

# SISTEMAS 'in vitro', UN COMPLEMENTO EN EL MEJORAMIENTO DE LAS MUSACEAS

por

Margarita Perea-Dallos\*

## Resumen

Perea-Dallos, M.: Sistemas 'in vitro' un complemento en el Mejoramiento de las Musaceas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 19 (70): 323-332, 1992. ISSN 0370-3908.

La mayoría de los clones comestibles de plátanos y bananos son triploides, ordinariamente partenocárpicos y efectivamente de semillas estériles, lo cual hace que los programas de mejoramiento convencionales no sean aplicables de manera rápida y eficaz. Una alternativa viable para mejorar estos cultivares consiste en la utilización de sistemas 'in vitro' como complemento para la propagación clonal y el mejoramiento genético a través del empleo de mutaciones, el cultivo de células y protoplastos y su posterior regeneración en plantas, seguida de evaluación y selección en campo.

## Abstract

Most of the edible bananas and plantains are triploids, parthenocarpic with sterile seeds. The genetic system of *Musa* is extremely complicated. Sterility caused by different factors are common in most of the clones. The complexity of these crops, needs a more sophisticated system to support conventional Breeding Programmes. The potential of mass propagation, mutations, cells, protoplasts for plant regeneration and plant selection it is very high.

## Introducción

El desarrollo de la agricultura a través de los años, responde al hallazgo del mejoramiento de la calidad y aumento de la producción de los cultivos de interés para el bienestar de la humanidad. La evolución de las plantas ha permitido el mejoramiento de variedades más productivas en cultivos de importancia para la producción de alimentos.

Después de la Segunda Guerra Mundial, observamos con especial interés los avances en el desarrollo de las Ciencias Básicas que aplicados al sector

agrícola han generado un gran impacto en el establecimiento de tecnologías apropiadas hacia una Agricultura Moderna.

Los esfuerzos obtenidos durante la época de la llamada 'Revolución Verde', proyectaron a la agricultura hacia la orientación de modernas metodologías para lograr una mayor y mejor producción agrícola mediante la obtención de nuevas variedades.

Resulta interesante hablar en la actualidad de una 'Nueva Revolución Verde' que proyecta en el futuro crear y cultivar 'nuevas plantas'. La obtención de estos clones excluye los sistemas de hibridación y de polinización cruzada. En efecto, las nuevas metodologías están orientadas al cultivo de

\* Profesor Asociado, Departamento de Biología Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Apartado 23227 Santafé de Bogotá, D.C., Colombia..

células, protoplastos y tejidos, además de las técnicas de recombinación genética para conseguir una gran diversidad biológica a partir de los mecanismos moleculares y celulares. (Sasson, 1984).

Es importante resaltar que los beneficios potenciales de la Biotecnología permiten solucionar problemas que afectan los cultivos (calidad, patógenos, estrés) importantes como renglón de exportación, como es el caso de los plátanos y bananos.

Colombia, al igual que otros países de América Latina, ha logrado incrementar la producción de la fruta para satisfacer la demanda del consumo nacional y ubicarse como tercer país exportador a nivel mundial.

### Plátanos y bananos

Los plátanos y bananos pertenecen al género *Musa* propio de las regiones tropicales y subtropicales, y con mayor representación de importancia dentro de la familia de las Musaceae, comprendida en el gran grupo de las Monocotiledóneas. El género *Musa*, se ha destacado por su importancia en la alimentación humana y constituye uno de los productos de exportación más importantes para la economía nacional.

Las especies más importante de este género son *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, por cuanto han contribuido por diversos procesos genéticos a la aparición de los plátanos y bananos comestibles, estudios esclarecidos por S. Kurz en 1865. El origen de tales cultivares se remonta a las especies silvestres diploides. Simmonds y Shepherd (1955) puntualizaron estas posiciones por medio de estudios taxonómicos de manera que la ploidía y composición genómica de la gran variedad de clones son designados para *Musa acuminata* como 'genoma A' y para *Musa balbisiana* como 'genoma B', dando origen a clones diploides, triploides y tetraploides.

Los bananos utilizados como fruta (Dessert bananas) presentan dominancia *acuminata* (AAA) y tienen muy bajo contenido de almidón y mayor contenido de azúcares. Los plátanos de cocción (Cooking bananas) de dominancia *balbisiana* (ABB) tienen alto contenido de almidones y bajo contenido de azúcares (Champion, 1963).

Las especies comestibles del género *Musa* son partenocárpicas y efectivamente de semillas estériles, por lo tanto su propagación es asexual. La baja variación genética debida a la condición partenocárpica dificulta el mejoramiento por las vías convencionales. En este sentido, la utilización de los sistemas *in vitro* permite la búsqueda de material resistente a las enfermedades que atacan al plátano y al banano, puesto que la mayoría de los clones comestibles son susceptibles a patógenos, tales como hongos, bacterias, virus y nemátodos, los cuales causan serias pérdidas en la producción (Rowe, 1964).

