
EMPLEO DE LAS RADIACIONES GAMMA EN LA INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN *HELICONIA PSITTACORUM*

USE OF THE GAMMA RADIATION IN THE INDUCTION OF GENETIC VARIABILITY AT *HELICONIA PSITTACORUM*

Aura Inés Urrea¹, Sandra Milena Ceballos²

Resumen

El propósito de este trabajo fue estandarizar una metodología de formación de callos embriogénicos e inducción de mutaciones y la regeneración de somaclones a partir de poblaciones de callos irradiados de *Heliconia psittacorum*. En esta especie ornamental, de los dos tipos de explantes evaluados, las yemas de inflorescencias no respondieron positivamente a la inducción de embriones, en las bases de hojas por el contrario, se logró la formación de callo embriogénico, en cantidad y apariencia similar en los tres medios de cultivo evaluados. Para la etapa de multiplicación, se encontró que en el medio basal MS suplementado con biotina y 2,4-D, se alcanzó una consistencia más friable de los callos y estados proembrionarios bien definidos. La regeneración de embriones alcanzó mejor respuesta (60-70%) en el medio MS suplementado con aminoácidos y vitaminas. En cuanto al efecto de diferentes dosis de radiación sobre la multiplicación de los callos, no se encontraron diferencias significativas entre las dosis utilizadas, sin embargo, 50 y 75 Gy tuvieron los valores promedio más bajos. En la etapa de regeneración el porcentaje se incrementó significativamente en el tratamiento con 30 Gy, un segundo grupo de respuesta se formó con el control y las dosis 10 y 20 Gy; mientras que 50 y 75 Gy presentaron los porcentajes de regeneración más bajos. Teniendo en cuenta la radiosensibilidad de los callos embriogénicos y algunos aspectos del desarrollo, se seleccionó 40 Gy como dosis adecuada para la inducción de variabilidad genética en callos embriogénicos en *H. psittacorum*

Palabras clave: callos embriogénicos, in vitro, radiomutagénesis, sensibilidad.

Abstract

The purpose of this study was the standardization of a methodology of mutation's induction and regeneration of somaclones from an embryogenic callus population of *Heliconia psittacorum*. In this ornamental species, of two of kind explants evaluated, the inflorescences buds did not show a positive response to embryo induction. Nevertheless, in the leaves base, we noticed the formation of embryogenic callus, similar in size and appearance in the three culture media evaluated. In the multiplication stage was found that in the basal medium MS supplemented with biotin and 2,4-D, was observed a more friable and consistence callus and will defined pro-embryonic stages. The embryos regeneration was better (60-70%) in the MS supplemented with amino acid and vitamins. Related to the effect of the different doses in the callus multiplication, it was not found significant differences among the different doses, however, 50 and 75 Gy had the lowest average values. In the regeneration stage, the percentage with 30 Gy increased significantly, a second group formed by the control, 10, and 20 Gy. While the 50 and 75 Gy doses showed the lowest regeneration percentage. Taking into account the embryogenic callus radio-sensibility and some developmental aspects, we selected 40 Gy as the appropriated doses for the genetic variability induction in embryogenic callus *H. psittacorum*.

Key words: embryogenic callus, in vitro, radiomutagenesis, sensibility.

INTRODUCCIÓN

La demanda actual de nuevas variedades de plantas en la mayoría de los cultivos, implica un reto para

los fitomejoradores en la búsqueda de métodos que incrementen la eficiencia y efectividad en la creación

Recibido: septiembre de 2004; aceptado para publicación: mayo de 2005.

¹ Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <aurrea@matematicas.udea.edu.co>.

² Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <sandramilena72@hotmail.com>.

de variabilidad. Muchos de los objetivos de la mejora, fundamentalmente resistencia a enfermedades y plagas, factores abióticos adversos y hábitos de crecimiento entre otros, pueden ser logrados por métodos biotecnológicos tales como la inducción de variación somaclonal (Brar y Jain, 1998), la mutagénesis in vitro (Ahloowalia y Maluszynsky, 2001) y la selección in vitro. Entre estos, la mutagénesis inducida in vitro tiene como ventaja especial, la posibilidad de incrementar las frecuencias de mutaciones génicas y puntuales (las más importantes en el mejoramiento) por medios físicos y químicos (Pérez, 1998). Por otro lado, las técnicas de cultivo in vitro pueden acortar los ciclos de mejoramiento y por lo tanto reducir los costos del desarrollo de un nuevo cultivar (Ibrahim et al., 1998).

El mejoramiento genético a partir de la mutagénesis inducida ha sido probado en cultivos tan importantes como trigo, arroz, cebada, algodón y judía, entre los propagados por semilla. De acuerdo con la base de datos de la FAO/IAEA, de las 465 mutantes liberadas entre las plantas propagadas vegetativamente la mayoría son plantas floriculturales y unas pocas frutales. Ejemplos de ellas tenemos crisantemo, alstroemeria, dahlia, rosa, begonia, clavel, *Streptocarpus* y azalea (Ahloowalia y Maluszynski, 2001).

Las plantas ornamentales son ideales para aplicar esta técnica ya que después del tratamiento mutagénico rasgos tan importantes como características de la flor y hábitos de crecimiento pueden ser fácilmente monitoreados (Schum y Preil, 1998).

Los países tropicales cuentan con gran diversidad de especies de plantas del género *Heliconia*, las cuales son actualmente catalogadas como flores exóticas en el mercado internacional. Sin embargo, algunas de estas especies presentan limitantes para ser incluidas en este mercado por características tales como el tamaño de la planta, del pedúnculo, peso de las inflorescencias, duración en florero y sensibilidad al transporte, entre otras.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de radiaciones gamma sobre la multiplicación y regeneración de callos embriogénicos de *H. psittacorum* y seleccionar la dosis óptima para inducir mutantes potenciales de interés económico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Inflorescencias de *H. psittacorum* var. Andrómeda en estado juvenil (sin abrir las brácteas), fueron obtenidas de plantaciones comerciales de especies del género *Heliconia* ubicados en el departamento de Antioquia. Las bases de hojas de vitroplantas requeridas para el estudio, fueron donadas por el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Desinfección del material. La desinfección de las inflorescencias se realizó de forma general, someténdolas inicialmente a un lavado con agua jabonosa seguida de un enjuague con agua corriente, luego se realizaron dos desinfecciones con hipoclorito de sodio al 2,5 y al 2% (5 y 2 min, respectivamente) y finalmente se enjuagaron con agua destilada abundante, previamente esterilizada. Las desinfecciones con hipoclorito se llevaron a cabo en cámara de flujo laminar, bajo condiciones asépticas.

1. Inducción y multiplicación de embriones de *H. psittacorum*

1.1. *Inducción.* Para la inducción de callos embriogénicos se evaluaron dos tipos de explante, las inflorescencias (yemas apicales y las dos laterales más próximas al ápice) y bases de hojas de vitroplantas. Este último explante se obtuvo a partir de vitroplantas en fase de multiplicación, se realizaron cortes laterales hasta ubicar el sitio de unión del rizoma y las hojas para realizar un corte 0,5 cm inmediatamente por encima de este punto de unión y 0,2 cm por debajo.

Los medios de cultivo evaluados fueron los descritos por Natan et al. (1993), **medio 1**; Valencia y Atehortúa (1999), **medio 2**; y un tercer medio de cultivo, **medio 3**, resultado de ensayos preliminares, compuesto por las sales y vitaminas MS suplementado con pantotenato de calcio 2 mg/l, biotina 1 mg/l, 2,4-D 4 mg/l, L-glutamina 50 mg/l, sacarosa 40 g/l, fitagel 1,8 g/l. El pH fue ajustado a 5,7.

Ambos tipos de explante se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad constante, a una temperatura de 24 ± 2 °C. Las variables respuesta analizadas en este ensayo fueron: necrosis (muerte del tejido), tejido

vivo sin crecimiento, porcentajes de callo embriogénico formado y de callo no embriogénico.

