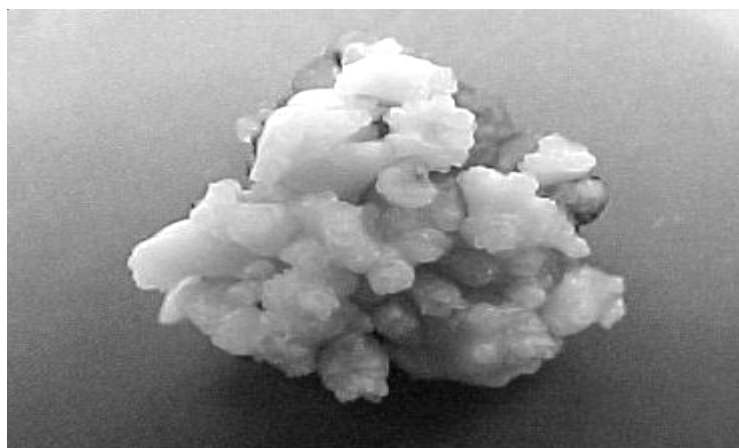


Figura 2. Desarrollo de yemas adventicias en el cv. 'Grande naine' en el medio de cultivo: Sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ a los 60 días de cultivo.

Con el conocimiento de que el TDZ puede influir negativamente en la elongación y el enraizamiento de los brotes la concentración de 1.0mg.l<sup>-1</sup> fue seleccionada para incorporarla en los medios de cultivo de inducción de yemas adventicias, ya que esta fue la mínima concentración ensayada que permitió la formación de estas estructuras sin diferencias significativas con la más alta.

#### Determinación del tamaño mínimo del explante para la multiplicación

En todos los tamaños de explantes evaluados fueron obtenidos altos porcentajes de supervivencia con solo diferencias significativas para el explante de menor tamaño (Figura 3 a). Igual tendencia se manifestó cuando se analizó el incremento de masa fresca total

de los explantes. Se observó una disminución significativa en este parámetro a medida que disminuyó el tamaño de los mismos (Figura 3b). Cuando se calculó la tasa de crecimiento relativa se apreció que este índice para el tamaño de 1.0 mm<sup>3</sup> fue muy similar al de los explantes de 9.0 y 4.0 mm<sup>3</sup> (Figura 3c).

Teniendo en cuenta que no se encontró afectación en la supervivencia del explante con el tamaño de 1.0 mm<sup>2</sup> respecto al control y que la tasa de crecimiento relativo mostró valores similares a los tamaños de explante superiores se seleccionó este tamaño para utilizarlo en los siguientes experimentos.

### Regeneración de plantas a partir de yemas adventicias

Los resultados en la figura 4 muestran que la media de los explantes que regeneraron plantas por frasco cuando se utilizó el medio de cultivo compuesto solamente por las sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina y 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, fue significativamente superior al medio de cultivo de multiplicación de brotes propuesto por Orellana (1998). El 96% de los explantes, que estaban compuestos solamente por yemas adventicias, lograron en un solo subcultivo la regeneración de plantas (Figura 4 b).