Estos cultivares presentan un amplio rango de enfermedades, entre ellas la Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (Stover, 1977), detectada en la zona de Urabá a finales de 1991; la Sigatoka Amarilla, causada por el hongo *Mycosphaerella musicola*, el Mal de Panamá debido al hongo *Fusarium oxysporum* L. ssp. *cubense* que devastó en 1926 los cultivos de Gros Michel en América Central, y el Moko, enfermedad bacterial causada por *Pseudomonas solanacearum*.

Algunos patógenos sistémicos afectan al género *Musa*; por consiguiente se hace necesario un estricto control sanitario para evitar la diseminación del material infectado por virus. En Colombia se ha detectado el Virus del Mosaico del Cocombro (CMV). El Viroide del Bunchy Top (BBTV), no presente en América, se considera de repercusiones catastróficas si llegase a introducirse, tal como ha sucedido en algunos países de Asia y Africa. El Virus del Mosaico del Abaca esta igualmente restringido para los continentes asiático y africano. (Drew, et al, 1989).

La mayor parte de los esfuerzos en las investigaciones para el mejoramiento en plátanos y bananos se han dirigido a mejorar la calidad de la fruta, a la búsqueda de plantas de bajo porte con el propósito de combatir el volcamiento y a la obtención de clones resistentes a enfermedades fungosas (Rowe, 1984).

### Sistemas 'in vitro' en Musaceas

La regeneración de los vegetales a través de los sistemas 'in vitro' puede ocurrir como una continuación del crecimiento y desarrollo de estructuras organizadas separadas de la planta (explante), tal como ocurre en el caso de los meristemos apicales y laterales, o puede ser el resultado de un proceso de formación de 'novo' a partir de células o grupos de células (callos) donde no existía organización alguna. Estas células pueden derivarse de órganos vegetativos somáticos o de estructuras sexuales y genéticas de la planta (Krikorian, 1982).

La selección del explante y las manipulaciones orientadas al desarrollo celular o tisular en condiciones 'in vitro' (asepsia, medios de cultivo, fotoperíodo, temperatura, etc.) permite la formación de estructuras o regeneración de plantas.

Las metodologías 'in vitro' en plátanos y bananos han sido estudiados extensamente en los últimos años (Krikorian y Cronauer, 1984).

### Cultivo de Meristemos

El primer caso de regeneración de plantas a partir de brotes meristemáticos de banano se refiere a los trabajos de Ma y Shii (1972, 1974). Posteriormente Berg y Bustamante (1974) demostraron que podían obtenerse plantas libres del CMV mediante el cultivo de meristemos y tratamientos por termoterapia.

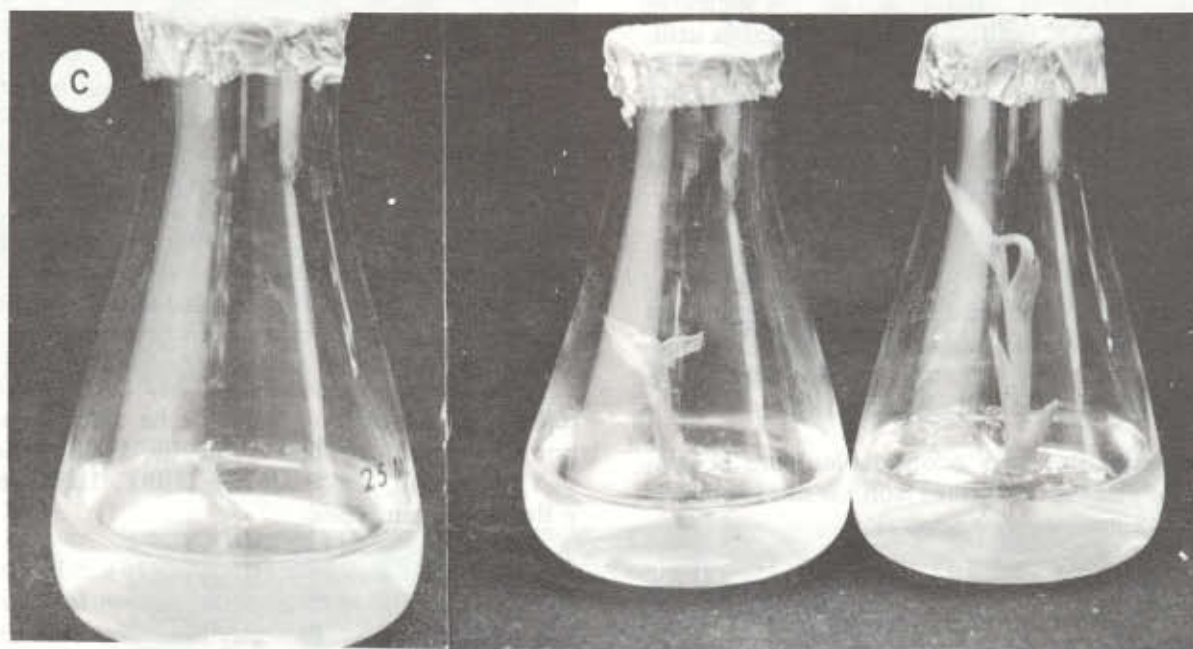
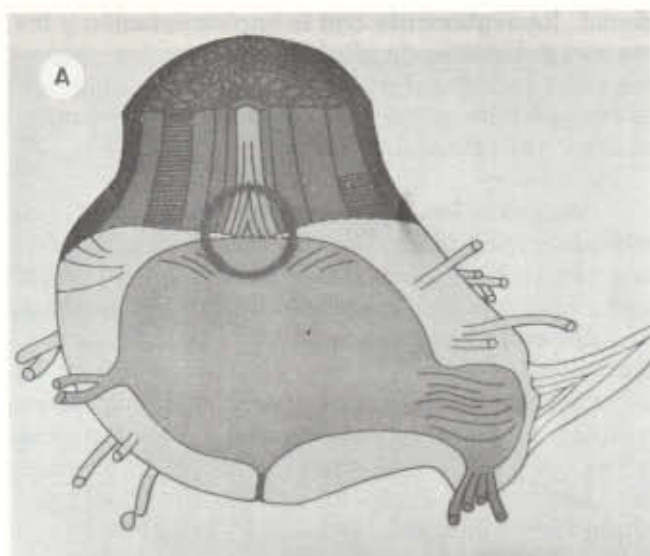