1.2. *Multiplicación.* A partir de los resultados obtenidos en la inducción de callos embriogénicos, se evaluó el proceso de multiplicación, para lo cual los callos formados se trasplantaron a los mismos medios de inducción. Se determinó el efecto de estos medios en la multiplicación a partir de las variables: porcentaje de callos en crecimiento, color y textura de los callos.

2. Regeneración de plantas

Para la etapa de regeneración se estudiaron dos medios de cultivo. El medio 1 compuesto por sales MS a la mitad de su concentración, las vitaminas MS completas, biotina 1 mg/l, sacarosa 30 g/l, fitagel 1,8 g/l y a un pH de 5,7. El medio 2 contenía las sales y vitaminas MS, suplementado con biotina 2 mg/l, pantotenato de calcio 2 mg/l, L-glutamina 50 mg/l, adenina 3 mg/l, AIA 1 mg/l, sacarosa 30 g/l, fitagel 1,8 g/l y pH 5,7.

Los callos se mantuvieron bajo condiciones de luz y a una temperatura de 24 ± 2 °C. Se registró cada 15 días el porcentaje de callos con embriones en estadios avanzados de regeneración (coleoptilar y planta) y el tiempo de inicio de este proceso.

3. Efecto de la dosis de radiación sobre la multiplicación y regeneración de los callos embriogénicos

Callos en estado proembriogénico con dos pases de multiplicación se sometieron a diferentes dosis de rayos gamma en una fuente de cobalto 60, se evaluaron dosis de 0, 10, 20, 30, 50 y 75 Gy. El equipo para realizar las exposiciones fue facilitado por el Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín (Antioquia), Colombia.

Se irradiaron 25 callos por dosis, para un total de 175 callos. Inmediatamente después de la aplicación del tratamiento mutagénico, los callos fueron transferidos a medio fresco de multiplicación, realizando dos pases más cada 30 días, antes de ser transferidos a medio de regeneración.

Para este experimento se evaluó en cada dosis de radiación el porcentaje de multiplicación de cada

uno de los callos y el porcentaje de callos en fase de regeneración. A partir de estos datos, se seleccionó la dosis de radiación que disminuyó la multiplicación de los callos embriogénicos y los porcentajes de regeneración hasta un 50% con respecto al control.

4. Cambios morfológicos observados.

En las plantas in vitro, después de dos meses de regeneradas a partir de callos irradiados con diferentes dosis, se identificaron los cambios morfológicos más comunes originados por radiomutaciones como: tamaño de la planta (altura y grosor), la forma y color de hojas y pseudotallo, la cantidad y longitud de las raíces formadas, tomando como control, vitroplantas provenientes de los embriones no irradiados.

5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple. Para determinar grupos homogéneos y significativamente diferentes a un nivel de 5,0%, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan o Dunnett's C, esta última cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos.

Para determinar la dosis letal 50 se trazó una regresión lineal con los datos obtenidos en el experimento 3. El procesamiento de los datos se realizó con los paquetes estadísticos SPSS/PC versión 9.00 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Inducción y multiplicación de embriones de *H. psittacorum*

1.1. *Inducción.* En esta etapa, las yemas apicales y laterales de inflorescencia empleadas como explante, se oscurecieron rápidamente (una semana) en los tres medios de cultivo evaluados, la mayoría de ellas se mantuvieron sin cambios evidentes en su morfología, solo unas pocas mostraron pequeñas zonas con callos en formación a los 30 días de cultivo aproximadamente. Sin embargo, este callo no continuó su proliferación y se necrosó después de este tiempo, aun en medio fresco. Las bases de hojas, por el contrario, respondieron a la formación de callo 20 días después

de la siembra, presentando una apariencia nodular, proceso que estuvo acompañado en la mayoría de los casos de la fenolización del explante inicial, con el 100% en el medio 1, 70% en el medio de cultivo 2 y 50% en el medio de cultivo 3. En este último, el explante se conservó verde por más tiempo. Pasados 30 días aproximadamente, se observó la formación de callos embriogénicos en la superficie del explante, en cantidad y apariencia muy similar en los tres medios de cultivo evaluados.