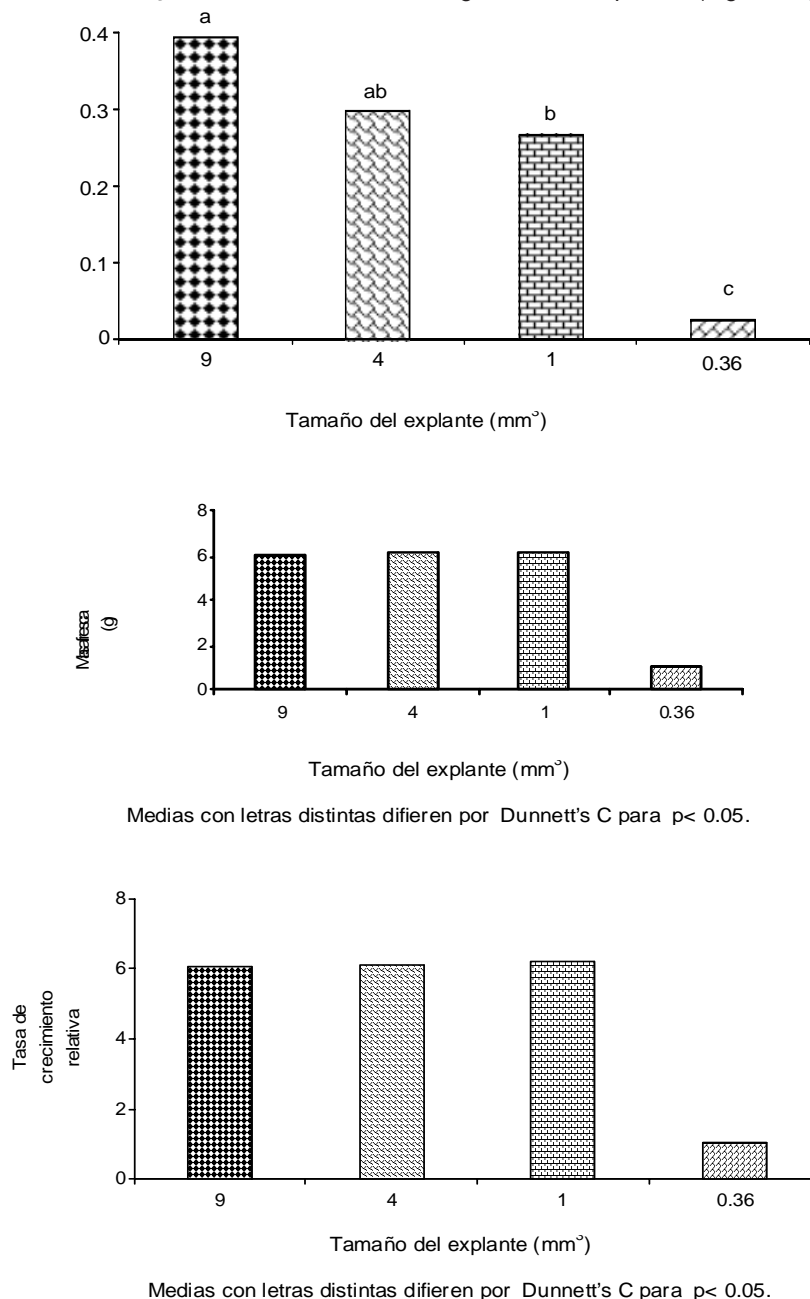
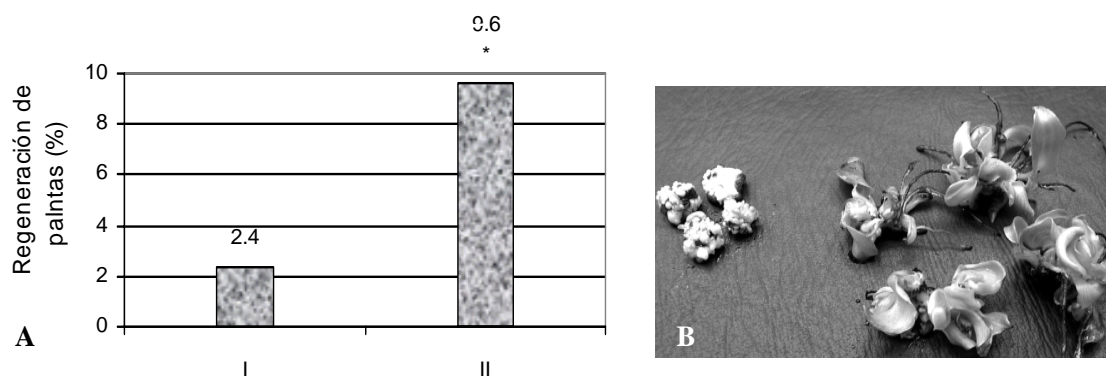


Figura 3. Influencia del tamaño del explante (mm<sup>3</sup>) en el crecimiento de yemas adventicias en el cv. 'Grande naine' a los 30 días de cultivo. A- Supervivencia B- Incremento de la masa fresca. C- Tasa de crecimiento relativa



Medias difieren por la prueba t-student para  $p < 0.05$ .

Figura 4. Influencia del medio de cultivo en la regeneración de plantas a los 30 días de cultivo en el cv. 'Grande naine'. A- Medias de explantes con regeneración de plantas en (I)- Sales MS con  $1\text{mg.l}^{-1}$  de tiamina,  $20\text{g.l}^{-1}$  de sacarosa,  $0.05\text{mg.l}^{-1}$  de AIA y  $4.0\text{mg.l}^{-1}$  de 6-BAP (II)- Medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento. B- Regeneración de plantas en el medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento.

Con los resultados obtenidos se desarrolló un protocolo para la regeneración de plantas a partir de yemas adventicias en el cv. 'Grande naine', el mismo incluyó:

\_ Establecimiento *in vitro* de ápices según la metodología propuesta por Orellana (1998).

\_ Colocar los explantes desarrollados en un medio de cultivo de inducción de yemas adventicias compuesto por las sales MS,  $1.0\text{mg.l}^{-1}$  de tiamina,  $20\text{g.l}^{-1}$  de sacarosa,  $1.0\text{mg.l}^{-1}$  de TDZ.

\_ Multiplicar las yemas adventicias en el mismo medio de cultivo de inducción (explantes de  $1.0\text{mm}^2$ ), los subcultivos se realizarán cada 30 días.