Figura 1. Diferentes etapas en el proceso de regeneración de plantas 'in vitro' (plátanos y bananos). A. *Musa* sp, localización del meristemo. B. Aislamiento del meristemo en condiciones asépticas. C. Desarrollo y regeneración de plántulas en condiciones 'in vitro'. D. Evaluación en campo del material obtenido 'in vitro'.

Actualmente se dispone de varias metodologías establecidas para el cultivo y la micropropagación de brotes meristemáticos de distintos genotipos de *Musa* (De Guzmán et al, 1976; Vessey y Rivera, 1981; Sore Swamy et al, 1983; Cronauer y Krikorian, 1984 a, b; Damasco y Barba, 1984; Hwang et al, 1984; Banerjee y De Langhe, 1985; Vuylsteke y De Langhe, 1985; Jarret et al, 1985; Novak et al, 1986; Wong, 1986; Gupta, 1986).

En condiciones *in vitro*, el meristemo floral puede transformarse en un sistema multiplicador de brotes vegetativos adecuado para la micropropagación (Cronauer y Krikorian, 1985 a, b; Bakry et al, 1985).

El cultivo de meristemas ofrece la posibilidad de eliminar patógenos vasculares y sistémicos como los virus, viroides y micoplasmas de especies propagadas vegetativamente. Sin embargo, los recientes estudios de Drew y Smith (1991) en Australia utilizando el cultivo de meristemas de plantas de banano (Grand nain) infectadas con el virus del Bunchy Top, demostraron que las plántulas regeneradas presentaban los síntomas virales a pesar de haberlas tratado previamente por termoterapia.

### Propagación clonal

La propagación clonal implica la reproducción de plántulas en condiciones asépticas y cuyas características fenotípicas y genotípicas son idénticas a las de la planta original. (Krikorian, 1982).

Los explantes más aconsejables para la producción de plantas uniformes son los meristemas y las yemas axilares y caulinares.

El desarrollo de los sistemas de propagación vegetativa ha tomado enorme importancia en algunos cultivos de interés en la economía colombiana, como es el caso de las flores, algunos frutales, tuberosas y específicamente los plátanos y bananos.

Los primeros trabajos sobre la propagación masiva de plátanos y bananos en Colombia, se iniciaron en 1982 en la Universidad Nacional — Santa-fé de Bogotá, con la Asesoría Científica del Profesor Abraham Krikorian de la Universidad de Nueva York-Stony Brook, quien continua con su permanente colaboración.

Recientemente, la industria bananera ha tenido un aumento significativo en la producción de la fruta, para lo cual se han establecido alrededor de 25.000 a 30.000 hectáreas de banano con material producido por cultivo de meristemas, traídos en su mayoría de Israel. Actualmente, los laboratorios privados del país ofrecen al sector bananero plántulas de banano Grand nain de excelente calidad.

### Potencial en el mejoramiento de plátanos y bananos

La variabilidad genética constituye una alternativa muy importante en el mejoramiento tradi-

cional. Recientemente con la implementación y los avances del cultivo de células, se pueden lograr nuevas variantes naturales a partir de tejidos somáticos, lo cual permite el hallazgo de mutaciones espontáneas en corto tiempo.