Por lo tanto elegimos las bases de hojas como el tejido más adecuado para la inducción de callo embriogénico en *Heliconia psittacorum* comparado con las yemas de inflorescencias.

Aunque las yemas de inflorescencia han sido el explante más utilizado en especies de *Heliconia* tanto para la regeneración directa de plantas (Atehortúa et al., 1999) como para la inducción de embriones somáticos (Valencia y Atehortúa, 1999), en este trabajo no se logró respuesta a la formación de callo embriogénico. Probablemente en esta especie, el explante utilizado no logró responder a la formación de embriones con las combinaciones hormonales evaluadas y elementos nutritivos. El genotipo es un factor importante para tener en cuenta en la regeneración de plantas.

El empleo de bases de hojas para inducir embriogénesis ha sido reportado con éxito en diferentes especies

de *Musa* (Gómez et al., 1999; Novak et al., 1989). En *H. psittacorum*, Natan et al. (1993) lograron mejorar la inducción de embriones somáticos sobre este tipo de explante, con el empleo de secciones transversales delgadas de las bases de hojas.

1.2. *Multiplicación de callos embriogénicos.* Para la multiplicación de los callos, encontramos en los tres medios evaluados resultados muy similares en cuanto a los porcentajes de multiplicación de callo, sin embargo se presentaron diferencias en cuanto al color, consistencia y apariencia de los callos. En el medio 2, el callo presentó una coloración amarillo crema y una consistencia blanda que dificultó la transferencia a medio fresco y un retraso en el proceso posterior de regeneración. En el medio 1, por el contrario, los callos formados mantuvieron una consistencia más definida, lo que permitió el mejor manejo, sin embargo, los callos se tornaron de color marrón, además del color oscuro que tomó el medio de cultivo pocos días después de la transferencia. En estos dos medios, los callos se multiplicaron y presentaron estados proembriogénicos y embriogénicos poco definidos. En el medio 3 se observó una consistencia más friable de los callos y el medio de cultivo mantuvo su color original, la apariencia de la masa embriogénica en multiplicación fue de un color blanco, con estados proembrionarios bien definidos (proembriones próximos al estado globular) (figura 1). Con base en estos resultados se seleccionó el medio 3 para la multiplicación de los callos inducidos.

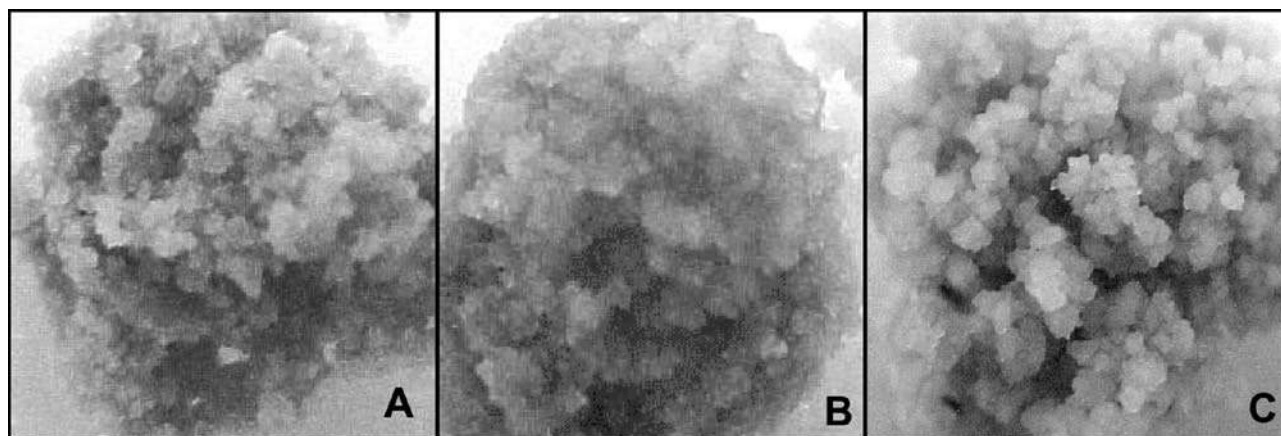


Figura 1. Características de los callos en los diferentes medios de multiplicación evaluados. A. En el medio 1. B. En el medio 2. C. En el medio 3

