

# Cambios morfoanatómicos en los ápices del vástago y de la raíz del banano Williams (AAA, *Musa* sp.) bajo distintas concentraciones de N<sup>6</sup>-benciladenina<sup>1,2</sup>

Maribel Ramírez-Villalobos<sup>3\*</sup>, Helga Lindorf<sup>4</sup> y Eva de García<sup>5</sup>

J. Agric. Univ. P.R. 92(1-2):53-72 (2008)

## RESUMEN

Hoy en día existen escasas evidencias estructurales acerca del crecimiento *in vitro* de los ápices del vástago (AV) y de la raíz (AR) del banano. Este trabajo tiene como objetivo analizar los cambios morfoanatómicos que ocurren durante el crecimiento del AV, AR y explante del banano Williams bajo distintas concentraciones de N<sup>6</sup>-benciladenina (BA). Se estudiaron AV de explantes (8 mm × 1.5 mm, abarcando punta del vástago con porción del rizoma) cultivados en 0, 2.5 y 5 mg/L de BA durante cero, tres, seis, nueve y 12 días y, asimismo, la primera raíz de dichos explantes cuando alcanzó 1 a 1.5 cm. Las muestras se seccionaron (10 a 12 µm) y se tiñeron con safranina-fast green. El AV presentó forma de domo con organización túnica-carpus (una capa de túnica). Su diámetro fue mayor al cultivarlo con BA (93.75 a 142.05 µm) que sin esta citoquinina (73.87 a 85.23 µm), exceptuando los valores del día 6 (127.84 µm, sin BA). En el explante inicial sin cultivo el diámetro fue de 164.78 µm. En 2.5 mg/L de BA al día nueve, el AV mostró una zona transicional parecida al cambium. Esta concentración indujo mayor número de brotes por explante (2.19) a los 35 días. El AR en medio sin BA presentó protodermis, meristemo fundamental, procambium, células iniciales y caliptra mientras que con BA se identificaron procambium, meristemo fundamental y caliptra (comprimida). La benciladenina disminuyó la cantidad y la longitud de las raíces, inhibió la producción de primordios de raíces laterales, atrasó el período de emergencia radical y produjo distorsión en su morfoanatomía.

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 25 de octubre de 2006.

<sup>2</sup>Trabajo financiado parcialmente por la Fundación UCV (FUCV) bajo el Proyecto No. 0297/2006. Agradecimientos al Vicerrectorado Académico de la Universidad del Zulia por la Beca otorgada para cursar estudios de Postgrado en Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Al Instituto de Botánica Agrícola de la Universidad Central de Venezuela (UCV) en especial la Dra. Damelis Jáuregui y a la Auxiliar de Biología Norbelis Garcés por su orientación y procesamiento parcial de las muestras, respectivamente.

<sup>3</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. ZU4005.

\*Autor para correspondencia; e-mail: mcramire@cantv.net, mcramire2008@yahoo.com.

<sup>4</sup>Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal. Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias. UCV. Apartado 47114. Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela; e-mail: hlindorf@movistar.net.ve.

<sup>5</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical. IBE. Facultad de Ciencias. UCV. Apartado 47114. Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela; e-mail: egarcia@reacciuon.ve.

**Palabras clave:** ápice del vástago, ápice de la raíz, morfogénesis, benciladenina, *Musa* sp.

#### ABSTRACT

**Morphoanatomic changes in shoot and root apices of banana Williams (AAA, *Musa* sp.) cultured on different N<sup>6</sup>- benzyladenine concentrations**

Structural evidence about the in vitro growth of the shoot apex (SA) and root apex (RA) of banana is for the most part lacking. This paper presents an analysis of the morphoanatomic events that occur in the in vitro development of the SA, RA and explants of banana Williams cultured under different N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) concentrations. We examined the SA of explants (8 mm × 1.5 mm, shoot tip with part of rhizome) grown on 0, 2.5 and 5 mg/L of BA for 0, 3, 6, 9 and 12 d, and also the first emergent root (1 to 1.5 cm long) from these explants. Samples were sectioned (10 to 12 μm) and stained with safranin-fast green. The SA showed a dome shape with tunica-carpus organization (a single tunica layer). SA diameters were larger for explants growing in BA (93.75 to 142.05 μm) than in those growing without the cytokinin (73.87 to 85.83 μm), except for the diameter on the sixth day (127.84 μm). The noncultured initial explant without culture reached a diameter of 164.78 μm. The SA showed a cambium-like transitional zone in explants cultured with 2.5 mg/L of BA on the ninth day. This concentration also induced the highest number of shoots per explant (2.19) in 35 days. RA growing in media without BA showed protoderm, ground meristem, procambium, initial cells and root cap whereas with BA procambium, fundamental meristem and root cap (compressed) were distinguished. Benzyladenine decreased the number and length of the roots, inhibited the formation of lateral roots, increased the time for root emergence and caused distortion in their anatomic structure.

**Key words:** shoot apex, root apex, morphogenesis, benzyladenine, *Musa* sp.

#### INTRODUCCIÓN

El cultivo de bananos y plátanos se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales del mundo, donde tienen gran importancia económica dado que son fuente de alimento, empleo e ingreso (Crouch et al., 1998). En el mercado internacional las principales frutas que conforman el movimiento diario son las bananas. En términos de volumen representan las primeras frutas de exportación ocupando el segundo lugar, después de las cítricas, en términos de valor lo que se corresponde a 12% del volumen total de frutas producidas en el mundo (Martínez et al., 2007). Venezuela en particular destinó a este cultivo una superficie de siembra de 34,000 ha y tuvo una producción estimada de 520,000 t y rendimientos de 15.29 t/ha en el año 2005 (Agrocadenas, 2007). Todas las variedades comerciales de plátanos y bananos cultivadas en Venezuela son susceptibles a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y a la sigatoka amarilla (*M. musicola*), por lo que se ha promovido la obtención de clones resistentes o tolerantes a la enfermedad mediante la aplicación de herramientas biotecnológicas a las variedades de *Musa*, en especial al banano Williams, un triploide (AAA) del subgrupo Cavendish, comercial y susceptible a estas enfermedades (Trujillo y García, 1996; García et al., 2001).

La aplicación de métodos clásicos para mejorar tanto la producción como la resistencia a enfermedades resulta limitada debido a largos períodos de generación, alta esterilidad y poliploidía de la mayoría de los cultivares. Por otra parte, el éxito en el uso de métodos más noveles depende, entre otros factores, de la existencia de técnicas eficientes y reproducibles para la inducción de brotes y embriones somáticos. La carencia de protocolos de regeneración es en muchos casos el principal obstáculo para la aplicación de la biotecnología moderna, incluyendo la transferencia de genes (Caboni et al., 2002). En contraposición, el cultivo *in vitro* de puntas del vástago o puntas del brote con una porción de rizoma (Martin, 1975) se ha consolidado mundialmente por sus múltiples ventajas para la micropropagación y la distribución de manera comercial de plantas de banano sanas (García et al., 2002), pues este tipo de técnica permite la regeneración vía organogénesis directa y con una adecuada estabilidad genética (Krikorian et al., 1993).