Merced a los adelantos obtenidos en los últimos años, las investigaciones en plátanos y bananos se orientan hacia el mejoramiento genético y es así como los grupos de investigadores a nivel mundial, realizan esfuerzos orientados hacia la inducción de mutaciones, embriogénesis somática, cultivo de anteras para la regeneración de plantas haploides, cultivos de células y protoplastos e Ingeniería Genética.

### Mutagenesis 'in vitro'

Las mutaciones inducidas han constituido en los últimos años una valiosa contribución para los fitomejoradores. El potencial de ampliar la variabilidad genética de las poblaciones vegetales aumenta la posibilidad de realizar selección con mayor eficiencia en busca de solucionar algunos problemas en cultivares de interés agroeconómico, (Perea y Navarro, 1988).

La incidencia de variación producida es aún impredecible y depende del genotipo, de los agentes mutagénicos y de los reguladores de crecimiento que se utilicen en los cultivos asépticos.

La inducción de mutaciones para el mejoramiento de plátanos y bananos ha sido propuesta por Champion, 1963; De Langhe, 1969; Broertjes y Van Harten, 1978; Rowe, 1981, 1984; Stover y Buddenhagen, 1986.

Broertjes y Van Harten, (1978), reiteran que los tratamientos mutagénicos ofrecen la oportunidad de obtener cambios genéticos discretos sin que se produzca una grave destrucción del genotipo original.

El cultivo de brotes meristemáticos ha sido propuesto como sistema adecuado para la inducción de mutaciones en plátanos y bananos (Donini y Micke, 1984; Novak et al, 1985, 1987). De Guzmán y colaboradores, (1975, 1980, 1982) lograron el desarrollo de brotes de banano utilizando radiaciones Gamma con dosis de 25 Gy. Epp, (1987) publicó los resultados de las irradiaciones Gamma utilizando meristemas derivados del cultivar "Umalag" que es de tipo Cavendish Grand nain, cultivado extensamente en Filipinas. Yang y Lee, (1981) lograron igualmente inducir mutantes de banano 'Pei-Chiao' y 'Hsien-Jen-Chia' sumergiendo las plántulas obtenidas "In vitro" en una solución del 0.1 al 1.0% de Etil-metano-sulfonato (EMS), sin mencionar el grado de quimerismo ocurrido en plantas totalmente irradiadas.

### Variación somacional somaclonal

Las modificaciones de las plantas generadas a partir de células y tejidos obtenidas 'in vitro', cons-

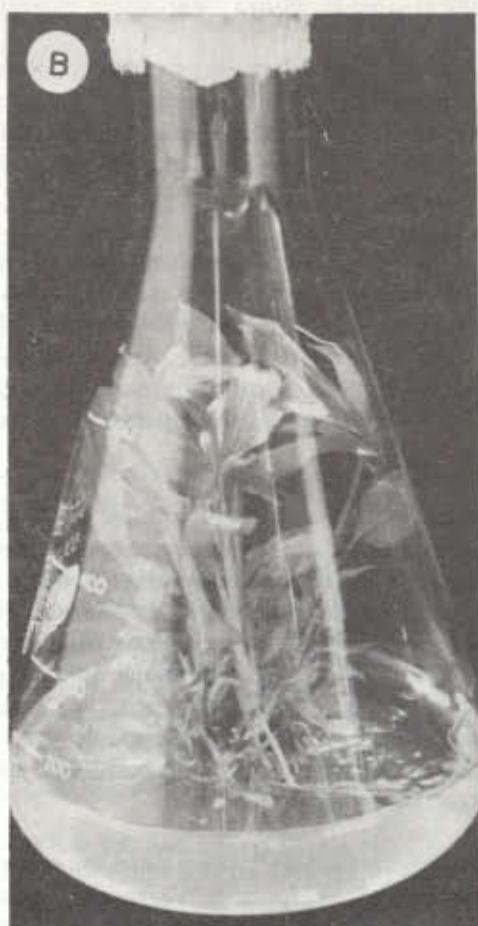
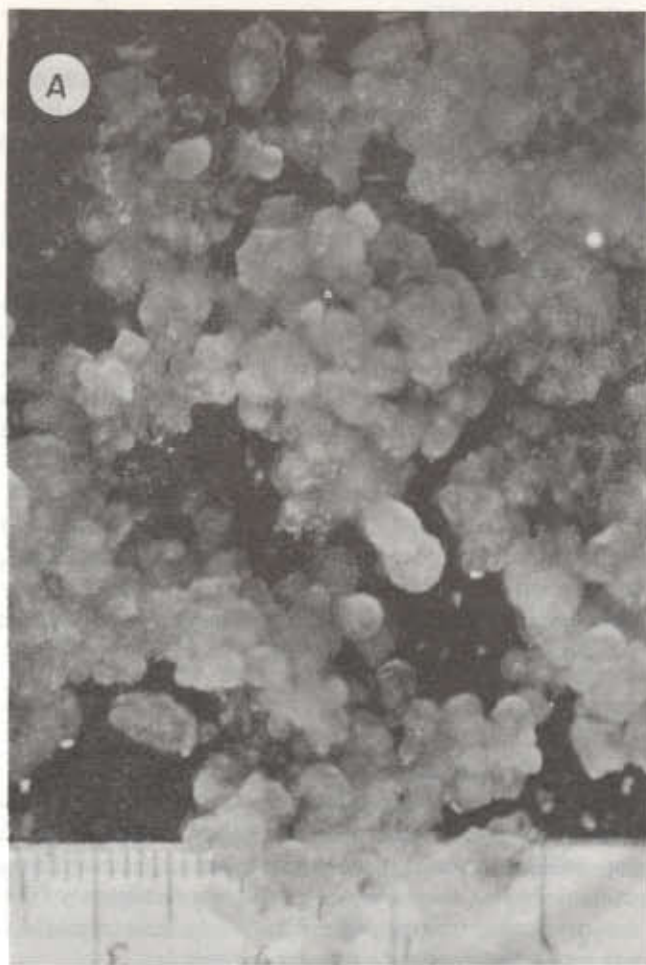