\_ Regenerar las plantas en un medio de cultivo compuesto por las sales MS,  $1.0\text{mg.l}^{-1}$  de tiamina y  $20\text{g.l}^{-1}$  sacarosa.

## DISCUSIÓN

En especies leñosas se han utilizado diferentes concentraciones de TDZ para el desarrollo de yemas adventicias. Dependiendo del cultivo y del tipo de explante esta concentración oscila desde  $0.2\text{mg.l}^{-1}$  a  $5.0\text{mg.l}^{-1}$  y puede ser combinada con otros reguladores del crecimiento como isopenilaminopurina (2ip), Ácido naftalenacético (ANA), Ácido indol-3-butírico (AIB), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Zeatina (Huetteman y Preece, 1993; INIBAP, 2001).

Sin embargo, en bananos del subgrupo Cavendish (AAA), pocos investigadores han usado el TDZ como citoquinina en los medios de cultivo (Arinaitwe *et al.*, 2000; INIBAP, 2001; Srangsam y Kanchanapoom, 2003). Seguramente debido a que este regulador del

crecimiento puede influir negativamente en la elongación y el enraizamiento de los brotes (Huetteman y Preece, 1993; Murthy *et al.*, 1998; De Carvalho *et al.*, 2000).

La respuesta de este cultivar se debe a la alta dominancia apical que presenta (INIBAP, 1996), lo que condujo a que las concentraciones de 6-BAP estudiadas, solamente estimularan la formación de brotes y fueran incapaces de favorecer el desarrollo de yemas adventicias que crecieran con las características descritas anteriormente, aunque concentraciones altas han sido usadas para la inducción de brotes en la micropropagación de plantas (Hirimburegama y Gamage, 1997; Vani y Reddy, 1999; Braga *et al.*, 2001).

El TDZ al ser más activo a bajas concentraciones que la citoquinina aminopurina y ser menos susceptible a las enzimas degradantes presentes en las plantas (Mok *et al.*, 1987), permitió el desarrollo de estas estructuras.

Una fuerte correlación fue encontrada por INIBAP (1996) entre la constitución genómica de los cultivares (el porcentaje del genoma B), la dominancia apical *in vitro* y el número de ciclos en el medio de cultivo de multiplicación necesarios para sobreponer la dominancia apical. Clones con genoma BB y ABB tienen una baja dominancia y en relativamente bajas concentraciones de citoquininas pueden multiplicarse eficazmente, mientras que los cultivares AAA requieren hasta nueve subcultivos en el medio de cultivo antes de que la dominancia apical se elimine.

En este trabajo utilizando el TDZ en los medios de cultivo, solo dos subcultivos fueron necesarios para el desarrollo de yemas adventicias. Roux *et*

al. (2000) obtuvieron yemas adventicias del cultivar 'Grande naine' en el sexto subcultivo con  $4.5 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-BAP.

Los explantes grandes tienen un potencial regenerador considerablemente mayor, sin embargo, la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja (Litz y Jarret, 1993).

Jiménez (1998) correlacionó el tamaño del explante con la supervivencia, lo cual pudiera estar relacionado con el contenido de fenoles, además, de que estos explantes tienden a ser dañados más fácilmente. En el presente estudio los explantes de  $9.0$ ,  $4.0$  y  $1.0 \text{ mm}^3$  mostraron altos porcentajes de supervivencia.

La considerable disminución del crecimiento en el tamaño de  $0.36 \text{ mm}^3$  cuando se compara con los demás pudiera atribuirse, a la relación del número de células intactas y dañadas dentro del tejido vegetal, a la composición de reguladores de crecimiento del medio de cultivo, que para este tamaño, pudiera resultar sobresaturada y/o al grado de contacto de los explantes con el medio nutritivo.

Mediante la tasa de crecimiento relativa se expresa el incremento de masa por unidad de tejido inicial y por unidad de tiempo, esto da una comparación más efectiva entre explantes que difieren en su tamaño (Vazquez y Torres, 1995).

Cuando se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo, bajos porcentajes de regeneración de plantas fueron obtenidos para este genotipo en contraste a lo referido por Okole y Schulz (1996) quienes obtuvieron 90% de regeneración de plantas con 6-BAP ( $2.4 \text{ mg.l}^{-1}$ ) en el medio de cultivo.

## CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo para la regeneración de plantas *in vitro* a partir de yemas adventicias en el cv. 'Grande naine'.

El TDZ ( $1.0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) resultó ser la citoquinina más efectiva para la inducción de yemas adventicias, lo que se logró, en solo dos subcultivos con porcentajes de formación de 72%.

Se obtuvo 96% de regeneración de plantas en medios de cultivo libres de reguladores del crecimiento.