El crecimiento del vástago resulta por la actividad del meristemo apical del vástago—también llamado ápice del vástago (AV), punto vegetativo o punto del vástago—que produce su alargamiento y ramificación (primordios foliares y yemas axilares). Por su parte, el meristemo apical de la raíz (AR)—ápice de la raíz o punto vegetativo de la raíz—está protegido por la caliptra que hace que este meristemo sea subapical (Clark, 1997; Lindorf et al., 1999). Existen pocas investigaciones en banano sobre el AV (Banerjee et al., 1986; Fahn et al., 1963; Fahn, 1967; Biju et al., 1997) y el AR (Riopel y Steeves, 1964), y estas se han realizado con plantas cultivadas en campo. Para el nivel *in vitro* no se dispone de mayor información sobre los cambios morfoanatómicos que ocurren en el AV y AR del explante ni sobre la iniciación y el desarrollo de sus raíces laterales. Este conocimiento es fundamental si se pretende manipular o mejorar el proceso de organogénesis.

Algunas investigaciones de banano reportan el efecto benéfico de las citoquininas sobre la formación de vástagos o brotes axilares en puntas del vástago cultivadas *in vitro* (Hardy y García, 1994; Roels et al., 2005). Las citoquininas tienen gran importancia económica sobre todo en la industria de la micropropagación, siendo la más usada la N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) (Segura, 2000). Estas sustancias son derivados de adenina caracterizados por su capacidad de inducir la división celular en plantas e interactuar con las auxinas en la determinación de la dirección de la diferenciación celular (Caboni et al., 2002). Entre sus funciones se encuentran la proliferación de yemas axilares y la neoformación de vástagos (Segura, 2000). Werner et al. (2001) señalan que las citoquininas tienen efectos opuestos en los ápices del vástago y de la raíz. Mientras que en los vástagos una reducción de los niveles de citoquininas endógenas conlleva un retardo en su desarrollo (debido a una dis-

minución en la tasa de proliferación celular en el ápice), dicha reducción resulta en un mayor desarrollo de los ápices radicales.

Este trabajo tuvo como objetivos analizar los cambios morfoanatómicos que ocurren durante el desarrollo de los ápices del vástago y de la raíz del banano Williams bajo distintas concentraciones de benciladenina. De igual manera, se han analizado la morfoanatomía del explante, la formación de primordios de raíces laterales y las características morfológicas de los explantes.

### MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal para esta investigación se obtuvo de vitroplantas de banano Williams (cuarta multiplicación), cultivadas durante ocho semanas en medio Murashige y Skoog (MS) (1962) más 30 g/L de sacarosa, vitaminas de Morel y Wetmore (1951), 2.5 mg/L de benciladenina y 7 g/L de agar. Las condiciones de cultivo fueron frascos de vidrio pequeños (6.5 cm × 5.5 cm), 30 ml de medio, luz blanca fluorescente continua (33  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ . El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de su esterilización a  $121^\circ \text{C}$  y  $1.1 \text{ kg}/\text{m}^2$  de presión por 20 min.

De las vitroplantas se extrajeron puntas del vástago—constituidas por el ápice del vástago y tres o cuatro primordios foliares—con una pequeña porción del rizoma. Estos explantes de 8 mm de alto por 1.5 mm de diámetro se sembraron en el medio descrito anteriormente con diferentes concentraciones de BA: 0, 2.5 y 5 mg/L (Hardy y García, 1994) y se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo mencionadas por un tiempo de tres, seis, nueve y 12 días después de la siembra, para un total de 12 tratamientos.

Además, se cultivaron explantes por tantos días como fuese necesario para que la primera raíz formada (en cada concentración) alcanzara una longitud de 1 a 1.5 cm. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo de los explantes en cada concentración de BA y logrado el tamaño de las raíces se procedió a la fijación de tres muestras por tratamiento en FAA al 70% (5 ml de formaldehído, 5 ml de ácido acético glacial y 90 ml de alcohol etílico al 70%) y a su procesamiento histológico. Para el estudio del AV los explantes cultivados se redujeron a un tamaño de 10 mm de largo mediante la eliminación de algunas de las bases foliares; y para el AR se tomó un centímetro de raíz, desde la parte distal hacia la basal.

Para el procesamiento histológico las muestras se sometieron a una serie de deshidratación ascendente de alcohol butílico terciario (ABT) (Johansen, 1940) con las siguientes proporciones de agua destilada, etanol al 95% y alcohol butílico terciario absoluto: ABT 70% (30:50:20), ABT 85% (15:50:35), ABT 95% (0:45:55), ABT 100% (0:25:75) y ABT

(0:0:100), permaneciendo en cada mezcla durante dos horas. Además, se efectuaron otros dos pasos con ABT absoluto dejando las muestras en el último cambio hasta el día siguiente (12 horas). Seguidamente se efectuó la infiltración de las muestras en parafina líquida (punto de fusión 56 a 57° C), agregando un volumen equivalente al ABT, realizando tres cambios de parafina cada dos horas y dejando las muestras en la estufa a 60° C hasta la evaporación del alcohol. Finalmente, las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se almacenaron a 10° C. Se realizaron cortes longitudinales (12  $\mu\text{m}$ ) y transversales (10  $\mu\text{m}$ ) con un micrótopo de rotación, se tiñeron con safranina acuosa al 1% (en agua destilada) y 'fast green' al 0.5% (en etanol absoluto) y se montaron en bálsamo de Canadá para su observación en el microscopio de luz.

Con la finalidad de comparar la anatomía del AV del explante inicial sin cultivo (0 días) con la de aquellos en cada concentración de BA bajo los diferentes tiempos de cultivo, se aislaron puntas del vástago con una porción de rizoma de las vitroplantas, se fijaron inmediatamente en FAA (70%) y se realizaron cortes longitudinales según el procedimiento descrito. Para efectuar las comparaciones anatómicas entre la estructura normal de la raíz y la obtenida bajo los distintos tratamientos fue necesario recurrir a raíces de plantas obtenidas *in vitro* con siete meses bajo condiciones de umbráculo y no a las raíces experimentales sin BA, pues en ellas los tejidos no se habían diferenciado totalmente. Los cortes transversales de estas raíces se realizaron a mano alzada, se colorearon con azul de toluidina acuosa al 0.5% y se montaron en aguaglicerina en partes iguales.

En este trabajo se usó un diseño totalmente al azar con tres repeticiones y cinco explantes como unidad experimental. Cada tres días, por un período de doce, y cada siete días, en el rango de 14 a 63, se registraron las siguientes características morfológicas de los explantes: altura de planta (AP), número de hojas por explante (NH), número de brotes (vástagos) por explante (NB), número de raíces por explante (NR), longitud de la raíz más larga (LR) y número de raíces laterales en la raíz más larga (RL). El diámetro (D), la altura (A) y la relación D/A del AV se midieron en las secciones longitudinales hasta los 12 días. Para el diámetro se consideró el punto de la axila del último primordio foliar, y para la altura, la longitud desde el punto medio del diámetro hasta la parte distal del meristemo. El área de las células, núcleos y nucléolos se estimó dependiendo de su forma o figura geométrica. Para la evaluación del efecto de los tratamientos se analizaron la altura de planta y el número de hojas a los 12 días de cultivo y en todas las variables a los 35 días empleando el procedimiento GLM del programa SAS (1989); cuando se encontraron efectos significativos se aplicó la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Morfoanatomía general del explante.** En el ápice del vástago del banano Williams, tanto del explante inicial sin cultivo como de aquellos cultivados con o sin BA (2.5 y 5 mg/L), se observaron el procambium, la protodermis y el meristemo fundamental (Figura 1E). El meristemo apical se localiza en el centro del rizoma rodeado por las vainas foliares y a los lados del meristemo se observan los primordios foliares (Figuras 1E-F y 2). En monocotiledóneas, los primordios foliares se originan de tal manera que partes de cada hoja se presentan sobre ambos lados del eje debido a que sus bases encierran el pseudotallo en desarrollo (Biju et al., 1997).

