

## Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa* spp. y su impacto económico

Miguel Suárez-Castellá\*, Rafael G. Kosky, Borys Chong-Pérez, Maritza Reyes, Leyanis García-Águila, Zoe Sarría, Pedro Orellana, Alex Rodríguez, Robin Triana, Zaida Pérez, Milagros González, Miladys León, Blanca Pérez. \*Autor para correspondencia

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

### RESUMEN

La embriogénesis somática como tecnología de propagación ha sido reconocida por muchos autores como la futura generación en la regeneración de plantas por biotecnología, a escala masiva, por las ventajas en la eficiencia productiva. Sin embargo, se han registrado en la literatura científica especializada los problemas que han confrontado diversas experiencias en su empleo. Se destacan los bajos porcentajes de germinación de los embriones somáticos formados, la presencia de plantas fuera de tipo y los pocos estudios de las plantas en campo, lo que ha limitado su aplicación en la producción *de plantas in vitro* a escala comercial. El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) concibió una estrategia de innovación tecnológica que viene aplicando durante los últimos tres años en el escalado para la producción comercial de más de 300 000 plantas *in vitro* de plátanos y bananos ('Grande naine', 'Cavendish enano', 'FHIA 18' y 'FHIA 21'). El presente trabajo pretende mostrar las ventajas de la producción masiva de plantas *in vitro* de plátanos y bananos con el empleo de embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido. Se realizaron análisis comparativos de los principales gastos de producción de la embriogénesis somática y la organogénesis. A partir de los resultados se constató que el empleo de embriogénesis somática como tecnología para la producción masiva de plantas es viable, eficiente y constituye una herramienta clave en la producción de alimentos.

Palabras clave: bananos y plátanos, biofábrica, escalado de tecnología

### ABSTRACT

Somatic embryogenesis as a propagation technology has been recognized by many authors as the future generation of plant regeneration on mass scale due to the advantages in production efficiency. However, specialized scientific literature has stated the problems faced by various experiences in the use of this technology. It highlights the presence of off-types plants and the few studies of plants in the field, which has limited its application in the *in vitro* plant production at a commercial scale. The Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) developed a strategy of technological innovation that has been used for the past three years in the production at commercial scale of more than 300 000 *in vitro* plants of plantains and bananas ('Grande naine', 'Dwarf Cavendish', 'FHIA 18' and 'FHIA 21'). Based on that experience, this paper aimed to show the economic advantages using somatic embryogenesis for plantain and banana propagation in semisolid culture media. Comparative analysis of the main concepts of production cost in somatic embryogenesis and organogenesis were used. Results demonstrated that the use of somatic embryogenesis as a mass production of plants technology is viable, efficient and a key tool for food production.

Keywords: banana and plantain, biofactory, scaling technology

### INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un proceso de regeneración de plantas que ha sido descrito para especies vegetales dicotiledóneas y monocotiledóneas. Este ofrece la posibilidad de formación y multiplicación ilimitada de embriones somáticos con capacidad de

germinación y regeneración de plantas completas (Ibaraki y Kurata, 2001).

La importancia de la embriogénesis somática (Kosky, 1998) se resume en:

- es el sistema de regeneración de plantas más eficiente debido a la naturaleza bipolar del embrión somático,

- ofrece la posibilidad de automatizar todo el proceso de propagación *in vitro*,
- permite obtener altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo,
- da la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales.

A nivel internacional existen varias metodologías de propagación de plantas de *Musa* spp. por embriogénesis somática. Las más reconocidas han sido las desarrolladas por Escalant *et al.* (1994) en el CIRAD-FLHOR, Francia y por Schoot (1997) en la Universidad Católica de Lovaina, en Bélgica. Sin embargo, en todas las variantes hay elementos no abordados que constituyen limitaciones para la validación de la embriogénesis somática para *Musa* spp. como tecnología comercial de propagación masiva de plantas. Estas se concentran en: bajos porcentajes de germinación de los embriones somáticos formados, presencia de plantas fuera de tipo e insuficientes estudios en campo de plantas obtenidas por esta vía. Por ello, la estrategia de innovación debe estar encaminada a su solución.