## REFERENCIAS

Ahloowalia BS (1998) *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. En: Jain MS, Brar DS y Ahloowalia BS (Eds) Somaclonal variation and induced mutations crop improvement, pp. 293-309. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Arinaitwe G, Rubaihayo PR, Magambo MJS (2000) Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 86: 13-21

Braga MF, Sa M, Mustafa PC, Sa M (2001) Evaluation of a commercial protocol for *in vitro* multiplication of banana (*Musa* sp.) cv. Caipira (AAA). *Revista Brasileira de Fruticultura* 23 (2): 215-219

De Carvalho MH, Van Lê B, Zully-Fodil Y, Pham Thi AT, Thanh Van KT (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159 (2): 223 – 232

Hirimburegama, K, Gamage N (1997) Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa* spp. (banana and plantain). *Journal of Horticultural Science*. 72 (2): 205-211

Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119

INIBAP (1996) *Musa* Germoplasm Management. Annual Report. Networking Banana and Plantain, Montpellier, France

INIBAP (2001) Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 2000. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, pp. 48-56, INIBAP. Montpellier

Jambhale ND, Patil SC, Jadhav AS, Pawar SV, Waghmode BD (2001) Efecto del número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de cuatro clones de banana. *InfoMusa* 10 (1): 38-39

Jiménez E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez JP (Ed.) Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología, pp. 45-56. IBP, Santa Clara

Lee K, Zapata-Arias F, Brunner H, Afza R (1997) Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* sp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 1-8

Madhumita N, Joshi VJ, Chaudhari AN, Nandi M (1997) Effect of shoot-tip cutting and different levels of cytokinin on micropropagation of dwarf Cavendish var. Basrai of banana. *Journal of Soils and Crops* 7(2): 134-135

May GD, Afza R R, Mason HS, Wiecko A, Novack FJ, Arntzen CJ (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium* mediated transformation. *Bio/Technology* 13: 486-492

Mok MC, Mok DWS, Turner JE, Mujer CV (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22: 1194-1196

Murashige, T, Skoog R (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 473-493

Murthy BNS, Murch SJ y Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Development Biology- Plant* 34: 267 – 275

Novak FJ (1992) *Musa* (Banana and Plantains). En: Hammerschlag, FA, Litz, RE (Eds.) Biotechnology of Perennial Fruit Crops, pp.449-488. CAB International, Wallingford, Oxon

Okole BN, Schulz FA (1996) Micro-cross sections of banana and plantain (*Musa* spp.) morphogenesis and regeneration of callus and shoot buds. *Plant Science* 116: 185-195

Orellana PP (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología, pp.151-177. IBP, Santa Clara

- Rodrigues PHV, Tulmam, Neto A, Cassieri, Neto P, Mendes-BMJ (1998) Influence of the number of subcultures on the somaclonal variation of banana plantlets cv. Nanicao in Vale do Ribeira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 20 (1): 74-79
- Rout GR, Samantaray S, Das P (2001) Augmenting *in vitro* shoot multiplication with growth regulators and light conditions in *Musa acuminata* cv. Dwarf Cavendish. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 43: 15-21
- Roux N, Dolezel J, Swennen R, Zapata-Arias FJ (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimera in *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 189-197
- Sahijram L, Soneji JR, Bollamma KT (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated banana (*Musa* sp.). *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 39: 551-556
- Sandoval JA, Cote FX, Escoute J (1996) Chromosome number variations in micropropagated true-to-type and off-type banana plants (*Musa* AAA) cv. Grande Naine. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 32 (1): 14-17
- Santana RA, Alloufa MAI, de Santana RA (2000) Micropropagation in pacovan cultivar of banana (*Musa* spp.): effect of different concentrations of BAP. *Revista Brasileira de fruticultura* 22 (3): 481-482
- Srangsam A, Kanchanapoom K (2003) Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid banana (*Musa* sp.) Gros Michel (AAA) group. [www.psu.ac.th/PreidentOffice/Edu Service/journal/25-6-pdf/01callus\\_banana.pdf](http://www.psu.ac.th/PreidentOffice/Edu Service/journal/25-6-pdf/01callus_banana.pdf).
- Vani A, Reddy GM (1999) Novel techniques in efficient micropropagation of certain popular banana cultivars. *Journal of Genetics and Breeding* 53 (3): 247-250
- Vazquez E, Torres S (1995) Crecimiento y Desarrollo. En: Vazquez, E y Torres S (Eds) *Fisiología Vegetal*, pp. 269-314. Editorial Pueblo y Educación. La Habana
- Vuylsteke D, Ortiz R, Ferris S, Crouch J (1997) Plantain improvement. *Plant Breeding Rev.* 14: 267-320
- Zaffari GR, Kerbavy GB, Kraus JE, Romano EC (2000) Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 187-192