En banano las hojas aparecen en forma helicoidal, la de mayor edad enrollada sobre la más joven en forma de cono, con un ápice filiforme. Las hojas sucesivas se producen casi en el mismo plano sin entrenudos claramente visibles (Figuras 1E-F). Esto de acuerdo a Biju et al. (1997) representa una de las características distintivas de la fase vegetativa del AV en 'Red banana', en el que la actividad meristemática en las bases foliares contrasta con la ausencia de este tipo de actividad en la zona de células madres centrales (zona central, ZC) del ápice del vástago, así como en la región de los posibles entrenudos. Además, durante la fase vegetativa la zona central permanece pasiva y las hojas sucesivas se producen casi en el mismo plano sin ningún desplazamiento vertical.

El rizoma está constituido en gran parte por parénquima y en él se pudieron distinguir dos zonas: la externa o parénquima cortical y un cilindro central (Figura 1F) del cual se originaron raíces. En el parénquima cortical se localizaron varias trazas vasculares que alimentan las hojas, las raíces y las yemas axilares o futuros hijos. Lo antes descrito coincide con otros reportes para el banano (Simmonds, 1962; Sandoval y Müller, 1999).

**Morfoanatomía del ápice del vástago.** El AV de plantas de banano Williams cultivado in vitro bajo diferentes concentraciones de benciladenina y tiempos de cultivo mostró la organización citohistológica de la teoría túnica-carpus descrita por Schmidt (1924), citada por Fahn (1967) y Esau (1977) (Figura 2). En el material observado la túnica es uniseriada, en contraste con otros bananos como el Dwarf Cavendish y Red banana, en los que la túnica presenta dos (Fahn et al., 1963) y tres (Biju et al., 1997) capas celulares, respectivamente.

Aunque los planos de división celular fueron anticlinales en toda la túnica, citohistológicamente se pudieron distinguir dos zonas en ella (Figuras 1A-B). Una zona apical central constituida por pocas células iniciales grandes (129.14 a 161.42  $\mu\text{m}^2$ ), ligeramente teñidas, con núcleos grandes (25.35  $\mu\text{m}^2$ ), nucléolos poco coloreados y baja densidad

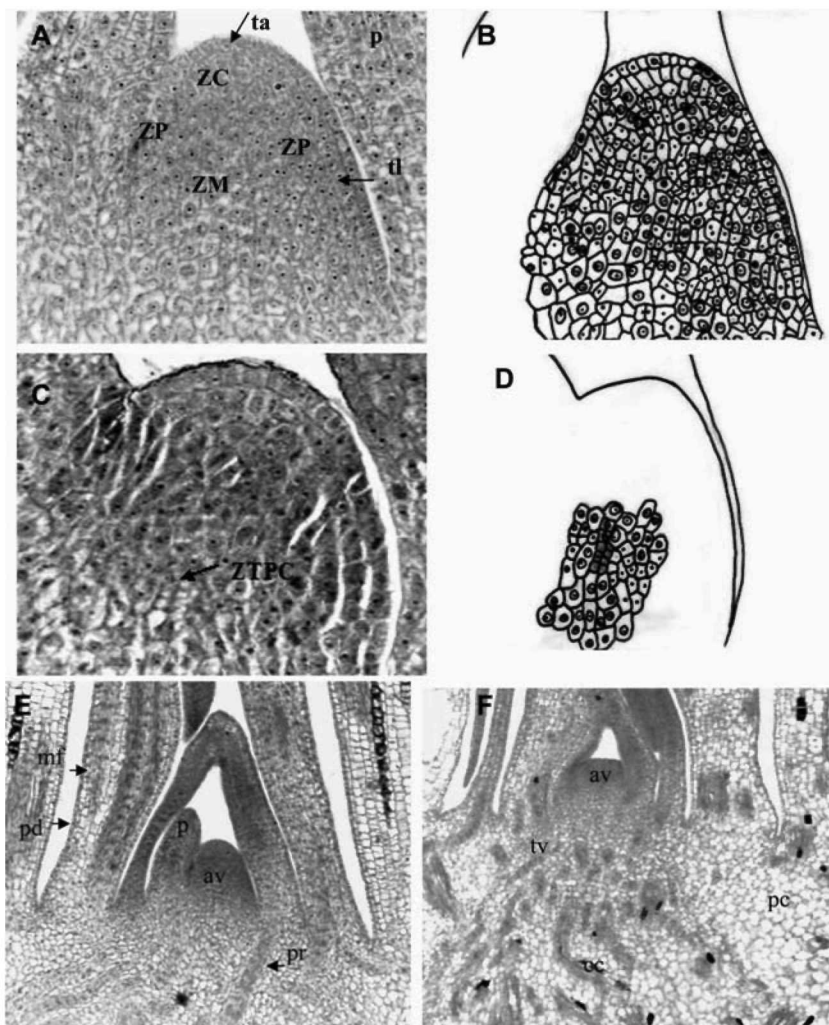


FIGURA 1. Cortes longitudinales del ápice del vástago (A-D) y punta del vástago (E, F) de vitroplantas de banano Williams. A) Testigo; zonas de la túnica y el corpus. Túnica: apical central (ta) y lateral (tl). Corpus: central (ZC), periférico (ZP) y medular (ZM). 400X. B) Dibujo esquemático de A, los puntos representan nucléolos y los círculos núcleos. C) 2.5 mg/L de benciladenina a los nueve días de cultivo, mostrando la zona transicional parecida al cambium (ZTPC). 400X. D) Dibujo esquemático de C, representando la ZTPC por células sombreadas. E) Testigo; ápice del vástago (av), primordio foliar (p) y regiones meristemáticas: mf, meristemo fundamental. pd, protodermis. pr, procambium. 100X. F) Traza vascular (tv) y zonas del rizoma: cc, cilindro central. pc, parénquima cortical. 40X.

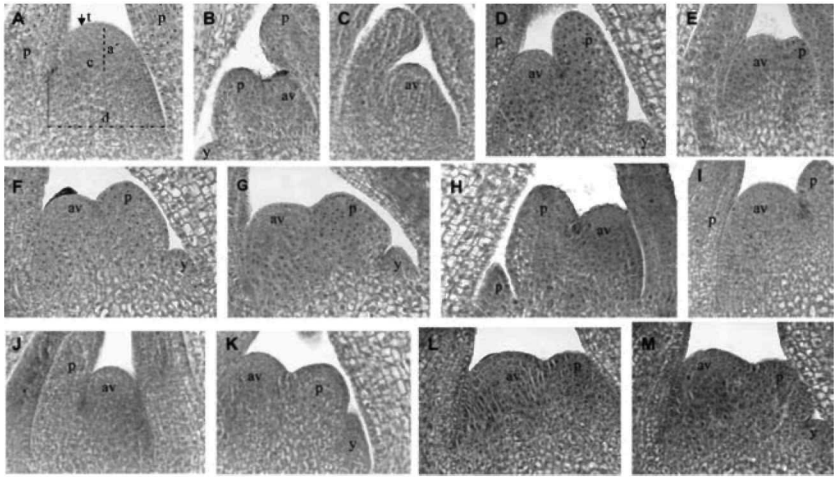


FIGURA 2. Cortes longitudinales del ápice del vástago (av) de vitroplantas de banano Williams cultivadas in vitro bajo diferentes concentraciones de benciladenina (BA) en función del tiempo después de la siembra. 400X. A-E) 0 mg/L de BA a los 0 (testigo), tres, seis, nueve y 12 días, respectivamente. F-I) 2.5 mg/L de BA a los tres, seis, nueve y 12 días, respectivamente. J-M) 5 mg/L de BA a los tres, seis, nueve y 12 días, respectivamente. a, altura. c, corpus. d, diámetro. p, primordio foliar. t, túnica. y, yema axilar.

citoplasmática; y una zona lateral, ubicada a los lados del primordio foliar, con células pequeñas ( $32.29$  a  $50.44 \mu\text{m}^2$ ), altamente teñidas, de citoplasma denso, núcleos grandes ( $18.33$  a  $25.34 \mu\text{m}^2$ ) en comparación al tamaño de la célula, y nucléolos prominentes con alta coloración. Además, hubo alta tasa de división anticlinal cerca del primordio foliar.