Figura 2. Embriogénesis somática. A. Estructuras globulares que originan la embriogénesis somática, B. Regeneración de plantas, C. Transferencia a campo.

tituye un fenómeno de interés en el mejoramiento genético conocido como 'Variación Somaclonal'.

Los estudios realizados por Larkin y Scowcroft (1981) demostraron que la presencia de cambios epigenéticos (Variación temporal) o variaciones genéticas (cambios heredables) se presentan de manera espontánea.

La mayoría de las investigaciones sobre Variación Somaclonal, han hecho evidente que las causas que generan estos cambios pueden estar influenciadas por el genotipo de la planta, cambios fisiológicos 'in vitro', presencia de citoquininas y/o auxinas en el medio de cultivo utilizado y frecuencia de subcultivos.

Resulta interesante mencionar el caso de la caña de azúcar como ejemplo representativo de variación somaclonal. Krishnamurthi (1981) al evaluar en condiciones de campo, las plantas derivadas de callo, observó que presentaban resistencia a la enfermedad de Fiji. Recientemente se han reportado algunos casos de variación fenotípica a través de la propagación clonal en *Musa* spp., lo cual constituye una alternativa en el mejoramiento genético de plátanos y bananos.

Vuylsteke (1989), utiliza para *Musa* los términos 'Variación fenotípica' y 'Variación somaclonal' para describir la variabilidad inducida 'in vitro', considerando un posible origen genético. El enanismo es la mayor característica en los bananos (*Musa* AAA) cv. Grand Nain; en menor proporción se presentan las hojas angostas y distorsionadas, los racimos con dedos anormales y el pseudotallo rojo. (Hwang, 1986; Reuveni et al, 1985; Stover, 1987; Pool e Irizarry, 1987). Stover, (1987) encontró variación en los plátanos (*Musa* ABB o BBB); sin embargo, Ramcharan et al, (1985) y Vuylsteke et al (1988), encontraron en los plátanos tipo Hartón (*Musa* AAB), que la variación se presenta en la inflorescencia en forma de reversión al tipo 'French plantain'.

### Embriogénesis somática

Los embriones somáticos son estructuras bipolares, muy similares a los embriones zigóticos, capaces de desarrollar plantas normales. A través de los años, ha sido posible la obtención de embriones somáticos hasta el desarrollo de plantas completas de un gran número de especies, con el propósito de ser aplicados como métodos de propagación vegetativa.

En Musáceas, se ha logrado la formación de embriones somáticos en algunos clones diploides y triploides. Si la regeneración de plantas obtenidas mediante la embriogénesis somática tiene su origen a partir de una célula, se resuelve el principal problema de la mutagénesis al producir plantas sólidas (Novak, 1987, 1988 b). De Langhe considera, que la embriogénesis somática podría ser en un futuro

la clave para el mejoramiento genético en plátanos y bananos (1986).

Cronauer y Krikorian, (1988) lograron la embriogénesis somática en *Musa ornata*. De igual manera Novak y colaboradores, (1989) obtuvieron el desarrollo sincrónico de embriones somáticos a partir de segmentos de hoja y rizoma en clones diploides y triploides y la regeneración de plantas. De otra parte, Escalant y Teisson (1988, 1989) lograron la obtención de la embriogénesis somática a partir de embriones zigóticos inmaduros en diploides. Recientemente, Harran y Rossignol (1991), lograron la formación de embriones somáticos y la regeneración de plantas a partir de inflorescencias en Grand nain (AAA).

La producción masiva de embriones somáticos y su capacidad para germinar y desarrollar plantas, genera un verdadero potencial de alta significancia para cruces naturales y abre nuevas expectativas para manipulaciones genéticas.