El 2,4-D ha sido el regulador de crecimiento más utilizado en la inducción de embriones somáticos, pero es bien conocido que la concentración para utilizar, la etapa del proceso embriogénico y las necesidades endógenas del explante son factores determinantes de la respuesta de una especie vegetal en particular (Permingeat y Morre, 2001). Así una concentración que favorece en la etapa de inducción de los embriones puede tener efecto diferente para la multiplicación (Gómez et al., 1999), lo que podría explicar los resultados obtenidos en el medio 1. Por otro lado, el efecto de esta fitohormona no debe ser considerado independiente de la concentración de otras auxinas y compuestos adicionados al medio de cultivo como el agua de coco y caseína hidrolizada (Natan et al., 1993), ya que en algunos casos estas combinaciones tienen efectos positivos en el proceso de inducción, aunque en otras investigaciones aún no es claro este efecto. Para mantener la adecuada embriogénesis repetitiva en esta especie se requirió nivel de esta auxina a 4 mg/l.

2. Regeneración de plantas

En esta etapa del proceso embriogénico, la mejor respuesta se presentó en el medio 2, en el cual a los 80 días se obtuvo un porcentaje de regeneración mayor (70%) que en el medio 1 (20%). El medio 2 conteniendo además de la auxina AIA, los aminoácidos adenina y L-glutamina, y las vitaminas, biotina (H) y pantotenato de calcio (B5) permitió mejor respuesta al desarrollo del embrión.

En general, en la etapa de regeneración no es necesario el uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, sin embargo, en algunas especies se recomienda el uso de citoquininas y ácido absísico (ABA) (Pérez, 1998) u otras fitohormonas al inicio del proceso (Mandal et al., 2000). Gómez et al. (2000) reportaron como requerimiento para la regeneración de embriones somáticos en el género *Musa* el aminoácido prolina. Permingeat y Morre (2001), lograron mejorar la frecuencia de regeneración de callos embriogénicos de maíz adicionando ácido giberélico (GA₃) al medio de cultivo.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la etapa de maduración es indispensable para muchas especies ya

que en esta fase se acumulan proteínas y demás sustancias de reserva determinantes de la germinación y desarrollo de los embriones somáticos, posiblemente los embriones de *H. psittacorum* al no pasar por etapa de maduración requieren de compuestos adicionales al medio MS para incrementar el porcentaje de germinación y conversión de los embriones.

3. Efecto de las diferentes dosis de radiación

En esta especie, el efecto de las diferentes dosis de radiación sobre la multiplicación de los callos embriogénicos irradiados mostró un comportamiento muy similar con respecto al control 30 días después de aplicado el tratamiento. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes dosis, 50 y 75 Gy tuvieron mayor efecto sobre el porcentaje de multiplicación de callo (tabla 1). La regresión lineal trazada con los porcentajes de multiplicación contra las dosis aplicadas no nos permitió seleccionar en esta etapa una dosis adecuada.

En la etapa de regeneración, el porcentaje se incrementó significativamente en el tratamiento con 30 Gy. Un segundo grupo de respuesta se formó con el control y las dosis 10 y 20 Gy; 50 y 75 Gy, presentaron los porcentajes de regeneración más bajos (tabla 2). En cuanto al número total de plantas obtenidas, es importante resaltar que los somaclones provenientes de los callos embriogénicos irradiados con 30 Gy, alcanzaron el mayor número (40) y mostraron un desarrollo más rápido a nivel in vitro, al comparar con la dosis 10 Gy (11 plantas) y control (8 plantas). En 50 Gy se obtuvieron solo 4 plantas y de 75 Gy no se lograron desarrollar hasta planta los embriones que

Tabla 1. Efecto de la dosis de radiación sobre la multiplicación de callos embriogénicos de *H. psittacorum*

Dosis de radiación. Gy	% de multiplicación de callos. Promedio	Error estándar
0	45,6 a	1,2
10	41,4 ab	4,0
20	44,3 a	2,3
30	52,1 a	13,2
50	38,0 ab	7,4
75	31,4 ab	13,0

Valores con letras no comunes en la misma columna difieren para $p \leq 0,05$ por el test de Duncan.