El corpus fue menos homogéneo que la túnica y en su organización interna se pudieron distinguir tres zonas principales (Figura 1A-B) de acuerdo a lo descrito por Clark (1997): a) La zona de células madres centrales o zona central (ZC), que probablemente representa las iniciales del corpus y se localizó debajo de la porción apical de la túnica (iniciales de la túnica); b) La zona del meristemo medular o zona medular (ZM); c) La zona del meristemo periférico o zona periférica (ZP). Se ha señalado que en la ZC las divisiones son relativamente poco frecuentes y se considera análoga al centro quiescente del ápice de la raíz; sus células frecuentemente tienen paredes primarias gruesas con punteaduras. La ZP se considera mitóticamente más activa (Raven et al., 2005).

En el tratamiento con 2.5 mg/L de BA a los nueve días de cultivo se lograron apreciar vestigios de una zona transicional parecida al cambium (ZTPC) (Figuras 1C-D) ubicada entre las células madres centrales y los meristemos periférico y medular. La presencia de esta zona



transicional sugiere que la organización interna del corpus en el banano Williams corresponde a la que se ha descrito como tipo *Opuntia* (ZC, ZP, ZM y ZTPC) (Fahn, 1967). El período de tiempo en el cual se manifiesta la ZTPC es muy corto (Fahn et al., 1963), lo que puede haber determinado que no se observara en todos los tratamientos.

Se ha descrito la ZTPC con forma de copa y variando considerablemente en altura y diámetro durante el plastócrono (período de tiempo entre la formación de dos primordios), alcanzando su máximo desarrollo cerca del primordio foliar (Fahn et al., 1963). De acuerdo a Philipson (1954), la ZTPC es una característica temporal en muchas plantas en las que se presenta (*Phoenix dactylifera*, banano Dwarf Cavendish, *Chrysanthemum morifolium*, *Opuntia cylindrica*, *Bellis perennis*, *Xanthium pennsylvanicum* y *Liriodendron tulipifera*), ya que esta zona desaparece al final del plastócrono (Fahn et al., 1963). Por lo tanto, esta zona no debería utilizarse como un criterio para clasificar los ápices del vástago.

**Variaciones en las dimensiones del ápice del vástago.** En general, se encontró que el AV muestra una forma de domo muy pronunciada durante su crecimiento in vitro (Figura 2). El diámetro del AV tendió a ser mayor en los explantes que se cultivaron en medio con BA (93.75 a 142.05  $\mu\text{m}$ ) que en los que no se les aplicó BA (73.87 a 85.23  $\mu\text{m}$ ), exceptuando el diámetro a los seis días de cultivo (Cuadro 1). Sin embargo, en el explante inicial sin cultivo se apreció que el AV presentó 164.78  $\mu\text{m}$ , valor que superó al de los tratamientos. En cuanto a la altura, el explante inicial sin cultivo presentó el mayor valor (85.23  $\mu\text{m}$ )

CUADRO 1.—Valores ( $\mu\text{m}$ ) del diámetro (D), la altura (A) y la relación D/A del ápice del vástago de los explantes del banano Williams cultivados in vitro bajo diferentes concentraciones de benciladenina y tiempos de cultivo.

Benciladenina	Tiempo de cultivo (días)				
	0	3	6	9	12
0 mg/L	Explante inicial sin cultivo				
D	164.78	73.87	127.84	85.23	73.87
A	85.23	36.93	68.18	42.61	28.41
D/A	1.93	2.00	1.87	2.00	2.60
2.5 mg/L					
D		93.75	93.75	99.43	113.64
A		31.25	25.57	28.41	25.57
D/A		3.00	3.67	3.50	4.44
5 mg/L					
D		113.64	119.32	127.84	142.05
A		65.50	45.46	34.09	42.62
D/A		1.82	2.62	3.75	3.57

y en los restantes se ubicaron entre 25.57 y 45.46  $\mu\text{m}$ . La relación diámetro/altura de los AV osciló entre 1.82 a 4.44  $\mu\text{m}$ .

En 0 mg/L de BA el diámetro aumentó casi al doble a los seis días de cultivo, al compararlo con el de tres días; después disminuyó, hasta que a los 12 su valor se hizo igual al de los tres días (Cuadro 1). Estos cambios del AV se asocian a la fase plastocrónica (Fahn et al., 1963). El AV inicialmente muestra su forma típica de domo (Figura 2B), la cual aumenta en diámetro y altura hasta alcanzar su área máxima (Figura 2C), luego experimenta cambios morfológicos en la medida que comienzan a emerger los primordios foliares hasta obtener su área mínima (Figura 2E). El AV recupera su forma inicial después de la emergencia de los primordios foliares. Estos eventos plastocrónicos también han sido descritos por Esau (1977) y Banerjee et al. (1986) bajo condiciones in vivo e in vitro, respectivamente.

Los diámetros del AV obtenidos en los diferentes tratamientos se ubicaron alrededor de los 100  $\mu\text{m}$ , valor reportado para la mayoría de los meristemos vegetales (Segura, 2000). Sin embargo, son considerablemente más bajos que los 280  $\mu\text{m}$  indicados para los bananos (Fahn et al., 1967) y específicamente para el cultivar 'Dwarf Cavendish' que fluctúa entre 180 y 270  $\mu\text{m}$  (Fahn et al., 1963; Sandoval y Müller, 1999).

**Formación de raíces adventicias en el explante.** En el rizoma se localizaron primordios de raíces adventicias completamente organizados a los nueve, 12 y 28 días en 0, 2.5 y 5 mg/L de BA, con tamaños de 0.58, 0.05 y 0.02 cm, respectivamente (Cuadro 2). El tiempo que tomaron las raíces para alcanzar 1 a 1.5 cm (después de la siembra del explante) fue de 12, 28 y 42 días en medio con 0, 2.5 y 5 mg/L de BA, respectivamente. Por tanto, las raíces de medio sin BA tuvieron crecimiento rápido y las del medio con BA, crecimiento lento. Las secciones longitudinales del explante reflejaron que los primordios de raíz en medio sin BA se formaron en la parte distal del rizoma, cerca de la base de las vainas foliares (Figura 3A), y en la parte proximal en aquellos explantes cultivados en 2.5 mg/L de BA, originándose en ambos casos a partir de células cercanas a los tejidos vasculares de la periferia del cilindro central (Figuras 3A-C). En el medio con 5 mg/L no se observó la formación de primordios de raíces adventicias en las secciones del explante hasta los doce días.