### Cultivo de anteras

El potencial para la obtención de plantas haploides mediante el cultivo de anteras, radica en la conformación genética de las células de polen para ser utilizado como material homocigótico. Estas metodologías constituyen para los genetistas y fitomejoradores, una de las aplicaciones más importantes en el desarrollo de nuevas variedades.

El desarrollo celular y el éxito en los cultivos de anteras depende primordialmente del estado fisiológico de la planta madre y de las condiciones ambientales de fotoperíodo, intensidad lumínica, temperatura y nutrición. El estado de desarrollo del polen en el momento de la transferencia es crítico para la inducción de la androgénesis.

El trabajo de Bakry, (1991) en bananos, ha demostrado la multiplicación celular y regeneración de plantas, sin hacer evidente su ploidía.

Actualmente nuestro laboratorio realiza estudios básicos relacionados con inflorescencias (*Musa* AA y BB), anteras, granos de polen y desarrollo celular. Para el desarrollo de esta metodología se requiere el estudio del genotipo, entender la complejidad de la inflorescencia, establecer el estado apropiado del grano de polen y la obtención del medio de cultivo. Los logros de estas investigaciones permitirán avances considerables en el mejoramiento de las Musáceas.

### Protoplastos

Los protoplastos ofrecen el mayor potencial para la regeneración de plantas de genotipos específicos. Cocking (1960), logró eliminar la pared celular en los vegetales y obtener protoplastos mediante la acción enzimática; luego se logró la fusión de protoplastos de maíz y avena (Power y Cocking, 1971); estas metodologías se están desarrollando y

evaluando en gran número de especies y desde entonces se han obtenido resultados significativos en unas pocas. De hecho, la fusión de protoplastos de plantas de diferentes especies, permite la producción de los híbridos somáticos cuya constitución genética difiere de los híbridos que los originaron.

Actualmente los protoplastos son utilizados para transformación genética incorporando en ellos determinada estructura o gen foráneo y lograr su expresión como una característica nueva y estable.

El aislamiento de protoplastos en algunos clones de *Musa* spp. ha sido exitoso (Krikorian 1988, Novak et al. 1990, Rossignol 1991). Estos esfuerzos ponen de presente la aplicación de estas metodologías en el mejoramiento de plátanos y bananos.

### Ingeniería genética

La utilización de la Ingeniería genética o tecnología de ADN recombinante, al igual que la Biología Molecular, se han incrementado para la modificación de caracteres específicos. Estos sistemas presentan un gran potencial en el mejoramiento genético en plantas de interés agronómico. La introducción de genes o moléculas o células y/o protoplastos y la posterior regeneración de la planta, permiten modificar el genoma y generar resistencia en los vegetales ya sea a patógenos, a insectos, o a condiciones ambientales adversas.

El sistema más estudiado ha sido la utilización del *Agrobacterium tumefaciens*, la bacteria que produce tumores en los vegetales. Estos tumores contienen una masa de células que proliferan con rapidez, puesto que no obedecen a los mecanismos normales de control de crecimiento del tumor, y en este sentido su comportamiento es análogo a los tumores animales, (Perea, 1989). El *Agrobacterium tumefaciens*, presenta en el interior de la célula un pequeñísimo fragmento circular de ADN, denominado Plásmido Inductor de Tumor (Plásmido Ti).

El otro sistema utilizado es la transferencia directa, la cual se basa en la inserción directa de genes foráneos, empleando la microinyección o bombardeo de partículas de oro con moléculas de ADN exógenas hacia las células, (Klein, 1990). La aplicación de estos sistemas ha hecho posible la transformación de los protoplastos y la regeneración de plantas en algunas especies cultivables.