Tabla 2. Efecto de la dosis de radiación sobre la regeneración de callos embriogénicos de *H. psittacorum*

Dosis de radiación. Gy	% de regeneración de callos. Promedio	Número de plantas regeneradas
0	60,0 bc	8
10	71,6 ab	11
20	53,3 cd	8
30	80,8 a	40
50	13,0 ef	4
75	6,0 f	0

Valores con letras no comunes en la misma columna difieren para $p \leq 0,05$ por el test de Duncan.

iniciaron el proceso de regeneración. La regresión lineal de esta etapa muestra una disminución en los porcentajes de regeneración por debajo del 50% con dosis iguales y superiores a 50 Gy.

4. Cambios morfológicos observados

Los principales cambios morfológicos observados en las vitroplantas provenientes de los diferentes tratamientos fueron altura de la planta, y longitud y cantidad de raíces. La forma y color de hojas y pseudotallo no tuvieron cambios apreciables en estado de vitroplanta. La tabla 3 muestra el registro de estas observaciones.

A partir de los resultados obtenidos en los numerales 3 y 4, se seleccionó 40 Gy como la dosis adecuada para inducir variabilidad genética en *H. psittacorum*.

Los resultados obtenidos en esta investigación corroboran lo reportado en otros trabajos, donde las bajas dosis de rayos gamma estimulan cambios físicos y bioquímicos (Berezina y Kaushanskii, 1989), que se ven reflejados en procesos fisiológicos como la regeneración de plantas, acelerándola (Chakravarty y Sen, 2001) e incrementando la formación de sustancias de reserva (Al-Safadi et al., 2000). Por el contrario, altas dosis generalmente tienen efecto negativo sobre la multiplicación y regeneración de plantas, así como en la altura y desarrollo de estas ocasionando pérdida de la capacidad regenerativa o la malformación de las plantas (Chakravarty y Sen, 2001).

Un tratamiento mutagénico óptimo implica tanto una alta frecuencia de mutaciones (efectividad) como un rango favorable de mutaciones deseables (eficiencia). Para considerar la sensibilidad a las radiaciones se debe tener en cuenta cuáles factores biológicos, ambientales y químicos alteran la respuesta de las células de plantas superiores a la radiación en su efectividad y eficiencia y que además dependen de las propiedades específicas y condiciones del tratamiento, del tipo de radiación y del sistema biológico empleado. En células y tejidos tratados in vitro deben considerarse otros factores como rango de dosis, temperatura, homogeneidad de la población, período de restablecimiento después del tratamiento mutagénico, entre otros. Por lo tanto, cada genotipo debe ser evaluado para un tratamiento óptimo dentro de un rango de condiciones.

La selección de la dosis óptima de radiación puede hacerse empíricamente, como regla general la dosis

Tabla 3. Efecto de las diferentes dosis de radiación sobre la altura de las plantas y la longitud de las raíces en plantas regeneradas a partir de callos

Dosis (Gy) / Variables	0	10	20	30	50
Altura de la planta (cm).	Promedio: 1,75. Rango: 0,5-2.	Promedio: 1,70. Rango: 0,5-2,5.	Promedio: 1,90. Rango: 0,5-2,5.	Promedio: 3,8. Rango: 1,5-7,5.	Promedio: 0,75. Rango: 0,2 y 0,8.
Longitud de las raíces (cm).	Promedio: 1,9. Baja cantidad. No se observan pelos radiculares.	Promedio: 2,06. Rango: 0,3-4,5. Baja cantidad y presencia de pelos radiculares.	Promedio: 2,0. En poca cantidad y presencia de pelos radiculares.	Promedio: 3,4. Rango: 1,5-7. Abundantes y gran cantidad de pelos radiculares.	Muy pocas raíces con una longitud promedio de 1,2 cm.

del mutágeno debe llevar a la supervivencia del 40-60% del material tratado con respecto al no tratado, aunque el concepto de dosis útil depende ampliamente de los objetivos del mejoramiento (Pérez, 1998; Urrea, 2000).