En los primordios de raíces adventicias del medio sin BA se lograron apreciar las regiones meristemáticas de diferenciación primaria: proto-dermis, meristemo fundamental y procambium. También se distinguieron las células iniciales del AR y la caliptra o cofia (Figura 3B). En las raíces en medio con 2.5 mg/L de BA se identificaron el procambium, el meristemo fundamental, la corteza (células de forma y tamaño variable de 82.62 a 516.20  $\mu\text{m}^2$ ) y la caliptra. La proto-dermis no se logró detectar y la caliptra lució algo comprimida (Figuras 3D-E). Las características

CUADRO 2.—Valores de altura de planta (AP) (cm), número de hojas por planta (NH), número de brotes por explante (NB), número de raíces por planta (NR), longitud de la raíz más larga (LR) (cm) y número de raíces laterales (RL) durante el cultivo in vitro de los explantes del banano Williams bajo diferentes concentraciones de benciladenina (BA) (mg/L).

BA mg/L	Tiempo de cultivo (días)												
	0	3	6	9	12	14	21	28	35	42	49	56	63
0 BA	R												
AP	0.80	0.90	0.96	0.98	1.69 a	1.93	2.47	2.77	3.15 a		—	—	—
NH				1.00	1.56 a	1.68	2.48	3.00	3.90 a	—	—	—	—
NB									0.00 b	—	—	—	—
NR				0.50	1.53	1.87	3.86	4.33	5.50 a	—	—	—	—
LR				0.58	2.09	2.81	7.48	9.09	9.38 a	—	—	—	—
RL							15.24	18.20	21.70	—	—	—	—
2.5 BA													
AP		0.91	0.93	0.95	1.28 b	1.33	1.41	1.59	1.68 b	1.69	1.83	2.01	2.43
NH				1.00	1.10 b	1.57	2.31	2.48	2.73 b	2.77	3.35	3.56	3.77
NB							0.55	1.00	2.19 a	2.91	3.30	3.25	3.92
NR					0.08	0.11	0.33	0.86	1.26 b	1.45	2.75	4.13	5.54
LR					0.05	0.04	0.15	0.63	0.63 b	1.00	1.54	1.88	2.09
RL													0.00
5 BA													
AP		0.87	0.90	0.91	0.94 c	1.08	0.98	1.01	1.03 bc	1.10	1.11	1.18	1.23
NH				1.00	1.08 b	1.37	2.30	2.30	2.71 b	2.70	3.00	3.04	3.04
NB							0.37	0.89	1.89 a	2.56	2.88	3.18	4.05
NR					0.00			0.13	0.54 b	1.04	1.56	2.14	2.45
LR					0.00			0.02	0.18 b	0.57	0.99	1.68	1.87
RL													0.00

R: Raíz de planta bajo condiciones de umbráculo. —: No hubo medición debido a que la parte aérea de la planta y las raíces cubrieron el envase. Medias de cada variable con letras distintas difieren significativamente (P < 0.05).

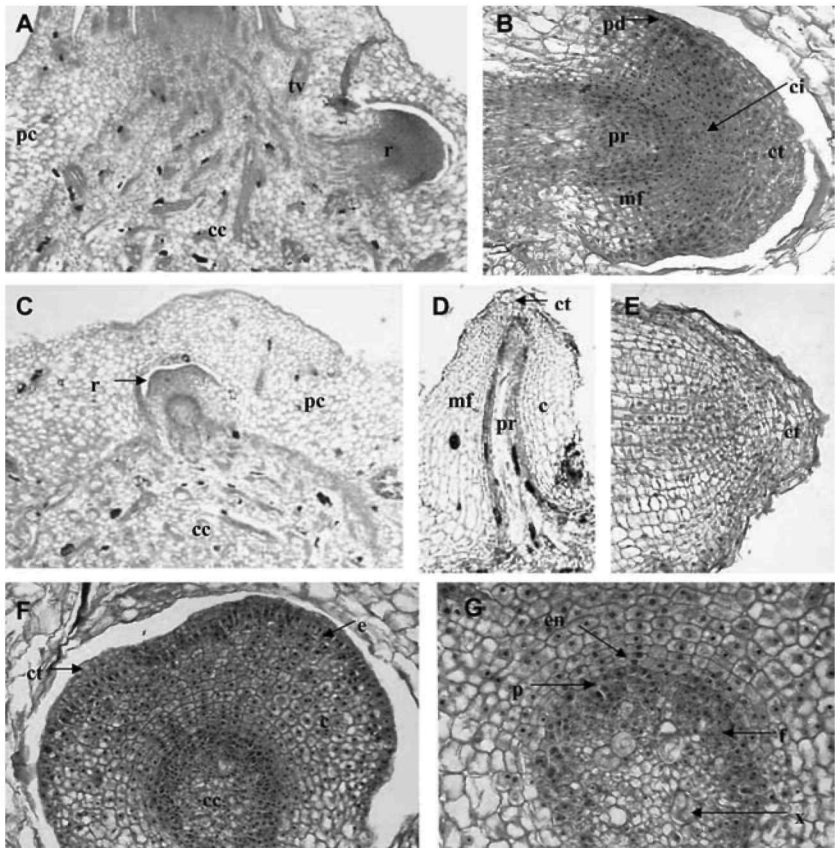


FIGURA 3. Formación de raíces adventicias en explantes de banano Williams. A, B) Corte longitudinal de raíz en medio sin benciladenina (BA) a los nueve días de cultivo in vitro. C, F, G) Corte transversal de raíz en medio sin BA, nueve días. D, E) Corte longitudinal de raíz en medio con 2.5 mg/L de BA, a los 12 días. c, corteza. cc, cilindro central. ci, células iniciales. ct, caliptra. e, epidermis. en, endodermis. f, elementos de floema. mf, meristemo fundamental. p, periciclo. pc, parénquima cortical. pd, protodermis. pr, procambium. r, raíz adventicia. tv, traza vascular. x, elementos de xilema. A) 40X. B, E, G) 400X. C) 100X. D, F) 200X.

anteriores de las raíces en medio con BA se asocian al efecto inhibitor de las citoquininas sobre la formación de este órgano (Skoog y Miller, 1965).

Las secciones transversales de los primordios de raíces adventicias en medio sin BA mostraron la epidermis, la corteza con la endodermis, el cilindro central, parte de la caliptra y los elementos de los tejidos vasculares primarios, xilema y floema (Figuras 3F-G). Las células epidérmicas presentaron citoplasma denso (altamente teñido), pared del-

gada, forma alargada ( $6.82$  a  $9.09 \mu\text{m} \times 18.18$  a  $20.45 \mu\text{m}$ ), con núcleos ( $16.21 \mu\text{m}^2$ ) y nucléolos prominentes ( $10.38 \mu\text{m}^2$ ). La corteza consistió de células parenquimatosas ( $123.94$  a  $185.91 \mu\text{m}^2$ ) de forma variable y se ensanchó por divisiones periclinales y alargamiento de las células de las capas más internas por encima de la endodermis, formándose filas radiales (Figuras 3F-G). En el cilindro central se identificaron elementos de xilema y floema y el periciclo o pericambium (Figura 3G).