### Bibliografía

- Bakry, F., F. Laverde-Guignard, L. Rossignol & Y. Demarly, 1985. Developpement de pousses végétatives à partir de la culture *in vitro* d'explants inflorescentiels de bananiers (*Musa* sp., Musacées). *Fruits*, 40: 459-465.
- Bakry, F. 1992. First evidence for androgenesis in bananas (*Musa acuminata* Colla). In: *Biotechnology for Bananas and Plantain INIBAP Workshop - San José - Costa Rica*, 27-31 January 1992. (In press).
- Banerjee, N. & E. de Langhe, 1985: A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant cell Rep.* 4: 351-354.
- Berg, L.A. & M. Bustamante, 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus free bananas. *Phytopathol.* 64: 320-322.
- Broertjes, C. & A.M. Van Harten. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops. Elsevier Sci. Publis. Comp. Amsterdam.
- Champion, J. 1963. *Le bananier*. G.P. Maisonneuve et Larose. Paris-France.
- Cocking, E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-963.
- Cronauer, S.S., & A.D. Krikorian, 1985 a. Reinitiation of vegetative growth from aseptically cultured terminal floral apex of banana. *Amer. J. Bot.* 72: 1598-1601.
- . 1985 b. Aseptic multiplication of banana from excised floral apices. *Hort. Science* 20: 770-771.
- . 1988. Temporal, spatial and morphological aspects of multiplication in aseptically cultured *Musa* clones, In: *Progress and prospects in forest and crop biotechnology*. (Valentine, F. Ed.) Colloquium, April 18-20, 1985. State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, New York, Springer Verlag.
- Damasco, O.P. & R.C. Barba, 1984. *In vitro* culture of Saba (*Musa* sp. cv. Saba BBB). *Phil. Agric.*, 67: 351-358.
- De Guzmán, E.V. 1975. Project on production of mutants by irradiation of *in vitro* cultured tissue of coconut and bananas and their mass propagation by the tissue culture technique. In: *Improvement of Vegetatively Propagated Plants through Induced Mutations*. IAEA-TECDOC. 173: 53-76.
- De Guzmán, E.V., E.M. Ubalde, & A.G. del Rosario. 1976. Banana and coconut *in vitro* cultures for induced mutations studies. In: *Improvement of Vegetatively Propagated Plants and Tree Crops through Induced Mutations*. IAEA-TECDOC-194, Vienna: 33-54.
- De Guzmán, E.V., A.C. Decena, & E.M. Ubalde, 1980. Plantlet regeneration from unirradiated and irradiated banana shoot tip tissues cultured *in vitro*. *Philipp. Agric.* 63: 140-146.
- De Guzmán, E.V., A.G. del Rosario, & P.C. Pagcaliwagan, 1982. Production of mutants by irradiation of *in vitro*-cultured tissues of coconut and banana and their mass propagation by the tissue culture technique. In: *Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants II*, IAEA, Vienna: 113-138.
- De Langhe, E. 1969. Bananas. In: F.P. Ferwerda & F. Wit (Eds); *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Misc. Pap. Landbouwhogeschool. Veenman. Wageningen: 53-78.
- . 1986. Una estrategia internacional es necesaria para el mejoramiento genético del plátano y babano. *Ciencia y Tecnología*, No. 70: 40-46. Informe mensual. Unión de países Exportadores de Banano - UPEB - Panamá.
- Domini, B., & A. Micke, 1984. Use of induced mutations in improvement of vegetatively propagated crops. In: *Induced Mutations for Crop Improvement in Latin America*. IAEA-TECDOC-305, Vienna: 79.
- Dore Swamy, R., N.K. Srinivasa & E.K. Chacko, 1983. Tissue culture propagation of banana. *Sci. Hort.*, 18: 247-252.
- Drew, R.A., J.A. Moisaner & M.K. Smith. 1989. The transmission of banana bunchy-top virus in micropropagated bananas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 187-193.