Por estas razones, la embriogénesis somática, en el género *Musa*, se ha empleado fundamentalmente como herramienta en programas de mejoramiento genético (Daniels *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2010). No obstante, Côte *et al.* (2000) y López *et al.* (2005) refieren su posible uso para la propagación *in vitro* de plantas de cultivares de plátanos y bananos.

En Cuba, la propagación *in vitro* a escala comercial tiene más de 20 años de experiencia práctica, preferentemente mediante tecnologías de propagación vía organogénesis y con énfasis en determinados cultivares de plátanos y bananos. Sin embargo, en muchos de estos su empleo se ha limitado por la presencia de bajos coeficientes de multiplicación. El cultivo en inmersión temporal ha contribuido, a corto plazo, a la propagación *in vitro* de este cultivo (De Fera *et al.*, 2005; Basail *et al.*, 2007). La necesidad de producir material vegetal de plantación de alta calidad ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación *in vitro*.

El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) reconociendo la potencialidad de la embriogénesis somática, la alta demanda existente de plantas *in vitro* de este cultivo, que requiere de mayor eficiencia económica y considerando las limitaciones ya mencionadas de este método de regeneración, desarrolló bajo una estrategia de innovación tecnológica, un grupo de trabajos científico y productivos que permitieran validar la embriogénesis somática en *Musa* spp. como una tecnología viable y transferible para la producción a escala comercial de plantas *in vitro*.

El presente trabajo muestra la estrategia innovadora desarrollada y los impactos económicos en la producción de plantas *in vitro* por el empleo a gran escala de la embriogénesis somática en bananos y plátanos.

### **Estrategia de innovación para el empleo de la embriogénesis somática como tecnología de propagación comercial de plantas *in vitro* de *Musa* spp.**

Esta estrategia parte del análisis de las limitaciones reconocidas de la embriogénesis somática en los bananos y plátanos para que sea validada como tecnología de propagación de plantas escala comercial. Se concibió y aplicó una estrategia que tuvo en cuenta la solución de estas limitantes, que incluyó las variables tecnológicas que influyen y aspectos clave para el empleo progresivo de esta tecnología en las biofábricas o laboratorios comerciales de cultivo de tejidos.

La estrategia de innovación tecnológica desarrollada contempló tres componentes:

1. determinación de la variante tecnológica a emplear para el desarrollo de la embriogénesis somática,
2. definición de los retos tecnológicos a través de investigaciones de I+D y,
3. resultados de las investigaciones y el escalado productivo en biofábrica.

A continuación se define cada componente de la estrategia.

**Determinación de la variante tecnológica a emplear para el desarrollo de la embriogénesis somática**

En los últimos años se han logrado avances en el escalado de la embriogénesis somática como tecnología para la propagación masiva de plantas del género *Musa*, para ello se han desarrollado distintas variantes derivadas del empleo de diversos equipos y técnicas modernas, aunque en todos los casos presentan limitaciones para su validación absoluta (Kosky *et al.*, 2002; Posada-Pérez *et al.*, 2003).

A partir de los resultados logrados en el desarrollo de la embriogénesis somática en *Musa* spp. se procedió a analizar la variante más idónea para su aplicación en los laboratorios comerciales de cultivo de tejidos (Biofábricas) (Tabla 1).

Un análisis de las tres variantes mencionadas, sobre la base de sus ventajas y desventajas tecnológicas y teniendo como factor común el empleo de medios de cultivo líquido permitió concluir que:

- se requiere de elevados gastos de inversión inicial para su empleo en los laboratorios comerciales de cultivo de tejidos (Biofábricas),

- se puede enfrentar resistencia al cambio tecnológico en los laboratorios comerciales de cultivo de tejidos (Biofábricas) por sustitución de la propagación vía organogénesis por embriogénesis somática,

- a pesar de las publicaciones científicas al respecto, existían dudas en cuanto a la validez de estas tecnologías a escala comercial.