***Morfoanatomía de las raíces adventicias desarrolladas.*** En raíces obtenidas de explantes cultivados en medio sin BA y con  $2.5$  y  $5 \text{ mg/L}$  de BA, la sección longitudinal del ápice de la raíz al momento de alcanzar  $1$  a  $1.5 \text{ cm}$  de largo mostró la caliptra, el cilindro central ( $109.09 \mu\text{m}$ ), la corteza, la epidermis y los pelos radicales (Figura 4). En las raíces procedentes de medio sin BA, la epidermis consistió de células alargadas, altamente teñidas, con núcleos y nucléolos prominentes. Por su parte, las células de la corteza mostraron una mediana coloración, la cual fue más intensa hacia la parte más cercana del promeristemo (que incluye el centro quiescente y las células iniciales). Además, varias células experimentaron división celular y hubo muchos espacios intercelulares en la zona más alejada del ápice de la raíz. La caliptra cubrió el promeristemo y registró un área aproximada de  $36,529.18 \mu\text{m}^2$ . En la medida en que sus células se alejaron del promeristemo fueron más grandes ( $322.40 \mu\text{m}^2$ ), alargadas ( $23.64 \mu\text{m}$ ), con núcleos grandes, poco contenido citoplasmático, vacuoladas y dispuestas laxamente. En medio con  $2.5$  y  $5 \text{ mg/L}$  de BA, la caliptra lució comprimida, el cilindro central reducido ( $72.72 \mu\text{m}$ ) y la epidermis no se distinguió muy bien (Figura 4B). Las células de la corteza fueron grandes ( $123.94$  a  $1,900.35 \mu\text{m}^2$ ), alargadas, con núcleos y nucléolos prominentes, y algunas de forma irregular.

Tanto con BA ( $2.5$  y  $5 \text{ mg/L}$ ) como sin BA, el cilindro central integrado por procambium diferenció algunas traqueidas con engrosamiento de tipo anular (Figuras 4B-D). En BA, las traqueidas se observaron muy cercanas al ápice de la raíz, a  $440 \mu\text{m}$  desde la parte distal, proceso asociado al crecimiento lento de este órgano como respuesta al tratamiento. En medio sin BA las traqueidas se ubicaron a  $990 \mu\text{m}$ . La distancia entre el ápice de la raíz y los primeros elementos conductores maduros puede ser variable y depende de la edad de la raíz, la tasa de crecimiento, la especie, la presencia de enfermedades, el tipo de raíz (corta o larga, terminal o lateral), entre otros factores. En general, las raíces de crecimiento lento tienen elementos vasculares maduros más cerca del meristemo apical de la raíz que las de crecimiento rápido (Esau, 1977). Por otra parte, en todas las raíces hubo formación de pelos radicales unicelulares. En medio con BA estos pelos radicales se observaron más próximos al ápice de la raíz ( $181.80 \mu\text{m}$ ) y en medio sin BA se apreciaron a  $888.88 \mu\text{m}$  desde la parte distal.

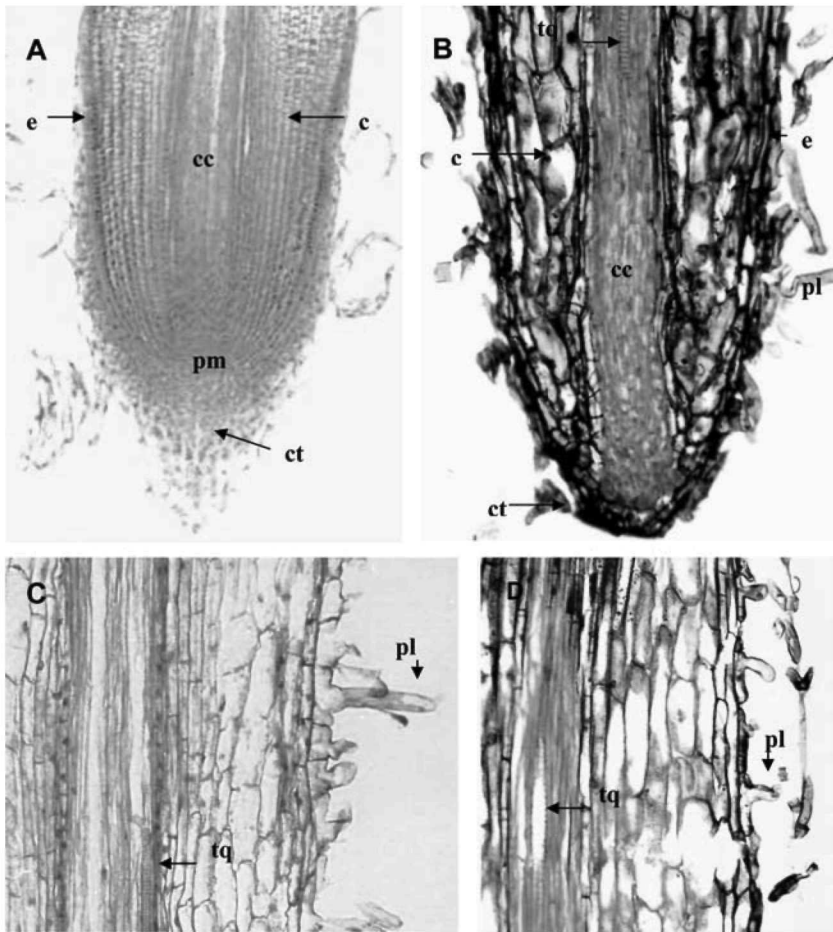


FIGURA 4. Cortes longitudinales de raíces adventicias de plantas de banana Williams al momento de alcanzar 1 a 1.5 cm de largo. A, C) Medio sin benciladenina (BA) a los 14 días de la siembra de los explantes. B, D) Medio con 5 mg/L de BA a los 42 días de cultivo. c, corteza. cc, cilindro central. ct, caliptra. e, epidermis. pl, pelos radicales. pm, promeristemo. tq, traqueidas. A) 100×. B, D) 200×. C) 400×.

Las secciones transversales de raíces de plantas bajo condiciones de umbráculo permitieron apreciar la corteza, la endodermis, la estructura interna del cilindro central y la formación de primordios laterales (Figuras 5A-D). En la endodermis se observaron puntos o bandas de Caspary y algunas células en división. Los elementos de los tejidos vasculares se distribuyeron como grupos de floema alternando con los

polos xilemáticos. El número de polos xilemáticos varió entre 17 y 19 (Figura 5A), valor que fue inferior al de 28 a 34 que se ha señalado para banano (Sandoval y Müller, 1999). Además, el periciclo se observó discontinuo (Figura 5C) interrumpido por primordios de raíces laterales (1 a 3) bien organizados, siendo visible en ellos su procambium y meristema fundamental (Figura 5D). La estimulación del periciclo para entrar en división celular y producir primordios de raíces laterales se vincula a una acumulación natural de auxina y de carbohidratos en algunas de sus partes, y a un incremento de la tasa de respiración (Hartmann y Kester, 2001). Las auxinas elevan el bloqueo G2 de las células del periciclo y emprenden la transición de la fase G2 a la M (Couéé et al., 2004), permitiendo la división celular. La alta tasa de respiración puede deberse a que el movimiento de las auxinas requiere energía metabólica ya que no se produce en ausencia de oxígeno ni en presencia de inhibidores del ATP (Acosta et al., 2000).