- Epp, M.D. 1987. Somaclonal variation in bananas: a case study with *Fusarium* wilt. In, Persley G.J. & E.A. De Langhe (Eds.). Banana and Plantain Breeding Strategies. Proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 Oct., 1986. ACIAR Proceedings No. 21: 140-150. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Escalant J.V. & C. Teisson, 1988. Embryogénese somatique chez *Musa* sp. C.R. Acad. Sc. Paris, T. 306, Serie III: 277-281.
- 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla. Plant Cell Reports 7: 665-668.
- Gupta, P.P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 6: 33-39.
- Harran, S., G. Ducreux & L. Rossign, 1991. Etude de cal infloresciels de deux cultivars de bananiers (901 et GN) et des plantes qui en sont issues. Université de Paris 130 pp.
- Hwang, S.C., C.L. Chen, J.C. & H.L. Lin, 1984. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. Hort Sci., 19: 231-233.
- Jarret, R.L., W. Rodríguez, & R. Fernández, 1985. Evaluations, tissue culture propagation, and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. Sci. Hort., 25: 137-147.
- Klein, T.M., S.A. Goff, B.A. Roth, & M.E. Fromm, Applications of the particle gum in plant biology -1990-. In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology: 57-66 H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas & J. Van Aartrijk (Eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht-Holland.
- Krikorian, A.D. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biol. Rev. 57: 151-218.
- Krikorian, A.D. & S.S. Cronauer, 1984 a. Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement. Econ. Bot. 38: 322-331.
- . Banana. In, Sharp, W.R., D.A. Evans, P.A. Ammirato & Y. Yamada, (Eds.). Handbook of Plant Cell Culture, 2: 327-348. Macmillan, New York.
- Krikorian, A.D., S.S. Cronauer-Mitra, & M.S.F. Fitter Corbin, 1988. Protoplast culture of perennials. Scientia Hort. 37: 277-293.
- Krishnamurthi, M. 1981. Sugarcane improvement through tissue culture and review of progress. In: Rao, A.N. (Ed.) Tissue Culture of economically important plants. Asian Network for Biological Sciences and Committee on Science and Technology in developing countries (COSTED) Singapur 70-77.
- Larkin, P.J. & E.R. Scowcroft, 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
- Ma, S.S. & C.T. Shii, 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. J. Chin. Soc. Hort. Sci., 18: 135-142 (Chinese with English summary).
- . 1974. Growing banana plantlets from adventitious buds. J. Chin. Soc. Hort. Sci. 20: 6-12 (Chinese with English summary).
- Novak, F.J., B. Donini, T. Hermelin, & A. Micke, 1985: Potential of banana and plantain improvement through *in vitro* mutation breeding (abstract). In: Resúmenes VII. Reunion A.C.O.R. B.A.T., San José, Costa Rica, 1985, p. 75.
- Novak, F.J., R. Afza, V. Phadivibulya, T. Hermelin, H. Brunner, & B. Donini, 1986. Micropropagation and radiation sensitivity in shoot-tip cultures of banana and plantain. In, Nuclear Techniques and *In Vitro* Culture for Plant Improvement: 167-174. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Novak, F.J., R. Afza, A. Micke, & T. Hermelin, 1987: *In vitro* mutation induction in meristem-tip culture of banana and plantain. In: Proceedings of 2nd Annual Conference of Intern. Plant Biotech. Network (IPBNet), Bangkok, Thailand, Abstr. No. 36.
- Novak, F.J. & A. Micke, 1988. Mutation breeding and 'in vitro' techniques for Crop Improvement in developing countries. In: Gene Manipulation for Plant Improvement in Developing countries. Kuala Lumpur, SABRAO Proceedings. 63-83.
- Novak, F.J., R. Afza, M. van Duren, M. Perca-Dallos, B.V. Conger & X. Tang, 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking bananas (ABB) *Musa* spp. Biotechnology 7: 154-159.
- Novak, F.J. 1991. *In vitro* mutation system for crop improvement. In: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement, IAEA, Vienna 2: 327-342.
- Perca-Dallos, M. & W. Navarro-Alvarez, 1988. Técnicas 'in vitro' para la producción y mejoramiento de plantas. Universidad Nacional de Costa Rica - Conicit, Costa Rica, 105 pp.
- Perca-Dallos, M. 1989. La Nueva Revolución Verde. Revista Universidad Nacional de Colombia. 19: 78-83 Bogotá, Colombia.
- Pool, D.J. & H. Irizarry, 1987. Off type banana plants observed in a commercial planting of 'Grand Nain', propagated using the *in vitro* culture technique. In, Galindo, J.J. & R. Jaramillo, (Eds.). Proceedings of the 7th ACORBAT meeting held at San José Costa Rica, 23-27 Sept., 1985. CATIE Technical Bull. 121: 99-102.
- Power, J.B. & E.C. Cocking. 1971 Fusion of isolated plant protoplasts. Nature 225: 1016.
- Rauveni, O., Y. Israeli, H. Degani, & Y. Eshdat, 1985. Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. Research Report AGPC: IBPGR/85/216. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Rowe, P. 1981. Breeding and "intractable" crop: bananas. In: Rachic, K.O. & J.M. Lyman (Eds): Genetic Engineering for Crop Improvement. The Rockefeller Foundation: 66-83.
- 1984. Breeding bananas and plantains. Plant Breeding Reviews 2: 135-155.
- Sasson, A. 1984. Las Biotecnologías: Desafíos y Promesas - Unesco. Paris, Francia.
- Simmonds, N.W. & K. Shepherd, 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. J. Linn. Soc., Bot. 55: 302-312.
- Stover, R.H. 1977. Banana (*Musa* spp.). In, Hewitt, W.B. & L. Chiarappa, (Eds.). Plant Health and Quarantine International Transfer of Genetic Resources: 71-79. CRC Press, Boca Raton.
- Stover, R.H. 1987. Somaclonal variation in Grand Naine and Saba bananas in the nursery and field. In, Persley, G.J., & E.A. De Langhe, (Eds.). Banana and Plantain Breeding Strategies: Proceeding of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 Oct., 1986. ACIAR Proceedings 21: 136-139. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Stover, R.H. & I.W. Buddenhagen, 1986. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. Fruits, 41: 175-191.

- Vessey, J.C. & J.A. Rivera, 1981. Meristem culture of bananas. *Turrialba* 31: 161-163.
- Vuylsteke, D. & E.A. De Langhe, 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Trop. Agric. (Trinidad)*, 62 (4): 323-328.
- Vuylsteke, D., R. Swennen, G.F. Wilson, & E.A. De Langhe, 1988. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa sp. cv. AAB*). *Sci. Hortic.* 36: 70-88.
- Vuylsteke, D.R. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* Germplasm. International Board for Plant Genetic Resources. 56 pp. IBPGR—Roma.
- Wong, W.C. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa spp.*): Initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 6: 159-166.
- Yang, S., & S. Lee, 1981. Mutagenic effects of chemical mutagens in banana. *J. Agric. Assoc. China, New Ser.* 116: 36-47 (in Chinese with English summary).