El empleo de la tecnología de propagación masiva en *Musa* spp. vía embriogénesis somática mediante las variantes tecnológicas anteriores requiere de preparación técnica, rigor y experiencia por el personal, para la ejecución de las operaciones de trabajo, esto implica capacitación del personal en la nueva tecnología. Además, se necesita de una inversión en equipamiento para su empleo (Biorreactores, SIT, agitador orbital, entre otros).

Como consecuencia de este análisis se determinó la conveniencia en la definición y desarrollo de una variante de aplicación de la tecnología de embriogénesis somática para la propagación masiva de plantas *in vitro* en *Musa* spp. con el empleo de medios de cultivo semisólidos.

Tabla1. Variantes de escalado de la embriogénesis somática en *Musa* spp.

Variantes de escalado	Embriogénesis somática en <i>Musa</i>
Escalado en Biorreactores (Kosky <i>et al.</i> , 2002)	
Escalado en Sistemas RITA® (Posada-Pérez <i>et al.</i> , 2003)	
Escalado en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) (Kosky <i>et al.</i> , 2002)	

Las ventajas de esta variante son:

- disminución de los gastos de inversión inicial respecto al resto de las variantes,
- tiene algunos puntos comunes con las tecnologías de micropropagación vía organogénesis y por ende menos barreras para el cambio tecnológico,
- constituye una variante de tránsito hacia la ES en medios de cultivo líquido y de hecho para la formación del capital humano necesario para la producción comercial y a escala masiva de plantas *in vitro*.

### Definición de retos tecnológicos a través de investigaciones de I+D

Para la solución de las limitaciones de la embriogénesis somática y de las variables que influyen se definieron retos específicos de carácter investigativo y productivo tales como:

- definición del tipo de explante inicial y la época idónea de recolección en campo,
- definición de variables para la selección de callos con estructuras embriogénicas idóneos,
- determinación del tiempo óptimo de cultivo de la suspensión celular y número adecuado de subcultivos,
- estudio sobre la multiplicación secundaria de los embriones somáticos,
- definición de concentraciones mínimas de reguladores de crecimiento a emplear y en general de medios de cultivos simples,
- estudios para lograr sincronización de la germinación de los embriones somático,
- escalado a nivel de producción comercial y diseño del sistema de organización, planificación y control de la producción, calidad y los costos y,
- estudios de estabilidad genética y comportamiento productivo por varios ciclos de cosecha en campo de las plantas de diferentes cultivares de *Musa* obtenidas por embriogénesis somática.

### Resultados de la investigación y el escalado productivo en biofábrica

Las soluciones derivadas del desarrollo de las investigaciones del tipo I+D para cada una de las variables definidas, permitió conformar una tecnología para la propagación masiva de plantas *in vitro* de *Musa* spp. Esta fue implementada en la biofábrica del IBP para su escalado. Entre los principales resultados de las investigaciones realizadas se encuentran:

- se determinó el tipo de explante a emplear y la influencia del número de brácteas emitidas en el momento de la colecta, la mejor época del año en que se debe hacer su recolección en campo, para la formación de callos con estructuras embriogénicas, lo que optimizó el establecimiento *in vitro* (García-Aguila *et al.*, 2006; García-Aguila *et al.*, 2009; Posada-Pérez *et al.*, 2010).
- se definió un nuevo método para optimizar el establecimiento de las suspensión celulares (Chong-Pérez *et al.*, 2005; Chong-Pérez *et al.*, 2007).
- se determinaron las concentraciones de reguladores de crecimiento mínimas a emplear, así como el número óptimo de subcultivos de las suspensiones celulares (Kosky *et al.*, 2000; Kosky *et al.*, 2001; Chong-Pérez *et al.*, 2005).
- se diseñó un medio de cultivo específico para la fase de maduración de los embriones somáticos que potenciaba su germinación (Kosky *et al.*, 2000).
- se definió una fase de crecimiento de las plantas para aprovechar la germinación asincrónica de los embriones somáticos con el empleo de medios de cultivo semisólido.
- se determinaron los principales índices tecnológicos de cada fase de la embriogénesis somática y se constató que los resultados fueron superiores a la producción de plantas *in vitro* empleando organogénesis.

El escalado productivo de esta tecnología contempló la producción de 365 347 plantas *in vitro* de plátanos y bananos, en especial de los cultivares 'Grande naine', 'Cavendish enano', 'FHIA 18' y 'FHIA 21'.