Un método rápido y simple para determinar el efecto del tratamiento mutagénico es la medida de la altura y la longitud de las raíces. La altura de la planta ha sido utilizada como indicador de sensibilidad a las radiaciones (Plana, 1996). Para cultivos propagados vegetativamente se considera una dosis que provoque

una reducción del 30% como suficiente para lograr gran cantidad de mutantes.

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS, el BID y el OCyT por la financiación del proyecto macro del cual hace parte este trabajo; al Departamento de Radiología del Hospital Universitario San Vicente Paúl, Medellín (Antioquia) y al Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia), Colombia.

REFERENCIAS

- Anónimo.** 2000. Methods of induction of mutation, a training manual. Joint FAO/IAE Program. IAEA Laboratories-SEIBERSDORF, Austria. Plant Breeding Unit.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M.** 2001. Induced mutations: a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118:167-173.
- Al-Safadi B, Ayyoubi Z, Jawdat D.** 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 61:183-187.
- Atehortúa L, Urrea AI, Gil U, Mora B, Valencia C, Corrales M, Carmona A, Vallejo A.** 1999. *Heliconia* tissue culture. *Heliconia Society International Bulletin*, 9(4):16.
- Berezina NM, Kaushanskii DA.** 1989. *Presowing irradiation of plant seeds*. Oxonian Press PVT. Ltd., New Delhi.
- Brar DS, Jain SM.** 1998. Somaclonal variation: mechanism and application in crop improvement. *En: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Kluwer Academic Publishers, Great Britain. pp. 15-37.
- Chakravarty B, Sen S.** 2001. Enhancement of regeneration potential and variability by gamma irradiation in cultured cells of *Scilla indica*. *Biologia Plantarum*, 44(2):189-193.
- Gómez KR, Gerth A, García RL, Freyre M, Pérez B, Herrera I.** 1999. Obtención de callos y regeneración de plantas en diferentes clones de plátano y banano (*Musa sp.*). *CORBANA*, 25(52):143-154.
- Gómez R, Barranco LA, Gilliard T, Reyes M.** 2000. Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). *Infomusa*, 9(1):12-16.
- Ibrahim R, Mondelaers W, Debergh PC.** 1998. Effects of X-irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Rosa hybrida*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54:37-44.
- Mandal A, Chakrabarty D, Datta SK.** 2000. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of *Chrysanthemum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 60:33-38.
- Nathan JM, Kumar PP, Chong-Jin G.** 1993. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L. f. *Plant Science*, 90:63-71.
- Novak FJ, Afza R, Duren MV, Perea-Dallos M, Comger BV, Tang X.** 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa spp.*). *Biotechnology*, 7:154-159.
- Pérez J.** 1998. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Ediciones Geo. Villa Clara, Cuba.
- Permingeat H, Morre J.** 2001. Optimización de la regeneración de plantas de maíz (*Zea mays*) por embriogénesis somática. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR* (Rosario, Argentina), 1(1):360-382.
- Plana D.** 1996. Evaluación de la radiosensibilidad de tres variedades de tomate. Tesis de diploma. ISAAC, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.
- Schum A, Preil W.** 1998. Induced mutations in ornamental plants. *En: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Kluwer Academic Publishers, Great Britain. pp. 333-366.
- Urrea AI.** 2000. Efecto de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y sus metabolitos en la selección de somaclones de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Diacol Capiro obtenidos por mutagénesis *in vitro* y variación somaclonal. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Valencia C, Atehortúa L.** 1999. Somatic embryogenesis in *Heliconia stricta* Huber. *Heliconia Society International Bulletin*, 9(4):14.