En la sección transversal de raíces de medio sin BA (Figura 5E) se identificaron la epidermis, la corteza con la endodermis y el cilindro central con algunos elementos conductores primarios. La mayoría de las células de la corteza presentaron forma redondeada y algunas alargadas (309.79 a 794.82  $\mu\text{m}^2$ ). El cilindro central mostró una estructura en proceso de obliteración con pocos vasos grandes de metaxilema (3 a 4), y con protoxilema y floema poco diferenciados (Figura 5F). Hacia la periferia del cilindro central, cerca del periciclo, se detectaron puntos xilemáticos más angostos constituyendo posiblemente el protoxilema (10 a 11) aunque no se evidenció el engrosamiento de la pared celular.

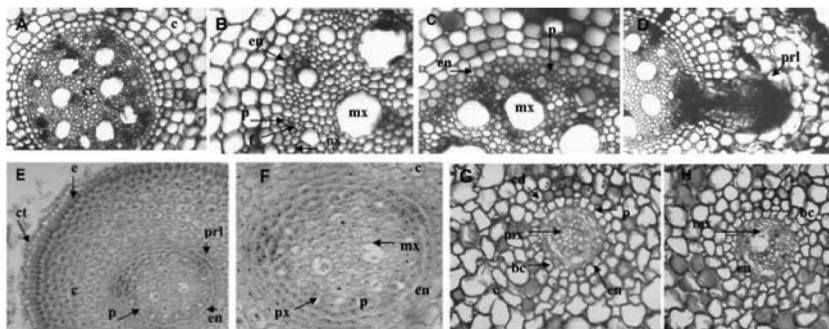


FIGURA 5. Cortes transversales de raíces adventicias de plantas de banano Williams. A-D) Raíz de planta obtenida in vitro con siete meses de establecida en umbráculo. E-G) Raíz al momento de alcanzar de 1 a 1.5 cm de largo en medio de cultivo sin benciladenina (BA) a los 14 días de la siembra de los explantes (E, F) y en medio con 2.5 mg/L de BA a los 42 días de cultivo (G, H). bd, bandas de Caspary. c, corteza. cd, células en división de la endodermis. en, endodermis. f, elementos del floema. mx, metaxilema. p, periciclo. prl, primordio de raíz lateral. px, protoxilema. A, B, E) 200 $\times$ . C, D, F-H) 400 $\times$ .

En el periciclo de las raíces obtenidas en medio sin BA se observaron de uno a dos puntos de iniciación de primordios de raíces laterales entre 350 a 400  $\mu\text{m}$  desde la parte distal de la raíz, lo cual tiene semejanza con lo observado en cebolla (*Allium cepa*) (Pulgarin et al., 1988). Los primordios de raíces laterales en el banano Williams de este estudio consistieron de grupos de células en división (nueve a 10 células), con núcleos y nucléolos prominentes con alto contenido citoplasmático y alta tinción (Figuras 5E-F).

Las raíces en medio con 2.5 y 5 mg/L de BA mostraron una estructura algo distorsionada y no se presentaron inicios de primordios de raíces laterales (Figuras 5G-H) probablemente por la acción inhibitoria de esta citoquinina (Skoog y Miller, 1965). La epidermis no se apreció, el cilindro central estuvo reducido (73.87  $\mu\text{m}$ ) y la endodermis lució gruesa. En la endodermis se detectaron las bandas de Caspary y en ocasiones puntos de Caspary (Figuras 5G-H). En el cilindro central se observó un sólo vaso de metaxilema grande y a su alrededor varias células de paredes gruesas que probablemente sean protoxilema, formando de seis a siete polos xilemáticos. El floema no se distinguió bien (Figuras 5G-H). En la corteza, las células fueron más grandes (774.52 a 1,831.32  $\mu\text{m}^2$ ) y de forma muy irregular, y hubo muchos espacios intercelulares hacia la periferia de la misma. En raíces laterales de *Panax ginseng* se han observado efectos similares en las células de la corteza, más ensanchadas, por la acción del ácido naftalenacético (Kim et al., 2003). Los efectos observados en las raíces del presente estudio tratadas con BA se pueden asociar a un desbalance en la concentración de citoquininas endógenas que afecta la formación y el alargamiento de la raíz (Werner et al., 2001).

**Variaciones en el desarrollo de los explantes.** En función del tiempo de cultivo (Cuadro 2) los explantes aumentaron de altura para el tercer día y mostraron algunas hojas y raíces adventicias al noveno. Para los 12 días de cultivo, las distintas concentraciones de BA reflejaron diferencias significativas en cuanto a altura de la planta (AP) y número de hojas por planta (NH). En este tiempo la no aplicación de BA determinó los valores más altos de AP (1.69 cm), NH (1.56), número de raíces por planta (NR) (1.53) y longitud de la raíz más larga (LR) (2.09 cm). A los 35 días de cultivo se detectaron diferencias significativas en todas las variables morfológicas estudiadas respecto a la concentración de BA (Cuadro 2). La no aplicación de BA arrojó los máximos valores en todas las variables, exceptuando en el número de brotes por explante (NB). La brotación ocurrió sólo en 2.5 y 5 mg/L de BA, concentraciones que resultaron estadísticamente iguales presentándose 2.19 y 1.89 brotes por explante, respectivamente. Durante el período de 42 a 63 días de cultivo con BA el NB presentó incrementos, obteniéndose a los 63



días 3.77 y 4.05 brotes en 2.5 y 5 mg/L de BA, respectivamente, valores que fueron semejantes por lo que deberían considerarse otras concentraciones entre 2.5 y 5 mg/L, o por encima de 5 mg/L, así como otros tipos de citoquininas para aumentar la brotación de los explantes.

La alta respuesta de brotación obtenida con BA entre los 35 y 63 días se relacionó con que los explantes incorporaron rápidamente este regulador del crecimiento que promueve la división celular, la proliferación de yemas y el desarrollo de primordios foliares, entre otros (Skoog y Miller, 1965; Banerjee et al., 1986). El NB obtenido a los 56 días (ocho semanas) con BA es similar a los valores reportados por Hardy et al. (1994), quienes registraron entre tres y cinco brotes por explante a la octava semana de la cuarta multiplicación, pero empleando 5 mg/L de BA. Los autores concluyeron que la concentración anterior fue la más recomendable para la fase de multiplicación de bananos, porque aun cuando no indujo el mayor número de cultivos con brotes fue eficaz para aumentar la brotación. Esto no concuerda con lo observado en esta investigación pues el mayor NB se registró con 2.5 mg/L de BA.

Con respecto al NR y LR, a los 14 días de cultivo las concentraciones de 0 y 2.5 mg/L de BA produjeron 1.87 y 0.11 raíces con longitud de 2.81 y 0.04 cm, respectivamente (Cuadro 2). Para 5 mg/L de BA, las raíces se notaron a los 28 días de cultivo siendo escasas (0.13 raíces), muy cortas (0.02 cm) y en muchos casos se doblaron tomando forma de zig-zag. Además, en la medida en que transcurrió el tiempo de cultivo, muchas de las raíces se hicieron muy gruesas (2 a 2.5 mm) y se tornaron negras. La aplicación de BA en el medio atrasó el tiempo de emergencia de las raíces, disminuyó su cantidad y longitud. La longitud de raíz alcanzada a los 14 días en los explantes cultivados en medio sin BA se logró en las sometidas a BA a los 63 días (Cuadro 2).