Un análisis comparativo entre la embriogénesis somática *Musa* spp. empleando medios de cultivo semisólidos y la organogénesis demostró la viabilidad de esta variante seleccionada.

Entre las ventajas se destacaron: como promedio se incrementó en 10 veces el coeficiente de multiplicación, se simplificó la manipulación del material vegetal en la cabina de flujo laminar por el personal, se disminuyeron los porcentajes de contaminación microbiana, se redujeron los gastos de personal, reactivos e insumos, se incrementó en un 30.0% la productividad del trabajo en la cabina de flujo laminar así como se requiere una inversión mínima de equipamiento para su empleo. No obstante, tiene como desventaja la falta de sincronización en la germinación de los embriones somáticos.

Además, se trabajó en la definición de los principales subsistemas para el desarrollo de la producción masiva de plantas *in vitro*, siendo los de organización del trabajo, planificación y control de la producción y los recursos, calidad, así como el cálculo de los costos de producción los principales.

Como parte del escalado se realizó una generalización en otras biofábricas y empresas agrícolas del país en ocho provincias, que incluyó tanto la evaluación de esta tecnología en la producción de plantas *in vitro* como su evaluación en campo.

Las investigaciones y el escalado realizado pretendieron dar solución a las limitaciones reconocidas internacionalmente que tiene la embriogénesis somática como tecnología de propagación masiva de plantas *in vitro* de *Musa* spp. (bajos porcentajes de germinación de los embriones somáticos formados, presencia de plantas fuera de tipo e insuficientes estudios en campo de plantas obtenidas por esta vía).

Se constató que como promedio a partir de 4.0 ml de suspensión celular se formaron 10 240

embriones somáticos ( $\pm 50.0$ ) con germinación superior al 90.0%.

En la fase de aclimatización no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de supervivencia de plantas *in vitro* obtenidas por embriogénesis somática (98.0%) y por organogénesis (97.6%).

En relación con la presencia de plantas fuera de tipo los resultados alcanzados en el escalado de la embriogénesis somática con medios de cultivo semisólidos en la producción de plantas *in vitro* de *Musa* fueron positivos. En una población de 13 000 plantas de 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) obtenidas mediante embriogénesis somática con medios semisólidos y evaluadas en la fase de aclimatización se constató que solo el 0.1% de ellas presentaba cambios fenotípicos (Tabla 2).

En los estudios en campo con plantas de diferentes cultivares de plátanos y bananos obtenidas mediante embriogénesis somática se pudo precisar que también fueron bajos los porcentajes de plantas con cambios fenotípicos (Tabla 3).

Tabla 2. Cambios fenotípicos observados en la fase de aclimatización de plantas de 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) obtenidas vía embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido.

Tipos cambios	Número de plantas	%
Plantas con hojas variegadas	3	0.02
Plantas en forma de Abanico	8	0.06
Plantas coreácea	2	0.01
Total	13	0.1

Tabla 3. Variabilidad fenotípica en campo encontrada en plantas de bananos y plátanos obtenidas vía embriogénesis somática.

Cultivar (Referencia)	Número total de plantas	Número de ciclos evaluados	Porcentaje de variabilidad
'Grande naine' ( <i>Musa</i> AAA)	5500	1	0 %
'Cavendish enano' ( <i>Musa</i> AAA) (Orellana <i>et al.</i> , 2010)	6720	2	0.34 %
'FHIA-18' ( <i>Musa</i> AAAB) (Kosky <i>et al.</i> , 2006)	4500	2	0.7%
'FHIA-21' ( <i>Musa</i> AAAB) (García-Aguila <i>et al.</i> , 2007)	6252	1	0.015%

La embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido presenta ventajas respecto a la organogénesis, lo cual se refleja en la eficiencia económica de la producción de plantas *in vitro*. Existe un grupo de aspectos que se pudieron precisar durante el escalado en la biofábrica de esta tecnología que posibilita mayores ventajas de la embriogénesis somática entre las que se encuentran:

- se simplifican las acciones de los operarios de cabina de flujo laminar, en especial en las fases de germinación y crecimiento de las plantas lo que propicia altos niveles de productividad del trabajo,
- se disminuyen los gastos de reactivos al producir mayores volúmenes de plantas por explante inicial (aprox. 10 000 a partir de 4.0 ml de suspensiones celulares), esto posibilita ahorro en los gastos de producción,
- disminuyen las pérdidas por contaminación microbiana ya que es menor el tiempo en que se expone el material vegetal ante los operarios

de cabinas de flujo laminar, en especial en las fases de germinación y crecimiento de las plantas.

Un análisis comparativo sobre algunas variables seleccionadas en la producción de 10 000 plantas *in vitro* de *Musa* spp. vía embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido, con respecto a organogénesis, en un periodo de 4 meses, permitió corroborar sus ventajas (Tabla 4).

El impacto económico de la tecnología desarrollada es significativo ya que se reducen los costos de producción además de todas las ventajas señaladas.

El cálculo de la ficha de costos para la producción de plantas *in vitro* mediante esta tecnología confirma la disminución de los gastos respecto al empleo de organogénesis (Tabla 5).

Tabla 4. Comparación de variables para la producción de 10 000 plantas *in vitro* de *Musa* spp. en 4 meses mediante organogénesis y embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido.

Variables	Organogénesis	Embriogénesis somática
Tiempo de obtención de los explantes iniciales	1.2 meses	5 meses
Número de explantes iniciales	1425 ápices	4 ml de suspensión celular
Número de operadoras empleadas en el proceso	10	5
Índices de pérdidas por contaminación microbiana	5- 8	1-2
Índices de pérdidas totales	10	2

Tabla 5. Comportamiento de partidas de gastos de producción de plantas *in vitro* de *Musa* spp. mediante embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido y organogénesis.

Concepto de gastos	Reducción de los gastos de producción (embriogénesis somática respecto a organogénesis)(%)
Gastos de personal	40.0 – 45.0
Gastos de reactivos e insumos	30.0
Costos totales	35.0 – 40.0

## CONCLUSIONES

La embriogénesis somática de *Musa* spp. en medios de cultivo semisólido por sus ventajas constituye una variante innovadora ya que requiere menor gasto de inversión inicial, es más compatible con la organogénesis, en especial en las fases de germinación y crecimiento, lo que podría frenar la resistencia al cambio que genera esta tecnología en su transferencia.

La estrategia de innovación tecnológica se sustentó en la solución de las principales limitaciones reconocidas internacionalmente sobre la embriogénesis somática hasta convertir la variante decidida en una opción tecnológica viable y poderosa para la producción de plantas *in vitro* de *Musa* spp.

La embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido desarrollada por el IBP constituye una tecnología de propagación a escala masiva de plantas *in vitro* de *Musa* spp. que representa la primera muestra de la nueva generación tecnológica para la propagación comercial de plantas, de ahí la importancia de estos resultados.