La formación de raíces laterales visibles solo se notó en 0 mg/L de BA ocurriendo a partir de los 21 días, momento en el que se registraron 15.24 raíces laterales (Cuadro 2). Estas raíces emergieron a unos 3 a 4 cm desde la parte distal de la raíz, lo cual también fue apreciado en plantas de umbráculo. En las concentraciones de BA no se observaron raíces laterales durante el periodo de estudio. Investigaciones efectuadas en plantas adultas de *Musa* spp. cultivadas en campo señalan que muchas de las raíces laterales de primer orden emergen a unos 12 a 15 cm detrás del ápice de la raíz adventicia (Blomme et al., 2003).

Acosta et al. (2000) indican que la sensibilidad de un tejido u órgano a las hormonas puede variar con la edad y las condiciones ambientales y que entre los que posiblemente desempeñen un papel mayor se encuentran la concentración de los receptores hormonales, la efectividad de la unión receptor-hormona y la cadena de acontecimientos que se

sucedo con posterioridad a dicha unión, de la que depende la respuesta final. Estos investigadores señalan, además, que la respuesta hormonal estaría condicionada únicamente por la sensibilidad, aunque la opinión más extendida es que tanto la variación de la concentración como la sensibilidad frente a la hormona son importantes en la acción hormonal.

### CONCLUSIONES

El ápice del vástago del banano Williams presentó forma de domo con la organización túnica-carpus y una capa de túnica. El diámetro del ápice del vástago fue mayor al cultivarlo en un medio con benciladenina. En la concentración de 2.5 mg/L de benciladenina a los nueve días de cultivo el ápice del vástago mostró una zona transicional parecida al cambium. Esta concentración indujo el mayor número de brotes por explantes a los 35 días de cultivo, lo cual constituye un dato importante para la aplicación de sistemas de propagación comercial de bananos in vitro. Por otro lado, aunque el ápice de la raíz en medio con benciladenina presentó protodermis, meristemo fundamental y caliptra (compri-mida), esta citoquinina disminuyó la cantidad y la longitud de las raíces, atrasó el tiempo de emergencia de la raíz, inhibió la producción de primordios de raíces laterales y produjo distorsión en la morfoanatomía de la raíz.

### LITERATURA CITADA

- Acosta, M., J. Sánchez y M. Bañón, 2000. Auxinas. *En*: pp. 305-323. J. Azcón y M. Bieto (Eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Primera Edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Edicions Universitat de Barcelona.
- Agrocadenas, 2007. Información mundial. Producto bananos. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. <http://www.agrocadenas.gov.co/banano/reportes.htm> (18/10/2007).
- Banerjee, N., D. Vuylsteke y E. De Langhe, 1986. Meristem tip culture of *Musa*; histomorphological studies of shoot bud proliferation. *En*: pp. 139-147. L. Withers y P. Alderson (Eds.). Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworths, London.
- Biju, S., S. Kurien y N. Mohanakumaran, 1997. Cambios en el punto de crecimiento del cultivar "Red Banana" durante diferentes fases fisiológicas. *InfoMusa* 6:19-21.
- Blomme, G., R. Swennen y A. Tenkouano, 2003. Evaluación de la variación genotípica en la arquitectura de las raíces de *Musa* spp. bajo condiciones de campo. *InfoMusa* 12:24-29.
- Caboni, E., D. Angeli, A. Chiappetta, A. Innocenti, H. Van Onckelen y C. Damiano, 2002. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70:199-206.
- Clark, S., 1997. Organ formation at the vegetative shoot meristem. *The Plant Cell* 9:1067-1076.
- Coué, I., I. Hummel, C. Sulmon, G. Gouesbet y A. El Amrani, 2004. Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 76:1-10.

- Crouch, J., H. Vuylsteke y R. Ortiz, 1998. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). International Institute of Tropical Agriculture, Nigeria.
- Esau, K., 1977. Anatomy of seed plants. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 550 pp.
- Fahn, A., 1967. Plant Botany. First English Edition. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford. 534 pp.
- Fahn, A., S. Stoler y T. First, 1963. Vegetative shoot apex in banana and zonal changes as it becomes reproductive. *Botanical Gazette* 124:246-250.
- García, E., C. Giménez, M. Vidal, G. Palacios y O. Haddad, 2001. CIEN-BTA-03: a new somaclonal variant resistant to yellow sigatoka. Biochemical, genetic and molecular characterization and agronomic studies. *InfoMusa* 10:12-13.
- García, L., B. Pérez, Z. Sarría y J. Clavero, 2002. Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20. *InfoMusa* 11:35-38.
- Hardy, I. y E. García, 1994. Micropropagación de bananos (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. *YTON* 55:31-41.
- Hartmann, H. y D. Kester, 2001. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. Octava Reimpresión. Editorial Continental. México. 760 pp.
- Johansen, D., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York and London. 523 pp.
- Kim, Y., E. Hahn, E. Yeung y K. Paek, 2003. Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39:245-249.
- Krikorian, A., H. Irizarry, S. Cronauer y E. Rivera, 1993. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa* AAB) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Ann. Bot.* 71:519-535.
- Lindorf, H., L. Parisca y P. Rodríguez, 1999. Botánica, Clasificación, Estructura y Reproducción. Segunda Edición. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. 584 pp.
- Martin, P. 1975. La planta viviente. Serie Biología Moderna. Stanford University. Primera Edición en español y segunda en inglés. Compañía Editorial Continental, SA (CECSA). Calz. de Tlalpan 4620, México 22, D.F. 272 pp.
- Martínez, G., E. Delgado, R. Pargas, E. Manzanilla y H. Ramírez, 2007. Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial de banano. I: producción, exportación e importación. Revista Digital CENIAP Hoy No. 13. <http://ceniap.gov.ve/pbd/revistastecnica/ceniaphoy/index.htm> (18/10/2007).
- Morel, G. y R. Wetmore, 1951. Tissue culture of monocotyledons. *Amer. J. Bot.* 38:138-140.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Phys. Plant.* 15:473-493.
- Philipson, W., 1954. Organization of the shoot apex in dicotyledons. *Phytomorphology* 4:70-75.
- Pulgarin, A., J. Navascués y P. Casero, 1988. Branching pattern in onion adventitious roots. *Amer. J. Bot.* 75:425-432.
- Raven, P., R. Evert y S. Eichhorn, 2005. Biology of plant. Seventh edition. W.H. Freeman and Company Publishers, New York. 686 pp.
- Riopel, J. y J. Steeves, 1964. Studies on the roots of *Musa acuminata* cv 'Gros Michel'. 1. The anatomy and development of main roots. *Ann. Bot.* 28:475-490.
- Roels, S., M. Escalona, I. Cejas, C. Noceda, R. Rodríguez, M. Canal, J. Sandoval y P. Debergh, 2005. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82:57-66.

- Sandoval, J. y L. Müller. 1999. Anatomy and morphology of the banana plant (*Musa* AAA). *CORBANA* 24:43-60.
- SAS Institute, Inc., 1989. SAS (Statistical Analysis System) Institute, Inc., Cary, NC.
- Segura, J., 2000. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. *En*: pp. 305-323. J. Azcón y M. Bieto (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. Primera Edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Edicions Universitat de Barcelona.
- Simmonds, N., 1962. The evolution of the bananas. Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York. 170 pp.
- Skoog, F. y C. Millar, 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *En*: pp. 481-494. Molecular and cellular aspects of development. E. Bell (Ed.) Harper and Row, New York.
- Trujillo, I. y E. García, 1996. Strategies for obtaining somaclonal variants resistant to yellow sigatoka (*Mycosphaerella musicola*). *InfoMusa* 5:12-13.
- Werner, T., V. Motyka, M. Strnad y T. Schmülling, 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10487-10492.