## REFERENCIAS

- Basail Pérez Milagros, Rafael G. Kosky, Víctor Medero Vega, Eneida Otero Gálvez, Marlenys Torres Delgado, Manuel Cabrera Jova, Jorge López Torres, Magaly García García, Arletys Santos Pino, Aymé Rayas Cabrera, José de la C. Ventura Martín, Maricel Bauta Toledo, Miguel Álvarez Mesa, Eriker Páz Chávez, Yoel Beovidez García, Julia Albert Llerena, Alexis Ortega Ortiz, Alberto Espinosa Cuéllar, Jesús García Ruiz (2007) Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la propagación *in vitro* del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 7 (1): 53 – 56
- Chong-Pérez B, R Gómez Kosky, M Reyes, I. Bermúdez-Carbaloso, J Gallardo, M. Freire-Seijo, L. Posada-Pérez, I. Herrera, R. Swennen (2005) Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de 'Grande naine' (AAA). *InfoMusa* 14 (1): 13-18
- Chong-Pérez Borys, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes, Idalmis Bermúdez-Carbaloso, Jorge Gallardo-Colina, Marisol Freire-Seijo, Laisyn Posada-Pérez, Idalia Herrera (2007) Comparación entre dos métodos de establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). *Biotecnología Vegetal* 7 (2): 95 – 101
- Côte F, Folliot M, Domergue R & Dubois C (2000) Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. 'Grande Naine'). *Euphytica*. 112: 245-251
- Dai XM, Xiao W, Huang X, Zhao JT, Chen YF, Huang XL (2010) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts of dessert banana cv. 'Da Jiao' (*Musa paradisiacal*/ABB Linn.) via somatic embryogenesis. *In vitro Cellular & Dev. Biology - Plant* 46 (5): 403-410
- Daniels D, Kosky R, Vega M (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA 21 (*Musa* spp. AAAB). *In vitro Cell. Dev. Biol.* 38: 330-333
- de Fera, Jiménez E, Barbón-Rodríguez R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2005) Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital. *Biotecnología Vegetal* 5 (2): 95-101
- Escalant JV, Teisson C, Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro Cell Dev. Biol* 30: 181-186
- García-Águila Leyanis, Miladys León, Rafael G. Kosky, Pedro Orellana, Ricardo González (2007) Evaluación en campo de la estabilidad genética en plantas obtenidas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA 21' (*Musa* AAAB). *Biotecnología Vegetal* 7(3): 143 – 147
- García-Águila Leyanis, Rafael G. Kosky, Boris Chong, Maritza Reyes, Marisol Freire-Seijo, Yelenys Alvarado-Capó (2006) Obtención de plantas del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) a partir de líneas celulares embriogénicas. *Biotecnología Vegetal* 6 (2): 79 – 82
- García-Águila Leyanis, Rafael G. Kosky, Yelenys Alvarado-Capó, Zoe Sarría, Maritza Reyes (2009) Formación de embriones somáticos del cultivar 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) en medios de cultivo líquido. *Biotecnología Vegetal* 9 (2): 119 – 125
- Ibaraki Y, Kurata K (2001) Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 179-199
- Kosky RG, T Gilliard, LA Barranco, M Reyes (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido 'FHIA-18' (AAAB). *INFOMUSA* 9(1): 12-16
- Kosky R G(1998) Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed) *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*, pp. 57-77. IBP, Santa Clara

- Kosky RG, Barranco LA, Chong B, Daniels D, Reyes M, DeFeria M (2006) Trueness-to-type and yield components of banana Irbid cultivar 'FHIA-18' plants regeneration via embryogenesis in a bioreactor. *Euphytica* 150: 63-68
- Kosky RG, De Feria M, Posada LP, Gilliard T, Bernal FM, Reyes MV, Chávez MM, Quiala EM (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26
- Kosky RG, Luis del Sol, Maritza Reyes, Marisol Freire, Laisyn Posada-Pérez, Idalia Herrera, Jean Vicent Escalant (2001) Embriogénesis somática en bananos y plátanos partiendo de flores masculinas inmaduras. *Biotecnología vegetal* 1: 29-35
- López J, Kosky RG, Toledo H, Montano N, Rayas A, Reinaldo D, Chong B, Cabrera M, Santos A, Ventura J, Medero V, García M, Basail M, Cantero A y Arbel J (2005) Evaluación en campo de plantas regeneradas por embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares en cv. 'Navolean' (*Musa* spp., AAB). *Biotecnología Vegetal* 5(2):115-120
- Posada Pérez Laisyn, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes (2003) Empleo Sistemas de Inmersión Temporal en la multiplicación y germinación de embriones somáticos de banano cultivar Gran Enano (AAA) y papaya var. Maradol Rojo. *Biotecnología Vegetal* 3 (3): 143 – 147
- Posada-Pérez Laisyn, Rafael G. Kosky, Borys Chong-Pérez, Maritza Reyes, Idalmis Bermúdez-Carballoso (2010) Influencia de la época del año sobre la capacidad embriogénica de inflorescencias masculinas inmaduras en banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). *Biotecnología Vegetal* 10 (4): 245 – 250
- Schoofs H, Panis B, Strosse H, Mayo A, López J, Roux N, Dolezel J, Swennen R (1999) Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *Infomusa* 8(2): 3-7